

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390453

研究課題名(和文) 腫瘍融解性ウイルスを用いた扁平上皮癌に対する免疫療法

研究課題名(英文) Immunotherapy for squamous cell carcinoma with oncolytic virus

研究代表者

由良 義明 (YURA, YOSHIAKI)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00136277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍融解性ウイルス療法はウイルス感染によって腫瘍細胞を破壊する治療法である。腫瘍融解性単純ヘルペスウイルス1型RH2が扁平上皮癌に対して腫瘍免疫を増強する可能性について検討した。近交系マウス背部で両側性に腫瘍を形成し、一側にRH2を投与すると非投与側の腫瘍も増殖が抑制された。RH2感染によってdamage-associated molecular patterns (DAMPs)が産生された。感染細胞の培養上清には樹状細胞とT細胞を活性化する因子が認められ、プロテオーム解析でDAMPsの存在が確認された。RH2はDAMPsを介して腫瘍免疫の増強に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oncolytic virotherapy is based on the ability of virus to destroy tumor cells. We investigated whether the oncolytic herpes simplex virus type 1 (HSV-1) RH2 exerted an enhancing effect on tumor immunity for squamous cell carcinoma. In a bilateral tumor model with synergistic mice, tumors in one side were injected with RH2 and other side tumors left untreated. The growth of tumors of RH2-treated animals was reduced in both sides than that in untreated mice, indicating the enhancement of tumor immunity by RH2. In RH2-infected SCC cells, damage-associated molecular patterns (DAMPs) were produced. Proteome analysis revealed the presence of DAMPs in the supernatants of RH2-infected cells. These results indicate that RH2 stimulates tumor immunity through the function to produce immunogenic proteins including DAMPs.

研究分野：口腔外科学

キーワード：腫瘍融解性ウイルス療法 単純ヘルペスウイルス1型 扁平上皮癌 腫瘍免疫 オートファジー 免疫細胞 プロテオーム解析

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍融解性ウイルス療法は弱毒化した複製可能型ウイルスを癌細胞に感染させ、その細胞変性効果で腫瘍を破壊する治療法である。この治療では、ウイルスは直接的な殺細胞効果を示すだけでなく腫瘍免疫も肺活化するとされている。単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)は臨床研究で進展悪性黒色腫に対する効果がみられたことから、2015年10月に米国FDAによって治療薬として認可されている。頭頸部癌に対してHSV-1を用いたPhase I/IIの研究も行われている。われわれは、新規の腫瘍融解性HSV-1として神経毒性遺伝子を欠失したR849株と自然変異体HF株から組換え体ウイルスRH2を作製し、遺伝子構造を決定した。

## 2. 研究の目的

腫瘍融解性ウイルスとして、2種類の変異型HSV-1株から、神経毒性がなくしかも口腔扁平上皮癌(SCC)で細胞融合を形成する組換え体ウイルスRH2を作製し、ヒトSCCに対する抗腫瘍活性を明らかにしてきた。本研究では、近交系マウスを用いてHSV-1RH2のSCCに対する腫瘍免疫の増強効果を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞におけるHSV-1 RH2 感染

細胞として、CH3/He系マウス由来の皮膚SCC細胞株であるSCCVIIを用いる。さらに、マウスの肉腫NFSa細胞、NK細胞に感受性が高いYAC-1細胞、ヒト舌癌由来のSAS細胞を用いる。ウイルスはHSV-1のRH2である。

### (2) 担癌マウスの作成

近交系の5週齢メスC3H/HeJclマウスの背部皮下にSCCVII細胞を接種して腫瘍を形成する。

### (3) 免疫細胞の調整と機能

脾臓からLympholyte®-Ratにて脾臓リンパ

球を回収する。分画にはCD4あるいはCD8抗体磁気ビーズを用いる。脾臓リンパ球、CD4<sup>+</sup>T細胞除去リンパ球、CD8<sup>+</sup>T細胞除去リンパ球をフローサイトメトリーで解析する。

