

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号： 12601  
 研究種目： 基盤研究（B）  
 研究期間： 2009～2011  
 課題番号： 21390404  
 研究課題名（和文） 増殖型遺伝子組換えヘルペスウイルスを用いた新規脳腫瘍治療法の開発研究  
 研究課題名（英文） Developmental research on novel brain tumor therapy using recombinant oncolytic herpes viruses  
 研究代表者  
 藤堂 具紀（TODO TOMOKI）  
 東京大学・医学部附属病院・教授  
 研究者番号： 80272566

## 研究成果の概要（和文）：

第三世代がん治療用遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス I 型(G47Δ)の基本骨格に外来配列を直接組み込んで、特殊機能を有し、かつ脳腫瘍治療に応用可能な遺伝子組換えウイルスの開発研究を実施した。免疫刺激因子発現型やルシフェラーゼ発現型、腫瘍特異的プロモータ活用型の新規がん治療用ウイルスを複数作製し評価したところ、それぞれ高い有効性を認めた。G47Δの実用化を見据えた次世代の脳腫瘍ウイルス療法の基礎開発が進んだ。

## 研究成果の概要（英文）：

We performed a developmental research on recombinant oncolytic viruses that possess certain antitumor functions and are useful for brain tumor therapy. A third-generation oncolytic herpes simplex virus type 1 (G47Δ) was used as the backbone to insert foreign sequences. Oncolytic viruses that express immune-stimulatory factors or luciferase, or that use tumor-specific promoters, were constructed and evaluated, and proved to be highly useful. G47Δ is expected as a new drug for brain tumors in the near future, and a progress has been made in the basic development of next generation oncolytic virus therapy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍、ウイルス療法、単純ヘルペスウイルス I 型、ウイルスベクター、腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

手術技術や放射線／化学療法の進歩にもかかわらず悪性神経膠腫の治療成績はこの40年来ほとんど向上が見られず、新しい治療法の出現が待望される。近年、ウイルスゲノ

ムを遺伝子工学的に改変し、腫瘍細胞で選択的に複製するウイルスを作製して、ウイルス複製に伴う直接的な殺細胞効果を腫瘍治療に応用する試みがなされ、申請者は世界でもその開発研究の先端を担ってきた。本研究は、

これまでの研究成果を進展させ、増殖型遺伝子組換え HSV-1、特に第三世代 HSV-1 を基本骨格として外来遺伝子を発現する機能付加型遺伝子組換え HSV-1 を用いて、抗腫瘍効果が高く且つ安全で臨床応用可能な新しい悪性脳腫瘍の治療法開発を目的とした。

研究代表者は、第二世代 HSV-1 の G207 を用いた米国初の悪性神経膠腫に対するウイルス療法臨床試験の共同研究者であり、G207 の臨床開発の中心的な役割を担った。また HSV-1 を用いたウイルス療法がマウス脳腫瘍モデルで特異的抗腫瘍免疫を惹起することを見いだし( Todo T, et al. Hum Gene Ther 1999)、可溶性 B7-1 などの免疫遺伝子治療を組み合わせるとウイルス療法の治療効果が増強することを示した( Todo T et al. Cancer Res. 61: 153-161, 2001)。申請者は、G207 からさらに a47 遺伝子を除去することによって、世界で初めて三重変異を有する第三世代遺伝子組換え HSV-1(G47Δ)を作製することに成功した

( Todo T et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 2001)。新たに加えた変異のため、G47Δは感染腫瘍細胞の MHC class I 発現を維持して抗腫瘍免疫刺激を増強し、一方で腫瘍細胞に限ってウイルス複製能を還元して強い抗腫瘍作用を現す。G47Δはヒトグリオーマ細胞株において *in vitro*、*in vivo* いずれでも G207 に比べ高い抗腫瘍効果を示した。G47Δはまた、脳腫瘍に限らず他の固形癌にも高い治療効果を示す( Fukuhara H, Todo T et al. Clin Cancer Res 2005)。HSV-1 に感受性の高い A/J マウスへの脳内投与では、G47Δは G207 と同等以上の安全性を示した。我が国における臨床用 G47Δ 製剤の製造が完了し、平成 21 年 5 月に厚労省の承認を得、平成 21 年 11 月より再発膠芽腫を対象とした第 I-II 相臨床研究が開始された。

