

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20592085

研究課題名 (和文) 増殖型 HSV-1 ウイルスベクターを用いた神経芽腫の新規治療法の開発研究

研究課題名 (英文) Establishment of a novel therapeutic approach for neuroblastoma using replication-competent HSV-1 virus vector

研究代表者

菱木 知郎 (HISHIKI TOMORO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：00375776

研究成果の概要 (和文)：近年、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) のウイルス下のみをウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変することによりがん細胞で選択的に複製する変異 HSV-1 の作製が可能となった。これによりがん特異的な殺細胞効果を得ることができ、新たな癌治療の手段として注目されている。今回ヒト神経芽腫モデルを用いて改変単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) である T-01 の抗腫瘍効果につき検討した。T-01 はヒト神経芽腫細胞株に対し強い殺細胞効果を示した。ヌードマウスに神経芽腫細胞株を移植した系での検討でも T-01 は有意に腫瘍増殖を抑制する効果を示した。従来抗がん剤との併用では相加・相乗的な効果はなくむしろ拮抗的な効果を示した。これらを受け、従来抗がん剤治療との併用ではなく、寛解維持など他の場面での臨床応用の可能性を模索していく予定である。

研究成果の概要 (英文)：The antitumor effect of genetically modified human herpes simplex virus-1 (T-01) was assessed in human neuroblastoma models *in vitro* and *in vivo*. The results showed that T-01 propagates within and potentially kills neuroblastoma cells with a multiplicity of infection of 0.01. 1×10^6 pfu was capable to show significant growth suppression in nude mice neuroblastoma xenografts. However, T-01 was antagonistic against the cytotoxic effect of cisplatin. Thus, co-use of T-01 and anticancer drugs may not be optimal for the therapeutic strategy for neuroblastomas. T-01 may most be effective when targeted for minimum residual diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：小児外科学

科研費の分科・細目：小児腫瘍学

キーワード：神経芽腫 腫瘍融解ウイルス ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫はわが国では白血病について多い小児がんであり、年間におおよそ 200 例前後の発症があるとされる。集学的治療の進歩にも関わらず、進行神経芽腫の治療成績はいまだ極めて不良である。元来神経芽腫は化学療法に対する感受性が高い腫瘍であるが、多くの腫瘍は治療中に薬剤耐性を獲得し再発・再増殖を来す。このため本腫瘍の治癒率向上のためには modality の異なる新たな治療戦略が必要とされている。近年、腫瘍融解ウイルス療法は、正常組織を障害することなく腫瘍細胞の中のみで選択的に増殖しうるウイルスベクターの開発により、効果的かつ安全な治療として着実に臨床応用に近づいてきた。現在我々は神経芽腫に対する腫瘍融解ウイルス療法の臨床応用を想定し研究を進めている。

(神経芽腫に対するシンドビスウイルスの抗腫瘍効果)

シンドビスウイルスはトガウイルス科アルファ属に属する RNA ウイルスである。これまでに遺伝子改変のない野生型シンドビスウイルス (SIN AR339 株) の神経芽腫に対する抗腫瘍効果について検討してきた。その結果 SIN AR339 株は神経芽腫に対し強い腫瘍融解効果をもつことが明らかにされた (未発表データ)。SIN AR339 は正常細胞にはほとんど毒性を持たないとされず、また非常に強い腫瘍選択的感染性をもつ (Unno et al. Clin Cancer Res 11, 4553-4560, 2005) など、腫瘍融解ウイルスとして望ましい条件をそろえている。しかし一方で RNA ウイルスであるため変異を起こしやすく、安定した抗腫瘍効果を求めるには詳細なメカニズム解明が必要であり、臨床応用に向け今後の検討課題である。

(腫瘍融解ウイルス療法としての単純ヘルペスウイルス)

