

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10137

研究課題名（和文）口腔癌骨浸潤に対するIL-12発現型第三世代がん治療用HSV-1の治療効果の検討

研究課題名（英文）Therapeutic efficacy of triple-mutated oncolytic HSV-1 armed with IL-12 for bone invasion in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

内橋 俊大 (Uchihashi, Toshihiro)

大阪大学・大学院歯学研究科・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）：口腔扁平上皮癌（OSCC）は骨浸潤を伴うことが多く、QOLを低下させ予後を悪化させる。また、IL-12は、破骨細胞の分化を抑制することが報告されている。本研究では、マウスIL-12発現型がん治療用HSV-1（T-mfIL12）の腫瘍増殖と骨吸収効果を評価した。その結果、T-mfIL12を投与したマウスの生存期間は、T-01（コントロールウイルス）を投与したマウスよりも有意に長く、マイクロCT解析では、T-01とは異なり、T-mfIL12はmockと比較して骨吸収を有意に抑制した。この結果は、T-mfIL12がOSCC患者の骨浸潤を抑制し、腫瘍の進行抑制に有用であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の顎骨浸潤に対しては、顎骨切除を主とした外科的治療が標準治療であるが、超高齢化社会の現在、適応できない患者も多く、また外科的切除後のQOLの低下は著しく非侵襲的治療が切望されている。IL-12発現型がん治療用HSV-1（T-mfIL-12）は本邦で悪性黒色腫に対する臨床試験が行われており、目覚ましい効果を得ている。悪性黒色腫と同じく、視診触診可能な口腔癌に対して、T-mfIL-12は投与しやすいと考えられ、本研究成果より、IL-12の持つ抗腫瘍免疫賦活化効果に加え、骨吸収抑制効果が加わることにより、T-mfIL-12は強力な非侵襲的治療法に近い将来なり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：OSCC is frequently associated with bone invasion, which lowers the quality of life and worsens prognosis. IL-12, a well-known immunostimulatory cytokine, has been shown to suppress osteoclast differentiation in vitro. In this study, we evaluated the suppression effect of an oncolytic HSV-1 armed with murine IL-12 (T-mfIL12) on tumor growth and bone resorption in C3H/He mice with orthotopic OSCC. This model shows gradual mandibular bone invasion mimicking the clinical settings. T-mfIL12 or T-01 ( $5.0 \times 10^5$  pfu) was administered into the formed mass adjacent to the mandibular periosteum 7 days after SCCVII implantation. T-mfIL12-treated mice had significantly longer survival than those treated with T-01. Micro-computed tomography showed that T-mfIL12, unlike T-01, significantly suppressed the bone resorption compared with mock. The results suggest that IL-12 expressing oncolytic HSV-1 may be useful for suppressing bone invasion as well as inhibiting tumor progression in OSCC patients.

研究分野：口腔癌のウイルス療法

キーワード：がんウイルス療法

### 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、近年増加傾向にある。進行口腔癌、特に下顎骨肉癌は、その解剖学的特徴から比較的速やかに下顎骨へ進展、骨破壊をきたし、病的骨折に伴う摂食障害や疼痛により QOL を大きく低下させるだけでなく、骨破壊の進展は遠隔転移や生命予後と密接に関係する。現在手術を中心とした集学的治療が行われているが、制御率は未だ不十分であり、手術療法による顎顔面の器質的欠損、放射線療法に後発する放射性顎骨骨髓炎などに起因する QOL の著しい低下を伴う。それ故、進行口腔癌を、顎骨浸潤部を含めて非侵襲的に制御し得る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。

