

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293275

研究課題名(和文) 腫瘍溶解性ウイルスHF10吸着化リンパ球による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Systemic virotherapy using oncolytic herpes simplex virus adsorbed onto antigen-specific lymphocytes

研究代表者

粕谷 英樹 (KASUYA, Hideki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00402636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、HF10を抗腫瘍リンパ球に吸着させることでリンパ球を運び屋として利用し、HF10の全身投与法の確立を目的とした。模擬的な癌抗原としてovalbuminを発現するマウスメラノーマ細胞の皮下腫瘍モデルマウスに対して、HF10吸着リンパ球を尾静脈投与したところ、他の治療群と比較してHF10吸着ovalbumin抗原特異的T細胞治療群において最も高い抗腫瘍効果が示された。癌抗原特異的T細胞がovalbumin抗原提示している腫瘍内に選択的に集族し、T細胞に吸着したHF10が不活化されることなく腫瘍まで搬送され抗腫瘍効果を発揮した事が示唆され、臨床応用への基礎データを得た。

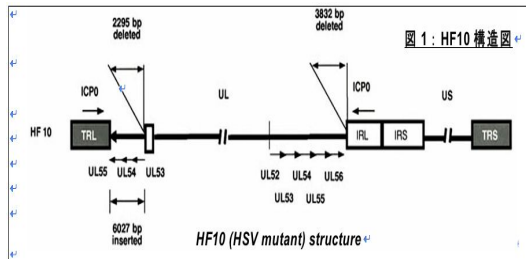
研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the possibility of systemic administration of HF10 adsorbed on the tumor antigen-specific lymphocytes. We administered adsorbed HF10 to the tail vein of mice with subcutaneous tumor expressed ovalbumin antigen and analyzed the efficacy of this treatment. HF10 adsorbed on ovalbumin antigen-specific T cells showed significant antitumor effect more than control group. Our results suggest that HF10 adsorbed on tumor antigen-specific lymphocytes could be delivered systemically without interference of host immune response, and it have significant potential in treatment of the disseminated tumors. We acquired precious basic data for clinical trial.

研究分野：消化器外科学

キーワード：HF10 腫瘍溶解性ウイルス 悪性黒色腫 ヒッチハイクメソッド リンパ球療法 Drug delivery

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍溶解性ウイルス HF10 はがん細胞のみに感染増殖する自然変異型のヘルペスウイルスである (図 1)。一般的な治療法として挙げられる化学療法や放射線療法と比較して、がん特異的に感染増幅する HF10 は副作用の軽減が大きく期待できる。我々名古屋大学医学部附属病院で行った臨床研究でも関連した副作用はなく、HF10 による抗がん治療は、化学療法よりも患者負担の少ない抗腫瘍薬であると言える。また、腫瘍特異的なリンパ球の誘導など、癌ワクチンすなわち全身療法としての効果も明らかにされつつあり、当院においても、強い抗腫瘍免疫の関連が示唆されている (Nakao A, Kasuya H, et al. Cancer Gene Therapy 2011)。



(2) 近年、がん患者のリンパ球を特殊な方法で活性化し、増殖して体内に戻す、活性化自己リンパ球療法の効果が報告されている。再発グリオーマに対する自己腫瘍特異的 T リンパ球注入療法、グリオーマに対する腫瘍細胞特異的ワクチン療法などの報告 (Yu JS, et al. Can. Research 2004) があり、各種癌領域についても癌リンパ球療法の効果についての報告がされてきている。また、癌細胞への特異性を持たせるため、体外での培養時に癌特異的な WT1 ペプチドに感作させる方法などが広く臨床応用されている。

2. 研究の目的

外科的切除のみでは治癒の望めない進行癌に対して、バイオ系抗癌剤は今後さらに期待される研究分野である。これまでの臨床研究は腫瘍へ直接 HF10 を注射していた。我々は、リンパ球が CTL 作用による抗腫瘍効果を示すだけでなく、生体内で HF10 の運び屋として機能する可能性に着目した。

