

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 13 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23701109

研究課題名(和文)脳腫瘍に対する腫瘍融解ウイルス治療の免疫学的側面の検討

研究課題名(英文)Examination for immunological effects of oncolytic Sendai virus on malignant brain tumor

研究代表者

長谷川 祐三 (Hasegawa, Yuzo)

千葉県がんセンター(研究所)・医療局 脳神経外科・医長

研究者番号：60436409

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)：インターフェロン 搭載ウロキナーゼ標的腫瘍融解ウイルスBioKnife- IFN が悪性脳腫瘍治療で直接的な抗腫瘍効果以外に免疫賦活作用を有するか検討した。BioKnife特にBioKnife- IFN 感染腫瘍細胞との共培養で樹状細胞は成熟化し抗腫瘍免疫系を活性化させる腫瘍壊死因子 およびインターロイキン12を大量に分泌した。またBioKnife感染に伴い感染細胞・非感染細胞ともに腫瘍適合抗原クラスIの発現レベルが上昇し、BioKnife- IFN 感染で顕著だった。これらに伴う細胞障害性T細胞の誘導はラット脳腫瘍モデルを用いて実際に生体内でもBioKnife- IFN 群のみで確認された。

研究成果の概要(英文)：Malignant brain tumor is highly invasive and intractable. Urokinase-targeted oncolytic Sendai virus vector, "BioKnife", is one of promising new therapeutic tools that possesses powerful oncolytic ability, we previously reported. We examined for immunological effects of this BioKnife armed interferon, "BioKnife-IFN" in this study. Dendritic cells secreted high level of tumor necrotic factor and interleukin-12 when they were cultured with 9L tumor cells infected by BioKnife, especially BioKnife-IFN. Rat malignant brain tumor cell line, 9L, is usually expresses low level of major histocompatibility complex class I and expression of this antigen was increased by BioKnife, especially BioKnife-IFN. This effect was not only observed in infected tumor cells but also non-infected cells, interestingly. Induction of cytotoxic T cells was actually detected in rats bearing brain tumor treated with BioKnife-IFN. This immuno-modulating BioKnife-IFN is very promising.

研究分野：Neurological surgery

キーワード：Oncolytic virus Glioblastoma dendritic cells gene therapy immunotherapy

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍は浸潤性に発育し、局所制御さえ困難で2年生存することが稀な予後不良な疾患である¹⁾。悪性腫瘍の基本的な標準治療は手術・化学療法・放射線療法であるが、悪性脳腫瘍に対して効果が立証された化学療法はごくわずかで新規治療法の開発が囑望されている²⁾。抗腫瘍ウイルス治療・遺伝子治療・免疫治療などが次世代の治療として期待されているが、我々は悪性脳腫瘍の主要な浸潤メカニズムの一つであるウロキナーゼ(uPA)をターゲットとした腫瘍融解ウイルス BioKnife(uPA 特異的腫瘍融解型センダイウイルスベクター)を用いて、その直接的な腫瘍細胞障害による抗腫瘍効果をこれまでの実験で実証している³⁾。

2. 研究の目的

インターフェロン β (IFN β) を搭載した BioKnife- IFN β は腫瘍内で大量の IFN β を産生する遺伝子治療ベクターとしての側面もあり、またウイルス感染・局所での IFN β 産生・腫瘍融解による腫瘍抗原の漏出は宿主免疫を賦活することが予想され免疫治療としての可能性も有すると考えられる。今回我々は、効率的な抗原提示を行い免疫機能のキーとなる樹状細胞に着目し、BioKnife- IFN β 感染が樹状細胞に与える影響を中心に、腫瘍融解ウイルス治療における免疫学的側面の検討を行った。

3. 研究の方法

・センダイウイルスベクター

治療用のウイルスベクターとして BioKnife, BioKnife-IFN β を用いた。コントロールベクターとして M 欠失型センダイウイルスベクター (dMSeV) を用いた。dMSeV はエンペロープを裏打ちする M タンパクをコードする RNA を欠失させており、細胞感染しても感染能力のあるウイルス粒子を産生しない

