

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670560

研究課題名(和文) iPS細胞由来樹状細胞とオートファジー誘導分子搭載ウイルスによる膵癌免疫療法

研究課題名(英文) Immunotherapy for pancreatic cancer using iPS cell-derived dendritic cell and autophagy-inducing oncolytic virus

研究代表者

山上 裕機 (Yamaue, Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療用遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス(T-01)の基本骨格に外来配列を直接組み込むことで、特殊機能を有し、かつ胃癌治療に臨床応用可能な遺伝子組換えウイルスの開発研究を施行した。我々がスクリーニングした分子であるサイトカインシグナリング3抑制(SOCS-3)発現癌治療用ヘルペスウイルスを作成して評価し、高い治療効果を実験モデルにおいて確認した。将来の臨床応用を見据えた膵癌治療用ヘルペスウイルス療法の基礎開発が進んだと考えられる。また、iPS細胞由来樹状細胞を癌治療用ウイルスの腫瘍微小環境下に用いることで腫瘍免疫能が強化された。

研究成果の概要(英文)：We developed recombinant oncolytic herpes simplex viruses that possess certain antitumor functions and are useful for gastric cancer therapy. A third-generation oncolytic herpes simplex virus type 1(T-01) was used as the backbone to insert foreign sequences. Oncolytic herpes simplex viruses expressing suppressor of cytokine signaling 3 (T-SOCS-3) were constructed, evaluated, and proved to be therapeutic potential. T-SOCS-3 may be a new agent against pancreatic cancer in the near future, and a progress has been made in the basic development of next generation oncolytic virotherapy. In addition, we confirmed that iPS cell derived dendritic cell was able to enhance antitumor immunity at the oncolytic condition of tumor microenvironment.

研究分野：膵臓外科学

キーワード：膵癌 免疫療法 樹状細胞 癌治療用ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

悪性新生物は成人死亡原因の第1位である。そのうち膵癌による死亡は約25,000人/年にも及び、臓器別では肺癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌につづく第5位と報告されており、決して希な疾患ではない。日本膵臓学会の癌登録データ解析によると、通常型膵癌は9,703名/11,050名(87.8%)と膵癌の多くを占めているが、その予後は5年生存率がわずか9.7%と極めて不良である。さらに5年以上生存例のほとんどが外科的切除例であることから、膵癌の最も効果的な治療方法は切除である。しかし、膵癌患者の約60%が切除不能であり、切除が可能であっても5年生存率は13%と切除後も予断を許さない状況である。今後、膵癌の予後を改善するために最も重要な点の一つは、切除術後の再発予防に有効な治療の開発である。

各癌種に対する治療法としてエビデンスに基づき確立されているものは、外科療法、化学療法、放射線療法があるが、さらに近年、第4の治療法として期待を集めているのが、免疫療法である。「免疫療法」は、免疫システムを利用して治療効果を得ようとする方法である。1991年にベルギーのLudwig 癌研究所のBoonらにより、悪性黒色腫細胞に発現する抗原MAGEをコードしている遺伝子が初めて同定された。さらに1994年には米国NIHのRosenberg SAらが腫瘍に発現する抗原をコードするMART-1, gp100 遺伝子を悪性黒色腫から同定し[9,10], それ以降、多くの遺伝子が同定されている。それらを由来とする一部の抗原については、MHCクラスIに提示されるペプチドエピートプが同定されており、ペプチドの刺激によって *in vitro* で腫瘍細胞を傷害するCTLを誘導できることも報告されている。

しかし、腫瘍免疫療法では、免疫機構からの逃避が問題となっている。そこで、より効率的な免疫療法の挑戦的开发に加えて、

他の新規治療法開発との併用も視野に入れ、二つのコンセプトを本研究に組み入れることにした。一つは癌治療用ウイルスの概念であり、もう一つは呼称 iPS (induced pluripotent stem cell)細胞と呼ばれる「人工多能性幹細胞」から誘導した樹状細胞(dendritic cell; DC)を用いた免疫療法の概念である。本研究はこの二つの融合療法の新規開発である。

