

厚生労働科学研究費補助金
(がん対策推進総合研究事業 (革新的がん医療実用化研究事業))
分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
(前立腺癌に対するウイルス療法の開発)

研究分担者・福原 浩
(東京大学医学系研究科 泌尿器科・准教授)

研究要旨

前立腺癌は、局所に限局している場合は手術療法や放射線療法が行われ、比較的予後が良い疾患であるが、ホルモン療法に抵抗性となった場合は有効な治療法がないのが現状である。ホルモン療法抵抗性となってからの生存期間中央値は12-15ヶ月であり、新たな機序による治療法が期待されている。そのため、今回、ホルモン療法抵抗性前立腺癌に対する臨床研究を計画しており、これは国の承認を受けて行うウイルス療法として前立腺癌に適応される、国内初の臨床研究となる。

A. 研究目的

ホルモン療法を施行したにもかかわらず再燃(再発)した前立腺癌に対して、治療手段は非常に限られており、ホルモン療法に抵抗性となつてからは、生存期間中央値(いわゆる平均余命)が12-15ヶ月とされている。抗癌剤治療が行われることがあるが、対象に高齢者が多いこともあり、そもそも選択されないことも多く。唯一効果があるとされるドセタキセルでも平均2-3ヶ月の延命効果しか認められていない。また、骨髄抑制などの副作用にて消耗して治療中止となる場合も多く見られるのが現状である。前立腺癌は多くの研究がなされている分野でありながら、再燃した際には有効な手だてがないことから、今回臨床研究を開始するウイルス療法のような、全く新しいアプローチによる治療

法開発が待ち望まれている。

G47Δをホルモン療法抵抗性前立腺癌患者に投与することが今回の臨床研究の目的である。

B. 研究方法

前立腺を摘出しておらず、ホルモン療法後に再燃した前立腺癌患者を対象疾患とする。遠隔転移がある場合も含み、抗癌剤ドセタキセル投与の既往は問わない。試験デザインは安全性確認の第I相とする。

経直腸超音波ガイド下に経会陰的(経皮的)に前立腺内に2カ所投与する方法で行い、

3例ずつ3段階で増加(2回投与→3回投与→4回投与、合計9例)する用量増加方法で行う。主目的は安全性の評価で、観察期間を6ヶ月、生

存期間追跡は2年間行うこととする。

C. 研究結果

ウイルス療法は、厳密には遺伝子治療ではないが、今回の実施計画書は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に則って審査を受けている。平成23年8月に東京大学医学部遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を受けたのち、厚生労働省に申請され、平成24年8月7日付で厚生労働大臣の承認を受けた。また、増殖型遺伝子組換えウイルスを使用するため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ法）に則って、第一種使用規程が厚生労働省に同時申請され、厚生労働大臣と環境大臣の承認を受けている。国の承認を受けて行うウイルス療法として前立腺癌に適応されるのは、今回の臨床研究が国内で初めてとなる。

D. 考察

この臨床研究は東京大学医学部附属病院泌尿器科にて平成25年5月より開始され、7症例にウイルス投与が終了している。平成27年度中に残りの2症例も投与終了する予定である。

E. 結論

ホルモン療法抵抗性再燃前立腺癌に対して、増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型G47Δを用いたウイルス療法の臨床研究を東京大学医学部附属病院泌尿器科にて開始している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Fujimura T, Yamada Y, Sugihara T, Azuma T, Suzuki M, Fukuhara H, Nakagawa T, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Nocturia in men is a chaotic condition dominated by nocturnal polyuria. *Int J Urol*. 2015, in press.
- ② Taguchi S, Fukuhara H, Kakutani S, Takeshima Y, Miyazaki H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Igawa Y, Kume H, Homma Y: Risk factors for clinical metastasis in men undergoing radical prostatectomy and immediate adjuvant androgen deprivation therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(24):10729-33.
- ③ Teshima T, Takahashi S, Nagamoto S, Miyazaki H, Nakagawa T, Fujimura T, Fukuhara H, Kume H, Homma Y: Intrascrotal dedifferentiated leiomyosarcoma originating from dartos muscle. *Case Rep Urol*. 2014, in press.
- ④ Kanatani A, Nakagawa T, Kawai T, Naito A, Sato Y, Yoshida K, Nozaki K, Nagata M, Yamada Y, Azuma T, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Adjuvant Chemotherapy Is Possibly Beneficial

- for Locally Advanced or Node-Positive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2014, in press.
- ⑤ Ito H, Aizawa N, Fujita Y, Suzuki M, Fukuhara H, Homma Y, Kubota Y, Ito M, Andersson KE, Igawa Y: Long-term caloric restriction in rats may prevent age-related impairment of in vitro bladder function. *J Urol*. 2014, in press.
- ⑥ Kakutani S, Fukuhara H, Taguchi S, Nagata M, Niimi A, Hattori M, Miyazaki H, Fujimura T, Nakagawa T, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Combination of docetaxel, ifosfamide and cisplatin (DIP) as a potential salvage chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2014, in press.
- ⑦ Taguchi S, Fukuhara H, Azuma T, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Ishikawa A, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Ultra-early versus early salvage androgen deprivation therapy for post-prostatectomy biochemical recurrence in pT2-4N0M0 prostate cancer. *BMC Urol*. 14, 81-86, 2014.
- ⑧ Yamada D, Matsushita H, Azuma T, Nakagawa T, Nagata M, Yamada Y, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Kume H, Homma Y, Kakimi K: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as a predictor of the response of metastatic renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitor therapy. *Mol Clin Oncol*. 2, 1023-1027, 2014.
- ⑨ Mukaiyama Y, Suzuki M, Morikawa T, Mori Y, Takeshima Y, Fujimura T, Fukuhara H, Nakagawa T, Nishimatsu H, Kume H, Homma Y: Multiple primary malignant neoplasms of the glottis, renal pelvis, urinary bladder, oral floor, prostate, and esophagus in a Japanese male patient: a case report. *World J Surg Oncol*. 12, 294, 2014.
- ⑩ Aizawa N, Ito H, Sugiyama R, Fujimura T, Suzuki M, Fukuhara H, Homma Y, Igawa Y: Selective inhibitory effect of imidafenacin and 5-hydroxymethyl tolterodine on capsaicin-sensitive C-fibers of the primary bladder mechanosensitive afferent nerves in the rat. *J Urol*. 2014, in press.
- ⑪ Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Matsui H, Fujimura T, Nishimatsu H, Fukuhara H, Kume H, Yu C, Kattan MW, Kiyohide F, Homma Y: Robot-assisted versus other types of radical prostatectomy: population-based safety and cost comparison in Japan, 2012-2013. *Cancer Sci*. 105, 1421-1426, 2014.
- ⑫ Nishimatsu H, Kitamura Y, Yamada D, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nakagawa T, Enomoto Y,