ため二次感染をきたさず、細胞障害も軽度である。BioKnife は dMSeV の F タンパクをウロキナーゼで活性化するように改変した腫瘍融解ウイルスベクターで、悪性腫瘍のように高濃度のウロキナーゼ存在下において感染細胞表面に蓄積したウイルス由来の F タンパクが活性化することで感染細胞と近接する未感染細胞が融合し、未感染細胞の細胞質内にウイルス RNA が移行することで巨細胞化しつつ感染が伝播し細胞死を誘発する。

・樹状細胞培養

ラットの骨髄細胞を採取し顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) およびインターロイキン 4 (IL-4) 存在下に、浮遊するリンパ球を適宜除去しながら 8-13 日培養して樹状細胞を採取した。

・フローサイトメトリーによる腫瘍細胞および樹状細胞の表面抗原測定

腫瘍細胞上の主要組織適合抗原 (MHC) クラス I および樹状細胞上の MHC クラス II と樹状細胞に特徴的な表面抗原 (CD80, CD86, CD54, CD11) の発現レベルをフローサイトメーターを用いて測定した。

・ELISA による樹状細胞の分泌サイトカイン測定

樹状細胞の成熟化の度合を判別するために、細胞障害性 T 細胞 (CTL) への分化を誘導する分泌サイトカインである腫瘍壊死因子 α (TNF- α) とインターロイキン 12 (IL-12) を ELISA 法で測定した。

・細胞障害性 T 細胞アッセイ

脳内に腫瘍細胞を注射したラットの 1・4・7 日後に IFN β 及び各種センダイウイルスベクターを腫瘍内投与し、14 日後にラット脾臓から脾臓細胞を取り出した。これを腫瘍細胞と共培養して細胞障害性 T 細胞の細胞障害性を

測定した。

4. 研究成果

<結果>

・骨髄由来樹状細胞の培養

骨髄細胞を GM-CSF と IL-4 存在下に培養し、樹状細胞に特徴的な表面抗原を 8・10・13 日目に確認した。8 日目では CD54 と CD11 と MHC クラス II の発現を認めたが、ナイーブ T 細胞を活性化させる際に必要な補助シグナル分子である CD80 と CD86 の発現は低かった。10 日目では CD80 と CD86 の発現を認めるようになり、他の表面抗原の発現レベルもさらに上昇していた。13 日目は 10 日目と各種抗原の発現傾向は大きな差を認めなかったが、特に MHC クラス II の発現がさらに上昇していた。以降の樹状細胞を用いた実験では、培養 10 日目の樹状細胞を使用した。

・センダイウイルスベクター感染腫瘍細胞と樹状細胞の共培養

培養 10 日目の樹状細胞と腫瘍細胞を共培養して樹状細胞の表面抗原の発現レベルの変化と分泌サイトカイン量の測定を行った。腫瘍細胞は未感染・dMSeV 感染・BioKnife 感染・BioKnife-IFN β 感染の群をつくり、感染翌日の腫瘍細胞と作成 10 日目の樹状細胞を 2 日間 GM-CSF 下に共培養した。腫瘍細胞との共培養によって成熟化した樹状細胞では CD80 と CD86 の発現は低下傾向ながら大きな差はなく、残りの表面抗原は明らかに発現レベルが低下しており、特に MHC クラス II で顕著であった。センダイウイルスベクターの差異による各種群間比較では明らかな差は認めなかった。

それに対して成熟樹状細胞が分泌するサイトカイン量は群間による明らかな差を認めた。TNF- α は BioKnife-IFN β 群で最も分泌量が多く、他の群間は差を認めなかった。IL-12 も BioKnife-IFN β 群で最も分泌量が多