HSV-1 は脳腫瘍治療に有利な特徴を多く有するが、組換えウイルス作製に多大の労力を要することに難があった。研究代表者らは、HSV-1 ゲノム全体を bacterial artificial chromosome (BAC) プラズミドに組み入れて recombinase 系を利用することにより、任意の外来遺伝子を組み込んだ HSV-1 を容易に作製できるシステムを考案した。まず G207 様の第二世代 HSV-1 を基本骨格とした作製系を確立させ、IL-12、IL-18 または可溶性 B7-1 遺伝子を直接組み込んだ 3 種と対照の遺伝子組換え HSV-1 を同時に短期間に作製することに成功した。異なる治療遺伝子を発現する 3 種の腫瘍治療用 HSV-1 を同時に腫瘍モデルに投与して、複数種の混合投与により治療効果を増強できることを明らかにした( Ino Y, Todo T, et al. Clin Cancer Res 2006)。更に、BAC を用いて第三世代 G47Δを基本骨格とした HSV-1 作製系を確立し、IL-18 と可溶性 B7-1 を同時に発現する第三世代 HSV-1 を作

製して、増殖型 HSV-1 による複数の免疫刺激遺伝子発現が高い治療効果につながることを示した( Fukuhara H, Todo T et al. Cancer Res 2005)。この系を用い、抗新生血管因子である platelet factor 4 や dominant-negative FGF receptor を発現する HSV-1 を作製し、抗腫瘍効果が増強されることを示した( Liu T et al. Mol Ther 2006; Liu T et al. Clin Cancer Res 2006)。

研究代表者らは、種々の免疫刺激遺伝子、中でも IL-12 を用いた「武装」が、抗腫瘍免疫惹起を介して HSV-1 の抗腫瘍作用を大きく増強することを示してきた( Todo T, Cell Adhesion Migration 2008)。T-BAC 系を用いて G47Δの基本骨格にマウス IL-12 遺伝子を挿入した第三世代「武装」HSV-1(T-mIL12)を作製したところ、*in vivo* の腫瘍内投与にて対照第三世代 HSV-1 (T-01) に比べ高い抗腫瘍効果を示したのみならず、静脈内投与でも抗腫瘍効果を発揮した。

更にマウス IL-23 を、IRES を用いて 2 つのサブユニットを発現させた T-mIL23ires と、single chain として発現させた T-mIL23sc を作製した。低用量では T-mIL23sc の方が T-mIL23ires に比べより高い効果を呈した。両側皮下腫瘍モデルにおける片側投与で、T-mIL12 と T-mIL23sc を併用すると、両側いずれの腫瘍に対しても、それぞれの単独投与に比べ有意に高い治療効果を示した。

## 2. 研究の目的

単純ヘルペスウイルス I 型(HSV-1)のウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変して、腫瘍細胞で選択的に複製するに遺伝子組換え HSV-1 を得ることができる。そのような HSV-1 のゲノムに直接外来遺伝子を挿入し、ウイルス複製に伴う直接的な殺細胞効果に加え特別な機能を有する機能付加型遺伝子組換え HSV-1 を作製して、脳腫瘍に対する次世代のウイルス療法の基礎開発を行う。研究代表者らは治療域の広い増殖型第三世代 HSV-1 の G47Δを開発し、臨床製剤の製造を完了して、我が国において再発膠芽腫を対象とした臨床研究が平成 21 年 11 月から開始された。本研究では G47Δの基本骨格に任意の外来遺伝子を容易かつ的確に組み込むことができる独自の作製システムを活用する。新たに作製した機能付加型 HSV-1 を用いて脳腫瘍治療における応用法を開拓して有効性と安全性を評価する。