Kume H, Igawa Y, Homma Y: Improvement of symptoms of aging in males by a preparation LEOPIN ROYAL containing aged garlic extract and other five of natural medicines - comparison with traditional herbal medicines (Kampo). Aging Male. 17, 112-116, 2014.

- ⑬ Sato YT, Fukuhara H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Nishimatsu H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y: Long-term results of radical prostatectomy with immediate adjuvant androgen deprivation therapy for pT3N0 prostate cancer. BMC Urol.14, 13, 2014.
- ⑭ Kamei J, Nishimatsu H, Nakagawa T, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Igawa Y, Kume H, Homma Y: Risk factors for septic shock in acute obstructive pyelonephritis requiring emergency drainage of the upper urinary tract. Int Urol Nephrol. 46, 493-497; 2014.

2. 学会発表

- ① 福原浩、藤村哲也、山田幸央、新美文彩、野宮明、竹島雄太、鈴木基文、西松寛明、久米春喜、本間之夫：限局性前立腺癌に対するロボット支援下根治的前立腺全摘除術。第102回日本泌尿器科学会総会（神戸）、2014年4月25日。
- ② Fukuhara H, Takeshima Y, Homma Y, Ino Y, Todo T: AN ONGOING CLINICAL T

RIAL OF A THIRD-GENERATION ONCOLYTIC HSV-1 G47Δ FOR PATIENTS WITH CASTRATION RESISTANT PROSTATE CANCER. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会（東京）、2014年8月6日。

- ③ 福原浩、佐藤ゆずり、鈴木基文、藤村哲也、東剛司、中川徹、西松寛明、久米春喜、森川鉄平、深山正久、本間之夫：前立腺全摘除術後即時ホルモン除去療法を施行したpT3N0前立腺癌症例の検討。第52回日本癌治療学会学術総会（横浜）、2014年8月30日。
- ④ 福原浩：前立腺癌に対するウイルス療法の試み。NPO法人ドクターズネットワーク研究会、2014年9月13日。
- ⑤ 福原浩：去勢抵抗性前立腺癌の病態と最新治療戦略。東京都病院薬剤師会中央支部勉強会、2014年10月10日。
- ⑥ 福原浩、藤村哲也、山田幸央、新美文彩、竹島雄太、山田雄太、東剛司、中川徹、久米春喜、本間之夫：当院におけるロボット支援腎部分切除術の初期経験。第28回日本泌尿器内視鏡学会総会（福岡）、2014年11月28日。
- ⑦ 福原浩、藤村哲也、宮川仁平、山田幸央、新美文彩、竹島雄太、山田雄太、中川徹、久米春喜、本間之夫：ロボット支援下前立腺全摘除術における下腿接触圧力測定による体位確保の工夫。第28回日本泌尿器内視鏡学会総会（福岡）、2014年11月28日。
- ⑧ 福原浩：前立腺癌に対する私見およびウイルス療法について。第6回Uro-Oncology Meeting、2015年2月2日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
 (がん対策推進総合研究事業 (革新的がん医療実用化研究事業))
 分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
 (希少・難治がんに対するウイルス療法の開発)

研究分担者・中原 寛和
 (近畿大学医学部附属病院 歯科口腔外科・准教授)

研究要旨

口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されている。本研究では脳腫瘍のような難治性のがんに対して、安全でかつ強い抗腫瘍効果の確認できた単純ヘルペスウイルス1型治療用ウイルス (G47Δ) が、舌癌などの口腔扁平上皮癌の治療に応用し得るかの検討を行った。まず、マウスにおいて舌癌モデルを作成し、皮下または舌に腫瘍を作成し、G47Δの効果を検討した。さらに舌に腫瘍を播種させ、形成した頸部リンパ節転移に対して、G47Δの効果を検討した。結果は本研究で作成した舌腫瘍モデルにおいて、ヌードマウス、免疫コンピテントマウスにおいて、G47Δは舌局所のみならず、リンパ節転移腫瘍においても抗腫瘍効果を発揮した。G47Δは*in vitro*, *in vivo*の系においてヒト口腔扁平上皮癌細胞に有効であった。今後、口腔癌のがん治療用ウイルスとして臨床応用可能であるとの結果を得た。

A. 研究目的

近年、ウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変し、癌細胞で選択的に複製するウイルスを癌治療に応用する試みがなされ、特に単純ヘルペスウイルスI型 (HSV-1) は癌治療に適した特徴を有することがわかってきた。治療用の増殖型変異HSV-1は、癌細胞に感染すると複製し、その過程で宿主の癌細胞を死滅させる。複製したウイルスは周囲に散らばって再び癌細胞に感染し、その後複製→細胞