### (4) 生細胞率と細胞傷害性の測定

MTT法で対照に対する比率から生細胞率を算出する。Lactate dehydrogenase (LDH) release assayにて細胞傷害性を測定する。

### (5) damage-associated molecular patterns (DAMPs)の検出

DAMPsとされるATP、high mobility group box 1 protein (HMGB1)、calreticulin (CRT)のうち、ATPはENLITEN ATP Assay Systemで発光させルミノメーターにて蛍光度を測定する。HMGB1はHMGB1 ELISA Kit IIを用いて測定する。CRTの細胞表面への移行は抗CRT抗体を用いた蛍光抗体法にて観察する。アポトーシスはannexin V-FITCおよびPIにて染色後FACS Calibur flow cytometerを用いて解析する。アポトーシスに伴って増加するactive caspase-3はActive Caspase-3 Immunoassayを用いて測定する。

### (6) オートファジーの検出

オートファゴソーム形成に必要なLC3の細胞内局在は、蛍光抗体法にて観察する。LC3-IからLC3-IIへ変換はイムノプロット法にて測定する。オートファゴソームの形態的な観察には透過型電子顕微鏡を用いる。

### (7) 超音波照射による音響穿孔法

細胞外物質の非侵襲的導入には超音波遺伝子導入装置ソニトロン2000Vを用いる。マイクロバブルとしてはArtison As0100を用いる。超音波による細胞表面の小孔形成の観察は走査型電子顕微鏡にて行う。

### (8) プロテオーム解析

タンパク質の網羅的検出には Q-Exactive 質量分析計を用いる。複数サンプル間でタンパク質の存在量を比較する isobaric tag for relative and absolute quantification (iTRAQ) 法によるプロテオーム解析を行う。

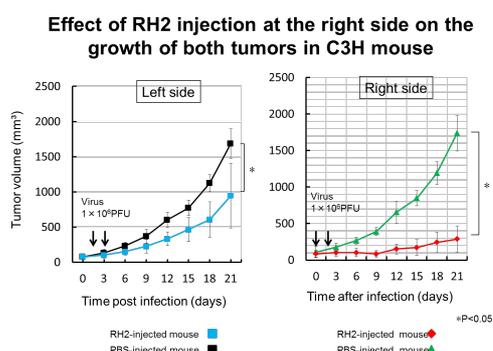
#### 4. 研究成果

##### (1) マウス SCC における RH2 感染

SCCVII 細胞に RH2 を各種感染多重度 MOI で感染させた場合、MOI=10 で円形化し浮遊する細胞が増加した。MTT assay で生細胞率を求めたところ、MOI=10 での感染では、24 時間後に 55%、36 時間後に 36%にまで低下した。

##### (2) RH2 投与による腫瘍体積の変化

マウス背部皮下に左右 2 個の腫瘍を形成した。RH2 投与マウスでは右側腫瘍に RH2 を、RH2 非投与マウスの右側腫瘍にはリン酸緩衝液(PBS(-))を投与し、経時的に腫瘍体積を求めた。非投与マウスでは左右の腫瘍はしだいに増大したが、RH2 投与マウスでは、RH2 投与側の腫瘍増加が強く抑制されるだけでなく、RH2 を投与していない左側腫瘍でも抑制され、RH2 投与による直接的な腫瘍破壊作用と腫瘍免疫の腑活化が明らかとなった(図 1)。



〔図 1 RH2 による SCCVII 腫瘍の増殖抑制〕

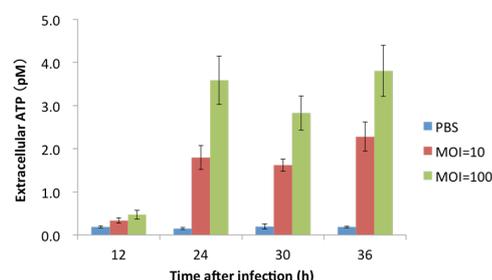
##### (3) 脾臓リンパ球による細胞傷害性

SCCVII 腫瘍に RH2 を投与したマウスの脾臓からリンパ球を回収し、SCCVII 細胞を標的として LDH release assay で細胞傷害性を測定した。SCCVII 細胞に対して強い傷害性を示し、