本研究は全く別の研究分野である腫瘍溶解性ウイルス HF10 と活性化自己リンパ球療法を組み合わせ、抗腫瘍リンパ球を運び屋として利用する事で、HF10 の全身投与方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス黒色腫細胞 B78H1 は HSV 非感受性細胞である。この B78H1 細胞から HSV の細胞内 entry に重要な gD 膜 receptor を改変し HSV に易感染性とした B78H1nectin 細胞を作製した。また、B78H1 細胞、B78H1nectin 細胞それぞれに模擬的な癌抗原として卵白アルブミン (ovalbumin) を発現するように形

質転換し B78H1-ova 細胞、B78H1nectin-ova 細胞を作製した。

(2) 上記の HSV および ovalbumin 抗原特異的リンパ球に対して異なる感受性を持つ 4 種の細胞株 (B78H1, B78H1-ova, B78H1nectin, B78H1nectin-ova) を用いて、HF10 吸着リンパ球による殺細胞効果を in vitro で検討した。HF10 吸着リンパ球は ovalbumin アレルギーの特殊な Transgenic mouse (OT-1 マウス) の脾臓から CD8 陽性 T 細胞を採取し、SIINFEKL ペプチド (ovalbumin 抗原) と IL-2 で刺激し、ovalbumin 抗原特異的な CTL を誘導した OT-1 T 細胞に HF10 を吸着させて作製した (図 2)。

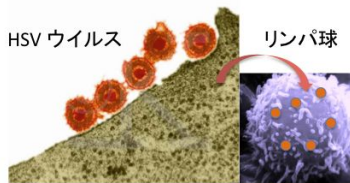


図 2 HF10 吸着リンパ球のイメージ

(3) B78H1nectin-ova を C57BL/6 マウスの皮下に移植し、腫瘍体積が約 100 mm³ に成長後の皮下腫瘍モデルマウスに対して、PBS (コントロール)、HF10 単独 (1x10⁶ pfu)、OT-1 T 細胞および control T 細胞単独 (1x10⁶ 個)、HF10 吸着 OT-1 T 細胞または HF10 吸着 control T 細胞 (1x10⁶ 個、T cell : HF10=1:1) を尾静脈投与した。継時的に腫瘍体積を測定し、各治療群間での比較を行った。Control T 細胞は C57BL/6 の脾臓から、CD8 陽性 T 細胞を採取し、CD3 抗体と IL-2 で刺激し、5 日間培養して得た。

4. 研究成果

(1) B78H1 細胞と B78H1nectin 細胞の HF10 感受性の違いを MTT アッセイにより評価した。具体的には、MOI=0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 の HF10 を各細胞株に感染させ、感染後 4h, 24h, 48h, 72h で継時的に MTT アッセイを行い MOI=0、HF10 感染後 4h の値をコントロール (1.0) として、グラフを作成した (図 3A, B)。その結果、B78H1 細胞は HF10 非感染性細胞株であること (図 3A)、また B78H1nectin 細胞が HF10 感受性細胞株であることを示した (図 3B)。また、感染後 48h, 72h の結果より、B78H1nectin 細胞は MOI = 0.1~1 の間において、HF10 感受性を顕著に示すことも示唆された。これらの細胞に ovalbumin を強制発現させた B78H1-ova 細胞、B78H1nectin-ova 細胞において、HF10 感受性に変化は見られなかった (data not shown)。

(2) 96 well plate に播種した B78 細胞群 4 株 (B78H1, B78H1-ova, B78H1nectin, B78H1nectin-ova) に対して各 T 細胞を 10 倍の細胞数で加え、培養 48 時間後に MTT アッセイを行い、未処理の細胞の値を (1.0) と