死→感染を繰り返して抗腫瘍効果を現す。一方、正常細胞に感染した治療用ウイルスは複製せず、正常組織には害が生じない。また腫瘍内でのウイルス増殖は、特異的抗腫瘍免疫を誘導する。従って、ウイルス複製による直接的殺細胞効果と、特異的抗腫瘍免疫の惹起により、特定の治療遺伝子の発現なしに癌を治癒させることが可能で、新しい癌治療法として高いポテンシャルを有している。第二世代の増殖型HSV-1 (G207) は二重変異を有

し、脳腫瘍に投与できるよう安全性を重視して世界で初めて臨床用に開発された。本研究代表研究者藤堂によって、治療原理、抗腫瘍効果の機序、他の治療法との併用効果、安全性などが解明された。藤堂らはその開発経験から、G207を改良し、世界で初めて三重変異を有する第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47 Δ)を作製することに成功した。このG47 Δ は、癌細胞におけるウイルス複製能と惹起される抗腫瘍免疫が増強し、安全性を維持しながら抗腫瘍効果が格段に改善した。また高いウイルス濃度が生産できることから実用性が高い。

一方、口腔癌は全癌の数%程度を占めており、手術を中心とした集学的治療が行われており治療の可能な癌の一つになってきた。しかしながら、口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されてきた。さらに、口腔癌の予後因子の一つに頸部リンパ節転移がある。局所は制御できても、リンパ節への転移を制御しなければ、完治は望めない。そこで本研究ではもう一つの目的として、ウイルス療法が転移リンパ節を制御できるかを検討することを目的としている。そのためには有効なモデルが必要である。そして、その効果の検討方法、ウイルスの有効な投与方法の検討が必要になることが予想される。それらを踏まえて本研究では治療用ウイルスを口腔癌に適用し、その実用化に向けた、基礎実験およびマウスモデルを用いた臨床に即した実験を計画した。

B. 研究方法

1) 口腔癌に対するウイルス療法の基礎実験

①培養細胞

アフリカミドリザル腎細胞株Vero、ヒト培養扁平上皮癌細胞としOSC-19、SAS、HSC-3、OSC-4(ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入)、マウス扁平上皮癌細胞KLN205、KLN205-MUC1(American Type Culture Collection (ATCC)より購入)を用いた。すべての細胞は添付文書により推奨された培地、凍結、継代、維持を行った。

②GFP導入培養細胞

ヒト培養扁平上皮癌細胞OSC-19およびSAS細胞にRetro-XTMQベクターを用いて、GFP (Green fluorescent protein) を導入し、GFP発現ヒト培養扁平上皮癌細胞OSC-19-GFP、SAS-GFPを作製した。培養は親株と同様の培地、凍結、継代、維持を行った。

2) ウイルス複製能

6ウェルプレートにVero細胞を 4.0×10^5 /2m²で1撒き、37°Cで16時間培養した。1%熱非働化FBS添加DPBSにて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 0.02 (8.0×10^3 PFU/0.7ml) のウイルス希釈液を作成した。1%熱非働化FBS添加DPBS 1 ml 1にてウエルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を0.7ml/ウエルにて1株につき3ウエルずつ感染させ、室温で5分間震盪し、37°Cで1時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非働化FBS添加DMEMを2 ml/ウエル加え、34.5°Cで72時間培養した。ウエルごとに培地と細胞を回収し、ドライアイス・エタノールにて凍結、融解を3回繰り返し、2分間超音波による細胞破碎処理を行

い、タイターを測定した。タイター測定は回収されたウェルごとに3枚のプレート、各2ウェルずつをカウントして行い、各株の平均を出した。

3) ウイルス感染能 (entry assay)

24ウェルプレートに細胞 5.0×10^4 /500 μ l/ウェルでまき、37°Cで16時間培養した。1%熱非働化FBS添加DPBSにて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 1.0 で感染させる。感染後6時間で感染をストップさせて、X-gal染色を行い、ウイルスの感染効率を測定した。

4) In vitro におけるウイルスペクターの殺細胞効果

各ウイルスの殺細胞効果について、in vitroにおいては以下のように評価した。細胞間、ウイルス間で比較することができるよう、ウイルス量、感染時間、培養時間などは全て同一条件で行った。6ウェルプレートに細胞を 2.0×10^5 /2mlまき、37°Cで16時間培養した。16時間後に作製したプレートのうち1枚を使用してトリプシン処理にて細胞をはがし、細胞数を測定した。6ウェルの平均細胞数をもとに、1%熱非働化FBS添加DPBSもてMOI1.0、0.1または0.1、0.01の2段階のウイルス希釈系列を作製した。1%熱非働化FBS添加DPBS 1 mlにて各ウェルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を0.7ml/ウェルにて各濃度3ウェルずつ感染し、室温で5分間震盪し、37°Cで1時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非働化FBS添加DMEMを2ml/ウェル加え、34.5°Cで培養した。24時間ごと4日間にわたり生存する細胞数を測定し、mock感染群における生存細胞数に対する、パーセント表示で評価した。細胞数の測定はCoulter counter (Beckman

Coulter, CA, USA) にて行った。なお、ヒト由来細胞株にはMOI 1.0および0.1を感染して行った。

5) 動物実験

5-6週のBALB/c nu/nu 雌マウス (ヌードマウス) を使用した。マウスは三協ラボサービスから購入し、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。動物実験は「動物愛護および管理に関する法律」を遵守し、東京大学バイオサイエンス委員会による東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った。なお、動物実験使用するウイルスの希釈には全て10%グリセロール添加PBSを使用した。

6) 皮下腫瘍モデルの作製

マウスの左側腹部に、25G針を使用して、DMEM溶液50 μ l/マウスにて希釈した細胞を皮下注射し、皮下腫瘍を作製した。ヒト扁平上皮癌細胞を使用した実験ではヌードマウスに細胞数 1.0×10^7 個/50 μ l/匹を、それぞれ皮下注射して皮下腫瘍を作製した。最大腫瘍径が5mm大になったときをday0として実験を行った。週に3回腫瘍を測定し、最大径 \times 短径 \times 厚み (mm^3) で腫瘍体積を算出して評価した。または生存期間を観察して評価した。片側の皮下腫瘍モデルにおいては腫瘍の最大径が24mmに達したとき安楽死させた。

