

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16438

研究課題名（和文）強力な免疫チェックポイント分子阻害能を有する新たな腫瘍溶解性ウイルスの開発

研究課題名（英文）Development of a new oncolytic virus with strong immune checkpoint molecular inhibitory ability

研究代表者

向山 宣昭（Mukoyama, Nobuaki）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40847521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍特異的に感染し、腫瘍を崩壊する。さらに、破壊された腫瘍が癌抗原を放出することにより癌免疫応答を惹起する。本研究は、T細胞の機能を抑制する免疫チェックポイント分子を阻害する新たな腫瘍溶解性ウイルスの開発を目的とした。抗マウスPD-L1 scFvならびにPD-1(1-239)を発現する新規腫瘍溶解性ウイルスC-REV-PD-L1-PD-1(1-239)を作成した。また、C-REV投与により腫瘍内に浸潤したT細胞のPD-1発現が減少することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-1阻害剤の投与の可否を判断するにあたり、腫瘍細胞のPD-L1発現率を調べる診断薬が承認されている。一方、PD-L1低発現の腫瘍に対してPD-1阻害剤が効果を発揮する報告もある。また、動物実験においてPD-L1を発現しない腫瘍に対して免疫チェックポイント阻害剤が効果を発揮することも報告されている。従って、腫瘍内のPD-1/PD-L1結合阻害と抗腫瘍効果の関係は明らかではない。本研究によって、腫瘍局所内におけるPD-1/PD-L1結合を直接阻害することにより、その阻害が抗腫瘍効果にどのように関与するか明らかになることにより、今後の免疫チェックポイント阻害治療に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Oncolytic viruses infect tumors specifically and destroy tumors. In addition, the destroyed tumor elicits a cancer immune response by releasing cancer antigens. The purpose of this study is to develop a new oncolytic virus that inhibits immune checkpoint molecules that suppress the function of T cells.

A novel oncolytic virus C-REV-PD-L1-PD-1 (1-239) expressing anti-mouse PD-L1 scFv and PD-1 (1-239) was generated. It was also clarified that C-REV administration reduced the PD-1 expression of T cells infiltrated into the tumor.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス 腫瘍免疫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解性ウイルス C-REV (旧称 HF10) は名古屋大学医学系研究科ウイルス学教室で開発されたバイオ製剤であり、医師主導の臨床研究が乳癌、頭頸部癌、膵癌を対象に名古屋大学医学部附属病院で行われ、当研究室は投与経路・併用療法のトランスレーショナルリサーチを継続的に行っている。CREV は腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (HSV) であり、遺伝子変異により腫瘍のみに感染し腫瘍を破壊する。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍特異的なリンパ球の誘導など、癌ワクチンすなわち全身療法としての効果も明らかにされつつある (Caroline JB, et al. Nature2011)。当院の臨床研究においても、ウイルスに誘導された細胞障害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞、樹状細胞等の抗原提示細胞の浸潤を腫瘍内に認め、強い抗腫瘍免疫の関連が示唆されている (Nakao A, Kasuya H, et al. Cancer Gene Therapy 2011)。

C-REV の増殖に伴って、癌微小環境が変化し、腫瘍血管からの漏出・腫瘍周囲の炎症・白血球浸潤が増加し、樹状細胞のリンパ節への移動が増加する。この炎症環境中にウイルスによって破壊された癌抗原やウイルス関連産物などが放出され、T 細胞が活性化される。ところが、腫瘍細胞や組織浸潤 T 細胞が産生する IFN $\gamma$  によって腫瘍に PD-L1 の発現が誘導され、抗原特異的 T 細胞の細胞障害活性を減弱させる。このような免疫寛容による免疫学的効果の減弱は、ウイルス療法のみならず、癌治療全体の克服すべき課題である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は癌のウイルス療法において、免疫チェックポイント分子による免疫寛容を阻止し、免疫学的効果が減弱する事を防ぐ画期的な新規ウイルスを開発することである。

本研究の独創的な点は、腫瘍溶解性ウイルスに免疫チェックポイント分子である PD-L1 に対する抗 PD-L1 scFv のみならず、PD-L1 に結合する PD-1 の細胞外領域 (PD-1(1-239)) を発現させ、免疫チェックポイント分子の結合を強く抑制することにより、腫瘍内特異的に免疫チェックポイントを阻害すると共に、腫瘍溶解性ウイルスが直接腫瘍を溶解し、腫瘍特異的なリンパ球を誘導することにより抗腫瘍免疫をより強固にすることにある。相互に補完し合う 2 種類の特性からの検討は予想しない新規の知見を得ることが出来る可能性がある。ウイルスの存在により抗原提示細胞、細胞障害性 T 細胞はさらに刺激を受け、活性化しサイトカインを放出しやすい状態となり、活性化した細胞障害性 T 細胞として攻撃的な側面をも併せ持つ事となる (Chimu Chuang, et al. Cancer Therapy 2009)。本研究によって得られる結果はウイルス療法の新たな展開だけでなく、免疫細胞療法分野にも新しい知見を提供し、外科的切除のみでは治癒不可能な多くの癌患者さんの生命予後に寄与する情報を発信する。

