

Title	神経幹細胞と腫瘍溶解ウイルスを用いた悪性脳腫瘍に対するウイルス免疫療法の研究
Sub Title	Investigation of immunovirotherapy for malignant brain tumors using neural stem cells and oncolytic viruses
Author	金井, 隆一(Kanai, Ryūichi) 峯, 裕(Mine, Yutaka) 脇本, 浩明(Wakimoto, Hiroaki) 佐々木, 光(Sasaki, Hikaru) 黒田, 俊彦(Kuroda, Toshihiko) 三好, 浩之(Miyoshi, Hiroyuki) 田村, 亮太(Tamura, Ryōta) 長島, 秀明(Nagashima, Hideaki) 戸田, 正博(Toda, Masahiro) 吉田, 一成(Yoshida, Kazunari)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>薬剤誘発性に複製開始する条件複製開始型の腫瘍溶解ウイルスと神経幹細胞を用いた、膠芽腫に対する複合的ウイルス療法の開発を試みた。薬剤(Dox)誘発性にICP4を発現するシャトルプラスミドを作成し、これを遺伝子導入した細胞株に於いては、Dox存在下でICP4発現すること、複製不能型HSV d120がプラーク形成することを確認した。また、d120の細胞障害性は適度であり、膠芽腫に対する治療として、神経幹細胞をcell carrierとして用いる手法の妥当性を確認した。In vivoでは腫瘍幹細胞がヒト膠芽腫に類似した組織像を呈する脳腫瘍を形成することを確認した。We attempted to establish an effective therapy against malignant gliomas, using a combination of conditionally replicating oncolytic virus and neural stem cells. To effectively target malignant cells that diffusely invade brain parenchyma, we designed an oncolytic virus which starts lytic replication only under doxycycline (Dox). We constructed a shuttle plasmid that starts translation of ICP4 in the presence of Dox, and confirmed that d120, a replication incompetent HSV mutant, forms plaques in cells transfected by the plasmid, only in the presence of Dox. Also, in vitro, we evaluated cytotoxicity of d120 against human neural stem cells. We concluded that the strategy was feasible, as d120 was appropriately attenuated for this purpose. We confirmed that patient derived glioma stem cells readily form tumors in the brains of nude mice, and that those tumors pathologically resemble brain tumors in patients. Likewise, mouse glioma stem cells form invasive brain tumors in wildtype mice.</p>
Notes	<p>研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K10769 研究分野：悪性脳腫瘍のウイルス療法</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K10769seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K10769seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和元年6月5日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10769

研究課題名(和文) 神経幹細胞と腫瘍溶解ウイルスを用いた悪性脳腫瘍に対するウイルス免疫療法の研究

研究課題名(英文) Investigation of Immunovirotherapy for malignant brain tumors using neural stem cells and oncolytic viruses

研究代表者

金井 隆一 (Kanai, Ryuichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：50327532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤誘発性に複製開始する条件複製開始型の腫瘍溶解ウイルスと神経幹細胞を用いた、膠芽腫に対する複合的ウイルス療法の開発を試みた。薬剤(Dox)誘発性にICP4を発現するシャトルプラスミドを作成し、これを遺伝子導入した細胞株に於いては、Dox存在下でICP4発現すること、複製不能型HSV d120 がプラーク形成することを確認した。また、d120の細胞障害性は適度であり、膠芽腫に対する治療として、神経幹細胞をcell carrierとして用いる手法の妥当性を確認した。In vivoでは腫瘍幹細胞がヒト膠芽腫に類似した組織像を呈する脳腫瘍を形成することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫など悪性神経膠腫は、放射線治療や化学療法に抵抗性で、脳実質へ広範に浸潤するため、既存の手法では治療効果改善は望めない。免疫療法やウイルス療法などの新規治療法に関し、現在も米国を中心に臨床試験が進行中だが、成績改善には本質的な見直しが必要だろう。本研究では、脳実質に浸潤した悪性腫瘍細胞を標的とし、薬剤誘導性に複製開始する腫瘍溶解ウイルスを神経幹細胞の性質を利用して運搬させ、浸潤した脳実質内で膠芽腫細胞を殺傷する手法を考案した。本研究分野では、治療ベクターが脳内に浸潤した腫瘍細胞へ到達できないことが課題だが、これを打開する手法となる。改善が必要だが、有望な手法であり、本分野での期待は高い。

