

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03835

研究課題名（和文）個別化医療に向けた腫瘍溶解ウイルス療法の開発

研究課題名（英文）Oncolytic virotherapy for personalized treatment

研究代表者

江崎 伸一（Esaki, Shinichi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：20620983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルス遺伝子は増殖の際に遺伝子が保存されないことがある。この遺伝的な不安定性を利用して、腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果を増強できる可能性を考えた。まずは様々な頭頸部癌の臨床検体から初代培養細胞株を作成した。30種類のうち半数で初代培養細胞の作成に成功した。そのうち一部の細胞は腫瘍造性を認めた。頭頸部癌のin vivo modelとして、利用可能であると考えられた。次に、各細胞で腫瘍溶解ウイルスを培養し、最も細胞変性が認められたウイルスを選択することにより、ウイルスの馴化を行った。ウイルスの増殖能の改善を認めたため、今後殺細胞効果の増加が認められるかなど検討を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍溶解ウイルス療法とは腫瘍細胞のみで増殖し、破壊すると同時にウイルスを放出し、周囲の腫瘍細胞が感染することにより腫瘍を縮小させることを目指した治療法である。化学療法、放射線療法、手術療法とは性質の異なる新たな治療法である。2022年には本邦初の腫瘍溶解ウイルスとしてデリタクトが条件付きで承認された。腫瘍溶解ウイルス療法が頭頸部癌を含めて様々な腫瘍に適応拡大されていくため、様々な癌腫に対する効果を検討することが必要である。また、腫瘍溶解ウイルス療法の効果を最大限高めるための工夫を行うことにより、臨床効果をさらに高めることが可能となる。

研究成果の概要（英文）：Viral genes may not be conserved during replication, leading to genetic instability. By leveraging this genetic instability, we hypothesized that the antitumor efficacy of oncolytic viruses could be enhanced. Initially, we established primary cultured cell lines from clinical specimens of various head and neck cancers. We successfully created primary cultures from half of the 30 different types of specimens. Among these, some cells demonstrated tumorigenic potential and were deemed suitable for use as in vivo models of head and neck cancers. Subsequently, we cultured oncolytic viruses in each cell line and selected the virus that exhibited the most pronounced cytopathic effects, thereby adapting the virus. Having observed an improvement in the virus's replication capacity, we plan to further investigate the increase in its cytotoxic effects.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：腫瘍溶解ウイルス 単純ヘルペスウイルス 頭頸部癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解ウイルス療法とは腫瘍細胞のみで増殖し、破壊すると同時にウイルスを放出し、周囲の腫瘍細胞が感染することにより腫瘍を縮小させることを目指したウイルスである。共同研究先の名古屋大学医学部ウイルス学講座では、自然発生型の弱毒型単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) HF 株からクローニングした HF10 が多くの癌細胞株で増殖性が非常に高く、担癌モデルマウスにも優れた抗腫瘍効果を示すことを報告してきた。HF10 は再発頭頸部癌を含む皮膚/皮下腫瘍を対象とした第 I/II 相試験を米国で終え、製造販売承認申請を行っている。G47Δ は共同研究先の米国ハーバード大学マサチューセッツ総合病院で作成された HSV-1 由来の腫瘍溶解ウイルスである。東京大学医科学研究所附属病院にて悪性神経膠腫を対象とした第 II 相試験を終え、2022 年に本邦初の腫瘍溶解ウイルスとして PMDA に条件付きで承認された。

ところで、ウイルス遺伝子は遺伝的な不安定性を有することが知られている。単純ヘルペスウイルスは 2 本鎖 DNA ウイルスであり、安定した遺伝子を有するとされているが、それでも違う研究室で継代された同じウイルス株を比較したところ、遺伝子配列が異なっていたことが報告されている。この遺伝的な不安定性を利用して、腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果を増強できる可能性を考えた。

頭頸部癌は原発巣やリンパ節転移ともほとんどが皮下、粘膜に発生し、腫瘍内への局所注入が容易であるため、腫瘍溶解ウイルスの治療対象として適性が高い腫瘍と考えられている。現在までに臨床試験が 2 件報告されているが、継続した治験が行われていないのが現状である。また、全臨床的研究に目を向けても、頭頸部癌を対象とした腫瘍溶解ウイルスの研究はほとんど行われていない。我々は名古屋大学医学部ウイルス学講座と共同研究を行い、HF10 の抗腫瘍効果や、治療に誘導される抗腫瘍免疫につき研究を継続してきた。腫瘍溶解ウイルス療法が様々な腫瘍に適応拡大されていく際に、頭頸部癌にも適応されるように、我々は頭頸部癌と腫瘍溶解ウイルス療法の研究を行っている。

