

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501351

研究課題名(和文) 難治性腫瘍に対するHSV-1型アンプリコンシステムを用いた新規遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) HSV-1 amplicon as a novel vector for gene transfer into refractory tumors

研究代表者

五島 典(Goshima, Fumi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70201499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスGM-CSFが直列に繰り返して組み込まれた HSV-1由来のアンプリコンベクターを作成し、卵巣癌腹膜播種モデルマウスに接種して治療した。mGM-CSFアンプリコンにより、腹膜腫瘍の縮小効果、生存の延長が認められた。免疫細胞を精査したところ、局所へのCD8陽性T細胞の誘導が認められ、腫瘍特異的な免疫の誘導が確認された。次にマウスIL-2を組み込んだアンプリコンベクターを作成し、細胞に感染させその上清中にIL2が分泌されていることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We made an HSV amplicon expressing murine GM-CSF to strengthen anti-tumor immune response for the treatment of ovarian cancer with intraperitoneal dissemination. Intraperitoneal injection of mGM-CSF amplicon prolonged survival and decreased intraperitoneal dissemination. Immunohistochemical staining revealed the infiltration of CD4- and CD8-positive cells into the peritoneal tumors. Murine splenic cells after each treatment were stimulated with HM-1 cells, and the strongest immune response was observed in the mice that received mGM-CSF amplicon injections. Now we have made an HSV amplicon expressing murine IL-2 and confirmed expression of IL2 in the infected cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：遺伝子治療 ウイルス アンプリコン 癌

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 単純ヘルペスウイルス HF10

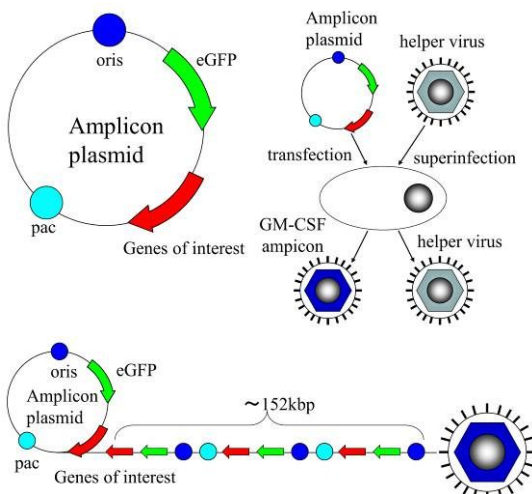
我々の研究室は単純ヘルペスウイルス 1 型自然発生型弱毒株 HF から HF10 をクローニングした。HF10 は癌細胞を含む多くの培養細胞において極めてよい増殖性を示すが、末梢からの神経侵襲性が減弱しているため、マウスでの病原性は著しく減弱しているウイルスである。HF10 を末梢に高濃度で ( $10^8$  pfu) 接種しても、マウスを死亡させることはない。その後のゲノム解析の結果、UL 領域の両端 (UL-US 結合部を含む) に大きな欠損があり、その結果 UL56、LAT (Latency-associated transcripts) の欠失を有すると共に、N 末端領域での frame-shift 変異により UL43、UL49.5、UL55 の発現欠損を持つことが判明した。

### (2) HF10 の抗腫瘍効果

我々の研究室では様々な癌細胞株 (悪性黒色腫、頭頸部扁平上皮癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、膀胱癌、卵巣癌、繊維肉腫等) を使用して担癌マウスモデルを作成し、HF10 の抗腫瘍効果を検討してきたが、HF10 は優れた抗腫瘍作用と安全性を示した。その結果を踏まえて、名古屋大学で転移性乳癌、頭頸部癌症例を使用して臨床治験が行われたが、HF10 の癌細胞破壊作用と安全性が確認できた。その後英国で製剤化を終え、米国内多施設にて第 1 相臨床試験が進行中であった。

### (3) HSV アンプリコンベクター

HSV-1 由来のアンプリコンベクターは、HSV-1 と同じ envelope をもつため HSV-1 と同様に様々な細胞に感染し、効率よく遺伝子導入できる。またアンプリコンベクター内には、サイトカイン遺伝子を含むアンプリコンプラスミドが HSV-1 ゲノム長相当 (150kbp) になるまで繰り返し入っているため (図 1)、遺伝子導入された細胞から沢山のサイトカイン分泌が期待できる。さらに、アンプリコンベクター自身はウイルスゲノムを有しないため、ベクターそのものの安全性も確保されている。