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は、ヒトのあらゆる種類の細胞に感染して複製する能力を有し本来強い殺細胞作用を呈するが、ウイルス感染および癌細胞増殖の分子細胞機構に基づいてウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変することで、がん細胞で選択的に複製する変異 HSV-1 の作製が可能となり、腫瘍特異的な CPE を導くことができる。二重変異 HSV-1 の G207 は、再発悪性グリオーマ患者を対象に第 I 相臨床試験が 2000 年に終了し、脳腫瘍内投与の安全性が確認されている。さらに藤堂らは、G207 のゲノムに更に変異を加えた三重変異 HSV-1 の G47Δ やその改良型の T-01 を開発したところ、より高い腫瘍内複製能力と強い免疫細胞刺激作用が得られた (Todo et al. PNAS 98, 6346-6401, 2001; Fukuhara et al. Cancer Res, 65, 10663-10668, 2005)。また IL-12、IL-18 な

どの免疫刺激遺伝子を発現する複数の「武装」増殖型 HSV-1 は、より強力な抗腫瘍効果を示した (Fukuhara et al. Cancer Res, 65, 10663-10668, 2005.; Ino et al. Clin Cancer Res, 12, 643-653, 2006)。

(神経芽腫に対する HSV-1 の有効性を裏付ける知見)

藤堂らは上述の一連の HSV-1 ベクターの有効性を、マウス神経芽腫細胞株 Neuro2a を用いて検証してきた。A/J マウスに Neuro2a の皮下腫瘍を作成し腫瘍内に HSV-1 を注入すると、強い抗腫瘍効果が得られることが確認されている (Todo et al. PNAS 98, 6346-6401, 2001; Fukuhara et al. Cancer Res, 65, 10663-10668, 2005)。さらに、両大腿部に皮下腫瘍を作成しその一方のみに HSV-1 を腫瘍内投与すると、対側の腫瘍増殖も抑制されることから、HSV-1 は CPE により腫瘍を融解するのみならず、腫瘍の融解の結果腫瘍特異的な抗原呈示が増し、抗腫瘍免疫を誘導することが示された。この効果は HSV-1 第二世代 G207 よりも第三世代の G47Δ やその改良型 T-01 でより強くみられることがわかっている。

神経芽腫の一部に自然退縮がみられることはよく知られている。この現象は進行症例でもみられることが知られており、進行神経芽腫の腫瘍内には 増殖像とアポトーシス像が混在することは決してめずらしくない。このため神経芽腫の治療戦略として抗腫瘍免疫の賦活化が有効であることは以前より予想されていた。我々は以前、IL-2 や GM-CSF を遺伝子導入したマウス神経芽腫細胞株 C1300 を放射線で賦活化した腫瘍ワクチンをあらかじめ注射したマウスには、その後 C1300 の皮下腫瘍を作成することができないことを明らかにしている (Yoshida et al. Int J Oncol 13, 73-78, 1998)。

これらのことと、成人において安全性の確立された治療であることをあわせ、神経芽腫に対する HSV-1 を用いた腫瘍融解療法は次世代に臨床応用可能な新規治療戦略の有力な候補であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、代表的な小児期の悪性固形腫瘍である神経芽腫に対する増殖型遺伝子組換え HSV-1 の抗腫瘍効果を検討し、難治性神経芽腫に対する新規治療法としての可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) ヒト神経芽腫における HSV-1 の増殖能
神経芽腫細胞株 (SH-SY5Y) を 6-well plate に 5×10^5 細胞/well で撒き、に HSV-1 (T-01) を moi0.01 で感染させ 5%CO₂ 下に 34.5°C で 24 時間培養した。上清と細胞を回収し、

freeze & thaw および sonication にてウイルス液とし、ウイルス力価を測定した。力価の測定は Vero 細胞を用いておこなった。前日に 3.6×10^5 細胞/well にて 6 well plate に Vero 細胞をまき、これに上記ウイルス液を 1 時間感染させたのち 0.1% ヒト IgG 加メディウムを加え、5% CO₂ 下 34.5°C にて 3 日間培養し、プラーク数を計測しウイルス力価を得た。Vero 細胞におけるウイルス増殖と比較検討をおこなった。