7) 皮下腫瘍モデルにおけるウイルスの腫瘍内投与実験

最大腫瘍径が5mmになったときをday0として、10%グリセロール添加PBS溶液20 μ l/マウスでウイルスを希釈して、30G針を用いてday0およびday3に腫瘍内投与した。

8) 舌がんモデルにおけるG47 Δ 投与実験

SAS-GFP または HSC-3 細胞 1×10^6 個を、

それぞれ 50 μ l の DMEM / F12、MEM に希釈し、ヌードマウス左舌縁部より 26 G 針を用いて舌内へ接種し、舌腫瘍を作成した。同様に、KLN205-MUC1 細胞は 2×10^5 個を 50 μ l の MEM に希釈し、DBA/2 マウスの舌内へ接種した。舌腫瘍内への G47 Δ および mock 投与は、ハミルトンシリンジと 30 G 針を用いて、20 μ l を緩徐に注入した。腫瘍細胞接種時を day 0 とし、以下随時ウイルス投与、処置を行った。

9) 頸部リンパ節へのG47 Δ 投与実験

KLN205-MUC1 舌がんモデルを作成し、day 3 に舌腫瘍を組織鋏で切除した。Day 16および day 21 に、頸部にメスで小切開を加え、両側の頸部リンパ節を明示し、鑷子でリンパ節を把持しながらハミルトンシリンジおよび 30 G 針を用いて、G47 Δ を 2.5×10^6 pfu / 5 μ l ずつ、両側の頸部リンパ節に緩徐にウイルス液を注入した。Mock も同様に両側に 5 μ l ずつ注入した。切開部は、3-0 バイクリルで縫合した。

10) 統計学的解析

統計学的解析はスチューデントt検定および生存期間の解析についてはKaplan-Meier法にて生存曲線を描き、Log-rank検定を行った。統計解析ソフトはエクセル統計2012 (SSRI) を用いた。

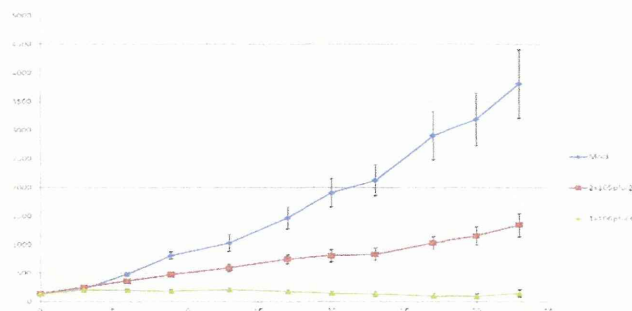
C. 研究結果

ヒト培養扁平上皮癌細胞とし、OSC-19、SAS、HSC-3、OSC-4のG47 Δ ウイルスの殺細胞効果、ウイルス複製能、ウイルス感染効果を検討した結果、殺細胞効果があり、複製能が高く、感染効率 (entry assay) の良好なOSC-19、SAS、HSC-3

を以下の実験に使用した。

G47 Δ の扁平上皮癌細胞のヌードマウス皮下モデルでの結果はin vivoにおいてもG47 Δ は十分な殺細胞効果が認められた (図1)。

(図1) G47 Δ のSAS皮下腫瘍への殺細胞効果



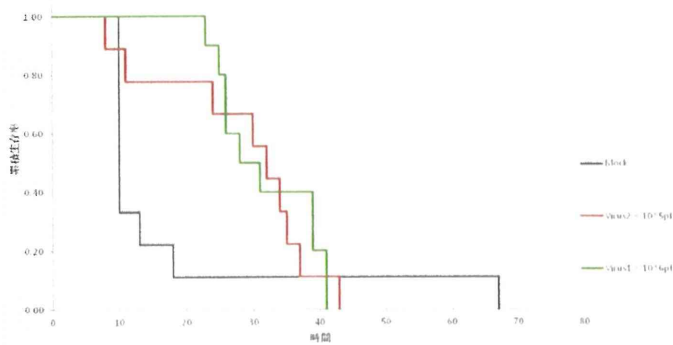
青：コントロール、赤：G47 Δ 2.0 \times 10⁵pfu、
緑：G47 Δ 1.0 \times 10⁶pfu投与。

同様の効果はOSC-19細胞でも得られた(結果省略)。さらにGFPを導入したOSC-19-GFP、SAS-GFPにおいて舌に投与し、顎下リンパ節に転移するかを検討したところ、両細胞とも、有意に顎下リンパ節への転移をGFP発現によって確認できた (図2)。G47 Δ の扁平上皮癌細胞OSC-19のヌードマウス舌腫瘍モデルでの結果はin vivoにおいてもG47 Δ は十分な殺細胞効果が認められた (図3)。

(図2) 顎下線にGFPの発現を認め、顎下リンパ節への転移を確認



(図 3) G47 Δ のOSC-19-GFP舌投与への殺細胞効果



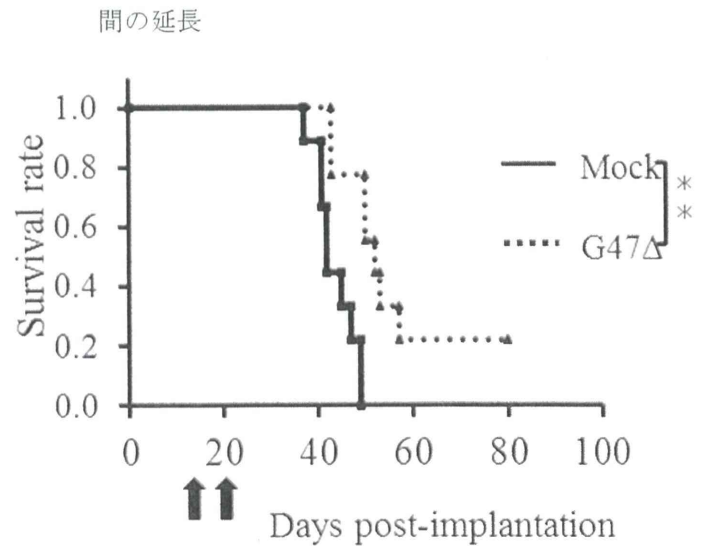
黒：コントロール、赤：G47 Δ 2.0 \times 10⁵pfu、
 緑：G47 Δ 1.0 \times 10⁶pfu投与。

