

bisphosphonate: a case report. J Oral

Maxillofac Surg 70(6): 1376-1379, 2012.

- ③ Morimoto Y, Hamada S, Ogura T, Nakahara H, et al. : A case of malignant melanoma discovered as a result of metastatic disease of the temporomandibular joint. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 25(1): 74-78, 2012.
- ④ 内橋俊大、中原寛和、他：下顎骨に発生した良性歯原性腫瘍および悪性腫瘍の鑑別。近大医学誌 37: 87-91, 2012。
- ⑤ 泉本貴子、中原寛和、他：周術期院内紹介患者の歯性感染症治療。近大医学誌 38: 69-72, 2013。
- ⑥ 岡本知子、中原寛和、他：注射用ビスフォスフォネート製剤投与患者の口腔管理についての臨床的検討。近大医学誌 38: 73-77, 2013。
- ⑦ 榎本明史、中原寛和、他：歯性感染症におけるシタフロキサシン(グレースビット)の有用性。Hospital Dentistry & Oral-Maxillofacial Surgery 24: 61-64, 2013。
- ⑧ 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。
- ⑨ 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 下出孟史、中原寛和、他。右側翼口蓋窩に発生した横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) の1例。第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会 (広島)、2012年5月17日。
- ② 岡本知子、内橋隆行、中原寛和、他。注射用ビスフォスフォネート製剤投与患者への系統的口腔管理確立への試み。第43回 (社) 日本口腔外科学会近畿地方会 (大阪)、2012年6月23日。
- ③ 中原寛和、松岡裕大、他。口腔扁平上皮癌細胞における治療標的分子Racの機能解析。第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月21日。
- ④ 内橋隆行、中原寛和、他。注射用ビスフォスフォネート製剤投与患者への系統的口腔管理確立への試み。第57回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 (横浜)、2012年10月20日。
- ⑤ 中原寛和、森影恵里、濱田傑。当科における口腔癌の臨床的統計的検討。第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会。(東京)、2013年1月24日。
- ⑥ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Todo T : A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using G47 Δ , A third generation oncolytic herpes simplex virus type 1. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会 (岡山)、2013年7月4日。
- ⑦ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T : Therapeutic efficacy of oncolytic virus G47 Δ for oral squamous cell carcinoma in orthotopic tongue cancer models. 第72回日本癌学会学術総会 (横浜)、

2013年10月4日。

3. その他

- ⑧ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T: A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using oncolytic herpes simplex virus G47Δ. The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop —Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction—, Beijing. Nov 1, 2013.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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。
- ⑪ 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。

なし

G. 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

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))
総合 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を用いて、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。

我が国で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で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希少・難治がんのひとつであるスキルス胃癌を含む

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

初年度はスキルス胃癌の腫瘍微小環境の性格からt hrombospondin-1 (TSP-1)に着目し、タキサン系抗癌剤の胃癌症例への腹腔内投与の有効性の期待ならびにTSP-1とタキサンの作用機序との関連から癌治療用単純ヘルペスウイルスでTSP-1を発現できるシステムを用いてTSP-1遺伝子発現癌治療用ヘルペスウイルスを作成し、ヒト胃癌動物モデルでの治療効果とその機序について検討した。

次年度以降は治療用ヘルペスウイルスが胃癌細胞株においてより複製効能となるために、SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling-3)に着目し、このc

DNAをsubcloningした発現ベクターを作成し、昨年度に用いた方法により、SOCS-3発現癌治療用ヘルペスウイルス T-SOCS-3を作成した。

また、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。コラ

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50ng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。

ヒト胃癌動物モデルでの癌治療実験に際しては和歌山県立医科大学動物実験室の指針に基づき承認を得た。

C. 研究結果

我々が作成したTSP-1発現型癌治療用ヘルペスウイルス(T-TSP-1)がヒト胃癌細胞株に対して、高い抗腫瘍効果を有し、さらに、動物実験系においても同様の効果を示した。さらに、その抗腫瘍効果が癌治療用ヘルペスウイルスの直接的効果に加えて、TSP-1による腫瘍血管抑制効果であることも明らかとなった。また、T-SOCS-3の治療効果を、胃癌新鮮切除標本を用いた短期培養系において確認した。

さらに、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のほうが複製能が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

難治性胃癌の代表であるスキルス胃癌の臨床病理学的結果より抽出した重要分子であるTSP-1を発現した癌治療用ヘルペスウイルスは難治性胃癌に対する治療効果が動物実験モデルで確認できた。

また、hTERT promoter制御下にRibonucleotide reductaseを発現する癌治療用ヘルペスウイルス(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、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治療効果が示唆され新規治療法の一つとして期待できる。臨床応用に向けてのさ

らなる解析が今後の課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ①Tsuji T, Nakamori M, et al. An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. International Journal of Cancer: 132,485-494, 2013.