## 3. 研究の方法

【平成 21 年度】

(1) ① 免疫刺激遺伝子発現型第三世代 HSV-1 の評価とヒト IL-12 発現型 HSV-1 の作製

本研究では、HSV-1の腫瘍内複製が特異的抗腫瘍免疫を惹起することから、種々の免疫刺激遺伝子を積極的に利用する。これまでの研究から、種々のサイトカインのうち、IL-12は単独でもHSV-1の oncolytic activityとの組み合わせで確実に治療効果を発揮することが判明している。またIL-12の2つのサブユニットの遺伝子をIRESを介して別々に発現させるよりも、fusion proteinとして発現させる方が効果が高いことを見いだした。これまでに、マウスIL-12を発現する第三世代HSV-1 (T-mIL12) や、マウスIL-23を発現する2種類の第三世代HSV-1 (T-mIL23ires と T-mIL23sc) を作製した。また、マウスIL-18発現型、およびマウスIL-12・マウスIL-18同時発現型の第三世代HSV-1も作製している。本研究では、特にT-mIL12とT-mIL23scを用いて、その有効性と安全性を評価し、実用に向けた適正化を図る。Preliminaryなデータでは、T-mIL12やT-mIL23scをそれぞれ単独で用いるより、組み合わせて用いた方がより少ないウイルス量で高い治療効果が得られる。組み合わせ方や、投与のタイミング、投与経路について検討し、安全性を評価する。

現時点では、種々の免疫刺激因子のうち、単独ではIL-12が最もウイルス療法の増強作用が強い。従って、G47Δの実用化に続いて、最初の機能付加型第三世代HSV-1としてIL-12発現型の臨床開発を行う。後述するT-BAC系を用いて、2つのサブユニットをfusion proteinとして発現するヒトIL-12発現型の第三世代HSV-1を作製し、臨床応用を前提にゲノム構造を詳細に検討する。in vitroで複製能、IL-12発現、IFN-γ誘導能等を確認する。

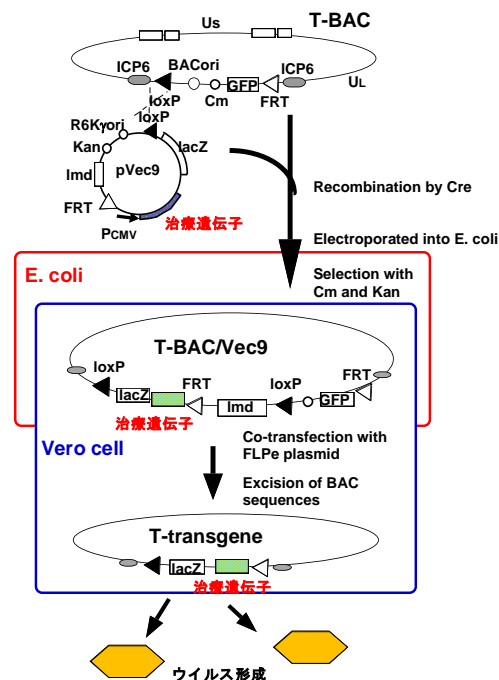
## ②マウス腫瘍モデルを用いた評価

マウス系はA/J、次いでBalb/cなどがHSV-1に感受性が高い。研究代表者の経験より、A/J由来のNeuro2a神経芽腫細胞が皮下にも脳内にも腫瘍を再現よく形成する上、免疫原性が低いのでHSV-1を用いた抗腫瘍免疫賦活のよい評価モデルとなり、本研究でもこれを第一選択として用いる。また、T細胞の関与を評価するために、U87MGヒトグリオーマ細胞株を用いて、ヌードマウス(Balb/c nu/nu)の脳腫瘍または皮下腫瘍モデルを用いる。更にNeuro2a腫瘍モデルにおける抗腫瘍作用の再現性を確認するため、Balb/c由来RENCA腎細胞癌、Balb/c由来CT26大腸癌、C57BL/6由来TRAMP前立腺癌などを用いる。Neuro2aとRENCAはいずれも転移癌モデルとしても有用性が高い。機能付加型HSV-1は、HSV-1が腫瘍細胞特異的とはいえウイルス複製能を保ちながら外来因子を人工的に発現するため、特に安全性の評価が重要となる。感受性の高いA/Jマウスを用いて脳内や静脈内投