(図 4) G47 Δ を転移リンパ節にて検出



図2で示した頸部リンパ節に転移した段階で舌にG47 Δ 1.0 \times 10⁶pfu投与を投与したところ、転移したリンパ節転移の縮小とマウスの延命効果が認められた(結果省略)。そこでリンパ節での腫瘍縮小効果はG47 Δ によるものかを検討するため、転移リンパ節でのHSV-1、GFP、 β galactosidaseの免疫染色を施行した(図4)。免疫染色の結果、転移リンパ節において、ウイルス(G47 Δ)が検出された。すなわち舌へ投与したG47 Δ がリンパ節へ移行し、抗腫瘍効果を発揮していることが判明した。

(図 5) G47 Δ の頸部リンパ節への投与にて生存期



KLN205-MUC1 舌がんモデルにおいては、mock 投与群は、day 12 に原発巣の腫大により死亡し始めた。本モデルにおいて、day 15 の MUC1 に対する免疫染色の結果から、少なくとも片側の頸部リンパ節はこの時期にほぼ転移腫瘍に置換されることが示されたことから、day 16、およびday 21 に 2.5 \times 10⁶ pfu / 5 μ l ずつ両側の頸部リンパ節に G47 Δ を投与し、マウスの生存期間を同量の mock を投与した場合と比較した。2 回の頸部への処置による侵襲に耐えるため、day 16 の時点で体重が 13.0 g 以上のマウスのみ実験に用いた。G47 Δ を投与したマウスは mock 投与群と比較し、有意に生存延長効果を認めたことから(図 5)、頸部リンパ節転移が明らかとなった進行頸部リンパ節転移に対して G47 Δ を直接投与することは、リンパ節転移の進行抑制に有効であることが示唆された。

D. 考察

口腔扁平上皮癌細胞に対するウイルス療法の確立を目指し、まずすでに、治療効果安全性の確立されている、第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47Δ)すなわち増殖型HSV-1ウイルスベクターを用いた治療法が応用できるのかを検討した。In vitro in vivoの実験においては、ウイルス複製能、ウイルス感染能、ウイルス殺細胞効果をスクリーニングとすることにより、OSC-19、SAS、HSC-3を用いて以下の実験を進めた。OSC-19、SAS、HSC-3はウイルス複製能、ウイルス感染能が得られる細胞種であれば、G47Δが有効な殺細胞効果を発揮することが明らかとなった。さらに、同様の細胞を用い、舌に投与するモデルでも有効な結果を得られた。

この結果は少なくとも、局所投与に当たっては、G47Δが口腔扁平上皮癌の臨床応用に当たり、十分有効性を発揮することを示唆する結果であった。またGFP導入は腫瘍の動態を見るうえで有効な方法であると考えられる。本実験においても転移腫瘍の有効な検出手段となっており、マウス転移作成モデルとして有効に機能すると考えられる。

そして、効率に頸部リンパ節転移をきたす細胞を用いた実験において、G47Δは局所における抗腫瘍効果のみならず、転移リンパ節においても抗腫瘍効果を発揮した。そしてそのリンパ節での抗腫瘍効果は単にウイルスが惹起する免疫応答反応による副次的効果ではなく、G47Δが直接リンパ節に移行し働いている可能性を強く示唆する結果が得られた。

次年度の実験計画としては、リンパ節転移腫瘍における抗腫瘍効果に対し、いかなる免疫担当細

胞が関与しているかの詳細な検討を行いたい。

一方、感染効率の悪い細胞に対する対策として、細胞への感染のメカニズムを詳細に検討することをさらなる検討課題としている。プレリミナリーなデータとしてウイルスに関与する膜タンパクとしてNectin-1が重要な働きをしていることを見出している。その発現によって、感染効率に影響が出ていることが示唆されている。今後その詳細なメカニズムを解明することにより、現時点では感染効率が悪く、G47Δによるウイルス治療が期待できないと思われる細胞にも効果を発揮する、扁平上皮癌細胞特異的な武装ウイルスの作製を目指す予定である。

E. 結論

本実験の目的とする口腔扁平上皮癌細胞に対して、第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47Δ)は細胞種を選別することにより、in vitro、in vivoの実験において十分な抗腫瘍効果を発揮した。さらに局所投与において転移リンパ節へも抗腫瘍効果が期待できることが分かった。今後、臨床応用へ向けた研究を進める予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 森影恵理、中原寛和、他：口腔粘膜の前癌病変についての病理組織および臨床統計的検討。近大医学誌 39: 93-96、2014。

- ② 徳宮元富、中原寛和、他：Reptin遺伝子によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の基底膜浸潤制御機構。日口外誌、2014 (in press)。

2. 学会発表

- ① Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T: Therapeutic efficacy of oncolytic HSV-1 G47Δ for lymph node metastases in orthotopic tongue tumor models. ASGCT annual Meeting, Washington D.C., USA. May 21th-24th 2014.
- ② Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T: Oncolytic HSV-1 G47Δ inoculated into the primary lesion of tongue cancer controls lymph node metastasis in mouse models. 第73回日本癌学会総会（横浜）、2014年9月27日-29日。
- ③ 内橋俊大、中原寛和、他：第3世代癌治療用ウイルスG47Δを用いたマウス舌癌モデルにおける治療効果。第59回日本口腔外科学会総会（幕張）、2014年10月17-19日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(がん対策推進総合研究事業 (革新的がん医療実用化研究事業))
分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
(希少・難治がんに対するウイルス療法の開発)