RH2 を投与していない担癌マウスとの間で有意差がみられた。系の異なるマウスに由来する NFSa Y83 細胞と YAC-1 細胞に対しては、細胞傷害性はみられなかった。この細胞傷害性に CD8<sup>+</sup>T 細胞が関与していた。

##### (4) DAMPs の検出と培養上清の抗腫瘍効果

SCCVII 細胞に RH2 を感染することによって、DAMPs である ATP、HMGB1 が細胞外に放出された(図 2)。CRT は細胞表面で発現した。放出される DAMPs の腫瘍免疫増強効果を知るため、RH2 感染 SCCVII 細胞の培養上清を濃縮、ウイルスを不活化したのち、SCCVII 腫瘍内に投与したところ、PBS(-)を投与した対照群と比較して腫瘍増殖が抑制された。



〔図 2 RH2 感染 SCCVII 細胞の細胞外 ATP 量〕

##### (5) RH2 感染細胞の培養上清のプロテオーム解析

RH2 感染 SCCVII 細胞の上清に含まれるタンパク質に対してプロテオーム解析を行った。非感染細胞の培養上清と比較して含有量で有意差を認めたタンパク質は 440 個であり、増加したのは 291 個、減少したのが 149 個であった。DAMPs について有意差を認めたものは 9 個で、RH2 感染で増加したものが 7 個、減少したものが 2 個であった。

##### (6) RH2 感染細胞におけるオートファジー

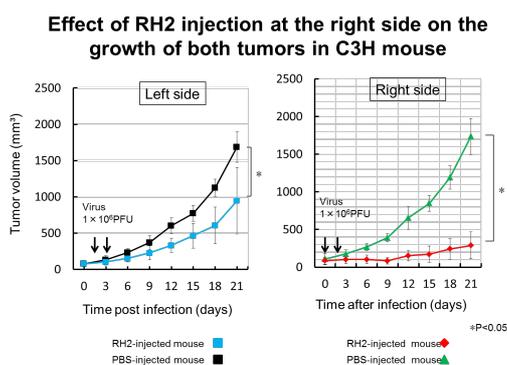
RH2 を感染させた SCCVII 細胞と SAS 細胞において細胞質で LC3 の発現が顕著となり、顆粒状に染色されるようになった。免疫プロットでも RH2 感染で、LC3-I から変換された

LC3-II の増加が確認された。透過型電子顕微鏡で感染 SAS 細胞を観察すると二重膜に囲まれたオートファゴソームが認められた。

SAS 細胞に RH2 を感染させ、オートファジー阻害剤を存在させて培養を行うと、RH2 による細胞傷害が抑制された。したがって、RH2 感染で誘導されるオートファジーは細胞死の促進に働くと考えられた。

#### (7)超音波照射が HSV-1 の腫瘍抑制能に及ぼす影響

低出力超音波は細胞膜に一過性の小孔を形成して（ソノポレーション）細胞外物質の細胞内移行を可能にする。走査型電子顕微鏡で観察すると、超音波照射した SAS 細胞で小孔形成がみられた。超音波により培養細胞でのウイルス感染効率が向上するため、ヌードマウスに形成した SAS 腫瘍に RH2 単独投与あるいは RH2 投与に超音波照射を併用したところ、RH2 の腫瘍増殖抑制効果がより顕著となり、超音波の併用効果が示された（図 3）。



〔図 3 RH2 投与と超音波が腫瘍体積に及ぼす影響〕

#### 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 13 件）

1. Takasu A, Masui A, Hamada M, Imai T, Iwai S, Yura Y. Immunogenic cell death by oncolytic herpes simplex virus type

1 in squamous cell carcinoma cells. Cancer Gene Therapy 23:107-113, 2016. 査読有, doi: 10.1038/cgt.2016.8.

2. Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S, Yura Y. Entry of oncolytic herpes simplex virus into human squamous cell carcinoma cells by ultrasound. Viruses 7: 5610-5618, 2015. 査読有, doi: 10.3390/v7102890.
3. Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S, Yura Y. Ultrasound as a method to enhance antitumor ability of oncolytic herpes simplex virus for head and neck cancer. Cancer Gene Therapy 22:163-168, 2015. 査読有, doi: 10.1038/cgt.2015.3.
4. Meshii N, Takahashi G, Okunaga S, Hamada M, Iwai S, Takasu A, Ogawa Y, Yura Y. Enhancement of systemic tumor immunity for squamous cell carcinoma cells by an oncolytic herpes simplex virus. Cancer Gene Therapy 20:493-498, 2013. 査読有, doi: 10.1038/cgt.2013.45.
5. Yamamoto N, Iwagami T, Kato I, Masunaga S, Sakurai Y, Iwai S, Nakazawa M, Ono K, Yura Y. Sonoporation as an enhancing method for born neutron capture therapy for squamous cell carcinomas. Radiation Oncology 8:280, 2013. 査読有, doi:10.1186/1748-717X-8-280
6. Takahashi G, Meshii N, Hamada M, Iwai S, Yura Y. Sequence of a fusogenic herpes simplex virus RH2 for oncolytic virotherapy. Journal of General Virology 94:726-737, 2013 査読有, doi:10.1099/vir.0.044834-0.

〔学会発表〕（計 24 件）

1. 高須彩子、奥長秀介、古川禎伸、飯井孝年、高橋 元、由良義明。腫瘍融解性単

- 純ヘルペスウイルスによる細胞死における pyroptosis の関与。第 63 回日本ウイルス学会学術大会。2015.11.22、福岡国際会議場、福岡市。
2. 古川禎伸、高須彩子、榊井敦史、多田晋也、飯井孝年、岩井聡一、由良義明。腫瘍融解性ウイルスの扁平上皮癌細胞に対する傷害に関する検討。第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2015.10.16、名古屋国際会議場、名古屋市。
  3. 多田晋也、高須彩子、岸本聡子、古川禎伸、岩井聡一、由良義明。腫瘍融解性ウイルス感染にて放出される腫瘍免疫増強因子のプロテオーム解析。第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2015.10.16、名古屋国際会議場、名古屋市。
  4. 由良義明。口腔ウイルスの功罪。第 25 回日本口腔内科学会学術大会、2015.9.19、大阪大学コンベンションセンター、吹田市。
  5. 古川禎伸、奥永秀介、高須彩子、由良義明。ソノポレーションによる腫瘍融解性ウイルス感染効率の向上。第 69 回日本口腔科学会総会・学術集会、2015.5.14、大阪国際会議場、大阪市。
  6. 高須彩子、奥長秀介、古川禎伸、飯井孝年、高橋元、由良義明。腫瘍融解性単純ヘルペスウイルスによる immunogenic cell death の誘導。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.11、パシフィコ横浜、横浜市。
  7. Yura Y, Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S. Low-intensity ultrasound as a method to improve the effect of oncolytic virotherapy on oral cancer. The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons ' Annual Meeting, September 11, 2014, Hawaii Convention center, Honolulu, USA.

8. 由良義明。口腔癌のウイルス療法をめざして。第 50 回日本口腔組織培養学会学術大会、2013.11.24、日本歯科大学生命歯学部九段ホール、東京都。
9. 飯井孝年、高橋 元、若林 健、奥長秀介、竹下彰範、岩井聡一、由良義明。単純ヘルペスウイルス I 型 RH2 によるマウス扁平上皮癌に対する免疫賦活効果。第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2012.10.19、パシフィコ横浜、横浜市。

〔図書〕(計 2 件)

1. 由良義明。朝倉書店、口腔科学 2013、806-807, 811-812.

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~surg2/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
由良義明 (YURA YOSHIAKI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：00136277

(2) 研究分担者  
( 0 )

研究者番号：

(3) 連携研究者

岩井聡一 (Iwai Soichi)  
大阪大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：10362675

濱田正和 (Hamada Masakazu)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：80506361