2. 研究の目的

腫瘍溶解ウイルス療法は従来の治療と異なる機序で抗腫瘍効果を示すため、頭頸部悪性腫瘍において新たな治療選択肢となりうると考えられる。しかし、腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果は細胞によって異なる事が知られている。本研究では頭頸部癌の患者毎に最適化した腫瘍溶解ウイルスを作成することを目的とした。頭頸部癌の臨床検体から得られた癌細胞で腫瘍溶解ウイルスを馴化させることにより、対象とする癌細胞での抗腫瘍効果が増強されるか検討した。がん細胞の有する遺伝子変異に基づき症例毎に最適化したがんの治療法が「個別化医療」として注目されているが、本治療法も腫瘍溶解ウイルスを症例毎に最適化できるため、「個別化医療」に向けた腫瘍溶解ウイルス療法になることが期待できる。

3. 研究の方法

A. 初代培養細胞株の作成

頭頸部癌患者の未固定組織を細かく裁断し、0.1% トリプシンで処理してフィルターを通して単細胞を得た。得られた細胞を 10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有培地で培養し、頭頸部癌の初代培養細胞株が得られた。

マウス舌癌細胞株を作成するため、マウスを麻酔して、舌に 4NQO (4-ニトロキノリン-1-オキシド) を接種した。舌に腫瘍が形成されたところで上記手法と同様に培養して細胞株を得た。

B. 腫瘍溶解ウイルス療法による殺細胞効果とウイルス増殖 (in vitro)

上記の初代培養細胞株を撒き、翌日に腫瘍溶解ウイルスを感染させた。72 時間後に MTS assay で生き残った細胞数を測定した。比較対象として、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株 FaDu, Detroit562、マウス扁平上皮癌細胞株 SCC7 を用いた。

ウイルス増殖については、初代培養細胞株を撒き、翌日に腫瘍溶解ウイルスを感染させ、経時的に上清を採取した。上清に放出されたウイルスをプラークアッセイ法にて測定した。

C. 担癌動物の作成と、腫瘍溶解ウイルスによる抗腫瘍効果 (in vivo)

上記の初代培養細胞株をマウスの皮下に接種し、皮下腫瘍モデルマウスを作成した。腫瘍溶解ウイルスを腫瘍内に接種し、経時的に腫瘍の大きさを検討した。一部の細胞株は耳介に接種して外耳腫瘍モデルマウスを作成し、腫瘍溶解ウイルスで治療を行った。また組織を採取して、組織学的な検討を行った。

D. 腫瘍溶解の馴化

上記の初代培養細胞株をまき、各穴にウイルスを感染させた。CPE (細胞変性効果) が最も認められた穴の上清を採取し、Vero 細胞で増殖させることにより馴化したウイルスを得た。馴化したウイルスにつき、上記 B と同様に殺細胞効果とウイルス増殖を調べた。

4. 研究成果

A. 作成した初代培養細胞株における HF10 の殺細胞効果

様々な頭頸部癌の臨床検体 30 検体から 15 種類の細胞株を得た。腫瘍溶解ウイルス HF10 の殺細胞性は細胞毎に異なった。例として下咽頭癌から得られた細胞株 (NSCC-1F, NSCC-2F) における殺細胞効果を図 1 に示した。

いずれの細胞もウイルスの MOI (ウイルスの力価に相当する) を上げるにつれて殺細胞効果が

上昇した。また、マウスに 4NQO を接種し、舌癌を作成した。舌癌細胞株を作成し (TC4, TC5s)、

HF10 による殺細胞効果を検討したところ、MOI 依存的な殺細胞効果を認めた (図 1)。

各細胞に HF10 を高い MOI (高い濃度) で感染させたところ、ほぼ全細胞が感染し、上清にウイルスが認められた (図 2)。100 分の 1 の濃度で感染させたところ、上清に分泌されるウイルスが経時的に増加した (図 2)。

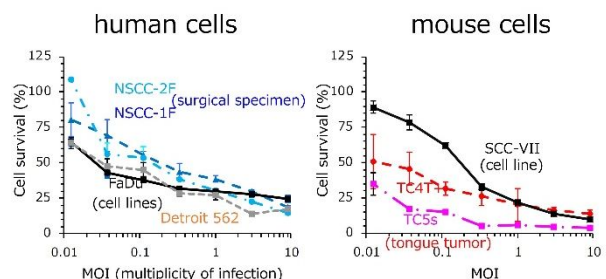


図 1 HF10 による抗腫瘍効果

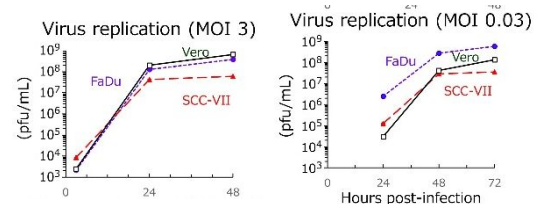


図 2 腫瘍溶解ウイルスの増殖曲線

B. 担癌動物の作成と HF10 の抗腫瘍効果

15 種類の細胞株をマウス皮下に接種し、腫瘍形成能を検討した。そのうち 5 つの細胞は腫瘍形成能を有していた。形成した腫瘍に HF10 を感染させたところ、腫瘍の縮小効果が認められた。しかし、腫瘍の形成率が安定しないため、HF10 の抗腫瘍効果を検討するには不適と考えられた。そこで、頭頸部扁平上皮癌細胞株を耳介に接種し、外耳腫瘍モデルマウスを作成した。腫瘍が明らかになった 7 日後から HF10 を 2 日おきに 2 回接種したところ、腫瘍が抑制され、マウスの生存が延長した (次頁図 3)。