近年、ウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変し、癌細胞で選択的に複製するよう作製された種々のウイルスが開発されている。がん治療用ウイルスは、癌細胞に感染すると複製し、宿主の癌細胞を死滅させる。複製したウイルスは周囲の癌細胞に感染し、複製→細胞死→感染を繰り返して抗腫瘍効果を示す。東京大学医科学研究所先端がん治療分野・藤堂具紀教授は、第二世代の遺伝子組み換え HSV-1 (G207) を改良し、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)。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、G47Δ は東京大学医科研病院において膠芽腫に対して医師主導治験が行われ、一年生存割合が92.3% (13例中12例が治療開始後1年以上生存)と標準治療の1年生存割合15%に比べ格段に向上しなおかつ高い安全性を認め、膠芽腫の新規治療薬として承認が近づいている。また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、高い抗腫瘍効果および舌投与時の安全性を示すことがこれまでの研究で明らかになり (図1; 応募者 unpublished data)、他の癌種への適応拡大を目指している。一方 IL-12 は、それ自体が高い抗腫瘍効果を有するだけでなく、INF-γ の発現を介して破骨細胞の形成を抑制する作用を持つ。悪性腫瘍による骨破壊は、腫瘍細胞により直接的に生じるわけではなく、破骨細胞の形成誘導により生じることが知られている。このことから破骨細胞の分化形成を抑制する IL-12 は、口腔癌の進行に伴う骨浸潤に対して効果的に作用することが期待できる一方、これまでの臨床応用における結果から、その全身投与による致死的な有害事象が問題となる。そこで、任意の外来遺伝子を G47Δ の基本骨格に組み込むことができる T-BAC システム (Fukuhara H, Todo T et al. Cancer Res, 2005) を用いて開発された、マウス IL-12 発現型ウイルス (T-mfIL-12) を腫瘍顎骨浸潤部局所で発現させることで、全身の有害事象のリスクを抑えながら優れた抗腫瘍効果さらに骨吸収抑制効果を示すのではないかと考えた。T-mfIL-12 は、既にマウス皮下腫瘍モデルにおいてコントロールウイルスである T-01 (T-BAC システムを用いて作成した G47Δ と同様の機能を有するウイルス) に比して有意に腫瘍抑制効果を示し、また舌への接種による安全性試験において、極めて高い安全性を示しており、マウス顎骨浸潤モデルを用いた場合にも同様の抗腫瘍効果を示し、さらに骨吸収抑制効果を発揮するのかが検討する。

### 2. 研究の目的

G47Δをはじめとするウイルス療法は、審美的・機能的側面を考慮しながら治療する必要のある口腔癌において、非常に有効な非侵襲的治療になると期待される。これまであらゆる固形癌に対する前臨床試験が行われているが、癌の浸潤転移の場として非常に重要である骨に対する抗腫瘍効果や組織的評価などは未だに行われていない。本研究においては、免疫正常マウスの顎骨浸潤モデルを用いて、T-mfIL-12 の抗腫瘍効果および骨吸収抑制効果を、μCT を用いて経時的、3次元的新規計測法により評価することに独自性があると考えられる。また、T-mfIL-12 は癌細胞へ感染する度に IL-12 を発現するため、ウイルスによる顎骨浸潤部の癌細胞の直接破壊に加えて、IL-12 の持つ破骨細胞の成熟抑制および apoptosis 誘導により骨吸収抑制効果を強く発揮するのではないかと考える。口腔癌骨浸潤先端で IL-12 が持続的に発現することは、QOL を維持しながら口腔癌の顎骨浸潤を効率よく制御する新規治療法となり得るのではないかと考えた。

### 3. 研究の方法

これまで、まず予備実験として recombinant IL-12 (以下 rIL-12) 製剤のマウス顎骨浸潤モデルへの効果を検討した。顎骨浸潤モデルは C3H マウスの左側咬筋部に C3H マウス由来口腔扁平上皮癌細胞である SCCVII を接種して作成し、μCT で経時的に確認すると骨破壊を来すことが確認できた。このモデルにおいて  $5 \times 10^5$  の SCCVII 接種7日後から rIL-12 およびコントロールとして PBS を7日間連続で腫瘍内投与し、腫瘍体積および下顎骨吸収量を経時的に測定したうえで生存期間を検討したところ、rIL-12 は有意な腫瘍増大抑制効果および骨吸収抑制効果を認め、生存期間の延長傾向を認めた。本実験では骨吸収