2) HSV-1 のヒト神経芽腫細胞株の細胞形態と増殖に与える影響

ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y (MYCN 非増幅株), IMR32, CHP134 (以上 MYCN 増幅株), マウス神経芽腫細胞株 C1300, ヒト由来線維芽細胞を 1×10^3 /well で 96well plate に撒き、T-01 を moi 0.01 または 0.1 で感染させ、経時的に細胞形態の観察および生細胞数測定 (Cell Titer Glo) にておこなった。

3) HSV-1 と抗がん剤の併用による増殖抑制効果の検討

ヒト神経芽腫細胞株 IMR32, CHP134 (以上 MYCN 増幅株) を 1×10^3 /well で 96well plate に撒き、T-01 を moi 0.01 または 0.1 で感染させ、同時にシスプラチンを各種濃度で添加し、経時的に生細胞数測定 (Cell Titer Glo) にておこなった。

4) ヒト神経芽腫に対する HSV-1 の抗腫瘍効果
動物: BALB/c nu/nu マウス (6 週齢♂) を用い、神経芽腫 xenograft を作成し T-01 の抗腫瘍効果を観察した。神経芽腫細胞株 CHP134 を 1×10^7 をマトリゲル 0.3ml にて細胞浮遊液とし、体幹皮下に接種した。作成された腫瘍が径 6-9mm になった時点で T-01 1×10^6 pfu/20ul を腫瘍内投与し対照群 (PBS/1%FCS) と腫瘍容積を経時的に比較した。T-01 は投与 3 日後に 1 回再投与した。

4. 研究成果

1) ヒト神経芽腫における HSV-1 の増殖能

ヒト神経芽腫 SH-SY5Y と Vero 細胞につき、moi 0.01 で感染後 24 時間のウイルス力価を検討した。その結果、 7.5×10^4 pfu/ml (Vero 細胞 1.1×10^5 pfu) と、高いウイルス力価が示され、ヒト神経芽腫細胞内でのウイルス増殖が確認された。

2) HSV-1 のヒト神経芽腫細胞株の細胞形態と増殖に与える影響

HSV-1 はヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y (MYCN 非増幅株) に対し、moi 0.01 の低濃度の感染で強い CPE を示した (図 1、2B)。マウス C1300 神経芽腫細胞株では moi 0.1 で増殖抑制はみられたが全体の細胞数は増加し続けた (図 2A)。同様に MYCN 増幅ヒト神経芽腫細胞株 IMR32、CHP134 において解析をおこなった。MYCN 遺伝子の増幅は神経芽腫の重要な予後不良因子であり、臨床上治療抵抗性を呈する

腫瘍に高頻度に見られる。IMR32 と CHP134 は day 1 までは増殖抑制効果のみに留まったが、day 2 から顕著な CPE が観察され、非増幅株である SH-SY5Y と同様に moi 0.01 で強い T-01 感受性を持つことが示唆された (図 3)。