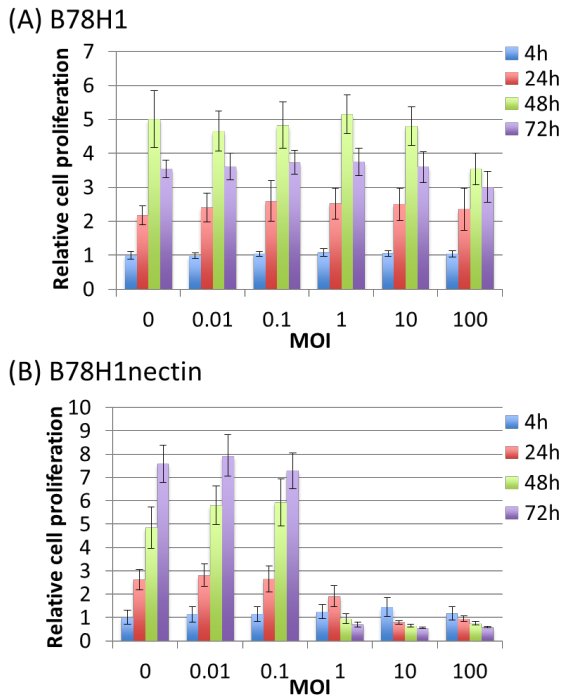


図3 HF10感受性

して細胞生存率を求めた(図4A, B)。その結果、HSV非感染性細胞株であるB78H1、B78H1-ovaにおいては、OT-1 T細胞がcontrol T細胞と比較してOVA発現細胞B78H1-ovaに対して強い細胞障害性を示し、HF10の吸着の有無による違いは見られなかった(図4A)。一方で、HSV易感染性細胞株であるB78H1nectin、B78H1nectin-ovaにおいては、

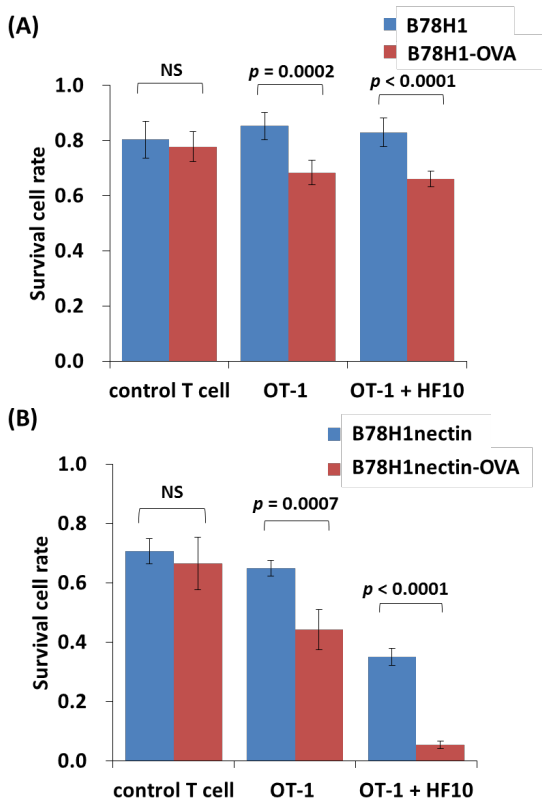


図4 HF10吸着OT-1 T細胞の細胞障害性

HF10吸着OT-1 T細胞がOVA発現細胞B78H1nectin-ovaに対して最も強い細胞障害性を示した(図4B)。なお、HF10を吸着したcontrol T細胞の細胞障害性は、B78H1nectinとB78H1nectin-ovaとの間に違いは見られなかった(data not shown)。

(3) B78H1nectin-ovaの皮下腫瘍モデルマウスに対してcontrol T cell、OT-1 T cell、HF10、HF10吸着control T cell、HF10吸着OT-1 T cellの5種類の異なる治療群の組み合わせを用い、in vivoでの全身投与(尾注)による抗腫瘍効果を腫瘍サイズの計測により評価した(図5A, B)。その結果、HF10単独治療群およびOT-1 T細胞単独治療群と比較してHF10吸着OT-1 T細胞治療群において有意に高い抗腫瘍効果が認められた(図5A)。また、HF10吸着control T細胞治療群よりもHF10吸着OT-1 T細胞治療群の方が高い抗腫瘍効果がある傾向が示された(図5B)。