## 2. 研究の目的

難治性腫瘍に対して新たな腫瘍治療法の開発が模索されているが、効果は限られている。HSV-1 は多くのヒトの細胞に感染し増殖することが知られているため、HSV-1 を抗腫瘍ウイルスとして利用することにより、従来の治療上とはアプローチの異なる新たな治療法になり得ると考えられる。HF10 の特性を踏まえ、安全性を確保しつつ抗腫瘍作用を増強する目的で、HF10 をヘルパーウイルスとしてマウス由来の抗腫瘍サイトカイン (mGM-CSF、mIL-2) を搭載したアンプリコンを作成した。これらのアンプリコンが、難治性の腫瘍に対する抗腫瘍作用増強の可能性を模索した。

## 3. 研究の方法

### (1) mGM-CSF アンプリコンによる抗腫瘍効果

最初に mGM-CSF アンプリコンによる抗腫瘍効果を検討した。6 週齢メスの C3B6F1 マウスにマウス卵巣癌細胞 (OV2944-HM-1) を腹腔内に接種し、卵巣癌腹腔内播種モデルマウスを作成した。3 日後より HF10、あるいは mGM-CSF アンプリコンを腹腔内に 3 回接種し、偽治療群には同時期に同量の PBS を接種した。

まず各治療による生存延長効果を検討した。次に最終治療から 5 日後に開腹して腹腔内の腫瘍を確認し、また腹膜を採取してパラフィン切片を作成し、H&E 染色にて組織学的に検討した。最終治療から 24 時間後に腹膜を採取して、パラフィン切片を作成し、免疫組織染色にて T 細胞の腫瘍内への浸潤の有無を検討した。最終治療から 5 日後の脾臓を採取して、脾臓内の白血球分画をフローサイトメトリーで検討した。治療開始から 5 日後の脾臓を摘出し、腫瘍細胞と共培養することにより、脾細胞に誘導された抗腫瘍免疫の有無を調べた。

### (2) mIL2 アンプリコンの作成

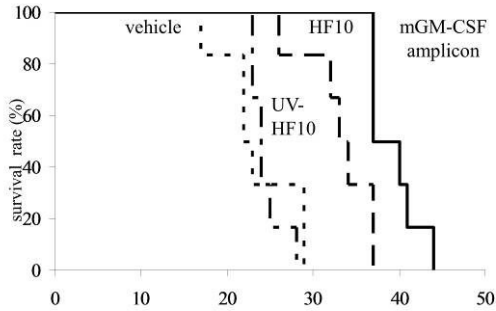
さらなる抗腫瘍効果を得るために、GM-CSF 以外のサイトカインによる治療法を模索した。抗腫瘍免疫を誘導するインターロイキン (IL) として IL2、IL12 が有用な候補であると考え、まず IL-2 を HSV のアンプリコンプラスミドに組み込み、マウス IL2 アンプリコン (mIL2 アンプリコン) を作製した。

## 4. 研究成果

### (1) 卵巣癌腹腔播種モデルマウスを用いた mGM-CSF アンプリコンによる生存延長効果

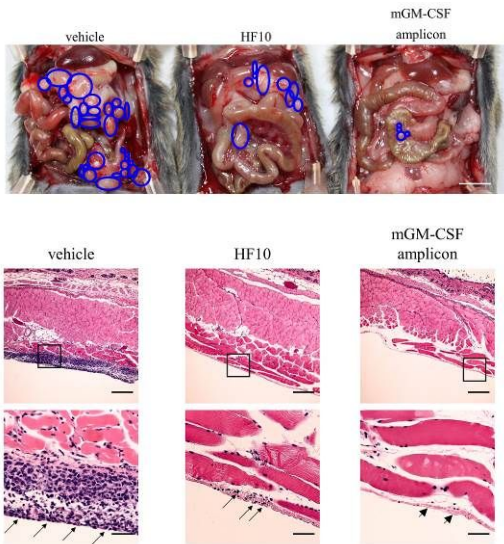
6 週齢の C3B6F1 マウスにマウス卵巣癌細胞 (OV2944-HM-1) を腹腔内に接種し、卵巣癌腹腔内播種モデルマウスを作成した。腫瘍接種