与などでの安全性評価を行う。

## ③T-BAC システムの活用

任意の治療遺伝子(transgene)を確実に挿入し、且つ複数の遺伝子組換えHSV-1を並行して短期間で作製することを可能にするため、G47Δを基本骨格とするbacterial artificial chromosome (BAC)システムを利用する。このBACシステムは、Cre-loxPとFLP-FRTの2つのrecombinase系を利用し2つの段階から成る(図)。第一段階は、BAC配列とgreen fluorescent protein (GFP)遺伝子をG47ΔゲノムのICP6欠失部位に挿入したBACプラズミド(T-BAC)を用いる。挿入配列はloxPとFRTに挟まれて存在する。一方、FRTとCMVプロモータの下流にmulti-cloning siteを含む複製制限型のシャトルプラズミドを作製し、任意の治療遺伝子をmulti-cloning siteに挿入する。試験管内でCre recombinationを行い、シャトルプラズミドのDNAを丸ごとT-BACのloxP部位に挿入する。大腸菌にelectroporateした後、目的のco-integratesを選択する。我々の経験では、選択された株の約80%は目的通りの挿入が得られる。次に第二段階として、このco-integratesをFLP発現プラズミドと共にVero細胞にco-transfectする。その結果2つのFRTに挟まれたprokaryote配列部分が切り出され、目的の遺伝子組換えHSV-1が産生される。最終的なウイルス株はlimiting dilution法により単離し、ウイルスDNAを制限酵素で切断してサザンブロット法で解析し確認する。



## (2) ルシフェラーゼ発現型 HSV-1 の作製と分子イメージングによるウイルス動態解析

T-BACシステムを用い、ルシフェラーゼ発現型遺伝子組換えHSV-1を作製する。脳腫瘍

或いは皮下腫瘍を有する動物に種々の経路で腫瘍治療用 HSV-1 を投与した際、ウイルスの体内動態を同じ個体で追跡したデータは少ない。最近、高感度 CCD カメラ (IVIS システム)により、生体透過性が良いルシフェラーゼの発現を、動物を生かしたまま生体外から検出することが可能となった。これを利用すべく本研究では、基質依存的に発光する CBR ルシフェラーゼ (生体透過性が良い改変型 luciferase) を G47Δ の基本骨格に挿入する。CMV プロモータでルシフェラーゼを制御するウイルスと HSV の US11 プロモータでルシフェラーゼを制御するウイルスの 2 種類を作製する。CMV プロモータは immediate early に働くため、HSV-1 が細胞に感染するとすぐにルシフェラーゼが発現される。一方で発現は一時的であるため、IVIS では新たな感染が起きている部位でのみルシフェラーゼ発現が検出されることになる。US11 は HSV の true late gene であるため、そのプロモータはウイルス複製の後期に働く。従って US11 プロモータを用いると、HSV-1 が細胞に感染しただけではルシフェラーゼが発現せず、ウイルス複製が起きている場合にのみルシフェラーゼが発現する。この 2 種類のルシフェラーゼ発現型 HSV-1 を使い分けると、第三世代 HSV-1 の感染の体内動態と、ウイルス複製の体内動態を区別して検出し、解析することができる。ウイルス療法の実用性向上を図るには有用なツールとなる。

### (3) 腫瘍特異的プロモータを利用した全脳腫瘍対応型 HSV-1 の作製

G47Δ は 3 つのウイルス遺伝子の人為的変異により腫瘍特異的なウイルス複製が得られる。そのうち ICP6 遺伝子はリボヌクレオチド還元酵素 (RR) の大サブユニットをコードし、ウイルス DNA 合成のキー酵素である。ICP6 遺伝子が不活化してあるため、正常細胞ではウイルス複製が行えないが、腫瘍細胞では RR 活性が上昇しているため、G47Δ は宿主細胞の RR を利用してウイルス複製が可能となる。G47Δ のウイルス複製能はある程度宿主細胞の RR 活性に依存する。G47Δ の ICP6 遺伝子を intact にした 2 重変異 HSV-1 (R47Δ) と比較すると、多くの腫瘍細胞株では G47Δ と R47Δ でウイルス複製能に大きな差がない中、一部では R47Δ に比べ G47Δ の複製能が約 10 分の 1 程度まで落ちていることがある (Todo T et al. PNAS 2001)。このような状況は、腫瘍細胞株の培養細胞では観察しにくいですが、理論的には、髄膜腫のように増殖が緩やかな腫瘍で G47Δ のウイルス複製が得にくく、効果を出しにくいと考えられる。これを克服し、増殖が緩やかな腫瘍にもウイルス療法を適用できるようにするため、ICP6 遺伝子を欠失する代わりに、腫瘍特異的プロモータで ICP6

遺伝子を制御し、腫瘍細胞に限っては ICP6 遺伝子が発現するような新世代 HSV-1 を作製する。T-BAC システムを活用し、プロモータには hTERT を利用する。

