

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591969

研究課題名(和文)大腸癌に対する増殖型ヘルペスウイルスを用いた新規治療法の開発研究

研究課題名(英文)Development of novel herpes virus therapy on colorectal cancer

研究代表者

篠崎 大(Shinozaki, Masaru)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：10312315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：増殖型遺伝子組換えヘルペスウイルス(G47 $\Delta$ )は単純ヘルペス1型を改良して腫瘍選択的に増殖し破壊する一方で、正常細胞ではほとんど増殖しないように変化したウイルスである。これの大腸癌に対する新規治療の前臨床試験を行った。殺細胞試験を細胞株にて行うとウイルス濃度・処理後日数によりコントロールに比して有意な殺細胞効果が認められた。X-gal染色では、細胞内にウイルスが取り込まれていることが確認された。ウイルス増殖試験では細胞株でのウイルス増殖が認められた。ヌードマウスで腫瘍を形成した後にG47 $\Delta$ を投与すると、コントロールに比して腫瘍増殖が抑制された。

研究成果の概要(英文)：G47delta is a modified herpes simplex virus type 1, which selectively proliferate in only tumor cells and destroy the host cell, and seldom affect non-tumor cells. We aimed to evaluate clinical effect of G47delta on colorectal cancer and performed a pre-clinical study. A cytotoxic assay revealed statistically significant cytotoxicity on cell lines compared with the control, according to the concentration of the virus and the term of the treatment. We confirmed that the virus was incorporated in the tumor cell though X-gal staining assay. Replication assay was performed to investigate proliferation of the virus in the cell lines, and we affirmed it. We made subcutaneous tumors of the cell lines. After injection of the virus to the tumors, we found suppression of tumor growth compared with the control.

研究分野：消化器外科

キーワード：がん ウイルス療法

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は男性では胃癌に次いで2位、女性では乳癌に次いで2位と罹患率が高い悪性腫瘍である。他の癌よりも比較的治りやすく、近年の化学療法により生存中央値が30カ月に達しようとしている。しかし肝以外に再発すると根治は難しく死亡数で見ると、全癌の中で男性は3位、女性は首位であり、その克服が国民的な課題となっている。

単純ヘルペス1型(HSV-1)は増殖型のウイルスで、感染した細胞内でウイルスが増殖し細胞を破壊し、さらに周囲の細胞に感染し破壊していく。HSV-1は他のウイルスと比べウイルス自体の免疫原性が比較的強く殺細胞作用が強いという、治療を行うにあたり有利な点がある。

HSV1716は34.5遺伝子のみを欠失した第1世代HSV-1である。34.5遺伝子は正常細胞内でのウイルス複製に必要な遺伝子であり、HSV-1の病原性の原因となる遺伝子である。正常の細胞ではウイルス感染に呼応して2本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ(PKR)のリン酸化が誘導され、細胞内でのタンパク合成が遮断されるためにウイルス複製が阻害される。ウイルスの34.5遺伝子産物はリン酸化PKRに拮抗する作用を有する。したがって、34.5遺伝子欠失HSV-1は正常細胞内で複製できないが、腫瘍細胞はもともとPKR活性が低いため、34.5遺伝子が欠失しているウイルスでも複製が可能となる。このHSV1716は比較的強力な殺細胞効果を維持する反面、正常組織への病原性も残存している。

G207は34.5遺伝子欠失に加え、ICP6遺伝子を不活化することで野生株にきわめて戻りにくくなると同時に腫瘍特異性が高まった。これはICP6遺伝子がコー

ドするリボヌクレオチド還元酵素(ribonucleotide reductase: RR)や、チミジンキナーゼ(tk)はウイルスのDNA合成に必須であるため、これらをコードするウイルス遺伝子を失活させると正常細胞では複製できない。しかし腫瘍細胞では宿主の酵素活性が高く、欠落したウイルス酵素を代償するためウイルス複製が可能となる。

G47ΔはG207の2カ所の変異からさらに、*a47*遺伝子とそれに重なる*US11*プロモーター領域を欠失させた三重変異を有する第3世代HSV-1である。この変異により、感染細胞表面のMHC Class IIの発現を強化して宿主免疫による抗腫瘍免疫を増強させるとともに、34.5遺伝子欠失によって減弱したウイルス複製能を腫瘍細胞内に限って復元した。

このように改良を加えていったため、G47Δは腫瘍特異的なウイルス複製能に優れ、かつ安全性が高い第3世代の遺伝子組換えHSV-1として再発膠芽腫患者を対象とした臨床研究が開始された。すでに投与は終了し結果をまとめている段階であるが、試験薬による明らかな重篤な有害事象は認められず、安全性に関して大きな問題は認められていない。また、効果についても期待できる成績と考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、G47Δが大腸癌に対し有効かどうか基礎的な検討を行うことである。まだ少数例ではあるが脳腫瘍に対し既に行われている臨床試験において安全性に関する特段の支障が認められないことを考慮すると、有効性が示されれば、進行大腸癌に対してG47Δが有効であるかどうか検討する臨床試験が可能になると考えられ、手術・放射線・化学療法以外の新たな機序による大腸癌治療の可能性が開けてくる。

### 3. 研究の方法

#### (1) Cytotoxic assay in vitro

細胞株 A-D に対して  $1.5-3.0 \times 10^5$  細胞に対し MOI 0.01 または 0.1 (細胞株 D では 0.1 または 1.0) の G47 $\Delta$  を作用させ 4 日間観察し生存細胞数を計測または MTS assay にて吸光度を計測した。

#### (2) X-gal staining assay

細胞株 A-D において G47 $\Delta$  を感染させた細胞で X-gal を発現するかどうか検討した。

#### (3) Replication assay

細胞株 A-D において G47 $\Delta$  を感染させ、24 時間後・48 時間後にウイルスがどの程度複製しているか検討した。

#### (4) Subcutaneous tumor therapy in nude mice

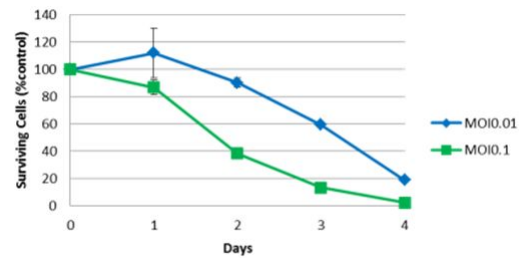
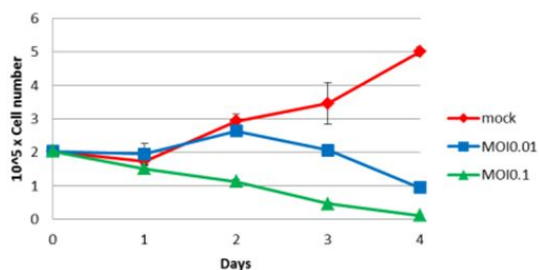
細胞株 A を用いてヌードマウスに皮下腫瘍を作成し、概ね 5mm 角程度に増大したところで G47 $\Delta$  を接種。その後 40 日間観察し、腫瘍の体積を経時的に計測した。

### 4. 研究成果

#### (1) Cytotoxic assay in vitro

細胞株 A-D いずれも MOI 0.1 において経時的に有意な細胞数の減少を認め、MOI 0.01 ではその作用が弱かった。

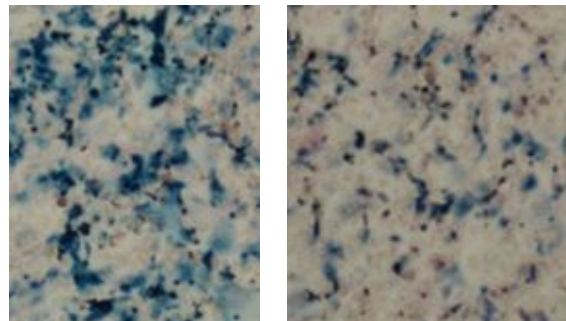
図 1 : 細胞株 A における cytotoxic assay



#### (2) X-gal staining assay

細胞株 A-D いずれにおいても腫瘍細胞は青色に染色され G47 $\Delta$  が細胞内に取り込まれていることが確認された。図 1 に代表例を示す。

図 2 : 細胞株 A における X-gal 染色



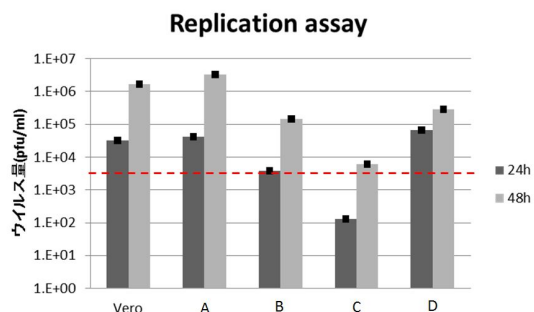
(A) MOI 3.0

(B) MOI 1.0

#### (3) Replication assay

細胞株 A では Vero 細胞とほぼ同等の増殖を示したが、細胞株 B, C では 24 時間、48 時間ともにやや低下していた。細胞株 D では 24 時間時点では Vero 細胞と同等であったが、48 時間ではやや低下していた。

図 3 : Vero 細胞をコントロールとしたときの各細胞株における G47 $\Delta$  の replication assay 結果

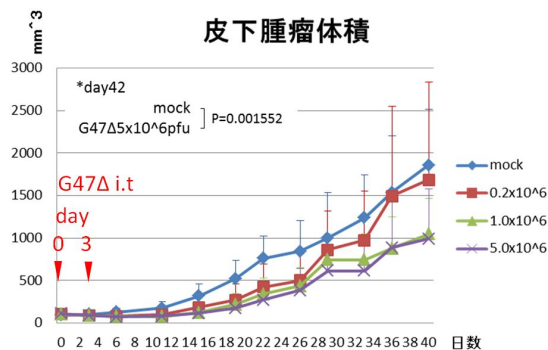


#### (4) Subcutaneous tumor therapy in nude

mice

上記(1)から(3)の結果を受けて、細胞株Aについて in vivo で抗腫瘍効果を検討することとした。予備実験の結果、腫瘍内に局所投与するウイルス量を  $0.2 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $5.0 \times 10^6$  およびコントロールの4群に決めた。初回ウイルス投与の約28日後付近まではいずれの濃度でも腫瘍増殖が抑制されている傾向が観察された。しかし、これ以降、 $0.2 \times 10^6$  群はコントロールと同等の腫瘍径となった。40日まで観察したが、各腫瘍のばらつきが大きく、統計学的な有意差には至らなかった。

図4:皮下腫瘍モデルにおけるG47Δの抗腫瘍効果



## 5. 主な発表論文等

本原稿執筆時点では成果をとりまとめている段階であり、受理された論文はない。

〔その他〕

ホームページ等

論文未発表のため、受理された後に公表する予定である。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠崎 大 (SHINOZAKI Masaru)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 10312315

### (2) 研究分担者

谷澤 健太郎 (YAZAWA Kentaro)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 60572542

釣田 義一郎 (TSURITA Giichiro)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号: 80345206

畑 啓介 (HATA Keisuke)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 60526755

### (3) 連携研究者

藤堂 具紀 (TODO Tomoki)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 80272566