## 2. 研究の目的

我が国では臨床試験が始まった癌治療用アデノウイルスやヘルペスウイルスに関しては更なる改良が着々と進んでいる。まず、アデノウイルスでは、化学療法の効果判定やナビゲーション外科が可能となるような製剤としての可能性がすでに報告されている。ヘルペスウイルス研究開発においても、我々の施設では G47Δ を用いた消化器癌に対する臨床試験を目指しながら、基礎研究開発も行っている。まず、ヘルペスウイルスには感染の際に宿主細胞を周囲の細胞と融合させる性質を有するいわゆるサブタイプが存在する。G207 から選別された融合垂系の Fu-10 はそのひとつである。また、syncytium と呼ばれる細胞融合を誘導する遺伝子を発現するように遺伝子組換えした Synco-2D は殺細胞効果が増強することを確認した。最近では、G47Δ の改良型である T-01 のゲノムに治療遺伝子を直接組み込み、増幅型遺伝子発現ベクターの機能を持たせて治療に応用する試みを行っている。具体的には、bacterial artificial chromosome (BAC) を利用し、第3世代腫瘍溶解性ヘルペスウイルスである T-01 のゲノムに治療戦略に応じた遺伝子をと組み込むシステムを取り入れ、研究開発に努めている。その理由として、ウイルス療法は化学療法や放射線治療との併用により相乗効果が期待できるためである。例えば、低線量の放射線照射が RR 活性を上昇させ、その結果、ヘルペスウイル

スの複製能を増強させたという報告や、ある種の抗癌剤が癌細胞の Growth Arrest and DNA damage inducible Protein 34 (GADD34) を誘導させることで腫瘍内でのウイルスの複製能を増強させることがわかっている。そこで我々は、膵癌に対する癌治療用ウイルスを新規開発していくうえで、ウイルスによる細胞死の概念に着目し、癌微小環境下における細胞死から誘導される種々の分子が、iPS 細胞由来 DC により効率よく認識され、それを介した抗腫瘍免疫応答の惹起へと繋がることを証明することを本研究の主たる目的とした。

### 3. 研究の方法

「平成 25 年度」

#### (1) 膵癌に対する分子標的機能強化型ヘルペスウイルスの開発

ヒト膵癌細胞株に対して癌治療用ヘルペスウイルスが一定の殺細胞効果を有することを確認したうえで、腫瘍特異的感染能と増殖能を増強する必要があると考え、ウイルスの膵癌細胞に対する標的化を追求した。さらに、ヘルペスウイルス側の envelope glycoprotein である gD を遺伝子改変し、CEA 発現胃癌細胞株に対して特異的に感染するヘルペスウイルスを作成する。これらの少なくとも 2 種類の分子標的機能増強型ヘルペスウイルスの作成後、in vitro 系の実験系を用いて、膵癌細胞株の CA19-9、DUPAN-2 の発現強度に分けて、これらのウイルスの感染能、複製能、殺細胞効果を検討する。

#### (2) 膵癌腹膜播種・肝節転移規定遺伝子の同定と、これを認識するヘルペスウイルス作成のスクリーニング

切除した膵癌切除標本の凍結組織 20 例 (腹膜播種陽性 5 例、陰性 5 例、肝転移陽性 5 例、陰性 5 例) を対象に、マイクロダ イセクション法により膵癌細胞のみを回収し RNA を抽出する。GeneChip Human U133

plus 2.0 array (Affymetrix 社) を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、腹膜播種陽性群と陰性群、肝転移陽性群と陰性群で各遺伝子の発現量を dChip software を用いて比較 (fold change 1.5 倍以上、2 群間の平均強度差 100 以上の予定) し、膵癌の再発形式として頻度の高い腹膜播種、もしくは肝転移のバイオマーカーを推測し、これらのバイオマーカーを標的としたヘルペスウイルスが作成可能か否かを分子生物学的に確認する。さらに抽出できた分子の中から、前述のヘルペスウイルスの gD に遺伝子工学的に組み込めるか否かを選択、検討する。

