

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791485

研究課題名(和文) 不活化ウイルス粒子に自家腫瘍ワクチンを併用した脳腫瘍に対する新規免疫療法の確立

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapy using combination of inactivated viral particle and autologous tumor vaccine for malignant glioma

研究代表者

松田 真秀 (Matsuda, Masahide)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30614333

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)：HVJ-E (HVJ envelope) はセンダイウイルス (HVJ: hemagglutinating virus of Japan) のゲノムRNAを破壊し複製能力を失わせた不活化粒子である。近年HVJ-E自身の有する抗腫瘍効果が明らかとなっており、我々はこの不活化粒子が膠芽腫に対して腫瘍局所における抗腫瘍効果を有することを明らかにしている。今回、HVJ-Eによる腫瘍局所での免疫寛容解除(制御性T細胞抑制)に自家腫瘍ワクチン療法による腫瘍特異的免疫活性化を組み合わせることで、相乗的抗腫瘍免疫反応が生じて強力な抗腫瘍効果が生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) derived from inactivated replication-defective Sendai virus was originally developed as a versatile drug delivery system. We had shown the ability of HVJ-E itself to enhance anti-tumor immunity through activation of effector T cells and natural killer cells and inhibition of regulatory T cells in glioma mouse models. In the present study, we have shown that the addition of systemic activation of tumor specific immunity by autologous tumor vaccination to local inhibition of immune tolerance by HVJ-E leads to synergistic activation of anti-tumor immunity against intracranial glioma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：不活化ウイルス粒子 自家腫瘍ワクチン 脳腫瘍 新規免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性脳腫瘍は人口 10 万人あたり年間 10~12 人発生するとされる。神経膠腫はグリア細胞から発生する原発性脳腫瘍であり、その中で最も悪性度の高い膠芽腫は浸潤性の発育形態を示すことから手術、放射線療法、化学療法を組み合わせた集学的治療を行っても再発はほぼ不可避であり、5 年生存割合は 10%に満たない。現在の標準治療であるテモゾロミドを用いた術後放射線化学療法を行っても生存期間中央値は 14.6 ヶ月に留まっており、新たな治療戦略の開発が急務である。

(2) HVJ-E とは、HVJ (hemagglutinating virus of Japan ; Sendai virus) に紫外線照射を加えることにより内部のゲノム RNA を破壊し複製能力を失わせた不活化粒子であり、安全かつ高効率な遺伝子治療用ベクターとして開発された。近年、HVJ-E 自身の有する抗腫瘍効果が明らかとなっており、タイプ インターフェロンの誘導による腫瘍細胞に対する直接的抗腫瘍効果が解明された。また、HVJ-E の大きな特徴として、単独で腫瘍特異的な免疫反応を賦活化する能力を有することが挙げられる。細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞を活性化させるのみでなく、制御性 T 細胞による免疫寛容状態を解除させることにより抗腫瘍免疫反応を誘導すると考えられている。我々は、実際にマウス膠芽腫モデルに対して HVJ-E を脳腫瘍内に直接投与することにより、腫瘍増大抑制効果が発揮され、その結果モデルマウスの生存期間が有意に延長することを明らかにしている。このように HVJ-E は、これまでの標準治療での根治が不可能な膠芽腫に対する新たな治療戦略となる可能性を有すると考えられる。

## 2. 研究の目的

HVJ-E の有する腫瘍局所での多彩な抗腫瘍効果のうち、脳内の腫瘍局所において免疫

寛容状態を解除し抗腫瘍免疫反応を誘導する能力に着目した。我々は、ホルマリン固定自家腫瘍ワクチン (AFTV) 療法の臨床研究を行っており、重篤な副作用を生じることなく、腫瘍に対する全身性獲得免疫を活性化させることができることを明らかにしている。HVJ-E の脳腫瘍内局所投与に AFTV 療法を組み合わせることにより、相乗的抗腫瘍免疫反応が生じて強力な抗腫瘍効果が生じるのかを腫瘍モデルを用いて検証する。さらに今後の臨床応用を念頭において、これらの併用療法における至適投与タイミングおよび至適投与回数に関する検討も行う。

## 3. 研究の方法

(1) C3H/HeN マウスと同系のマウス悪性グリオーマ細胞である RSV-M を用いる。RSV-M を背部皮下に接種した皮下腫瘍モデルと脳内に定位的に接種した脳腫瘍モデルの 2 種類のマウスモデルを作成し、治療実験を行う。

(2) HVJ-E は HVJ に 99 mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線を照射して作製し、自家腫瘍ワクチンは培養 RSV-M 細胞をホルマリンで固定して作製する。