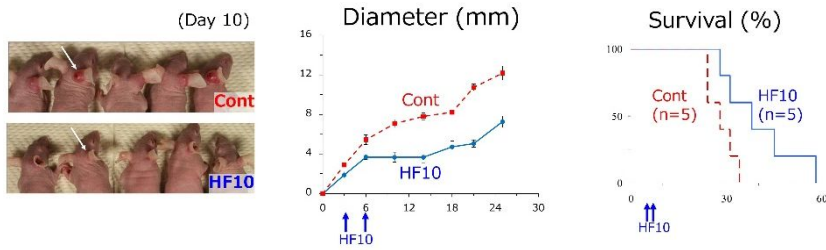


図3 外耳腫瘍モデルマウスにおける腫瘍径の変化と生存

C. 馴化ウイルスの作成

次に、各細胞株を 96well plate にまき、HF10 を接種させ、CPE が認められた最も認められた well の上清からウイルスを採取し、増殖させる、という行為を繰り返し、各細胞に馴化されたウイルスを得た。その結果の一部を図 4 に示した。G 株、C 株とも馴化前はウイルス増殖が乏しかったが、馴化によりウイルス増殖の増加が認められた。

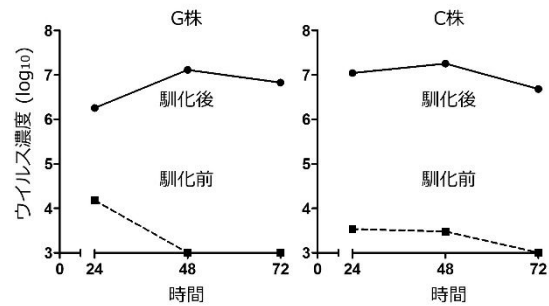


図4 馴化前後におけるウイルス増殖効果

頭頸部癌初代培養細胞株においても同様に馴化を行い、ウイルス増殖効果の亢進、殺細胞効果の増強を認めた（未発表）。マウスモデルでも抗腫瘍効果の増強が認められるか、現在検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takano Gaku, Esaki Shinichi, Goshima Fumi, Enomoto Atsushi, Hatano Yoshimi, Ozaki Haruka, Watanabe Takahiro, Sato Yoshitaka, Kawakita Daisuke, Murakami Shingo, Murata Takayuki, Nishiyama Yukihiro, Iwasaki Shinichi, Kimura Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Oncolytic activity of naturally attenuated herpes-simplex virus HF10 against an immunocompetent model of oral carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 220 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2020.12.007	査読の有無 無
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 Takemoto Naoki, Sanuki Tetsuji, Esaki Shinichi, Iwasaki Shinichi	4. 巻 49
2. 論文標題 Rabbit model with vocal fold hyperadduction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 810 ~ 815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2022.01.008	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 -

1. 著者名 Fukushima Akina, Kabaya Kayoko, Minakata Toshiya, Katsumi Sachiyo, Esaki Shinichi, Iwasaki Shinichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Age-related differences in the characteristics of persistent postural-perceptual dizziness	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1378206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2024.1378206	査読の有無 無
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 Minohara Kiyoshi, Matoba Takuma, Kawakita Daisuke, Takano Gaku, Oguri Keisuke, Murashima Akihiro, Nakai Kazuhiro, Iwaki Sho, Hojo Wataru, Matsumura Ayano, Ozaki Shinya, Ozawa Taijiro, Harata Ikuma, Tanaka Nobukazu, Maseki Shinichiro, Tsuge Hiroshi, Imaizumi Sae, Mitsuya Shoji, Moribe Kazuho, Esaki Shinichi, et al	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel Prognostic Score for recurrent or metastatic head and neck cancer patients treated with Nivolumab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96538-7	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 -

1. 著者名 Matoba Takuma, Minohara Kiyoshi, Kawakita Daisuke, Takano Gaku, Oguri Keisuke, Murashima Akihiro, Nakai Kazuyuki, Iwaki Sho, Tsuge Hiroshi, Tanaka Nobukazu, Imaizumi Sae, Hojo Wataru, Matsumura Ayano, Tsukamoto Koji, Esaki Shinichi, Iwasaki Shinichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Impact of tumor burden on survival in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer treated with immune checkpoint inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-18611-z	査読の有無 無
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 Kabaya Kayoko, Katsumi Sachiyo, Fukushima Akina, Esaki Shinichi, Minakata Toshiya, Iwasaki Shinichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Assessment of semicircular canal function in benign paroxysmal positional vertigo using the video head impulse test and caloric test	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 525 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.1020	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	高野 学 (Takano Gaku) (00812744)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院 (医学)・講師 (23903)	
研究分担者	大黒 徹 (Daikoku Toru) (80291409)	北陸大学・薬学部・教授 (33304)	
研究分担者	波多野 芳美 (Hatano Yoshimi) (90792672)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院 (医学)・研究員 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	五島 典 (Goshima Fumi)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	

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