

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19194

研究課題名(和文)武装型第三世代がん治療用HSV-1と免疫療法の併用効果および安全性の検討

研究課題名(英文)Evaluation of anti-tumor effects and safety in the therapy of the third generation armed oncolytic HSV-1 with immunotherapy

研究代表者

内橋 俊大 (UCHIHASHI, TOSHIHIRO)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60757839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HSV-1に対する感受性が強い A/Jマウスを用いて野生型 HSV-1であるstrainFと比較し、マウス舌への投与における安全性を検討した。strainFを  $1 \times 10^7$  pfu 投与したところ、全てのマウスが体動低下体重減少し、12日以内に死亡したのに対し、T-01(control)、武装型のT-B7-1、T-mfIL12は  $1 \times 10^7$  pfu 投与しても体重減少、体動低下なく60日生存した。さらにこれらのT-B7-1はマウス口腔癌モデルで抗CTLA-4抗体を併用すると抗癌作用が著しく増強し、武装型第三世代がん治療用HSV-1は非常に強力かつ安全な口腔癌治療薬となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のベースとなるウイルスであるG47 は第三世代のがん治療用HSV-1であり、膠芽腫において製剤化間近であり、その安全で強力な抗癌作用が期待されている。そこにIL-12やB7-1といった免疫賦活化因子を発現するウイルスを用いた本研究では、G47 以上の抗癌作用が期待されるが、舌癌頸部リンパ節モデルにおいて、現在臨床現場で2nd lineの治療法となっている免疫チェックポイント阻害剤モデルを用いた際の抗癌作用の増強は目覚ましく、安全性試験の結果は口腔癌への応用に向けて非常に重要であると考えられる。免疫療法との相乗効果は、特にリンパ節転移の抑制の点において画期的なものになり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：In the safety test, HSV-1-sensitive A/J mice injected with T-01, T-mfIL-12 and T-B7-1 into their tongues ( $1.0 \times 10^7$  pfu per mouse) survived 60 days, although those injected with wild-type HSV-1 strain F ( $1.0 \times 10^7$  pfu) all died within 12days. Furthermore, A/J mice injected with T-01, T-mfIL-12 and T-B7-1 into their tongues ( $1.0 \times 10^7$  pfu per mouse) survived 60 days without loss of weight or any behavioral effects in contrast to those injected with wild-type HSV-1 strain F ( $1.0 \times 10^7$  pfu). Moreover, armed oncolytic virus such as mouse B7-1 or mouse IL-12 is promising and safe in mouse tongue cancer model, especially in case with immune checkpoint inhibitor.

研究分野：口腔癌の遺伝子治療

キーワード：ウイルス療法 口腔癌 マウス舌癌モデル 頸部リンパ節転移 免疫療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は全癌の約2%程度を占めており、手術を中心とした集学的治療が行われているが、進行癌の制御率は未だ不十分であり、治療後 QOL の著しい低下をもたらすため、低侵襲かつ合併症が少なく強力な治療効果を持つ新規治療法の出現が切望されている。本研究で用いる世界ではじめて東京大学医科学研究所藤堂らによって開発された G47Δ は、癌細胞でのみ高いウイルス複製能を示し、同時に強力な抗腫瘍免疫を惹起することができ、安全性を維持しながら抗腫瘍効果が格段に向上した。現在、この G47Δ は膠芽腫に対して医師主導治験が行われており、ごく近い将来の製剤化が現実味を帯びている。すでに口腔癌を中心とした固形癌に対して前臨床試験が行われ、高い抗腫瘍効果が得られることがこれまでの研究で明らかになった。さらに、同時にヒトへの応用を考慮し安全性試験を HSV-1 に感受性の強い A/J マウスを用いて施行したところ、HSV-1 野生株の舌への投与では  $1 \times 10^6$  pfu の投与にて全てのマウスが12日以内に死亡したのに対して、G47Δ はその10倍量でも前例生存し、また体内分布試験でも舌以外では主要臓器においてウイルス DNA の検出はなく、行動実験においても軽度の異変を生じることもなく、体重も増加し続けたことより、G47Δ は舌癌モデルに用いるにあたり極めて安全であることが示唆された。