研究分担者・中森 幹人
(和歌山県立医科大学 医学部 外科学第2講座・准教授)

研究要旨

胃がんは我が国において罹患数の多いがんのひとつである。しかし、根治切除不能胃癌に対する化学療法を含む集学的治療の効果は十分といえないのが現状であり新規治療法の開発が望まれている。本研究では安全かつ強い腫瘍効果が期待できる遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス 1 型を用い、難治性胃がんに対する抗腫瘍効果の検討およびがん治療用ウイルスの開発を行った。

A. 研究目的

胃癌は、部位別がん罹患数において男性で1位、女性で3位と頻度の高い悪性腫瘍である。しかし、切除不能進行再発胃癌は化学療法を中心とした集学的治療の進歩により治療成績が向上しつつあるものの生存期間は9-12ヵ月と予後不良である。

我が国において臨床研究が開始された遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスは、3種の遺伝子を改変することにより腫瘍細胞においてのみ増殖し細胞死を起こすことにより抗腫瘍効果を発揮する。本研究代表者の藤堂により脳腫瘍においてその安全性・強い抗腫瘍効果が示されており従来の抗癌剤治療とは異なる新規治療法として期待がもてる。

本研究では遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスを難治性胃癌治療に応用するための基礎的臨床的研究

を目的とする。

B. 研究方法

腫瘍細胞特異的に複製能を増強することを目的としウイルス複製に必要なribonucleotide reductaseを発現するICP6遺伝子を hTERT promoterの下流に挿入した遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス(T-hTERT) (研究代表者より供与)を用い、胃癌細胞株および臨床検体における抗腫瘍効果と、その機序について検討した。

1) ヒト胃癌細胞株に対するT-hTERTの抗腫瘍効果の検討

ヒト胃癌細胞株10種類(MKN1、MKN7、MKN28、MKN45、MKN74、TMK1、NUGC3、NUGC4、N87、KATOIII)を6-well plateに 2×10^5 cellsずつ播き、24時間培養した。T-hTERTおよびコントロールのT-

nullを0.1MOIおよび0.01MOIで1時間感染後、上清を除去した。1%FBS含有培養液で24時間、48時間それぞれ培養し24時間後、48時間後にトリプシン処理を行い、cell count法にて生細胞を計測した。

2) 胃癌新鮮切除標本に対するT-hTERTの抗腫瘍効果の検討(短期培養系)

切除後3時間以内の胃癌新鮮切除標本を2~4mmの等質量小切片に分割した。抗生剤含有培地にて小切片をそれぞれ5回洗浄しT-hTERT、T-nullを 2.5×10^6 pfu含む10%FBS含有培養液で2時間感染させた。コーゲンゲル培地にて48時間培養した。

小切片より凍結標本を作製し標本をHE染色した。またMTS assay法でviabilityを確認した。

3) T-hTERTおよびT-nullの複製能の検討

ヒト胃癌細胞株を6-well plateに 2×10^5 cellsずつ播き、24時間培養した。T-hTERTおよびT-nullを0.01MOIで1時間感染後、上清を除去した。1%FBS含有培養液2mlで24時間培養した。ヘパリン(5mg/ml)を20 μ l加え、3時間インキュベートしたのち上清を4 $^{\circ}$ C、1200xg 10分間遠心した。上清を集め、4 $^{\circ}$ C、18000xg 4時間遠心したのち上清を除去し10%グリセロール入りPBSにウイルスペレットを懸濁した。プラークアッセイにてウイルスtiterを測定した。

4) T-hTERT感染によるribonucleotide reductase活性の変化の検討

ヒト胃癌細胞株MKN45よりタンパクを抽出し50n

gのタンパクを調整した。1次抗体：anti-RRM2 antibody [R2 (E-16): SC-10846]、2次抗体：Goat IgG HRPconjugated Antibodyを用いウエスタンブロッティングアッセイにてribonucleotide reductaseの主要サブユニットであるRRM2 (Ribonucleotide reductase M2 subunit)の発現を確認した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスを用いた研究を行うに際し、文部科学大臣による「遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認」を受けた。また、機関内の遺伝子組み換え実験安全委員会による承認を受けた。

胃癌臨床検体を用いた研究に際し、機関内の倫理委員会に申請し承認を受けた。

C. 研究結果

ヒト胃癌細胞株10種類に対してT-hTERTはT-nullと比較し、より強い抗腫瘍効果を認めた。特にヒト胃癌細胞株MKN45においては48時間後の生細胞割合がT-null感染群では86%に対しT-hTERT群では2%と著明な効果を認めた。

胃癌新鮮切除標本に対する評価ではT-hTERT、T-nullともに有意に生細胞割合を減少した。48時間後の生細胞割合はT-null群では63%に対しT-hTERT群では45%でありT-hTERTの方が強い抗腫瘍効果を示す傾向を認めた。

T-null、T-hTERTともに強い抗腫瘍効果を示した

細胞株では両ウイルスの複製能に差が認められなかったが先述の細胞株MKN45においてはT-hTERTの方が複製能の高いことが分かった。また、ウイルス未感染のMKN45はRRM2の発現が他の胃癌細胞株と比較し弱かったが、T-hTERT感染によりRRM2の発現増強が確認できた。

D. 考察

遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスの胃癌治療への応用をめざし、hTERT promoter制御下にRibonucleotide reductaseを発現する単純ヘルペスウイルスの抗腫瘍効果と機序を検討した。