### (4) 第三世代 HSV-1 の脳腫瘍幹細胞のターゲットニングの検討

がん幹細胞が self-renewal を行いながら daughter cells を生産してがんの増殖を担っており、がん幹細胞が放射線治療や化学療法に抵抗性が高いため、がんが再発するというメカニズムが明らかになりつつある。そこで本研究では、第三世代 HSV-1 を用いて悪性脳腫瘍の腫瘍幹細胞をターゲットとした治療法の開発を検討する。手術で得られた悪性グリオーマの組織から、神経幹細胞培養の手法で腫瘍幹細胞を培養する。膠芽腫から得た組織からは高い確率で CD133 陽性の sphere cells を得ることができ、ヌードマウスの脳内に  $5 \times 10^3$  個を植えただけで膠芽腫と同様の組織型を有する腫瘍形成が得られる。腫瘍幹細胞の特性は、CD133 の発現や、神経細胞やグリアへの分化能、ヌードもしくは SCID マウスにおける脳腫瘍および皮下腫瘍形成能で評価する。実験を行うに足る細胞数が得られた腫瘍幹細胞を用い、G47Δ を始めとする遺伝子組換え HSV-1 で感染させ、殺細胞作用とウイルス複製能を検討する。腫瘍幹細胞を SCID マウスの脳内に移植し、G47Δ の腫瘍内投与により根治を試みる。

### 【平成 22 年度以降】

#### (1) 抗腫瘍効果と安全性の in vivo 評価

本研究では、作製した遺伝子組換え HSV-1 や効果増強法の in vivo 評価を重視して、臨床応用の可能性を追求して実用性向上を目指す。前述の in vivo モデルを用いて、複数の免疫刺激遺伝子発現型 HSV-1 をどのように組み合わせ (IL-12 発現型と IL-23 発現型など)、どの投与経路 (脳腫瘍内、静脈内など) で治療を行えば、より効率良く治療効果を得られるかを検討する。ウイルス療法は腫瘍内投与を中心に開発が進んできたが、静脈内投与で治療効果を示せれば、臨床応用上極めて有用である。機能付加型 HSV-1 は、腫瘍に到達したウイルス量が少なくても大きな治療効果を引き出す可能性が特徴であり、免疫刺激遺伝子で「武装」することによって安全性を損なわずに腫瘍内投与と同等の治療効果が得られるか否かを評価する。また腫瘍の種類や投与経路によって適した「武装」HSV-1 が異なるか否かを調査する。HSV-1 に感受性の高い A/J マウスを用いて安全性評価を行い、安全性を犠牲にせずに治療効果を増強させる実用性を探る。また発現因子のウイルス複製への影響や、全身性免疫への影響を in vivo で調査する。

### (2) 全身免疫修飾による抗腫瘍効果の増強

申請者らは、HSV-1によるウイルス療法に低用量のサイトカイン全身投与を併用すると、ウイルス療法の効果が格段に増強されることを見いだしている (unpublished data)。種々の免疫刺激遺伝子発現型 HSV-1 の投与方法の適正化を検討したのちに、サイトカインもしくは免疫修飾因子の全身投与と併用し、更に抗腫瘍効果を上げる方策を検討する。臨床応用に際して、脳腫瘍の隅々にウイルスを到達させる理想的状況を得るのは困難であり、少ないウイルス複製から大きな効果を引き出すこと、それをできれば非侵襲的に実施すること、が将来の普及につなげる鍵となる。

### (3) ウイルス投与後の動態解析

ルシフェラーゼ発現型 HSV-1 を、A/J マウスの Neuro2a 脳腫瘍/皮下腫瘍モデルおよびヌードマウスの U87MG 脳腫瘍/皮下腫瘍モデルにおいて、腫瘍内投与もしくは静脈内投与を行い、ウイルスの体内動態を追跡する。ウイルス投与直後から IVIS システムを用いて CBR ルシフェラーゼの発色をマウス体外より経時的に観察し、その後組織学的解析を行う。このシステムでは、発光量を Bioluminescence imaging (BLI) を用いて定量的に評価することも可能である。