(3) 併用治療群における副作用出現の評価を行う。

(4) 各単独治療群と併用治療群の腫瘍増殖抑制効果の解析を通して、腫瘍ワクチンの治療回数および HVJ-E の投与タイミング等の至適併用療法の条件検討を行う。

(5) 各単独治療群と併用治療群における腫瘍組織解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) HVJ-E が腫瘍局所で抗腫瘍免疫反応を誘導した時点で、すでに全身性獲得免疫を活性化させておく必要があると判断し、マウス悪性グリオーマ細胞接種後の早期から複数回腫瘍ワクチンを投与する方針とした。条件

検討を重ねた結果、皮下腫瘍モデルにおいて、腫瘍ワクチンをグリオーマ細胞接種2日後から1日おきに計5回投与し、最終投与日にHVJ-Eを腫瘍内単回投与することで、効果的に腫瘍増大を抑制できることを見出した。腫瘍ワクチン療法単独群では腫瘍増大抑制効果はみられず、HVJ-E腫瘍内単回投与群ではある程度の増大抑制効果がみられた。併用治療群においては、腫瘍増大の著明な抑制のみならず、一部で腫瘍消失も観察され、腫瘍ワクチンを併用することによりHVJ-E単回投与でも治療効果が期待できることが明らかとなった。

(2) 皮下腫瘍組織の免疫組織化学染色においては、併用治療群でCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞の著明な腫瘍内浸潤が認められ、相乗的な抗腫瘍免疫反応が生じているものと考えられた。また細胞障害性T細胞の浸潤増強がみられるにも関わらず、制御性T細胞はコントロール群と比べて浸潤増強を認めなかった。

(3) 脳腫瘍モデルにおいては腫瘍増大による症状出現が早く、腫瘍ワクチンをグリオーマ細胞接種翌日から1日おきに計4回投与し、最終投与日にHVJ-Eを腫瘍内に定局的に単回投与することとした。併用療法による腫瘍増大抑制効果が示され、免疫組織化学染色解析の結果、脳内においても皮下と同様に効率的に抗腫瘍免疫応答が惹起されることが判明した。

(4) 皮下腫瘍モデル、脳腫瘍モデルのいずれの実験においてもマウスの体重減少や致死的な副作用の出現は認めなかった。

(5) これらの結果から、HVJ-Eと腫瘍ワクチン療法の併用による相乗的抗腫瘍効果が明らかとなった。HVJ-Eによる腫瘍局所での免疫寛容解除にワクチンによる腫瘍特異的免疫活性化を組み合わせるというアプローチは、これまでに報告がなく、非常に特色のあるアプローチである。今後はさらに、

ELISPOT assay等により腫瘍特異的獲得免疫の誘導を確認し、マウス脳腫瘍モデルにおける生存期間解析を行ったうえで、臨床応用を目指していく予定である。

## 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)

[学会発表](計6件)

1. 小沼邦之, 松田真秀, 石川栄一, 山本哲哉, 高野晋吾, 松村明. 悪性神経膠腫に対する hemagglutinating virus of Japan-envelope(HVJ-E)の自家腫瘍ワクチンによる増強効果の検討. 第33回筑波脳神経外科研究会学術集会 2015.2.1: 筑波大学(茨城・つくば)
2. 小沼邦之, 松田真秀, 石川栄一, 山本哲哉, 高野晋吾, 松村明. 悪性グリオーマに対する不活化ウイルス粒子と自家腫瘍ワクチンの併用療法. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会 2014.11.30: シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉・浦安)
3. 小沼邦之, 松田真秀, 石川栄一, 山本哲哉, 松村明. 悪性神経膠腫に対する non-replicating oncolytic vector therapy の自家腫瘍ワクチンによる増強効果. 第11回がんワクチン療法研究会学術集会 2014.11.22: 東京女子医科大学(東京・新宿区)
4. 小沼邦之, 松田真秀, 石川栄一, 山本哲哉, 阿久津博義, 松村明. 悪性グリオーマに対する不活化ウイルス粒子と自家腫瘍ワクチンの併用療法. 日本脳神経外科学会第73回学術総会 2014.10.10: グランドプリンスホテル新高輪(東京・港区)
5. Onuma K, Matsuda M, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A. Development of inactivated viral particle therapy

for malignant glioma. 11<sup>th</sup> Meeting of  
Asian Society for Neuro-Oncology  
2014.9.11-14 : Istanbul ( Turkey)

6. 松田真秀, 小沼邦之, 石川栄一, 金田安史, 松村明. 不活化ウイルス粒子による悪性脳腫瘍治療の開発 免疫療法としての側面 . 第9回がんワクチン療法研究会学術集会 2012.11.17 : 筑波大学(茨城・つくば)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松田 真秀 ( MATSUDA MASAHIDE )

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 30614333