く、未感染、dMSeV、BioKnife、BioKnife-IFN β と発現レベルが順番に増していた。

・腫瘍細胞表面の MHC クラス I の発現レベルの測定

まず各種ヒトおよびラットの腫瘍細胞表面の MHC クラス I の発現レベルを測定した。それぞれのセルラインにおける MHC クラス I の発現はまちまちであった。その他の実験で主に使用するラット悪性脳腫瘍細胞 9L の MHC クラス I 発現は非常に低レベルであった。

次に 9L を用いて IFN β タンパク投与および dMSeV 感染・BioKnife 感染・BioKnife-IFN β 感染 2 日後の MHC クラス I 発現レベルを同様に測定した。IFN β タンパク濃度に比例して MHC クラス I の発現レベルは上昇したが、50,000U/mL においてもその発現レベルは 2 倍程度にとどまった。dMSeV および BioKnife 感染でも同程度の発現レベル上昇が認められ、特に BioKnife-IFN β では 6 倍近い発現レベルの上昇を認めた。さらに dMSeV 感染において感染細胞と非感染細胞にわけて MHC クラス I の発現レベルを測定したところ、感染細胞だけでなく非感染細胞でも同等に発現レベルが上昇していることがわかった

・細胞障害性 T 細胞アッセイ

ラット脳腫瘍モデルを用いて、腫瘍融解ウイルス治療が細胞障害性 T 細胞の分化を誘導するか調べた。悪性脳腫瘍担癌ラットに腫瘍作成後 1・4・7 日で IFN β タンパクおよび dMSeV・BioKnife・BioKnife-IFN β の腫瘍内投与を行いさらに 1 週間後に脾臓を取り出し脾細胞を腫瘍細胞と共培養して細胞障害性を有するか検討した。BioKnife-IFN β 群においてのみ腫瘍細胞障害を認め、細胞障害性 T 細胞の誘導が確認された。

<考察>

腫瘍融解ウイルスである BioKnife は感染した細胞内で、細胞膜を融解する F タンパクを産生し、近隣の非感染細胞と融合することで感染を拡大し、最終的にアポトーシスをきたし感染細胞が死滅することで抗腫瘍効果を発揮する。この細胞融合は腫瘍の浸潤に関与するウロキナーゼ存在下にのみ発生するため正常細胞では感染が成立しても細胞融合をきたさず毒性をもたない。また感染能力のある娘ウイルスは産生されず、細胞質内でウイルス RNA およびタンパクは合成されるため遺伝毒性も有しない優れたウイルスベクターである。腫瘍融解による直接的な抗腫瘍効果はセルフリミッティングで感染から限られた期間しか効力を有しないが、ウイルス感染それ自体および、融合細胞死滅に伴う腫瘍抗原の細胞外漏出・BioKnife-IFN β が搭載し局所に過剰発現される IFN β が宿主の抗腫瘍免疫賦活に有用であるとの仮説のもとに一連の実験を行った。

まずウイルスベクターを感染させた腫瘍細胞と樹状細胞を共培養させた実験で、成熟樹状細胞の表面抗原の発現度合は差はないものの分泌 TNF- α および IL-12 は BioKnife-IFN β 感染群で顕著に認められることを示した。直接的な細胞融解と局所の IFN β の上昇は樹状細胞の腫瘍抗原取り込み・成熟化に効率的に寄与することが示唆された。樹状細胞の成熟化によってヘルパー T 細胞が活性化され細胞障害性 T 細胞が誘導されたとしても、細胞障害性 T 細胞が腫瘍を認識しその障害性を発揮するには腫瘍表面の MHC クラス I の存在が必須である。細胞表面上の MHC クラス I の発現レベルを低下させることは悪性腫瘍が宿主免疫から逃れる主要な手段の一つで、実際実験で使用した悪性脳腫瘍細胞 9L も他のセルラインに比して著明に MHC クラス I の発現レベルが低下し