### (4) 腫瘍特異的プロモータを利用した全腫瘍型 HSV-1 の評価

hTERT プロモータで制御した ICP6 遺伝子を G47Δ の基本骨格に挿入し、腫瘍の RR 活性に左右されずに高いウイルス複製が得られる全腫瘍型 HSV-1 を作製し、2 年目を以降にその特性を評価する。ICP6 遺伝子が不活化された G47Δ とそれが intact な R47Δ の間でウイルス複製に大きな差を生じる細胞株を対象に、hTERT プロモータ制御型 HSV-1 の複製能、殺細胞作用、ICP6 発現量などを評価する。更に、hTERT プロモータ制御型 HSV-1 が G47Δ より効果を発揮することが期待されるのは増殖能が低い腫瘍であるため、contact inhibition や serum deprivation など増殖能を人工的に下げた環境でウイルス複製能や殺細胞作用を比較検討する。in vitro の評価に続いて前出の in vivo モデルを用いて抗腫瘍作用を評価する。A/J マウスの脳内投与で安全性が下がっていないことを確認する。

## 4. 研究成果

### 【平成 21 年度】

本研究は、ウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変して腫瘍細胞で選択的に複製する単純ヘルペスウイルス I 型

(HSV-1) を脳腫瘍治療に応用する。特に、治療域が広く、進行性膠芽腫に対する臨床研究で用いられる第三世代 HSV-1 の G47Δ や、それを基本骨格として外来遺伝子を組み込んだ「武装」HSV-1 を用いた治療法開発を目的とした。膠芽腫患者の手術検体からグリオーマ幹様細胞を培養して評価に用いたところ、in vitro の sphere forming assay では、G47Δ がグリオーマ幹様細胞に対して効率よく殺細胞作用を呈した。ヌードマウスの脳内にグリオーマ幹様細胞を移植すると、元の病理形態を反映した脳腫瘍を形成することが示され、G47Δ の一回投与で有意に生存期間を延長させた。更に、がん治療用 HSV-1 の体内動態を生体外から観察するためのツールとして、CMV プロモータ制御下にルシフェラーゼを発現するウイルス T-luc (CMV) を作製した。In vitro では、G47Δ とほぼ構造を持つ対照ウイルス T-01 と同等のウイルス複製能を示した。T-luc (CMV) を生体に投与後 IVIS を用いて観察すると感染部位を検出できる。腫瘍内に直接投与すると Neuro2a (マウス神経芽腫) 皮下腫瘍では 7 日間、U87MG (ヒトグリオーマ) 皮下腫瘍では 14 日以上ウイルス感染の持続が認められた。また U87MG 皮下腫瘍を有するヌードマウスの尾静脈内投与では、肝臓への高い集積を認めるものの数日以内に消失し、一方皮下腫瘍に届いたウイルスの感染が遷延することが観察された。

### 【平成 22 年度】

可溶型マウス B7-1 を発現する HSV-1

(T-mB7.1-Ig) を作製して、低免疫原性の Neuro2a 神経芽腫細胞のマウス皮下腫瘍に投与したところ、低用量でも特異的抗腫瘍免疫を惹起して高い抗腫瘍効果を示した。更に、基質依存的に発光する CBR ルシフェラーゼを発現する遺伝子組換え HSV-1 (T-luc) を作製した。Neuro2a もしくは U87MG の皮下腫瘍モデルに T-luc を腫瘍内投与して IVIS で評価したところ、腫瘍に限局して長期のルシフェラーゼ発現が見られ、A/J マウスでは投与後 7 日間、ヌードマウスでは 14 日間以上検出された。U87MG 皮下腫瘍を有するヌードマウスへの尾静脈内投与では、まず肝臓に高いルシフェラーゼ発現を観察するものの 1 日で消失し、一方腫瘍では数日後に発現ピークを迎えて 15 日以上検出可能であった。また、hTERT プロモータで制御した ICP6 遺伝子を G47Δ の基本骨格に挿入して、緩徐に発育する腫瘍でも高いウイルス複製を示す全腫瘍型 HSV-1 (T-hTERT) を作製した。腫瘍の成長が早い U87MG の皮下腫瘍では、T-hTERT は対照ウイルス T-01 と同じ効果を