2. 学会発表

- ①中森幹人他：消化器癌に対する機能付加型ウイルス製剤の基礎的研究開発。第67回日本消化器外科学会総会（富山）、2012年7月18日-20日。
- ②中森幹人他：消化器癌に対する個別化ウイルス療法を目指した新しいアプローチ。第68回日本消化器外科学会総会（宮崎）、2013年7月17日-19日。
- ③中森幹人他：タキサン系薬剤による癌治療用ウイルスの効果増強に関する基礎的検討。第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月3日-5日。
- ④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。
- ⑤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。

G. 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))
総合 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、がん患者の臨床検体から樹立に成功した細胞株や入手可能な各種ヒトがん細胞株を用いて、この遺伝子組換え HSV-1 ウイルスがどのようなタイプのがん種の細胞株により効果的に殺細胞作用を発揮するのかを検証する。また「培養がん細胞株を異種移植し、ヒトの転移や進行がんの病態により近いマウスモデル」、あるいは「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)」を用いた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の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、他の事業でがん患者の臨床検体の腫瘍組織から樹立に成功した細胞株や入手可能な各種ヒトがん細胞株を用いた *in vitro* での非臨床試験をおこない、どのようなタイプのがん種の細胞株により効果的に殺細胞作用を発揮するのかを検証し、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す。また「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 *in vivo* での非臨床試験で、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

遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの複製能力は、解析対象の各種がん細胞株へ $MOI=0.01$ で感染させ、48時間後に回収されるウイルス量より算定し評価する。この系では、1) ウイルス複製の速さ(何時間で1サイクルの複製が完了するのか?)、2) ウイルス複製の程度(1サイクルで何倍に増えるのか?)、3) ウイルスがどの程度効率よく *mono layer* の細胞に広がって、次の複製を行うのか?(隣接する細胞と、培地を介した遠隔細胞への感染の両方を含む)を総合的に

に評価することができる。一方、HSV-1 ウイルスの殺細胞能力は、 $MOI=0.1$ 及び 0.01 の2段階で、ウイルス感染後、1日目、2日目、3日目の生細胞数を計測し評価する。これらの「複製能力と殺細胞効果」から、総合的に遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの *in vitro* における抗腫瘍効果を判定し評価する。

がん研究会では他の事業でがん患者の腫瘍組織から樹立に成功した細胞株や入手可能な各種ヒトがん細胞株を用いて、どのようなタイプのがん種の細胞株に遺伝子組換え HSV-1 ウイルスがより効果的に直接的な殺細胞作用を発揮するのかを検証する。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ので、できるだけ数多くの細胞株を解析して評価する。

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い。そこで、がん患者への遺伝子組換え HSV-1 ウイルス療法を行う前臨床段階として、まず始めに、膵がんの皮下腫瘍モデルで、遺伝子組換え HSV-1 ウイルスによる抗腫瘍効果を検証する。また、他事業において「ヒトがん患者の腫瘍組織を免疫不全マウスへ移植し、PDX 樹立の成功率が $20\sim 30\%$ である系」や「培養がん細胞株を異種移植した転移マウスモデル系」が確立されている。そこで次にこれらのマウスモデ

ルの中から、ヒトの進行がんの病態に より近いマウスモデル系を選定し、臨床上 汎用性の高い静脈内 あるいは 腹腔内投与による遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの持続的な抗腫瘍効果や有害事象を検証する。なお、遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの *in vivo* における抗腫瘍効果は、生存率や生存期間を含めた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 ウイルス実験を開始するにあたり、がん研究会では、平成22年3月25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22年4月14日に承認(21受文科振第1502号)された。しかしながら、この有効期限は平成26年3月までであったため、平成25年に 新たに3年の大臣確認実験の申請をおこなった。具体的には、平成25年12月3日に がん研究会 機関内の「遺伝子組み換え実験安全委員会」で 二種省令との整合性について確認・承認され、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・安全対策室へ新たに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)された。遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの取り扱いは、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 PDX や がん細胞株を用いた非臨床実験研究に関しては、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」)で、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で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・解析は、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