### 2. 研究の目的

G47Δ と同様の機能を有するウイルスとして各種遺伝子を組み込むことが可能なシステム (T-BAC システム) により作成開発されたコントロールウイルスである T-01 に、免疫刺激因子であるマウス可溶性 B7-1 およびマウス IL-12 を発現させた T-B7-1、T-mfIL-12 を用いてマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルで抗癌作用を検討する。この T-mfIL-12 および T 細胞活性の共刺激因子である可溶性 B7-1 を発現する T-B7-1 を用いることで、さらに高い抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え本研究で近年癌治療において大きな着目を浴びている、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体などとの併用により、これまでよりもさらに強力な抗腫瘍効果が得られるかを検討する。このことはウイルス療法とすでに癌治療の一翼を担っている免疫療法との相乗効果を図る画期的なものになると思われる。さらには、これらのウイルスの安全性試験を G47Δ の際と同様の方法で行うことで、臨床応用の際に最も重要な安全性の確保を担保できるとと思われる。

### 3. 研究の方法

KLN205-MUC1 モデル (ヒトの口腔癌転移様式と同じく舌への投与で、頸部リンパ節転移を来し、その後肺転移を惹起し死に至るモデル) においてがん治療用 HSV-1 の術前投与は口腔癌に頻発する後発リンパ節転移を抑制し得ることが示されており、その効果は可溶性 B7-1 や IL-12 などの免疫賦活化因子発現型ウイルスを用いるとコントロールウイルスの T-01 より生存延長効果があり、有意差をもってリンパ節転移巣の大きさの抑制効果があり、リンパ節内の腫瘍細胞数においても同様であった。この系を用いて、近年癌治療の実臨床でも用いられている免疫療法との併用を考慮し、マウス抗 CTLA-4 抗体と T-B7-1 の併用にて T-01 との併用より抗腫瘍効果が増強するかを、マウス生存期間、リンパ節転移巣の大きさ、また KLN205-MUC1 皮下腫瘍モデル (リンパ節よりマクロなモデル) で検討する。同様の方法にて、抗 PD-1 抗体と T-mfIL-12 との併用効果を、T-01 との併用効果との差を検討する。すでにそれぞれ抗体で一定の抗腫瘍効果をこのマウス系で示すことは明らかになっており、相乗効果があることがわかればウイルス療法の実現のその先に免疫療法との併用により、さらなる強力な抗癌作用 (転移部位も含む) をもつ治療法となり得るとと思われる。それに先立ち、まず現在未解明なウイルスが流入した後の抗腫瘍免疫の増強のメカニズムを探るため、KLN205-MUC1 皮下腫瘍マウスを作成し、KLN205-MUC1 舌癌モデルにおけるそれぞれのウイルス投与後 7 日目の頸部リンパ節からリンパ球を抽出し、皮下腫瘍へ投与し、それぞれのリンパ球が実際に抗腫瘍免疫がどの程度働くかを *in vivo* で検討する。同時に、G47Δ の安全性試験と同様の方法で、5 終齢の ♀ A/J マウスを用いて、野生型 HSV-1 である strain F をコントロールとし、 $1 \times 10^7$  pfu のウイルスを舌へ投与する。先行研究において、strain F は舌内で感染が拡大し摂食障害に全て死亡する。T-01、T-mfIL-12、T-B7-1 においては  $1 \times 10^6$  pfu、 $1 \times 10^7$  pfu のウイルスを舌へ投与し、生存期間を見る。この間、毎日行動観察を行い、点数化し評価を行う。また、同様の系で strain F 投与マウスが死亡し始める時期にマウスを sacrifice し、他のウイルス投与群のものと共に舌の HSV-1 免疫染色、H-E を行い、組織学的有害性の検討を行う

### 4. 研究成果

T-B7-1 と抗 CTLA4 抗体の併用により、KLN205-MUC1 舌癌モデルにおいて、著しい抗腫瘍効果の増強を認め (T-01 と抗 CTLA4 抗体の併用でも従来の T-01 単独より有意な転移抑制効果、生存延長効果を認めたと) T-01 と抗 CTLA4 抗体の併用よりさらに生存延長させる傾向にあった。また、皮下腫瘍モデルにおいても同様にこれまでの T-01 単独での治療効果に加え、有意な腫瘍抑制効果を認めた。さらに、T-01、T-mfIL12 を舌癌頸部リンパ節モデルに投与すると、T-mfIL-