示したが、成長の緩徐な OS-RC2 や DU145 の皮下腫瘍では、T-hTERT が T-01 に比べ高い治療効果を示した。

【平成 23 年度】

引き続き、腫瘍特異的プロモータを活用し、第三世代 HSV-1 の抗腫瘍作用を更に強化した腫瘍治療用 HSV-1 の評価を行った。脳腫瘍のウイルス療法には、特に hTERT プロモータが有用であり、G47Δ で不活化された 3 つのウイルス遺伝子のうち、ICP6 遺伝子を hTERT プロモータで制御した新しい腫瘍治療用 HSV-1 を利用した。この新型の腫瘍治療用 HSV-1 (T-hTERT) は、宿主が腫瘍細胞であれば、ICP6 遺伝子がコードする ribonucleotide reductase を自ら発現することになるため、宿主となる腫瘍細胞の ribonucleotide reductase 活性に左右されることなくウイルス複製を得ることができる。従って、髄膜腫のように緩徐に増大する良性腫瘍や、自らの増殖能はそれほど高くないグリオーマ幹細胞などでも高いウイルス複製能が得られると期待される。実際、膠芽腫患者から単離したグリオーマ幹細胞を用いて、その殺細胞作用や複製能を対照ウイルス T-01 と比較したところ、緩徐に増殖するグリオーマ幹細胞では、T-hTERT が有意に強く secondary sphere formation を抑制した。またグリオーマ幹細胞を用いたマウス脳腫瘍モデルでも、T-hTERT は T-01 より有意に高い抗腫瘍効果を示した。腫瘍特異的プロモータを活用した遺伝子組換え HSV-1 は、特に腫瘍幹細胞の割合が高い脳腫瘍に有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 19 件)

- ① Todo T, Active immunotherapy: Oncolytic virus therapy using HSV-1. *Adv Exp Med Biol*, 査読無、746 巻, 2012, pp.178-186
- ② Koga T, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Saito N, Nakagawa K, Shibahara J, Todo T. Extended field stereotactic radiosurgery for recurrent glioblastoma. *Cancer*. 査読有、巻なし、2011、電子版、DOI : 10.1002/cncr.27372
- ③ Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, Miyazono K. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J Biol Chem*. 査読有、Vol.286, No.48, 2011, pp.41434-41441, DOI : 10.1074/jbc.M111.300863
- ④ 藤堂具紀、稲生靖、悪性脳腫瘍の遺伝子治療、*BIO Clinica*、査読無、26 巻、4 号、2011、pp.33-37
- ⑤ Ogura M, Todo T, Tanaka M, Nannya Y, Ichikawa M, Nakamura F, Kurokawa M. Te mozolomide may induce therapy-related acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol*. 査読有、Vol.154, No.4, 2011, pp.663-665, DOI : 10.1111/j.1365-2141.2011.08641.x.
- ⑥ Muraguchi T, Tanaka S, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii T, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Ino Y, Todo T, Kuratsu J, Saya H, Hamada J, Hirao A. NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells by induction of oligodendroglial differentiation. *Cancer Res*. 査読有、Vol.71, No.3, 2011, pp.1135-1145, DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-10-2304
- ⑦ Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H. Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、Vol.108, No.30, 2011, pp.12384-12389, DOI : 10.1073/pnas.0906930108
- ⑧ 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*、査読無、29 巻、2 号、2011、pp.229-231
- ⑨ 稲生靖、藤堂具紀、悪性脳腫瘍のウイルス療法、*Biotherapy*、査読無、24 巻、6 号、2010、pp.443-447
- ⑩ Ino Y, Todo T. Clinical development of a third-generation oncolytic HSV-1 (G47Δ) for malignant glioma. *Gene Therapy and Regulation*. 査読有、Vol.5, No.1, 2010, pp.101-111
- ⑪ 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(増刊号 新時代の脳腫瘍学—診断・治療の最前線)*、査読無、68 巻、2010、pp.473-477
- ⑫ 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*、査読無、20 巻、7 号、2010、pp.798-806
- ⑬ 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*、査読無、40 巻、1 号、2010、pp.81-83
- ⑭ Fukuhara H, Homma Y, Todo T. Oncolytic virus therapy for prostate cancer. *Int. J. Urol*. 査読有、Vol.17, No.1, 2010, pp.20-30, DOI : 10.1111/j.1442-2042.2009.02383.x.
- ⑮ Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF-β signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell*. 査読有、Vol.5, No.5, 2009, pp.504-514, DOI : 10.1016/j.stem.2009.08.018.
- ⑯ 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*、査読有、