T-hTERTはribonucleotide reductase活性の低い胃癌細胞株に対しribonucleotide reductase発現を増強しウイルス複製能を高め、その結果抗腫瘍効果が増強することが示唆された。

また、胃癌細胞株のみならず、生体類似環境である胃癌切除標本の短期培養系における評価でもより強い抗腫瘍効果を発揮した。

E. 結論

遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスを用いた腫瘍溶解療法は胃癌に対する新規治療法の一つとして期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

当該期間に該当なし

2. 学会発表

①中森幹人他：胃外科切除標本の情報を活用した癌治療用ウイルス製剤の基礎的検討。第114回日本外科学会定期学術集会（京都）、2014年4月3日・5日。

②中森幹人他：胃癌に対する癌治療用ヘルペスウイルスのラパマイシンによる効果増強。第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25日・27日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金
(がん対策推進総合研究事業 (革新的がん医療実用化研究事業))
分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
(悪性脳腫瘍に対するウイルス療法の開発と臨床製剤製造)

研究分担者・菅原 稔
(公益財団法人がん研究会 ゲノムセンター・特任研究員)

研究要旨

野生型単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) への 3 つの人為的な遺伝子変異によって高い安全性と強力な抗腫瘍作用を実現した第三世代の遺伝子組換え HSV-1 ウイルスは、遺伝学的背景や発生要因、発生部位、増殖メカニズムに関わらず、あらゆる固形がんにも有効であることが示唆されていることから、ヒトのがんの多様性に対応しうる応用範囲の広さが期待できる。がん研究会では、この遺伝子組換え HSV-1 ウイルスを用いて、培養がん細胞株を異種移植した「ヒトの転移や進行がんの病態に より近いマウスモデル系」、または「生体内のヒトがん組織の性質を最も忠実に再現している可能性の高い PDX (Patient-derived xenograft)」を用いて非臨床試験をおこない、実用的な投与方法で、どのようなタイプのがん種に より効果的に長期にわたって持続的な抗腫瘍効果を発揮しうるのかを検証し、研究代表者が総括している「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」へ貢献することを目指す。

A. 研究目的

ヒトのがんには、各がん患者の遺伝子多型や遺伝子変異、生活環境等の違いに起因する「多様性」が認められる。これらの要因に起因する「がんの多様性」は、がんの最大の特徴であるとともに、有効な治療法開発の大きな障害となっている。医療技術の進歩にもかかわらず、がん死亡率は増加の一途をたどっており、希少がんや難治性がん、標準的な化学療法後に薬剤抵抗性を獲得し有効な治療法がなくなった再発がんや転移を伴うがん患

者に対する革新的な治療法の開発が待望される。

遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの最大の特徴の一つは、遺伝学的背景に左右されず、前臨床試験では あらゆる固形がんにも有効であることが示唆されている点である。したがって、このウイルス療法は「がんの多様性」に対処しうる応用範囲の広さが期待でき、実用化へ直結する可能性が高い。そこで、がん研究会では、希少がんや難治性がんに対する遺伝子組換え HSV-1 ウイルス療法の実用化へ貢献することを目指し、「ヒトの再

発や転移、進行がんの病態を想定し「より臨床症例に近いマウスモデル」を用いた非臨床試験で、投与方法も含めて「遺伝子組換え HSV-1 ウイルスが持続的かつ長期的に抗腫瘍効果を発揮しうるか？」を検証すると共に、有害事象についても検討する。

B. 研究方法

がん研究会では、数多くのがん種のなかから、特に、腹水、腹膜播種といった転移・進行がんモデルへの応用の可能性の高い「腹部臓器由来のヒト培養細胞株である大腸がん、卵巣がん、胃がん、膵がん等を用いた解析を優先におこなう。これらのがん種は臨床例も多く、有効な治療法の開発は社会への貢献度も高い。

これまでに *in vivo* の担がんマウスモデルにおいて、遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの腫瘍内への直接投与により抗腫瘍効果が認められた報告は多く、実際、これまでに「我々も膵がんの皮下腫瘍モデルで検証し、遺伝子組換え HSV-1 ウイルスによる腫瘍の退縮を確認している。

今年度は、他事業において、がん研究会で樹立に成功した膵がん細胞株、NCIPT-11 を免疫不全マウス NOD/SCID の腹腔内へ移植し、腹膜播種を発症するマウスモデルを用いて、遺伝子組換え HSV-1 ウイルスによる持続的な抗腫瘍効果の程度や有害事象の有無を検証する。HSV-1 ウイルスの投与は、臨床上「汎用性の高い投与方法の一つである腹腔内から、末期におこなう。なお、*in vivo* における遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの抗腫瘍効果は、生存期間やマクロ所見に加えて、

病理組織学的解析により検証する。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え HSV-1 ウイルスを使用する実験は、平成25年12月24日に「文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室」へ大臣確認実験を申請し、平成26年2月19日に承認（25受文科振第2385号、有効期限は平成29年3月31日まで）され、実験申請に基づいておこなう。

また、ヒトがん患者の腫瘍組織から樹立に成功したがん細胞株や PDX を用いた非臨床実験研究は、既に他事業から申請していた研究計画（ヒトゲノム・遺伝子解析研究、計画書課題名「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」）において、がん研究会の IRB 及びヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会にて審査を受け承認されており、これらのサンプルの取り扱いは、倫理面へ十分に配慮しておこなう。

更に「遺伝子組換え実験」は、公益財団法人がん研究会「遺伝子組換え実験安全規程」に準じておこない、適切な拡散防止措置を講じる。加えて「動物実験の取り扱い」については、公益財団法人がん研究会「動物実験等取扱規程」に準じておこなう。

C. 研究結果

研究代表者らは、これまでに *in vivo* の担がんマウスモデルにおいて、遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの「膠芽種」への腫瘍内直接投与において、十分な抗腫瘍効果とウイルスに起因する特記すべき有害事象は無かったことを報告している。した