遺伝子組換え HSV-1 ウイルス感染が誘導する細胞死の作用機序の解明、ならびに このウイルス療法が有効であるがん患者を事前に予測し得る候補遺伝子を検索するため、できるだけ数多くのがん種(主に、大腸がん、卵巣がん、胃がん、膵がん)のヒト培養がん細胞株の解析をおこなった。その結果、解析したヒトがん細胞株の多くは、がん種に関わらず、高い MOI=0.1 で高感受性であった。興味深いことに、ウイルスの複製効率は各がん細胞株で異なり、ある特定のがん種で特異的に高い、といった一定の傾向は認められなかった。また、たとえ同一のがん種であっても殺細胞効果と複製効率はそれぞれのがん細胞株で異なり、複製能の高いがん細胞株は、必ずしも殺細胞感受性が高いわけではなかった。このような結果は「ヒトのがんの多様性」を反映している可能性が高い。したがって、HSV-1 ウイルス療法の今後の個別化医療への応用に向けて、たとえ同一の

がん種であっても遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの治療効果や有効性を事前に予測するには、できるだけ数多くのがん細胞を解析し、「高感受性群」と「低感受性群」に分別後、両者の遺伝子発現プロファイルを比較し、HSV-1 ウイルス感染感受性に関与している候補遺伝子を探索する必要がある。そこで先ず始めに、*in vitro* において、低い MOI=0.01 の HSV-1 ウイルス感染 7 2 時間後の生存細胞数を計測し、抗腫瘍効果の程度により「高感受性群」と「低感受性群」及び両者の「中間群」の 3 グループに分類した。次に、これら「高感受性群」と「低感受性群」の遺伝子発現プロファイルを比較し、HSV-1 ウイルス感染感受性に関与している候補遺伝子を探索し、現在、候補遺伝子の実証実験の準備に着手している。

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で、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（膵がん、胃がん、卵巣がん、大腸がん等）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は、いずれのがん細胞株も大部分は高感受性である事が判明した。特に、腹部臓器由来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く期待も大きい。そこで、他事業で樹立に成功して開発された膵がん

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」、あるいは「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」を精査し、臨床上汎用性の高い投与方法によるウイルスの持続的な抗腫瘍効果や有害事象の検証をおこなった。その結果、HSV-1 ウイルス治療は皮下腫瘍への直接投与による顕著な腫瘍の退縮のみならず、進行がんモデルの一つである腹膜播種に対する腹腔内投与においても生存率改善や延命効果が認められたが、マクロ所見において、特に顕著な有害事象は認められなかった。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、病理標本の解析結果からも明確で、HSV-1 ウイルス治療による抗腫瘍効果を支持する結果であった。一方、皮下腫瘍の担がんマウスに対し、臨床上汎用性の高い静脈内投与においては、有意な抗腫瘍効果は認められなかった。

以上のように、遺伝子組換え HSV-1 ウイルス治療は皮下腫瘍への直接投与のみならず、ヒト膵がんの腹膜播種モデルにおける腹腔内投与においても、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。また、抗腫瘍効果に伴う生存率改善の評価に加えて、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、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ず、遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの強い抗腫瘍効果と高い安全性を支持する結果であった。

D. 考察

これまでに 遺伝子組換え HSV-1 ウイルスは、多くのがん種の人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 HSV-1 は、強力な抗腫瘍作用と高い安全性から、有効な治療法開発を困難にしている「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、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に関しては、未だ十分に理解できておらず、今後の課題である。したがって、HSV-1 ウイルスによる直接的な殺細胞の作用機序を解明するためには、さらに がん種や例数を増やして解析し、「高感受性群」と「抵抗性群」の遺伝子発現プロファイルを比較検証する必要がある。

また、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、「ヒトの転移や進行がんの病態により近い」マウスモデル系を用いて、がん治療用 HSV-1 ウイルスが持続的に抗腫瘍効果を発揮可能なより実用的な投与方法を更に開拓し、「抗腫瘍効果」と「有害事象」の有無の両面から検証可能なシステムを構築し、総合的に評価する必要がある。

加えて、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。また 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

遺伝子組換え HSV-1 ウイルスは、多くのがん種の人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、HSV-1 の強力な抗腫瘍作用から、「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、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。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、効率的でより有用な臨床応用へ向けた作用機序の解明は、今後の必要不可欠な重要課題である。

ヒト膵がんの末期を想定した腹膜播種マウスモデル系において、末期の HSV-1 腹腔内投与により、完治には至らなかったものの特に顕著な有害事象が観察されず、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事は、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。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「抗腫瘍効果」と「有害事象」の両面から十分に検証し、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」の選定を含めた、より実用的なウイルス投与方法と有害事象の有無を含む持続的な抗腫瘍効果を十分に評価可能なシステムを構築し、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. 研究発表

1. 論文発表

- ① Wang, L., Tsutsumi, S., Kawaguchi, T., Nagasaki, K., Tatsuno, K., Yamamoto, S., Sang, F., Sonoda, K., Sugawara M., Saiura, A., Hirono, S., Yamaue, H., Miki, Y., Isomura, M., Totoki, Y., Nagae, G., Isagawa, T., Hiroki, U., Hosokawa, S., Shibata, T., Sakamoto, H., Kanai, Y., Kaneda, A., Noda, T., and Aburatani, H. : Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Research*. Feb; 22(2): 208-219, 2012.
- ② 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

G. 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))
総合 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・門脇 則光
(京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学・准教授)

研究要旨

過半数のヒト造血器腫瘍細胞株およびprimaryの造血器腫瘍細胞にG47Δが感染しこれを殺傷したことから、造血器腫瘍がHSV-1ウイルス療法の対象になり得ることが明らかになった。

A. 研究目的

遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)の造血器腫瘍治療への応用を目指して、HSV-1による(1)造血器腫瘍細胞の直接的殺傷、(2)免疫系の活性化、(3)in vivoでの抗腫瘍作用の誘導、の3つが起こること、及びその機序を明らかにする。これにより、造血器腫瘍に対する複合的がん免疫療法の基盤となるウイルス療法を確立する。

B. 研究方法

In vitro, in vivoの実験により、造血器腫瘍に対するHSV-1ウイルス療法の抗腫瘍作用を細胞・分子・個体レベルで解析する。

- (1) 遺伝子組換えHSV-1 G47Δによる造血器腫瘍細胞の感染・殺傷
- (2) G47Δによる免疫系の活性化メカニズム
 - (1. 拡散センサーを介した免疫細胞の刺激、
 2. 腫瘍細胞の immunogenic cell

deathの誘導)

- (3) G47Δのリンパ腫皮下接種モデルへの腫瘍内投与による抗腫瘍作用とその免疫学的機序

(倫理面への配慮)

健常人末梢血や患者検体は、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して、京都大学倫理審査委員会の承認のもと、京都大学医学部学生または患者から書面でインフォームド・コンセントを得たうえで採取または使用する。被験者の個人情報、連結可能匿名化により保護する。対応表は、鍵のかかる保管庫に管理し、鍵は応募者のみが保有する。以上の方法により、応募者の責任において個人情報を厳重に管理する。

遺伝子組換えHSV-1を用いた実験については、「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」により、第二種使用等「遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型を用いた

腫瘍ウイルス療法」をする間に執る拡散防止措置を大臣確認申請し、すでに確認済である。また、組換えDNA実験計画は、すでに京都大学の承認を得ている。

動物実験は、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に準拠して行う。

C. 研究結果

(1) G47Δによる造血器腫瘍細胞の感染・殺傷

G47Δは、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫を含むヒト造血器腫瘍細胞株10種類中6種類に感染し、これらを殺傷した。

また、G47Δは、さまざまな病型を含むヒト primary造血器腫瘍細胞10種類中6種類に感染し、これらを殺傷した。

細胞株へのG47Δの感染・殺傷は、HSV-1レセプターnectin-1の発現と相関した。

(2) G47Δによる免疫系の活性化メカニズム

immunogenic cell deathにより細胞に表出される calreticulinの発現、及びATP, HMGB1の放出の有無を調べたところ、4細胞株中すべてでcalreticulinの発現がみられたが、ATP, HMGB1の放出がみられたのは1株のみだった。

マウスモデルを用いた実験はH26年度には施行していない。

D. 考察

HSV-1が正常の血液細胞に感染しにくいことから、造血器腫瘍はHSV-1ウイルス療法の対象として考えられていなかったが、本研究により対象にな

り得ることが明らかになった。

HSV-1 entry receptorのうちnectin-1の発現がG47Δの感染・殺傷と相関したが、実際にnectin-1がウイルスのentryに関わっているかどうかは、阻害抗体により検証する必要がある。

また、G47Δで死滅した造血器腫瘍細胞の免疫原性の有無は、樹状細胞の刺激能の有無という機能的なアッセイによっても検証する必要がある。

E. まとめ (結論)

造血器腫瘍はHSV-1ウイルス療法の対象になり得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kadowaki N. Guest editorial: immunotherapy for hematological malignancies: the quest to overcome tolerogenic drive. Int J Hematol 99(2): 105-106, 2014.