61 卷、7 号、2009、pp.442-446

- ⑰田中実、藤堂具紀、Low-grade glioma の治療オプションと放射線治療のタイミング、脳神経外科ジャーナル、査読無、18 巻、6 号、2009、pp.442-446
- ⑱Kamada K, Todo T, Ota T, Ino K, Masutani Y, Aoki S, Takeuchi F, Kawai K, Saito N. The motor-evoked potential threshold evaluated by tractography and electrical stimulation. J Neurosurg. 査読有、Vol.111、No.4、2009、pp.785-795、DOI : 10.3171/2008.9.JNS08414.
- ⑲Koga T, Morita A, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Shibahara J, Louis DN, Reifenger G, Itami J, Hara R, Saito N, Todo T. Long-term control of disseminated pleomorphic xanthoastrocytoma with anaplastic features by means of stereotactic irradiation. Neuro-Oncolog. 査読有、Vol.11、No.2、2009、pp.446-451、DOI : 10.1215/15228517-2008-112.

[学会発表] (計 14 件)

- ①藤堂具紀、Novel treatment – Oncolytic virus therapy、The 24<sup>th</sup> International Symposium in Tokyo “Malignant Brain Tumors: The present status and future prospects”、2011 年 11 月 23-25 日、東京
- ②藤堂具紀、稲生靖、悪性グリオーマのウイルス療法、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋
- ③藤堂具紀、稲生靖、A clinical study of a third-generation oncolytic HSV-1 (G47Δ) in patients with recurrent glioblastoma、第 17 回日本遺伝子治療学会、2011 年 7 月 15-17 日、福岡
- ④Todo T, Ino Y. Clinical development of a third-generation oncolytic HSV-1 (G47Δ) for recurrent glioblastoma. US-Japan Joint Seminars “Trends of gene & cell therapy as translational research in USA and Japan”、2011 年 7 月 14 日、福岡
- ⑤藤堂具紀、遺伝子組換えヘルペスウイルス G47Δ を用いたウイルス療法の開発、第 9 回遺伝子治療シンポジウム、2011 年 2 月 1 日、大阪
- ⑥藤堂具紀、悪性脳腫瘍のウイルス療法、第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会、2010 年 11 月 29 日、軽井沢
- ⑦藤堂具紀、稲生靖、第三世代 HSV-1 (G47Δ) を用いた再発膠芽腫に対するウイルス療法の臨床研究、第 48 回日本癌治療学会学術集会、2010 年 10 月 28-30 日、京都
- ⑧藤堂具紀、田中実、高橋雅道、斎藤邦昭、辛正廣、甲賀智之、武笠晃丈、斎藤延人、稲生靖、再発膠芽腫に対するウイルス療法：First-in-Man臨床研究の進捗状況、日本脳神経外科学会第69回学術総会、2010年10月

27-29日、福岡

- ⑨Todo T, Ino Y. Clinical development of a third-generation recombinant oncolytic HSV-1, G47Δ, for recurrent glioblastoma in Japan. The 18<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research and Therapy、2010年5月 17-20日、Travemuende, Germany.
- ⑩藤堂具紀、新たな治療の可能性（ウイルス療法）、第 30 回日本脳神経外科コンgres 総会、2010 年 5 月 7-9 日、横浜
- ⑪藤堂具紀、脳腫瘍のウイルス療法、第 14 回北海道脳腫瘍懇話会、2010 年 3 月 12 日、札幌
- ⑫藤堂具紀、我が国におけるウイルス療法の臨床開発、第 8 回遺伝子治療シンポジウム、2010 年 2 月 5 日、大阪
- ⑬藤堂具紀、遺伝子組換えヘルペスウイルスを用いたがんのウイルス療法の開発、第 5 回遺伝子治療推進産学懇話会、2009 年 9 月 24 日、東京
- ⑭藤堂具紀、稲生靖、脳腫瘍に対するウイルス療法開発に見る我が国のトランスレーショナルリサーチ、第 10 回日本分子脳神経外科学会、2009 年 9 月 19 日、岡山

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤堂 具紀 (TODO TOMOKI)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：80272566

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

稲生 靖 (INO YASUSHI)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：50372371  
福原 浩 (FUKUHARA HIROSHI)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20292948  
田中 実 (TANAKA MINORU)  
東京大学・医科学研究所・特任講師  
研究者番号：50332581