がって、膠芽種以外で がん研究会で樹立に成功したがん細胞株を用いて、腹水、腹膜播種や肝転移といった転移モデル作製に応用可能な腹部臓器由来のがん細胞株を 優先に HSV-1 感染感受性を解析し評価した。その結果、*in vitro* の殺細胞効果の解析において、MOI=0.1 で、いずれのがん細胞株も大部分は高感受性であった。

特に、腹部臓器由来のヒト培養細胞株である膵がん、胃がん、卵巣がん、大腸がん等のがん種の有効な治療法の開発は、臨床例も多いことから社会的な貢献度も高い。それゆえ、これらのがん種のなかから他事業で樹立に成功した膵がん細胞株を選定し、「ヒトの転移や進行がんの病態により近い」異種移植したマウスモデルを精査し、臨床上 汎用性の高い腹腔内投与方法によるウイルスの持続的な抗腫瘍効果の程度や有害事象の検証をおこなった。具体的には、先ず始めに、ヒト膵がん細胞株 NCIPT-11、 8.5×10^6 個を5週齢の NOD/SCID マウスの腹腔内へ移植した。次にながん細胞移植後42日目の腹膜播種の形成が広範囲に十分に認められる末期に、HSV-1 を腹腔内投与し治療を開始した(42日、45日、47日目の合計3回で、 1×10^7 pfu 投与)。その結果、解析対象の Mock 投与群においては、がん細胞移植後53日目から次第に死に始め80日目にはほぼ全例死亡したのに対し、HSV-1 ウイルス治療群においては36%の死亡率であり、45%のマウスは90日以上生存していた。また Mock 投与群と比較し、HSV-1 ウイルス治療群の生存率の向上 及び 延命効果は、病理組織標本(腹膜、横隔膜、腸管リンパ等の HE 染色)の解析から

も、支持する結果であった。

以上のように、遺伝子組換え HSV-1 ウイルス治療法は 皮下腫瘍への直接投与のみならず、ヒト膵がん細胞株 NCIPT-11 による腹膜播種マウスモデルにおける HSV-1 末期腹腔内投与において、完治には至らなかったものの 生存率や生存期間の延長を認め、十分な抗腫瘍効果を確認する事ができた。現在、マクロ所見に加えて、病理組織学的解析を詳細におこなっている。更に、抗腫瘍効果に伴う生存率改善や延命の評価に加えて、有害事象の有無を経過観察したところ、Mock 投与群と比較し HSV-1 投与群においては、体重減少、けいれん、脱毛、黄疸などといったマクロ的な有害事象の所見は特に観察されなかった。

D. 考察

これまでに 遺伝子組換え HSV-1 ウイルスは、多くのがん種のヒト培養細胞株で高感受性であることを確認することができ、特に、第三世代の遺伝子組換え HSV-1 は、強力な抗腫瘍作用と高い安全性から、「がんの多様性」に対応しうる応用範囲の広さが期待される。しかしながら、*in vitro* の解析結果から、HSV-1 ウイルス感染後、複製能力の高いがん細胞株は、必ずしも細胞増殖抑制効果が高いわけではなかったことから、HSV-1 ウイルス感染による直接的な殺細胞作用に関与している遺伝子群やそれらの遺伝子産物に起因する作用機序は、未だ十分に理解できていない。

一方、臨床応用を考えた際、がん患者の治療後

の生命に大きく影響を与える要因は、薬剤抵抗性を獲得した「再発がん」や「転移がん」であることから、今回「ヒトの転移や進行がんの病態により近い腹膜播種発症マウスモデル」を用いて、より実用的な腹腔内投与法で、持続的な抗腫瘍効果を検討した。また臨床応用を考えた際、「抗腫瘍効果」と「有害事象の有無」の両面から検証した結果、がん治療用 HSV-1 ウイルスの強力な抗腫瘍作用と高い安全性を確認することができた。

さらに、HSV-1 ウイルス療法は、長期にわたって持続的な抗腫瘍作用が発揮可能であることから、既存の治療法との併用で相乗的な効果が期待できる。加えて、副作用が低く、反復投与が可能、といった利点を兼ね備えている。一般にがん治療薬としての実用性の高さは、「効果を発揮するのに必要な量」と「副作用を引き起こす量」の差である「治療域の広さ」に依存することから、この HSV-1 ウイルス療法は十分な治療域の広さが見込まれ、革新的な治療法になる可能性が高く、実用化へ直結することが十分に期待される。

E. 結論

今回、ヒト膵がんの末期を想定した腹膜播種マウスモデルにおいて、末期の HSV-1 腹腔内投与により、特に顕著な有害事象も無く、抗腫瘍効果としての生存率の向上や延命効果が確認できたことは、臨床応用へ貢献しうる非臨床データの積み上げの一つといえる。

今後 遺伝子組換え HSV-1 ウイルスが、どのようなタイプのがん患者へより効果的であるの

かを事前に予測し、効率的で有用な臨床応用へ向けた作用機序の解明は必要不可欠な重要課題である。加えて、このウイルス療法は実用化へ直結する可能性が極めて高いため、更に多くのヒトの転移や進行がんの病態により近いマウスモデル系で十分に「抗腫瘍効果」と「有害事象」の両面から検証し、総合的に評価する必要がある。そのためにも、「生体内のヒトがん組織の性質を最も忠実に再現している可能性の高い PDX」、あるいは「ヒトの進行がんの病態により近い異種移植担がんマウスモデル系」の選定を含め、より実用的なウイルス投与法と持続的な抗腫瘍効果、有害事象の有無を十分に評価可能なシステムを構築し、さらに非臨床データの検証を積み上げていくことが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Wada Y, Matsuura M, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, Noda T, Miki Y. : Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip exon array. J Clin Bioinforma 4(1): 3, 2014 (doi: 10.1186/2043-9113-4-3).

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし