

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592014

研究課題名(和文) 増殖型遺伝子組換えウイルスを用いた根治不能肝腫瘍に対する新治療法の開発研究

研究課題名(英文) Efficacy of third-generation oncolytic herpes simplex virus type 1 for advanced hepatocellular carcinoma

研究代表者

権 雅憲 (Kon, Masanori)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70225605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌に対する新規治療として、欠失変異による高い治療効果と高い安全性を併せ持ち、更に抗腫瘍免疫の惹起力が増強した第三世代増殖型遺伝子組換えHSV-1(T-01)によるウイルス療法の効果検討を行った。ヒト肝癌細胞株(13種)を用いたT-01の殺細胞効果および低濃度における複製能を検討では、T-01は11種の細胞株に対し、高い殺細胞作用を示した。また、ヒト肝癌細胞株4種を用いてヌードマウスの皮下腫瘍・同所腫瘍・腹膜播種モデルにT-01を投与した検討では、T-01の腫瘍増殖の抑制と安全性が確認された。

研究成果の概要(英文)：The use of recombinant viruses which kill tumor cells selectively in the course of viral replication is called an oncolytic virus therapy. G47 is a third-generation oncolytic herpes simplex virus type 1 (HSV-1) that has triple genetic modifications in the viral genome, and has already been used in clinical studies. Deletions in the 34.5 gene and inactivation of the ICP6 gene make the virus replicate efficiently and selectively in tumor cells, and the deletion in 47 gene efficiently induces tumor cell specific immune responses. T-01 has a similar genetic structure to G47. Antitumor effect of T-01 was evaluated in this study using HCC cell lines. In cytotoxicity assays in vitro, all 11 HCC cell lines tested were susceptible to T-01. T-01 was tested in vivo using 4 HCC cell lines in subcutaneous and orthotopic tumor models in nude mice. In both models, intratumoral inoculation of T-01 inhibited tumor growth efficiently compared with mock inoculation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：増殖型遺伝子組換えウイルス 単純ヘルペスウイルス 抗腫瘍免疫 肝臓がん

1. 研究開始当初の背景

日本では、年間約3万人が新たに肝臓がん診断を受け、がん死の3位を占めている。肝臓がんにおいて、肝切除手術の可能な人は全体の約30%にとどまり、肝臓がんが発見された時点で約7割の人は背景肝の肝硬変が悪化進行し手術できない状態である。こうした肝臓がん特有の問題を克服するために様々な治療法が研究・開発されている。しかし進行肝細胞がんは予後が悪く、ステージ 期において MST は6か月、門脈腫瘍塞栓を伴う再発肝細胞癌において MST は2.7か月であり、現在 sorafenib が使用されている。切除不能進行肝癌において、placebo 群(MST7.9か月)に対し sorafenib 群(MST10.7か月)の生存延長を認めるものの(SHARP study) 臨床では無効例や副作用が強く中断する例が多く、次の治療法が存在しないのが現状である。

2. 研究の目的

近年、癌治療法として、ウイルスの特性を利用したウイルス療法の研究が精的に進められている。我々は肝細胞癌に対する新規治療として、第三世代増殖型遺伝子組換え HSV-1 (T-01) によるウイルス療法の効果検討を行った。T-01 は(1) 34.5 遺伝子の欠失、(2) ICP6 遺伝子の欠失と lacZ 遺伝子挿入、および(3) 47 遺伝子欠失変異の三重変異を有する。欠失変異による高い治療効果と安全性を併せ持ち、更に抗腫瘍免疫の惹起力が増強している(ウイルスの増殖に伴う、ウイルスそのものの直接的な腫瘍に対する局所的な殺細胞効果に加え、抗腫瘍免疫が増幅することによる転移病変への効果が期待出来る)。

3. 研究の方法

(1) *In vitro*では、ヒト肝癌細胞株(13種)を用いて、T-01の殺細胞効果および複製能を検討。(2) *In vivo*ではヒト肝癌細胞株(肝炎由来など背景を分別し、4種を検討)を用いて、

ヌードマウスの皮下腫瘍・同所腫瘍・腹膜播種モデルを作成し、T-01投与後の抗腫瘍効果や安全性を検討した。

(1) *In vitro*

培養細胞上でのウイルス複製能の検討

前日 5.0×10^5 cells/2ml/well の各種ヒト肝がん培養細胞株をまく。

各種培養細胞株を DPBS/1%IFCS で洗浄後、ウイルス希釈液(MOI 0.01)を添加する。

1時間の初期感染後、ウイルス液を除去し培養液を加え、48時間培養する。

48時間後、ウイルスの感染した細胞及び上清を回収する。

回収したウイルスに対し Vero 細胞を用い、タイターを測定する(プラーク法)。

ヒト肝細胞がん由来培養細胞株における

T-01の細胞障害性の検討

前日に6穴プレートに 2.0×10^5 cells/2ml/well の各種ヒト肝がん培養細胞をまく。

T-01投与量を決定する。

各種培養細胞を、T-01希釈液(MOI 0.1及び0.01)で感染させる。

1時間の初期感染後、ウイルス液を除去し、培養液を加え培養する。

1, 2, 3, 4日目に残っている培養細胞の数をカウントする。

(2) *in vitro*

皮下異種移植したヒト肝細胞がんに対する

T-01の腫瘍縮小効果の検討

BALB/c ヌードマウスの皮下腫瘍を測定し、1群あたりの匹数を決定する。

T-01投与量を決定し 10%glycerol/DPBS で希釈する。(1匹あたり 20 μ l に調製)

P2A 実験室の安全キャビネット内で麻酔後、腫瘍内にウイルスを投与する。

腫瘍径・体重等を観察する。

同所移植モデル/腹膜播種モデルでのT-01の
治療効果の検討

ヌードマウスにヒト肝細胞がん細胞株を異種移植、して、1群あたりの匹数を決定する。

T-01の投与量を決定する。(1匹あたり20 μ lに調製)

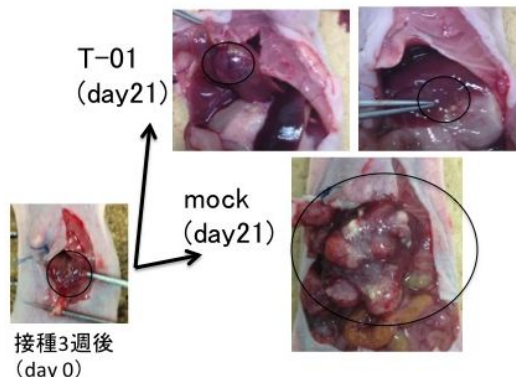
P2A 実験室の安全キャビネット内で麻酔後、腫瘍内にウイルスを投与する(局注、静注)

生存率など抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1) T-01は11種の細胞株に対し、高い殺細胞作用を示した。

(2) 様々なモデルに対し腫瘍増殖を抑制し、明らかな副作用は認めなかった(下図：Huh-7同所モデルでの検討)。



肝細胞癌に対し有効な新規治療法になりうる事が示唆された。現在T-01と同じ3つのウイルス遺伝子に変異を有するG47を用いて、他癌腫に対する複数の臨床試験が進行中である。今後、難治性モデル(肺転移など)に対する抗腫瘍効果や、ソラフェニブとの併用など、肝細胞癌への実用化を視野に入れた開発を行っていく。

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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

権 雅憲 (KON, Masanori)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 720225605

(2)研究分担者

海堀 昌樹 (KAIBORI, Masaki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30333199

藤澤 順一 (FUJISAWA, Junichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40181341

藤堂 具紀 (TODO, Tomoki)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：80272566