を計測するにあたり  $\mu$ CT 撮像し、右側下顎骨体積 (腫瘍非接種側) から左側下顎骨体積 (腫瘍接種側) を減じた値を骨吸収量とした。本実験結果より、IL-12 の連側投与は抗腫瘍効果のみならず顎骨浸潤 (骨吸収) の抑制に有効であると言える。そこで T-mfIL-12 は一度の投与でも、強力な直接的殺細胞効果を発揮するのに加え、rIL-12 の際に生じていた抗癌作用および骨吸収抑制効果を継続的に発揮することができるのではないかと考えた。この仮説に基づき、SCCVII 顎骨浸潤モデルにおける T-mfIL-12 (T-01, mock と比較) の腫瘍内単回投与腫瘍増大抑制効果、骨吸収抑制効果および生存期間延長効果を確認する。また同時に T-mfIL-12 (T-01, mock) 投与後の腫瘍を摘出し、骨吸収抑制効果の機序の検討のために、骨浸潤部の破骨細胞の TRAP 染色、q-PCR および ELISpot assay にて骨代謝関連因子の解析、すなわち mRNA (ACP5, CTSK, INF- $\gamma$ , Fas, FasL) 発現量、および INF- $\gamma$  産生量、産生細胞数の割合の検討を行う。T-mfIL-12 は、免疫正常能を持つマウスで著明な抗腫瘍効果を示すことがこれまでの *in vivo* の実験で明らかとなっている。すなわち、ヌードマウスにおいて同様の効果を T-mfIL-12 が示すかを本マウスモデルで確認し、特に T 細胞の活性化サイトカインである INF- $\gamma$ ・FasL について検討することで、骨吸収抑制効果の機序に T 細胞がいかに関わっているかを検討する。