「平成 26 年度以降」

#### (3) 平成 25 年度で作成したヘルペスウイルスの性能を確認の後、膵癌担癌モデルでの検討

(以下に実験プロトコール概要を示す)

Day 1: 膵癌細胞株、臨床症例 (倫理委員会承認) から樹立した膵癌細胞 ( $3 \times 10^6$  個) を 7 週齢 athymic female BALB/c ノードマウスに腹腔内投与する。

Day 7: retargeting 出来るように開発 (平成 25 年度研究計画) したヘルペスウイルス ( $1 \times 10^9$  ウイルス粒子) を腹腔内投与する (各治療群は  $n=7$  とする治療 7 日目に各群より 3 匹を麻酔下に蛍光発色条件でナビゲーション仮想手術を行う。その後、腫瘍含む各臓器 (腹膜、腸管、肝臓、脾臓) の組織学的診断を H&E 染色と X-gal 染色により評価する。残りの群に関しては生存期間をエンドポイントとして継続観察を行う。

#### (4) 癌幹細胞(CSC)に対しても強力な殺細胞効果を有するオートファジー誘導ヘルペスウイルスの効果の検証

抗癌剤感受性試験研究で用いた方法 (Anticancer Res, 2005) を用いて、90% 以上純化膵癌細胞より、CSC のマーカーとしても知られる ABCG2 (ATP-binding cassette, subfamily G, member 2) を発現する胃癌細胞

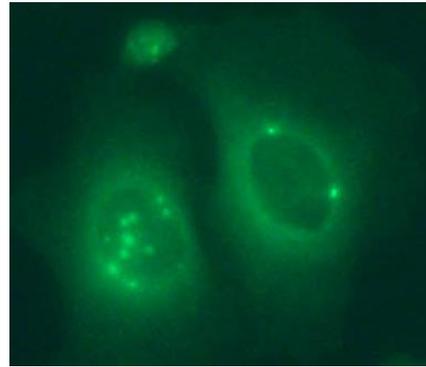
を色素 Hoechst 33342 を用いてフローサイトメトリー上で SP (side population)細胞として区別し、作成したオートファジー誘導ヘルペスウイルスに対する感受性を検討する。

(5) IPS 細胞由来 DC による腫瘍微小環境における特異的免疫能誘導の検討 平成 25-26 年度内に達成が予想される膵癌に対する分子標的化ウイルス療法の基礎的検討の解析の結果次第で、マウス IPS 細胞由来 DC がウイルス破壊後の環境で特異的免疫誘導可能か否かを免疫学手法により確認する。

#### 4. 研究成果

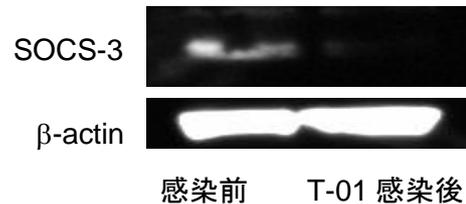
CA19-9 分子標的型ヘルペスウイルスの開発を主目的として、特に、ヘルペスウイルスの envelope glycoprotein である gD 部分の遺伝子工学的改変を主目的とした。まず、ヘルペスウイルスの gD 部分を含むシャトルベクターを用いて、CA19-9 分子に選択的に結合する分子の改変に取りかかったが、この遺伝子改変には相当の時間を要することが研究経過中に判明し、当該年度内を越えての目標達成が見込まれた。また、実地臨床応用を想定して、膵癌切除標本の CA19-9 分子の発現頻度を免疫染色して検討すると、全体の 30%程度の陽性率であり、欧米からの報告に比べて低頻度であることが判明した。一方、平行して進めていたオートファジーとヘルペスウイルス関連性の検証に関して、以下に示す新たな知見が得られた。諸家の報告では、癌治療用アデノウイルスの場合、オートファジーは腫瘍溶解においてオートファジーは正の効果作用とされている。我々の当該年度の研究では、膵癌細胞において、オートファジー現象はほぼ恒常的に認められてはいるものの、癌治療用ヘルペスウイルスの複製には、むしろ抑制的に関与している可能性が示唆された。癌治療用ヘルペスウイルスにオートファジー機能を付加することはむしろ逆効果となる可能性があり、非常に有用な知見であると考えら