12 群の生存期間が延長する傾向にあり、転移頸部リンパ節の体積は有意に抑制された。次いで T-mfIL12 投与により賦活化された頸部リンパ節内の抗腫瘍免疫効果についてさらに検討するために、KLN205-MUC1 舌癌頸部リンパ節転移モデルにおいて舌腫瘍内へのウイルス投与 5 日後の頸部リンパ節を摘出し内部のリンパ球を抽出し、このリンパ球を皮下腫瘍モデルへ腫瘍内投与し腫瘍体積変化を観察することで抽出リンパ球の抗腫瘍免疫作用を検討したところ T-01 と比較し有意に腫瘍体積抑制効果を示した。以上から T-mfIL12 は T-01 と比較しより高い抗腫瘍効果を示すことが明らかになり、既存の治療法より効果的な治療法になり得ることが示唆された HSV-1 に対する感受性が強い A/J マウスを用いて野生型 HSV-1 である strain F と比較し、マウス舌への投与における安全性を検討した。Strain F を  $1 \times 10^7$  pfu 投与したところ、全てのマウスが体動低下体重減少し、12 日以内に死亡したのに対し、T-01 (control)、武装型の T-B7-1、T-mfIL-12 は  $1 \times 10^7$  pfu 投与しても体重減少、体動低下なく 60 日生存し、これら免疫賦活化型第三世代がん治療用 HSV-1 は舌への投与において極めて安全であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yabuno Yusuke, Uchihashi Toshihiro, Sasakura Towa, Shimizu Hiroyuki, Naito Yoko, Fukushima Kohshiro, Ota Kaori, Kogo Mikihiro, Nojima Hiroshi, Yabuta Norikazu	4. 巻 18
2. 論文標題 Clathrin heavy chain phosphorylated at T606 plays a role in proper cell division	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 1976 ~ 1994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15384101.2019.1637201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Katsutoshi, Usami Yu, Kohara Masaharu, Sato Sunao, Iwamoto Yuri, Murakami Shumei, Uchihashi Toshihiro, Oya Kaori, Fukuda Yasuo, Hori Yumiko, Morii Eiichi, Toyosawa Satoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Clear Cell Carcinoma of Palatal Minor Salivary Gland Harboring a Novel EWSR1-ATF1 Fusion Gene: Report of a Case and Review of the Literature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Head and Neck Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12105-020-01211-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Kazuma, Tanaka Susumu, Oya Kaori, Uchihashi Toshihiro, Yokota Yusuke, Seki Soju, Fujishita Yohei, Kogo Mikihiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Multiple canalicular adenomas arising in the buccal mucosa and upper lip: Case report and literature review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 525 ~ 528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2020.07.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Katsutoshi, Naniwa Kohei, Usami Yu, Kohara Masaharu, Uchihashi Toshihiro, Tanaka Susumu, Yamada Saori, Iwamoto Yuri, Murakami Shumei, Oya Kaori, Fukuda Yasuo, Hori Yumiko, Morii Eiichi, Toyosawa Satoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Primary Alveolar Soft Part Sarcoma of Cheek: Report of a Case and Review of the Literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Head and Neck Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12105-021-01324-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Saori, Ishimoto Shunsuke, Uchihashi Toshihiro, Lee Atsushi-Doksa, Yokota Yusuke, Cho Jung soo, Ishihama Kohji, Kogo Mikihiro, Tanaka Susumu	4. 巻 33
2. 論文標題 Atypical lipomatous tumor of the buccal mucosa: A case report and review of literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2020.09.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Toshihiro Uchihashi, Akinari Sugauchi, Kyoko Kurioka, Yasushi Ino, Mikihiro Kogo and Tomoki Todo.
2. 発表標題 A NEW THERAPEUTIC STRATEGY FOR ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA USING G47 , A THIRD GENERATION ONCOLYTIC HSV-1.
3. 学会等名 IAOMS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Kodama, Toshihiro Uchihashi, Susumu Tanaka, Mikihiro Kogo.
2. 発表標題 2.A case of Salivary Duct Carcinoma(SDC) arising at submandibular gland suspected as specific inflammation.
3. 学会等名 IAOMS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyoko Kurioka, Toshihiro Uchihashi, Akinari Sugauchi, Miwako Iwai, Mikihiro Kogo and Tomoki Todo.
2. 発表標題 5.Therapeutic efficacy of IL-12 expressing oncolytic HSV-1 with triple mutations for neck lymph node metastases in mouse tongue cancer models.
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Uchihashi, A. Sugauchi, K. Kurioka, M. Kogo and T. Todo.
2. 発表標題 9.A new minimally invasive approach for oral suamous cell carcinoma using G47 , a third generation oncolytic HSV-1.
3. 学会等名 India-Japan Multidisciplinary Symposium on Oral Oncology, Maxillofacial Trauma & Implantology ( 国際学会 )
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------