#### 4. 研究成果

In vitro では、SCCVII 細胞に対する T-mfIL-12 の細胞障害作用は、コントロールウイルスである T-01 と同等であった。上記顎骨浸潤モデルにおいて、SCCVII 移植の 7 日後に、下顎骨骨膜に隣接する形成瘤に T-mfIL12 または T-01 ( $5.0 \times 10^5$  pfu) を投与した。T-mfIL12 を投与したマウスの生存期間は、T-01 を投与したマウスよりも有意に長かった。 $\mu$ CT 撮影結果より、T-01 とは異なり、T-mfIL12 は mock と比較して骨吸収を有意に抑制した。この結果より、IL-12 発現型がん治療用 HSV-1 が OSCC 患者の骨浸潤を抑制し、腫瘍の進行を抑制するのに有用であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takahashi Kazuki, Podyma-Inoue Katarzyna A., Saito Maki, Sakakitani Shintaro, Sugauchi Akinari, Iida Keita, Iwabuchi Sadahiro, Koinuma Daizo, Kurioka Kyoko, Konishi Toru, Tanaka Susumu, Kaida Atsushi, Miura Masahiko, Hashimoto Shinichi, Okada Mariko, Uchihashi Toshihiro, Miyazono Kohei, Watabe Tetsuro	4. 巻 40
2. 論文標題 TGF- generates a population of cancer cells residing in G1 phase with high motility and metastatic potential via KRTAP2-3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111411 ~ 111411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111411	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 Fujibayashi Emi, Mukai Satomi, Torigata Kosuke, Ando Yumi, Uchihashi Toshihiro, Nozaki Masami, Tanaka Susumu, Okada Masato, Kogo Mikihiro, Nojima Hiroshi, Yabuta Norikazu	4. 巻 12
2. 論文標題 LATS kinases and SLUG regulate the transition to advanced stage in aggressive oral cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12363-12363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16667-5	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 Uchihashi Toshihiro, Nakahara Hirokazu, Fukuhara Hiroshi, Iwai Miwako, Ito Hirotaka, Sugauchi Akinari, Tanaka Minoru, Kogo Mikihiro, Todo Tomoki	4. 巻 22
2. 論文標題 Oncolytic herpes virus G47 injected into tongue cancer swiftly traffics in lymphatics and suppresses metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 388 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2021.06.008	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 Seki Soju, Tanaka Susumu, Hara Takayuki, Nishimura Nao, Oya Kaori, Uchihashi Toshihiro, Hiraoka Shinichiro, Hamaguchi Munehiro, Kogo Mikihiro	4. 巻 33
2. 論文標題 A case of sclerosing odontogenic carcinoma	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 592 ~ 598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2021.03.008	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 Inubushi Toshihiro, Fujiwara Ayaka, Hirose Takumi, Aoyama Gozo, Uchihashi Toshihiro, Yoshida Naoki, Shiraiishi Yuki, Usami Yu, Kurosaka Hiroshi, Toyosawa Satoru, Tanaka Susumu, Watabe Tetsuro, Kogo Mikihiro, Yamashiro Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Ras signaling and RREB1 are required for the dissociation of medial edge epithelial cells in murine palatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	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) 10.1242/dmm.049093	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 Kodama Shingo, Podyma-inoue Katarzyna, Uchihashi Toshihiro, Kurioka Kyoko, Takahashi Hitomi, Sugauchi Akinari, Takahashi Kazuki, Inubushi Toshihiro, Kogo Mikihiro, Tanaka Susumu, Watabe Tetsuro	4. 巻 46
2. 論文標題 Progression of melanoma is suppressed by targeting all transforming growth factor isoforms with an Fc chimeric receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	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) 10.3892/or.2021.8148	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 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 15
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 1426 ~ 1431
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 Usta Sena Zeynep, Uchihashi Toshihiro, Kodama Shingo, Kurioka Kyoko, Inubushi Toshihiro, Shimooka Takuya, Sugauchi Akinari, Seki Soju, Tanaka Susumu	4. 巻 24
2. 論文標題 Current Status and Molecular Mechanisms of Resistance to Immunotherapy in Oral Malignant Melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17282 ~ 17282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242417282	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 Seki Soju, Kitaoka Yoshihiro, Kawata Sou, Nishiura Akira, Uchihashi Toshihiro, Hiraoka Shin-ichiro, Yokota Yusuke, Isomura Emiko Tanaka, Kogo Mikihiro, Tanaka Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Characteristics of Sensory Neuron Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): Potential for ALS Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2967 ~ 2967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11112967	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 Teranishi Ryugo, Yamamoto Kazuyoshi, Kurokawa Yukinori, Uchihashi Toshihiro, Sugauchi Akinari, Tanikawa Chihiro, Kubo Kosuke, Takahashi Tsuyoshi, Saito Takuro, Momose Kota, Yamashita Kotaro, Tanaka Koji, Makino Tomoki, Nakajima Kiyokazu, Isomura Emiko Tanaka, Eguchi Hidetoshi, Doki Yuichiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Oral frailty is a risk factor for body weight loss after gastrectomy: a single-center, retrospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1625 ~ 1632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-023-02413-y	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内橋俊大, 須河内昭成, 日尾清太郎, 田中晋, 藤堂具紀.
2. 発表標題 第三世代がん治療用HSV-1 を用いた口腔・食道重複癌に対する新規治療アプローチの開発.
3. 学会等名 第38回 歯科医学を 中心とした総合的な研究を推進する集い.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内橋俊大 藤堂具紀
2. 発表標題 ～がん微小環境の理解から迫る革新的治療法開発への試み～ 第三世代がん治療用HSV-1 G47 を用いた 低侵襲口腔がん治療の開発
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会学術総会学術大会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	犬伏 俊博  (Inubushi Toshihiro)  (30550941)	大阪大学・歯学部附属病院・講師   (14401)	
研究 分担者	伊藤 博崇  (Ito Hirotaka)  (30863815)	東京大学・医科学研究所・助教   (12601)	

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