日を day 0 とした。無治療のマウスは腹水貯留、癌性腹膜炎などにより 30 日以内に死亡した。3 日後より HF10、あるいは mGM-CSF アンプリコンを腹腔内に 3 回接種した (day 3, 6, 9)。偽治療群には同時期に同量の PBS を接種した。HF10 投与により有意な生存の延長が認められたが、mGM-CSF アンプリコンによりさらに有意な延長が認められた。



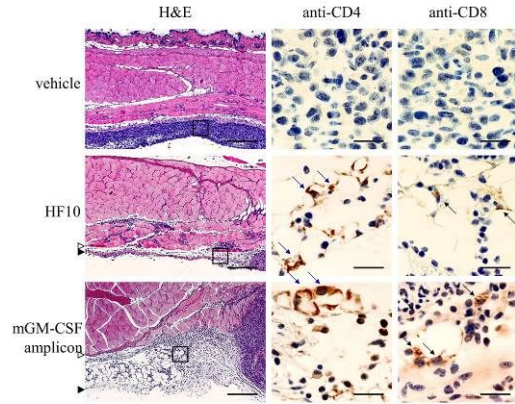
## (2) 各治療による腹腔内腫瘍、腹膜腫瘍の縮小効果

最終治療から 5 日後 (day 14) に開腹して腹腔内を探索し、また摘出した腹膜を組織学的に検討した。HF10 群では腫瘍の播種や腹膜への腫瘍浸潤がある程度抑えられていて、mGM-CSF アンプリコン群で腫瘍の播種や腹膜への腫瘍浸潤がさらに抑制されたことが確認できた。

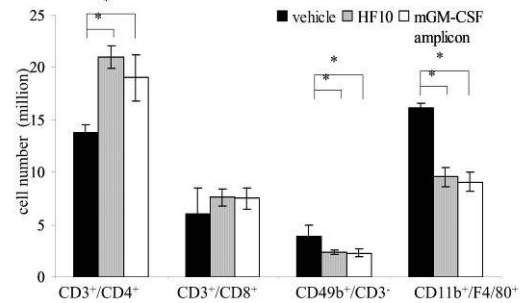


## (3) 腹膜腫瘍周囲の間質の形成と間質内の T 細胞の浸潤

最終治療の 24 時間後 (day 10) に腹膜を摘出し、免疫細胞の腹膜腫瘍への浸潤を免疫組織学的に検討した。HF10、mGM-CSF アンプリコン両治療群において、縮小した腹膜腫瘍周囲に間質の形成が認められ、その間質の中には CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の浸潤が認められた。間質に浸潤した CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞は、HF10 治療群より mGM-CSF アンプリコン治療群において多く認められた。

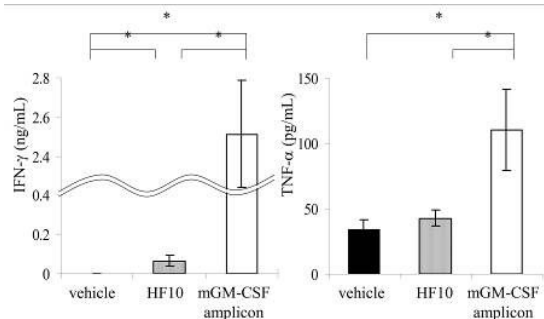


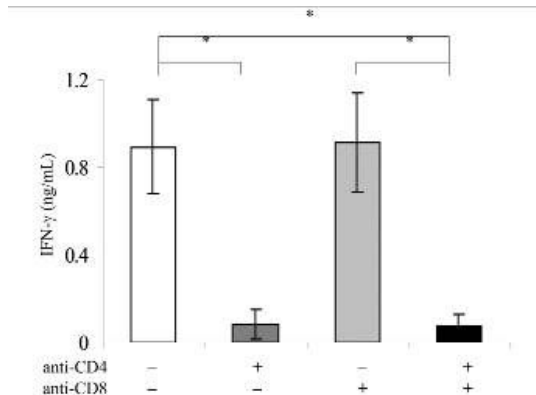
(4) 脾臓内に占める白血球の組成への影響  
また最終治療から 5 日後 (day 14) に採取した脾臓内の白血球分画を調べたところ、HF10、mGM-CSF アンプリコン治療群において CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の増加が認められた。