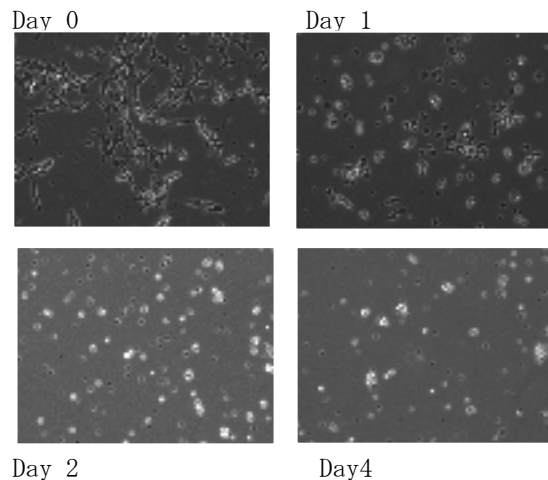


図 1 HSV-1 ベクター T-01 で感染させた SH-SY5Y における CPE

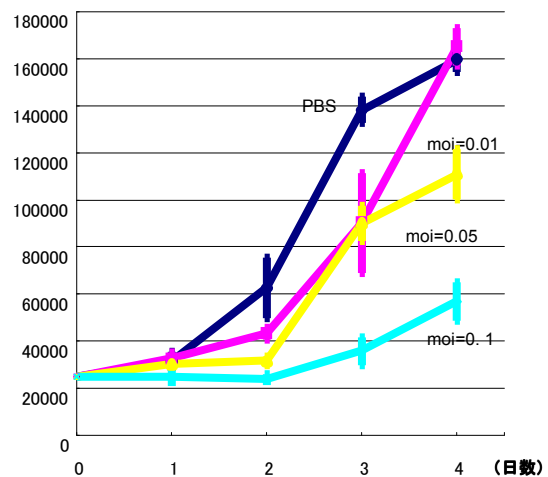


図 2A マウス神経芽腫 C1300 における T-01 感染後の生細胞数の変化 (Cell Titer Glo)

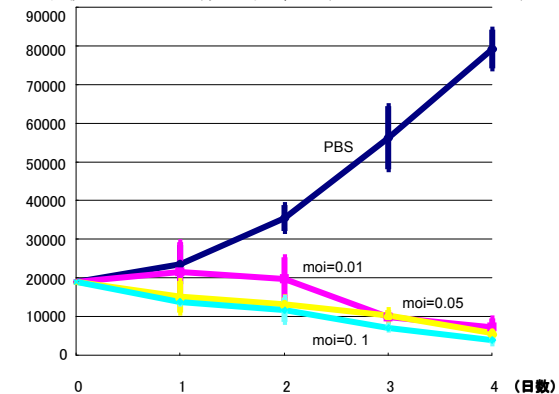


図 2B ヒト神経芽腫 SH-SY5Y T-01 感染後の生細胞数の変化 (Cell Titer Glo)

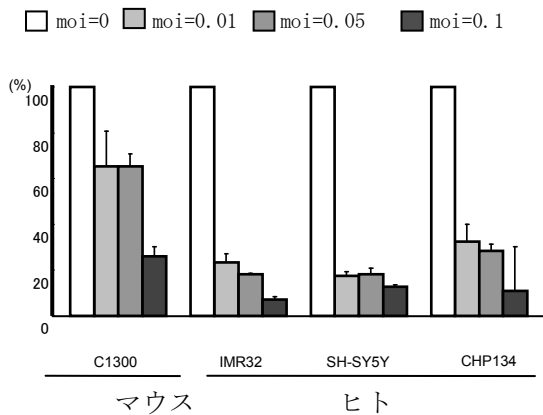


図3 T-01 感染後 72 時間の生細胞率 (未感染細胞を 100%とする)

3) HSV-1 と抗がん剤の併用による増殖抑制効果の検討

神経芽腫の標準的治療の根幹は手術・化学療法および放射線療法よりなる。特に抗がん剤に対する感受性の高い本腫瘍において、抗がん剤との相加効果・相乗効果によって治療強度を高めたり、抗がん剤用量の低減を可能にしたりする様な治療薬の探索が行われている。

今回、シスプラチンと T-01 を同時に添加下場癌の生細胞数の変化を検討した (図 4)。CHP134、IMR32 株ともに、シスプラチン非存在下では T-01 の moi 依存性に細胞増殖抑制効果がみられた。シスプラチンも同様に T-01 非存在下で用量依存性の細胞死を誘導した。しかし、予想に反して T-01 とシスプラチンを併用すると、T-01 が moi 依存性にシスプラチンの細胞死誘導に拮抗する現象がみられた。この拮抗は CHP134、IMR32 ともにみられた。