### 3. 研究の方法

(1) 抗 PD-L1 scFv および PD-1 の細胞外領域発現 C-REV (C-REV-aPD-L1-PD-1(1-239)) の作製

C-REV ゲノム UL43 領域に抗 PD-L1 scFv 遺伝子ならびに PD-1 の細胞外領域を挿入する (図 1)。抗マウス PD-L1 scFv の塩基配列は Genbank より入手した (KF041825)。抗 PD-L1 scFv と PD-1 細胞外領域 (PD-1(1-239)) を自己切断型 2A 配列で結合する。この遺伝子カセットの両端を各 500 塩基ずつ UL43 遺伝子と同じ塩基配列で挟んだプラスミドベクターを構築する。Lipofectamin3000 を用いて Vero 細胞に CREV のゲノム DNA と上記のベクターをトランスフェクションし、相同遺伝子組み換えにより UL43 に抗 PD-L1 scFv と PD-1 細胞外領域 (PD-1(1-239)) を発現する C-REV を作製する。

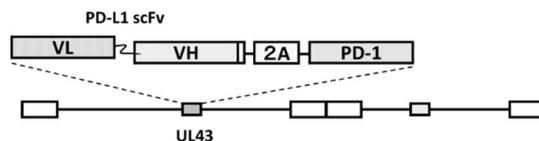


図 1 C-REV-aPD-L1-PD-1(1-239)の構造

(2) C-REV の抗腫瘍効果測定

マウス扁平上皮癌細胞株 SCC7 をマウス皮下に植え、背中に腫瘍を 2 つ作製し、7 日後、片一方の腫瘍に Mock (PBS) または C-REV を腫瘍内に注射する (3 日おきに 3 回)。継時的に腫瘍サイズとマウス体重を測定し、治療効果を明らかにする。

(3) 腫瘍内浸潤 T 細胞測定

C-REV を投与した腫瘍ならびに非投与腫瘍を単離し、酵素処理によりシングルセル化する。FACS により腫瘍内に浸潤した T 細胞を検出した。

### 4. 研究成果

(1) 抗 PD-L1 scFv および PD-1 の細胞外領域発現 C-REV (C-REV-aPD-L1-PD-1(1-239)) の作製

抗マウス PD-L1 scFv の塩基配列は GenBank より入手し (KF041825) 人工遺伝子合成により作成した。活性化マウス T 細胞から RNA を抽出、逆転写酵素により cDNA を作成し、PCR 法にて PD-1(1-239) を増幅した。PCR 産物を TA クローニングし、塩基配列をシーケンシングにより確認した。さらに 2A 配列を含む primer を作成し、overlap PCR 法にて aPD-L1-2A-PD-1(1-

239)を作成した。PCR産物をTAクローニングし、塩基配列をシーケンスにより確認した。この遺伝子をHSV1 UL43領域に相同組み換えで組み込むためのTarget vectorに挿入した。Lipofectamin3000を用いてVero細胞にC-REVのゲノムDNAと上記のベクターをトランスフェクションし、相同遺伝子組み換えによりUL43に抗PD-L1 scFvとPD-1細胞外領域(PD-1(1-239))を発現するC-REVの作製を試みた。Target vectorはGFPを発現することから、GFP発現を指標に細胞を採取し、ウイルス感染細胞を得た。ウイルス感染細胞からウイルスを得て、さらにVero細胞に感染させた。ウイルスのVero細胞への感染を返すことにより、高純度のウイルスを得ることが出来た。

### (2) C-REVの抗腫瘍効果測定

マウス扁平上皮癌細胞株SCC7をマウス皮下に移植し、背中に腫瘍を2つ作製し、7日後、片一方の腫瘍にMock(PBS)またはC-REVを腫瘍内に注射した。(3日おきに3回)。C-REVは投与側腫瘍の増殖を抑制した。興味深いことに、非投与側の腫瘍の増殖を抑制した(図2)。

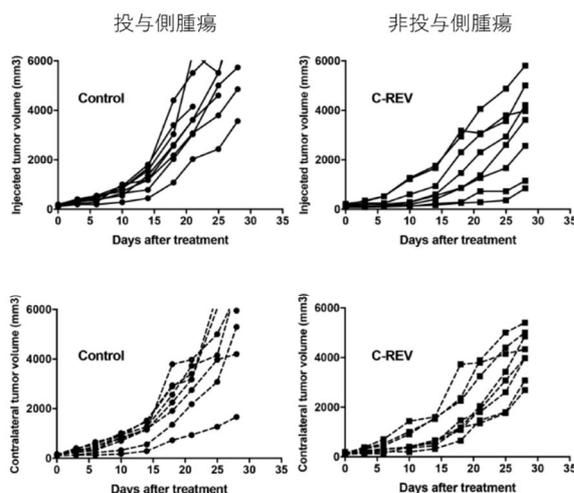


図2 C-REVのSCC7に対する抗腫瘍効果

### (3) 腫瘍内浸潤T細胞測定

C-REVは投与された腫瘍だけでなく、投与されていない腫瘍の増殖を抑制した。このことは、非投与側腫瘍の増殖抑制効果にT細胞が関与していることを示唆する。そこで、C-REV治療後の腫瘍を単離し、腫瘍内に浸潤したT細胞を測定した。C-REV処理により、投与腫瘍ならびに非投与腫瘍のT細胞、特に細胞障害性T細胞の浸潤が増加した(図3)。さらに、浸潤した細胞障害性T細胞のPD-1発現を調べたところ、C-REV投与により明らかにPD-1の発現が低下した(図3)。