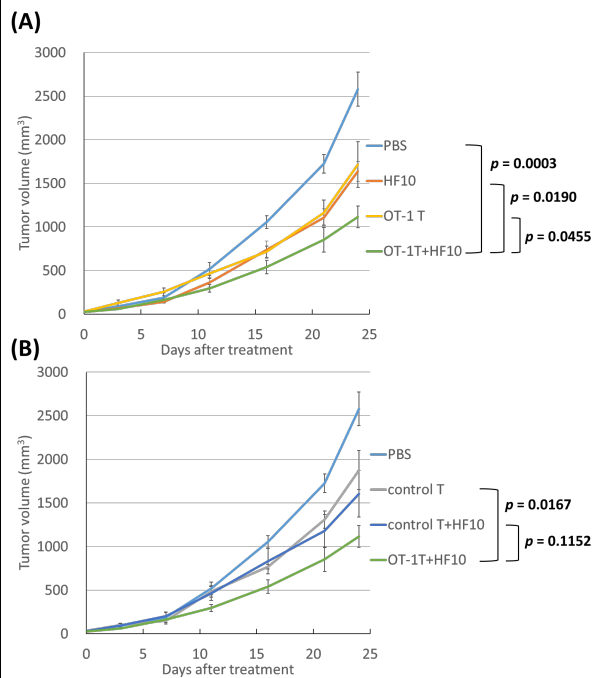


図5 HF10吸着OT-1 T細胞の抗腫瘍効果

考察) OT-1 T細胞がovalbumin抗原提示しているB78H1nectin-ovaの腫瘍内に選択的に集族し、OT-1 T cellに吸着したHF10が不活化されることなくB78H1nectin-ova腫瘍まで搬送され抗腫瘍効果を発揮したと考えられる。本研究結果から腫瘍特異的リンパ球を用いた腫瘍溶解性HSVの血管内投与法の有効性が示唆され、原発巣のみならず転移巣への効果も期待され、今後、難治癌の新たな治療戦略に繋がるものと考えられる。

今後の研究の展開として、本研究で得られた結果を基にして、TCR遺伝子改変T細胞を用いたHF10の血管内投与の効果について評価し、遺伝子改変T細胞療法と組み合わせた臨床応用の可能性を模索することが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Gewen Tan, Hideki Kasuya, Tefvik Tolga Sahin, Kazuo Yamamura, Zhiwen Wu, Yusuke Koide, Yoshihiro Hotta, Toshio Shikano, Suguru Yamada, Akiyuki Kanzaki, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Shuji Nomoto, Yoko Nishikawa, Maki Tanaka, Naoko Tsurumaru, Toshie Kuwahara, Saori Fukuda, Toru Ichinose, Toyone Kikumori, Shin Takeda, Akimasa Nakao, Yasuhiro Kodera, Combination therapy of oncolytic herpes simplex virus HF10 and bevacizumab against experimental model of human breast carcinoma xenograft、International Journal of Cancer、査読有、Volume 136, 2015、1718-1730、DOI: 10.1002/ijc.29163

Hideki Kasuya, Yasuhiro Kodera, Akimasa Nakao, Kazuo Yamamura, Tan Gewen, Wu Zhiwen, Yoshihiro Hotta, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Saori Fukuda, Naoko Tsurumaru, Toshie Kuwahara, Toyone Kikumori, Yusuke Koide, Yasushi Fujimoto, Tsutomu Nakashima, Yoshiki Hirooka, Hiroshi Shiku, Maki Tanaka, Kazuto Takesako, Touru Kondo, Branko Aleksic, Hiroki Kawashima, Hidemi Goto, Yukihiro Nishiyama、Phase I Dose-escalation Clinical Trial of HF10 Oncolytic Herpes Virus in 17 Japanese Patients with Advanced Cancer、Hepato-Gastroenterology、査読有、Volume 61、2014、599-605、DOI: 10.5754/hge14104

〔学会発表〕(計 19 件)

粕谷 英樹、Clinical Trial Using Oncolytic Virus HF10 in Japan、Pusan National University Gene and Cell Therapy Research Center の開所式、2016/1/7、梁山 (大韓民国)

Toru Ichinose, Akiyuki Kanzaki, Luo Chenhong, Yoshihiro Hotta, Koide Yusuke, Wu Zhiwen, Saori Fukuda, Toshie Kuwahara, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya, Systemic virotherapy using oncolytic herpes simplex virus adsorbed onto antigenspecific lymphocytes、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015/11/22~24、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

Zhiwen Wu, Toru Ichinose, Chenhong Luo, Gewen Tan, Tefvik T. Sahin, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Yoko Nishikawa, Yusuke Koide, Saori Fukuda, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya、Combination therapy against human pancreatic cancer with oncolytic herpes

virus hrR3 and monoclonal antibody bevacizumab、第 74 回日本癌学会学術総会、2015/10/8~10、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Hideki Kasuya, Yoshihiro Hota, Chenhong Luo, Toru Ichinose, Zhiwen Wu, Noriyuki Miyazima, Nobuaki Mukouyama, Yusuke Koide, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Anti-tumor immunity with locally administered HF10 effects to the liver and peritoneal metastasis in mouse models、第 74 回日本癌学会学術総会、2015/10/8~10、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