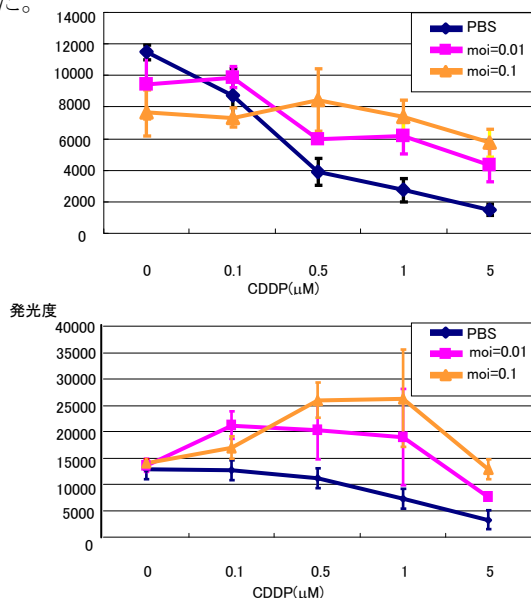


図4 シスプラチンと T-01 の併用による生細胞数の変化

4) ヒト神経芽腫に対する HSV-1 の抗腫瘍効果動物

BALB/c nu/nu の体幹皮下に CHP134 の xenograft を作成し、T-01 を腫瘍内投与した (治療群)。対照群には PBS/1%FCS を投与した。各群 7 匹のマウスについて検討し、腫瘍体積を経時的に測定した。治療群は対照群に比し有意に腫瘍増殖が抑制された (図 5)。

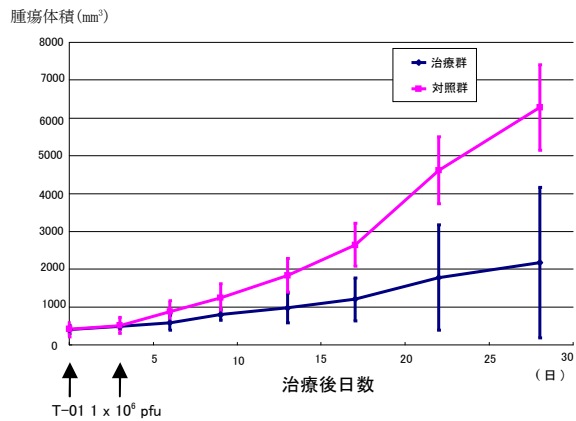


図5 スードマウス移植腫瘍片 (CHP134) に対する T-01 の抗腫瘍効果

抗腫瘍効果は治療時の腫瘍径が小さいものでは顕著にみられたが、ある一定の体積を超えた腫瘍に対する効果はかぎられていた。一方この系は免疫不全マウスを用いており、抗腫瘍免疫による腫瘍の縮小効果は期待できない。したがって、本系ではウイルスによる直接の CPE と by-stand effect による持続的な抗腫瘍効果のみにより腫瘍増殖が抑制されていることが示されている。マウス神経芽腫を用いた過去の検討により HSV-1 による CPE は抗腫瘍免疫を賦活化することが示されており、実際の臨床応用の場においてはより優れた抗腫瘍効果が期待できる。

まとめ

今回の結果から T-01 はヒト神経芽腫に対して強い CPE を示すことが確認された。この効果は予後不良因子である MYCN 遺伝子の増幅を持つ神経芽腫細胞株でも顕著にみられ、マウス生体内でも同様の効果を認めた。一方で T-01 は従来の抗がん剤との併用の際にはむしろ拮抗的に作用することが示唆される結果が得られた。また、既存の大きな腫瘍に対する効果は限られている可能性が示唆された。