れる。(次項上図は、癌治療用ヘルペスウイルス感染後にオートファジーが強く誘導させている現象を示している)



そこで、オートファジー誘導関連分子としては当初より開発に着手していた Beclin-1 よりも、SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3)が膵癌組織において非常に重要な分子であることが判明し、これを応用したヘルペスウイルス療法のプロジェクを次年度に立ち上げた。

#### Pancreatic cancer cell line



(上図は、第 3 世代ヘルペスウイルス T-01 が膵癌細胞に感染後、SOCS-3 の発現を減弱させ、ウイルスの複製能を下げる減少を示唆する研究データの一部である)

この研究成果より、安全性の高い oncolytic HSV として、我が国で第 I 相臨床試験が開始されたばかりである第 3 世代 oncolytic HSV; G47Δ を基本骨格とする新規第 3 世代 oncolytic HSV: T-01 を BAC (bacterial artificial chromosome) 法を用いて、SOCS-3 遺伝子発現ヘルペスウイルス(T-SOCS-3)を作成し、当初の研究計画に関しては、T-SOCS-3 を用いて行った。

ヒト膵癌細胞株を用いた担癌マウスに対する治療実験では、T-SOCS-3 は良好な抗腫瘍効果を示したが、膵癌新鮮切除標本を用

いた前臨床実験では、以下の問題点も明らかになった。T-SOCS-3, 第3世代ヘルペスウイルス(T-01)はともに膵癌組織に感染し、ウイルス関連蛋白も発現する。また、膵正常組織への感染は野生型のヘルペスウイルス (Strain F) よりも制御出来た。しかし、膵癌組織におけるウイルス複製能はかなり抑制されることから、今後の臨床応用、治療法として確立して行くうえで、ヘルペスウイルスの機能増強、分子標的化が必要であると考えられる。

また、iPS 細胞由来 DC 療法の研究では、Beclin-1 発現癌治療用ヘルペスウイルスを感染させたマウスメラノーマ B16 細胞に対する細胞障害活性を確認し、これが膵癌モデルにも応用できることを確認したばかりである。今後ではあるが、T-SOCS-3 を用いた実験系で本現象を確認出来れば、研究の主たる目標は達成出来ると考察している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 25 件)

1. Yachida S, Wood LD, Suzuki M, Takai E, Totoki Y, Kato M, Luchini C, Arai Y, Nakamura H, Hama N, Elzawahry A, Hosoda F, Shirota T, Morimoto N, Hori K, Funazaki J, Tanaka H, Morizane C, Okusaka T, Nara S, Shimada K, Hiraoka N, Taniguchi H, Higuchi R, Oshima M, Okano K, Hirono S, Mizuma M, Arihiro K, Yamamoto M, Unno M, Yamaue H, Weiss MJ, Wolfgang CL, Furukawa T, Nakagama H, Vogelstein B, Kiyono T, Hruban RH, Shibata T: Genomic Sequencing Identifies ELF3 as a Driver of Ampullary Carcinoma. *Cancer Cell*. 29(2):229-40, 2016 (査読あり)
2. Hirono S, Kawai M, Okada KI, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Yamaue H: Pancreatic neck cancer has specific and oncologic characteristics regarding portal vein invasion and lymph node metastasis. *Surgery* 159(2):426-40, 2016 (査読あり)
3. Kawai M, Hirono S, Okada KI, Sho M, Nakajima Y, Eguchi H, Nagano H, Ikoma H, Morimura R, Takeda Y, Nakahira S, Suzumura K, Fujimoto J, Yamaue H: Randomized Controlled Trial of Pancreaticojejunostomy versus Stapler Closure of the Pancreatic Stump During Distal Pancreatectomy to Reduce Pancreatic Fistula. *Ann Surg* in press (査読あり)
4. Yamaue H, Tsunoda T, Tani M, Miyazawa M, Yamao K, Mizuno N, Okusaka T, Ueno H, Boku N, Fukutomi A, Ishii H, Ohkawa S, Furukawa M, Maguchi H, Ikeda M, Togashi Y, Nishio K, Ohashi Y: Randomized phase II/III clinical trial of elpamotide for patients with advanced pancreatic cancer: PEGASUS-PC Study. *Cancer Sci* 106(7):883-90, 2015 (査読あり)
5. Okada K, Kawai M, Tani M, Hirono S, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H: Preservation of the left gastric artery on the basis of anatomical features in patients undergoing distal pancreatectomy with celiac axis en-bloc resection (DP-CAR). *World J Surg* 38(11):2980-5, 2014 (査読あり)
6. Tani M, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Yamaue H: Randomized clinical trial of isolated Roux-en-Y versus conventional reconstruction after pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 101(9):1084-91, 2014 (査読あり)
7. Kitahata Y, Kawai M, Tani M, Hirono S, Okada K, Miyazawa M, Shimizu A,