粕谷 英樹、山村 和生、堀田 佳宏、藤井 努、中尾 昭公、西山 幸廣、田中 舞紀、小寺 泰弘、EXPERIENCE OF TRANSLATIONAL RESEARCH USING HERPES ONCOLYTIC VIRUS HF10 IN NAGOYA UNIVERSITY HOSPITAL、第 70 回日本消化器外科学会総会、2015/7/15~17、アクトシティ浜松、オークラアクトシティホテル浜松、ホテルクラウンパレス浜松 (静岡県浜松市)

粕谷英樹、山村和生、堀田佳宏、Wu Zhewen、一ノ瀬亨、小出悠介、桑原寿江、山田豪、藤井努、田中舞紀、小寺泰弘、腫瘍モデルに対する腫瘍溶解性ヘルペスウイルス HF10 とエルロチニブとの併用療法、第 46 回日本腫瘍学会大会、2015/6/19~20、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Hideki Kasuya, Kazuo Yamamura, Yoshihiro Hotta, Tan Gewen, Wu Zhiwen, Toru Ichinose, Toshie Kuwahara, Yusuke Koide, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera、Potential Therapeutic Effectivity for Combination of HF10 with Erlotinib and Gemcitabine、the 9th International Conference on Oncolytic Virus Therapeutics、2015/6/13~16、ボストン (アメリカ)

Kasuya H., Yamamura K., Hotta Y., Tan G., Wu Z., Fukuda S., Kuwahara T., Hirooka Y., Goto H., Koide Y., Tanaka M, Kodera Y. Translational study using herpes oncolytic virus HF10 with Erlotinib and Gemcitabine、第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会、2014/8/6~8、東京慈恵会医科大学 (東京都港区)

Hideki Kasuya, Kazuo Yamamura, Tan Gewen, Tefvik T Sahin, Yoshiki Hirooka, Hidemi Goto, Yasuhiro Kodera, Maki Tanaka, POSSIBILITY OF COMBINATION THERAPY USING HERPES ONCOLYTIC VIRUS HF10 WITH ERLOTINIB AND GEMCITABINE AS PRECLINICAL DATA FOR CLINICAL TRIAL、8th International

Conference on Oncolytic Virus Therapeutics, 2014/4/10~13、オックスフォード(イギリス)

Gewen Tan, Hideki Kasuya, Tevfik Tolga Sahin, Toshio Shikano, Suguru Yamada, Akiyuki Kanzaki, Kazuo Yamamura, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Shuji Nomoto, Yoko Nishikawa, Maki Tanaka, Naoko Tsurumaru, Shin Takeda, Akimasa Nakao, Yasuhiro Kodera, Combination therapy of oncolytic herpes virus HF10 and bevacizumab against experimental model of human breast carcinoma xenograft, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014, 2014/4/5~9, San Diego(USA)

〔図書〕(計 2 件)

粕谷 英樹、他 98 名、(株)技術情報協会、次世代のがん治療薬・診断のための研究開発、2016、400 ページ(333-335)

粕谷英樹、小寺泰弘、山田豪、後藤秀実、廣岡芳樹、川嶋啓揮、田中舞紀、飯田橋パピルス、分子細胞治療フロンティア 2015 Chapter3 ウイルス治療 1 腫瘍溶解性ウイルス HF10: Combination Therapy の有用性、2014、236 ページ(111-119)

6. 研究組織

(1)研究代表者

粕谷 英樹 (KASUYA, Hideki)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号： 00402636

(2)研究分担者

小寺 泰弘 (KODERA, Yasuhiro)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号： 10345879

内田 宏昭 (UCHIDA, Hiroaki)
東京大学・医科学研究所・講師
研究者番号： 20401250

山田 豪 (YAMADA, Suguru)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号： 30467287

珠玖 洋 (SHIKU, Hiroshi)
三重大学・医学系研究科・産学連携講座
教員
研究者番号： 80154194

野本 周嗣 (NOMOTO, Shuji)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号： 40300967
(平成 25 年度—平成 26 年度)