## (5) 脾細胞に誘導される腫瘍特異的な抗腫瘍免疫

最後に、治療開始から 5 日後 (day 8) に採取した脾臓を摘出し、脾細胞を卵巣癌細胞と共培養して、卵巣癌細胞に特異的な抗腫瘍免疫が誘導されているかどうかを検討した。抗腫瘍サイトカインである IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  を検討したところ、mGM-CSF アンプリコンにより最も強い抗腫瘍免疫が誘導された。また CD4、CD8 陽性細胞を除去して検討したところ、この抗腫瘍免疫において CD4 陽性 T 細胞が主要な役割を担っていることが明らかになった。





### (6) mIL-2 アンプリコンの作成

最初に HSV の複製開始点とパッケージングシグナルを含むアンプリコンプラスミドを用意した。次に IL2 を増幅させ、アンプリコンプラスミドに組み込みクローニングし、IL2 アンプリコンプラスミドを抽出した。また、IL2 の遺伝子配列をシークエンサーで確認した。次に IL2 アンプリコンプラスミドと HF10 (ヘルパーウイルス) を共感染させ、アンプリコンベクターを作成した。最後にアンプリコンベクターを Vero 細胞に感染させ、その上清から IL-2 が分泌されていることを ELISA で確認した。

### 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 5 件)

- 1) Anti-CCR4 Monoclonal Antibody Mogamulizumab for the Treatment of EBV-Associated T- and NK-Cell Lymphoproliferative Diseases.  
Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, Siddiquey M, Sato Y, Suzuki M, Ito Y, Goshima F, Murata T, Kimura H.  
Clin Cancer Res. 2014 Oct 1;20(19):5075-84.  
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0580. 査読有
- 2) Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T cell and natural killer cell lymphoma.  
Siddiquey MN, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome K, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H.  
Cancer Sci. 2014 Jun;105(6):713-22.  
doi: 10.1111/cas.12418. 査読有
- 3) Role of latent membrane protein 1 in chronic active Epstein-Barr virus infection- derived T/NK-cell proliferation.  
Ito T, Kawazu H, Murata T, Iwata S, Arakawa S,

Sato Y, Kuzushima K, Goshima F, Kimura H.  
Cancer Med. 2014 Aug;3(4):787-95.  
doi:10.1002/cam4.256. 査読有

4) Oncolytic viral therapy with a combination of HF10, a herpes simplex virus type 1 variant and granulocyte-macrophage colony- stimulating factor for murine ovarian cancer.  
Goshima F, Esaki S, Luo C, Kamakura M, Kimura H, Nishiyama Y.  
Int J Cancer. 2014 Jun 15;134(12):2865-77  
doi: 10.1002/ijc.28631. 査読有

5) Enhanced antitumoral activity of oncolytic herpes simplex virus with gemcitabine using colorectal tumor models.  
Esaki S, Goshima F, Kimura H, Murakami S, Nishiyama Y.  
Int J Cancer. 2013 Apr 1;132(7):1592-601  
doi: 10.1002/ijc.27823. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 田中るい, 五島典, 江崎伸一, 村田貴之, 渡辺大輔, 西山幸廣, 木村宏, マウス悪性黒色腫両側皮下腫瘍モデルにおける HF10 とダカルバジン併用療法の検討  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日 パシフィコ横浜会議センター (神奈川県横浜市)
- 2) 五島典, 江崎伸一, 田中るい, 村田貴之, 渡辺大輔, 木村宏, 西山幸廣 マウス卵巣癌腹腔播種モデルにおける HSV-1 HF10 とマウス GM-CSF アンプリコンを用いた抗腫瘍効果の検討、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- 3) 五島典, 江崎伸一, 武藤義文, 岩田誠子, 鎌倉真紀, 渡辺大輔, 木村宏, 西山幸廣 マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける HSV-1 HF10 とマウス GM-CSF アンプリコンを用いた治療効果の検討、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 14 日: グランキューブ大阪 (大阪府大阪市)

### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
五島典 (GOSHIMA, Fumi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 70201499
- (2) 研究分担者  
木村 宏 (KIMURA, Hiroshi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 30303621

鎌倉 真紀 (KAMAKURA, Maki)  
研究者番号 : 80437003  
(平成 25 年 3 月 31 日まで研究分担者)

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
江崎 伸一 (ESAKI, Shinichi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号 : 20620983