Yamaue H: Preoperative cholangitis during biliary drainage increases the incidence of postoperative severe complications after pancreaticoduodenectomy. Am J Surg 208(1):1-10, 2014 (査読あり)

8. Yamaue H, Satoi S, Kanbe T, Miyazawa M, Tani M, Kawai M, Hirono S, Okada K, Yanagimoto H, Kwon AH, Mukouyama T, Tsunoda H, Chijiwa K, Ohuchida J, Kato J, Ueda K, Yamaguchi T, Egawa S, Hayashi K, Shirasaka T: Phase II clinical study of alternate-day oral therapy with S-1 as first-line chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. Cancer Chemother Pharmacol 73(1):97-102, 2014 (査読あり)

[学会発表] (計 20 件)

1. Yamaue H: The characteristics of pancreatic neck cancer. 2016 Gastrointestinal Cancers Symposium Jan 22, 2016 San Francisco, USA
2. Yamaue H: Artery first approach for borderline resectable pancreas head cancer. BRPC Symposium in Samsung University Dec 12, 2015 Seoul, South Korea
3. Yamaue H: Surgical strategy for borderline resectable pancreatic cancer. Seventh Japanese-Mongolian International Joint Symposium on Surgical Treatment of Digestive Tract Cancers Sep 26, 2015 Ulaanbaatar, Mongolia
4. Yamaue H: The use of an interposed graft during portal vein and/or superior mesenteric vein reconstruction in pancreatic resection for pancreatic cancer.」 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium 2015.1, San Francisco, USA
5. Yamaue H: 「Can We Reduce Complications Following Pancreatoduodenectomy? The

Mesenteric Approach and Clinical Trials」 45<sup>th</sup> Anniversary Meeting of the American Pancreatic Association & Japan Pancreas Society, 2014.11, Hawaii, USA

6. Yamaue H, Kawai M, Okada K, Tani M, Hirono S, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y : The impact of preservation of left gastric artery in distal pancreatectomy with celiac axis en-bloc resection(DP-CAR): Proposal of a novel surgical technique to reduce delayed gastric emptying. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of Pancreas Club 2014.5. Chicago, USA

[図書] (計 5 件)

1. 宮澤基樹, 勝田将裕, 山上裕機: がんワクチンと免疫チェックポイント阻害薬のコンセプトの違い がん分子標的治療 13(4):29-33, 2015
2. 中森幹人, 山上裕機: ウイルス治療「消化器癌克服のための癌治療用ヘルペスウイルスの現状と展望」分子細胞治療フロンティア 120-127, 2015

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med-2ndsurg.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山上裕機 (Yamaue Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20191190

(2)研究分担者

中森幹人 (Nakamori Mikihito)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10322372

川井 学 (Kawai Manabu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40398459

尾島敏康 (Ojima Toshiyasu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60448785

廣野誠子 (Hirono Seiko)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60468288