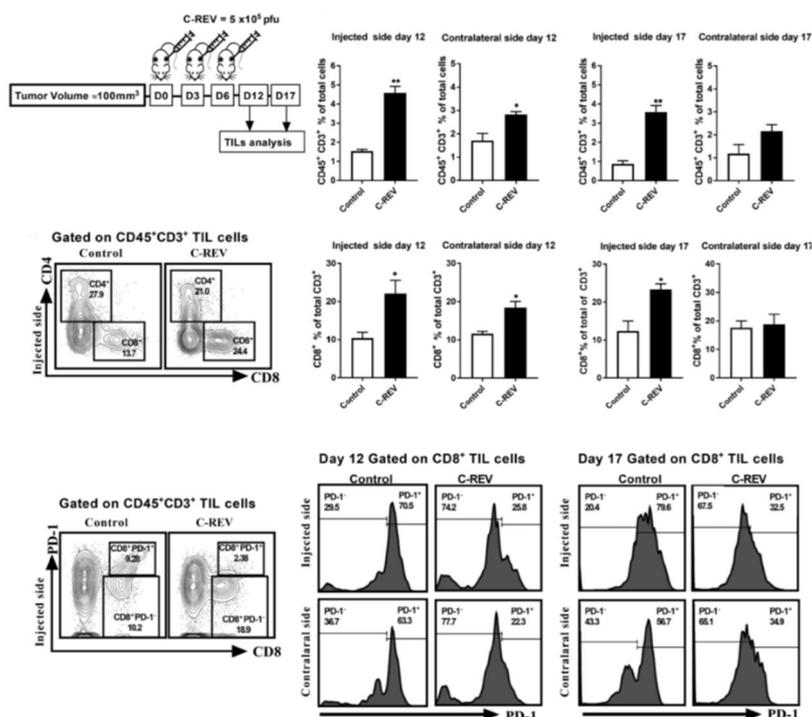


図3 C-REVの腫瘍浸潤T細胞に対する効果

本研究の目的は癌のウイルス療法において、免疫チェックポイント分子による免疫寛容を阻止し、免疫学的効果が減弱する事を防ぐ画期的な新規ウイルスを開発することであり、研究代表者らは PD-1/PD-L1 の結合を阻害するための抗 PD-L1 scFv および PD-1 の細胞外領域を発現する腫瘍溶解性ウイルス C-REV( C-REV-aPD-L1-PD-1(1-239) )の作製に成功した。一方、C-REV の抗腫瘍効果に關与する T 細胞の特徴を詳細に検討したところ、腫瘍内浸潤 T 細胞の PD-1 発現が明らかに減少していた。このことは、腫瘍内局所では、C-REV 処理により T 細胞上の PD-1 が減少することから、腫瘍内局所で PD-1/PD-L1 の結合を阻止する抗 PD-L1 scFv および PD-1 の細胞外領域発現は有用でないことを示唆する。また、PD-L1 欠損マウスに腫瘍を移植したモデルにおいて抗 PD-L1 効果が減弱、さらに PD-L1 欠損腫瘍をマウスに移植したモデルにおいて抗 PD-L1 が抗腫瘍効果を発揮したことから、腫瘍局所の PD-1/PD-L1 結合阻害より、宿主内の PD-1/PD-L1 結合阻害が免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果に大きく關与していることを示唆する ( Haidong Tang, et al. JCI 2018, Heng Lin, et al, JCI 2018 )。研究代表者らが作製した腫瘍溶解性ウイルス C-REV ( C-REV-aPD-L1-PD-1(1-239) ) は腫瘍内局所での PD-1/PD-L1 結合を阻害することから、腫瘍局所の PD-1/PD-L1 結合阻害が抗腫瘍効果に如何に關与するか証明する良いツールとなることが期待できる。今後、C-REV-aPD-L1-PD-1(1-239)と C-REV の抗腫瘍効果を比較することにより、腫瘍局所の PD-1/PD-L1 結合阻害が抗腫瘍効果に關与するか明らかになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Eissa Ibrahim Ragab, Mukoyama Nobuaki, Abdelmoneim Mohamed, Naoe Yoshinori, Matsumura Shigeru, Bustos Villalobos Itzel, Ichinose Toru, Miyajima Noriyuki, Morimoto Daishi, Tanaka Maki, Fujimoto Yasushi, Sone Michihiko, Kodera Yasuhiro, Kasuya Hideki	4. 巻 149
2. 論文標題 Oncolytic herpes simplex virus HF10 (canerpatrev) promotes accumulation of CD8 + PD-1 - tumor-infiltrating T cells in PD-L1-enriched tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 214 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33550	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------