ていた。しかしながら腫瘍細胞へのセンダイウイルス感染は MHC クラス I の発現レベルを上昇させ、特にこの効果は非感染細胞においても同様に認められた。さらに BioKnife-IFN β では dMSeV および BioKnife に比してさらに高レベルに MHC クラス I の発現が見られた。このように BioKnife-IFN β は直接的な抗腫瘍効果に加え、免疫を賦活する作用を有し、さらに細胞障害 T 細胞の効果発現にも関与していた。またラット脳腫瘍モデルにおいて BioKnife-IFN β 治療によって生体内でも実際に細胞障害性 T 細胞が誘導されることを確認し、直接的な抗腫瘍効果と相まって高い治療効果を得ていることが確認された。

悪性脳腫瘍の標準治療は最大限の摘出とそれに続く放射線化学療法である。他部位の癌と異なり、脳機能は局在しており、局所の機能悪化に伴う片麻痺や失語といった神経症状が日常生活能力を大幅に低下させる。そのため腫瘍浸潤を含む正常組織であるサージカルマージンをつけた摘出が行えず、腫瘍本体をくり抜くような手術となる。必然的に浸潤腫瘍が残存することとなり局所コントロールさえ困難でそれが難治の原因の一つとなっている。我々は腫瘍融解ウイルスである BioKnife-IFN β を手術摘出後に摘出腔に直接投与することを想定している。それにより摘出できなかった残存浸潤細胞への治療が可能となる。投与された BioKnife-IFN β は非感染腫瘍細胞にも感染を拡大し効果を発揮する。また腫瘍発生局所での免疫賦活に加担し、腫瘍摘出から放射線化学療法までの治療期間の空白を埋め、さらに免疫が活性化された状態での放射線化学療法の効果増大も期待される。このように基準の標準治療と併存する形で BioKnife-IFN β 治療が行えるのは大きな利点であり、これにより標準治療を行っても生存期間が 2 年を超えない難治疾患の治療の一助となれば望外の幸せである。

<引用文献>

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-996.
2. Chinot OL, de La Motte Rouge T, Moore N, et al. AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv Ther.* 2011;28:334-340.
3. Hasegawa Y, Kinoh H, Iwadate Y, et al. Urokinase-targeted fusion by oncolytic Sendai virus eradicates orthotopic glioblastomas by pronounced synergy with interferon-beta gene. *Mol Ther.* 2010;18:1778-1786

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 11 件)

- ・長谷川祐三 他。経鼻的内視鏡下経蝶形骨洞手術—Cadaver を用いた外科解剖の提示—日本内分泌学会雑誌 査読無し 83 Suppl. 28-30, 2007
- ・長谷川祐三 他。脳血管炎を伴う高安大動脈炎により出血性脳梗塞を発症した3歳男児の1例 査読有り 脳卒中 30 (4): 593-599, 2008
- ・長谷川祐三 他。CI 研究 査読有り 30 (1): 23-27, 2008 Multi-detector CT を用いた内視鏡下経鼻の経蝶形骨洞手術に必要な鼻腔・頭蓋底解剖
- ・Hasegawa Y et al. Urokinase-Targeted Fusion by Oncolytic Sendai Virus Eradicates Glioblastomas by Pronounced Synergy With Interferon-beta Gene

Mol Ther 査読有り 18 (10): 1778-1786, 2010

・Hasegawa Y et al. Comparison of Intensity Modulated Radiotherapy and Dynamic Three-Dimensional Conformal Radiotherapy With Regard to Dose Distribution and Sparing of Oargans at Risk *Neurol Med Chir (Tokyo)* 査読有り 51 (5): 349-55, 2011

・Iuchi. T, Shingyoji M, Sakaida T, Hatano K, Nagano O, Itakura M, Kageyama H, Yokoi S, Hasegawa Y, et al. T. Phase II trial of gefitinib alone without radiation therapy for Japanese patients with brain metastasis from EGFR-mutant lung adenocarcinoma *Lung Cancer* 査読有り 82(2): 282-7 2013