2. 学会発表

なし

G. 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))
総合 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・海堀 昌樹
(関西医科大学 外科学講座・准教授)

研究要旨

肝細胞がんの新たな治療法として、第3世代の制限増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型(T-01)を用いて、ヒト肝細胞がんに対する治療効果を検討した。T-01は様々な細胞株に対し高い殺細胞作用を示し、様々な動物モデルに対し腫瘍増殖を抑制した。ヒト肝細胞癌に対し、有効な新規治療法になりうる事が示唆された。前臨床実験にて有効性を確立し、基礎的データの集積することにより今後の治療への応用を目指す。

A. 研究目的

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IV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。

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う。T-01 は(1) γ 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) α 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 (図 1: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)。

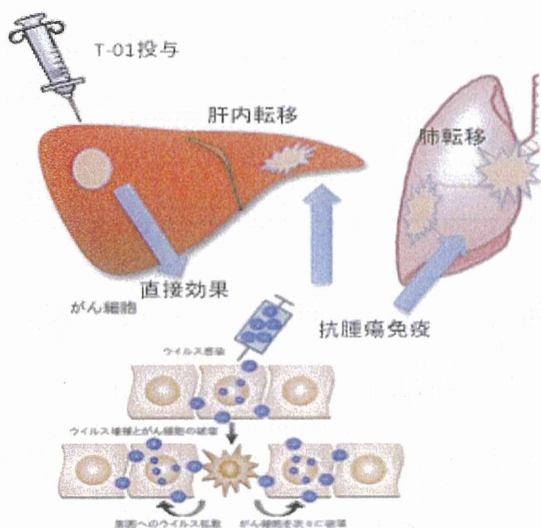


図1: T-01を用いた治療の概念

B. 研究方法

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

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 48 時間後、ウイルスの感染した細胞及び上清を回収する。

(5) 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

(1) 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。

(2) T-01 投与量を決定する。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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

(1) 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。

(2) 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)

(3)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。

(4)週 3 回、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

(1)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。

(2)T-01 の投与量を決定する。(1匹あたり 20 μ l に調製)

(3)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)。

(4)生存率など抗腫瘍効果を検討する。

(倫理面への配慮)

腫瘍実験における動物の福祉に関する英国癌研究調整委員会 (UKCCCR) 指針に沿って実験を行った。また平成23年10月4日付で文部科学大臣より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済みである。

C. 研究結果

①T-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(図2:Huh-7同所モデルでの検討)。

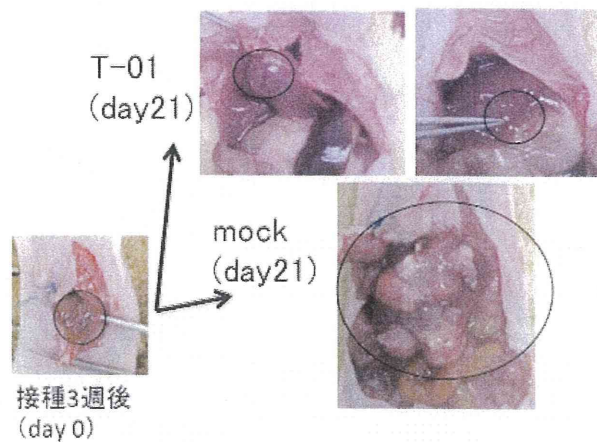


図2: 同所腫瘍モデル(Huh-7)に対する抗腫瘍効果の検討

腫瘍確認後、MockとT-01/1回投与群を投与21日目に開腹し腫瘍体積を比較した。T-01は抗腫瘍効果を示した。

D. 考察

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。

E. 結論

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 Δ 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。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中原 寛和	臨床解剖 唾液腺疾患の疫学	柏木 伸夫	唾液腺疾患のMRI	メジカルビュー社	東京	2014	10-13, 22-23

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koyama-Nasu R, Hruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T	The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells.	Oncogene	33(17)	2236-2244	2014
Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T	PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells.	Biochem Biophys Res Commun	441(1)	13-18	2014
Takai H, Masuda K, Hiraoka K, Echizen K, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Ogawa H, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, Akiyama T	5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the methylosome.	Cell Reports	9(1)	48-60	2014
Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MAE, Hayashi Y, Hamada JI, Hirao A	Strong therapeutic potential of γ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells.	J Neurooncol	121(2)	239-250	2014
Futamara G, Kawabata S, Siba H, Kuroiwa T, Suzuki M, Kondo N, Ono K, Tanaka M, Todo T, Miyatake S	A case of radiation-induced osteosarcoma treated effectively by boron neutron capture therapy.	Practical Radiation Oncology	9(1)	237	2014

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		in press	2015
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	15	10729-33	2014
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		in press	2014
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		in press	2014
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		in press	2014
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		in press	2014
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
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(6)	1023-1027	2014