これらのことから、T-01 は抗がん剤治療との併用ではなく、従来の抗がん剤治療終了後の寛解維持に有効である可能性がある。今後さ

らにヒト神経芽腫における解析をすすめ、臨床応用の可能性を模索していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Hishiki T, Saito T, Sato Y, Mitsunaga T, Terui E, Matsuura G, Saito E, Shibata R, Mise N, Yokoyama Y, Yoshida H. Src kinase family inhibitor PP2 induces aggregation and detachment of neuroblastoma cells and inhibits cell growth in a PI3 kinase/Akt pathway-independent manner. *Pediatr Surg Int.* 27: 225-230, 2011. 査読あり
- ② 藤堂具紀, 稲生靖: 悪性脳腫瘍の遺伝子治療。 *BIO Clinica* 26 (4): 33-37, 2011. 査読なし
- ③ 稲生靖, 藤堂具紀: 悪性神経膠腫に対するヘルペスウイルス療法。 *Clinical Neuroscience* 29 (2): 229-231, 2011. 査読なし
- ④ Ino Y, Todo T: Clinical development of a third-generation oncolytic HSV-1 (G47Δ) for malignant glioma. *Gene Therapy and Regulation* 5 (1): 101-111, 2010. 査読あり
- ⑤ Fukuhara H, Homma Y, Todo T. Oncolytic virus therapy for prostate cancer. *Int J Urol.* 17: 20-30, 2010. 査読あり
- ⑥ Hishiki T, Saito T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Nakagawara A, Kamiyo T, Nakamura Y, Matsunaga T, Yoshida H. Reevaluation of *trkA* expression as a biological marker of neuroblastoma by high sensitivity expression analysis—a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute. *J Pediatr Surg.* 45, 2293-2298, 2010. 査読あり
- ⑦ 稲生靖, 藤堂具紀: 悪性脳腫瘍のウイルス療法。 *Biotherapy* 24 (6): 443-447, 2010. 査読なし
- ⑧ 稲生靖, 藤堂具紀: 悪性脳腫瘍に対するウイルス療法。 *日本臨床* 68 (増刊号 10 新時代の脳腫瘍学-診断・治療の最前線): 473-477, 2010. 査読なし
- ⑨ 高橋雅道, 藤堂具紀: 神経膠腫の遺伝子治療。 *脳神経外科速報* 20 (7): 798-806, 2010. 査読なし
- ⑩ 稲生靖, 藤堂具紀: 悪性脳腫瘍に対するウイルス療法。 *感染・炎症・免疫* 40 (1): 81-83, 2010. 査読なし
- ⑪ 稲生靖, 藤堂具紀: 悪性脳腫瘍に対するウイルス療法。 *BRAIN and NERVE* 61 (7):

815-822, 2009. 査読なし

- ⑫ Todo T. "Armed" oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell Adh Migr.* 2:208-213, 2008. 査読あり
- ⑬ Todo T: Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. *Frontiers in Bioscience* 13: 2060-2064, 2008. 査読あり
- ⑭ 福原浩, 藤堂具紀: ウイルスによる癌治療。 *ゲノム医学* 8 (3): 173-181, 2008. 査読なし
- ⑮ 高橋雅道, 藤堂具紀: 脳腫瘍のウイルス療法。 *分子細胞治療* 7(2): 129-134, 2008. 査読なし

[学会発表] (計 2 件)

- ① Hishiki, T, Saito, T, Terui, K, Sato, Y, Takenouchi, A, Yahata, E, Ono, S, Nakagawara, A, Kamiyo, T, Nakamura, Y, Matsunaga, T, Yoshida, H. Re-evaluation of *trkA* expression as a biological marker of neuroblastoma by high sensitivity expression analysis ~ a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute ~. 43rd Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2010年5月26日 神戸
- ② 菱木知郎, 齋藤武, 照井慶太, 佐藤嘉治, 武之内史子, 八幡江里子, 大野幸恵, 鎌田稔子, 松永正訓, 吉田英生. 神経芽腫の予後因子としての *TrkA* 発現 高感度解析による再評価. 第25回日本小児がん学会 (小児がん46増 277, 2009) 2009年11月27日 浦安

[図書] (計 1 件)

Todo T: Active immunotherapy: Oncolytic virus therapy using HSV-1. *In* Yamanaka R (ed.): *Glioma: Immunotherapeutic Approaches*. Austin TX, Landes Bioscience, 2010 (published electronically <https://www.landesbioscience.com/curie/chapter/4898/>).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱木 知郎 (HISHIKI TOMORO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 00375776

(2) 研究分担者

藤堂 具紀 (TODO TOMOKI)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号: 80272566

吉田 英生 (YOSHIDA HIDEO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 00216194

白澤 浩 (SHIRASAWA HIROSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 : 00216194

齋藤 武 (SAITO TAKESHI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 20406044

照井慶太 (TERUI KEITA)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 70375773
(H20年～21年)

八幡江里子 (YAHATA ERIKO)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号 40456067
(H20年～21年)

佐藤嘉治 (SATO YOSHIHARU)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 60375772
(H22年)

光永哲也 (MITSUNAGA TETSUYA)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 80375774
(H22年)

(3) 連携研究者

稲生靖 (INO YASUSHI)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
ウイルスベクター開発・指導
研究者番号 50372371