・Iuchi T, Hatano K, Kodama T, Sakaida T, Yokoi S, Kawasaki K, Hasegawa Y, et al. Pahse 2 trial of hypofractionated high-dose intensity modulated radiation therapy with concurrent and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 査読有り 88(4): 793-800 2014

・Iuchi T, Kuwabara K, Matsumoto M, Kawasaki K, Hasegawa Y, et al. Levetiracetam versus phenytoin for seizure prophylaxis during and early after craniotomy for brain tumors: a phase II prospective, randomised study *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 査読有り 86(10): 1158-62 2015

・Iuchi T, Shingyoji M, Itakura M, Yokoi S, Moriya Y, Tamura H, Yoshida Y, Ashinuma H, Kawasaki K, Hasegawa Y, et al. Frequency of brain metastases in non-small-cell lung cancer and their association with epidermal growth factor receptor mutations *Int J Clin Oncol* 査読有り 20(4): 674-9 2015

・Iuchi T, Hasegawa Y, et al. Epilepsy in patients with gliomas: incidence and control of seizures *J Clin Neurosci* 査読有り 22(1): 793-800 2015

・ Iuchi T, Hatano K, Uchino Y, Itami M, Hasegawa Y, et al. Methionine Uptake and Required Radiation Dose to Control Glioblastoma Int J Radiat Oncol Biol Phys 査読有り 93(1): 133-40 2015

〔学会発表〕(計 12 件)

When may temozolomide be completed? A role of [11-C]-Methionine Positron Emission Tomography in the treatment of patients with gliomas

ECCO16, ESMO36 and ESTRO30 (The European Multidisciplinary Cancer Congress 2011), 23-27 SEPTEMBER 2011

悪性星状細胞腫テモゾロミド治療再発例に対する治療戦略

日本脳神経外科学会第 70 回学術総会

2011 年 10 月 12-14 日

グリオブラストーマに対するインターフェロンベータ搭載腫瘍融解型センダイウイルスベクター BioKnife-IFNb の効果

第 43 回ニューロオンコロジーの会

2012 年 4 月 7 日

Antiepileptic and Antitumoral effects of Levetiracetam in Patients With Malignant Tumors

European Conference of Oncology Pharmacy, 27-29 September 2012

悪性星状細胞腫治療における宿主の免疫機構が放射線壊死の発生に与える影響の検討

第 71 回日本脳神経外科学会総会

2012 年 10 月 17-19 日

The influence of tumor-infiltrating lymphocytes on radiation necrosis in the patients with malignant astrocytoma

European Society for Therapeutic Radiology and Oncology Forum 2013

19-23 April 2013

脳内留置剤カルムスチンウエハーが抽出

腔及び脳浮腫に与える影響の検討第

18 回脳腫瘍の外科学会

2013 年 9 月 19-20 日

腫瘍倍加時間に着目した診断時 MRI による神経膠芽腫患者の予後予測

第 72 回日本脳神経外科学会

2013 年 10 月 16-18 日

ギリアデル留置後の髄液循環障害を伴う遅発性髄膜炎

第 46 回ニューロオンコロジーの会

2014 年 1 月 25 日

担癌患者の脳卒中

Stroke 2014

2014 年 3 月 13-15 日

The influence of tumor-infiltrating lymphocytes and macrophages on radiation necrosis in the patients with malignant astrocytoma

ASNO 2014 11th Meeting of the Asian Society of NeuroOncology, 11-14 September 2014

BCNU ウエハー留置後髄膜炎

第 73 回日本脳神経外科学会

2014 年 10 月 9-11 日

〔図書〕(計 件): なし

〔産業財産権〕: なし

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 祐三 (YUZO HASEGAWA)

千葉県がんセンター(研究所)・医療局 脳神経外科・医長

研究者番号: 60436409