研究成果の概要(英文)：We attempted to establish an effective therapy against malignant gliomas, using a combination of conditionally replicating oncolytic virus and neural stem cells. To effectively target malignant cells that diffusely invade brain parenchyma, we designed an oncolytic virus which starts lytic replication only under doxycycline (Dox). We constructed a shuttle plasmid that starts translation of ICP4 in the presence of Dox, and confirmed that d120, a replication incompetent HSV mutant, forms plaques in cells transfected by the plasmid, only in the presence of Dox. Also, in vitro, we evaluated cytotoxicity of d120 against human neural stem cells. We concluded that the strategy was feasible, as d120 was appropriately attenuated for this purpose. We confirmed that patient derived glioma stem cells readily form tumors in the brains of nude mice, and that those tumors pathologically resemble brain tumors in patients. Likewise, mouse glioma stem cells form invasive brain tumors in wildtype mice.

研究分野：悪性脳腫瘍のウイルス療法

キーワード：膠芽腫 悪性脳腫瘍 腫瘍溶解ウイルス

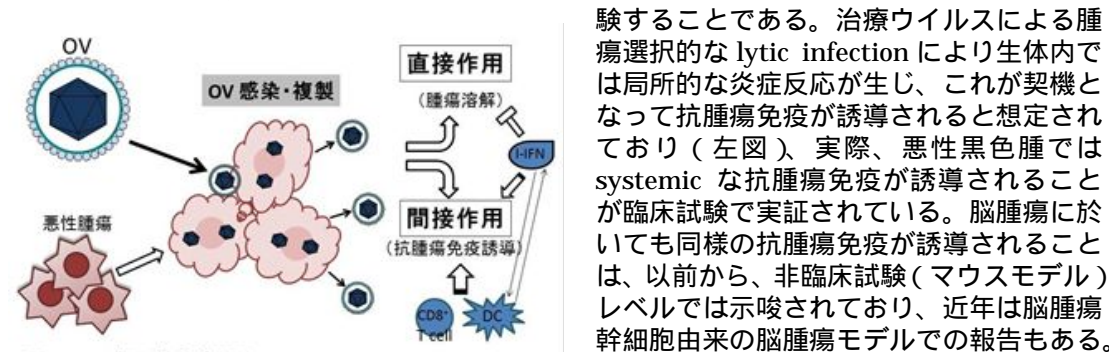
## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は脳実質に発生する原発性脳腫瘍で、過去数十年に渡って治療成績の向上が無い。発症時には既に周辺脳組織に広範に浸潤し、腫瘍組織自体も化学療法・放射線治療に抵抗性のため、現存の治療法のみによる治癒は望めない。また近年は治療抵抗性には脳腫瘍幹細胞が関わっているとされてきた。悪性神経膠腫に対する腫瘍溶解ウイルス療法は、臨床試験でその安全性が確認され、脳腫瘍幹細胞を殺傷でき、またウイルスに対する耐性も報告されていないが、臨床試験では確たる治療効果を示せていない。その原因は、従来の手法では、生体内に於いては、治療ウイルスが脳内に浸潤する腫瘍組織に持続的・効率的に感染できなかったため、と考えられた。

## 2. 研究の目的

悪性脳腫瘍に対する、より効果的なウイルス療法を開発することが目的である。脳内に浸潤する悪性脳腫瘍組織に対して、安全性を担保したまま、持続的・効率的に腫瘍溶解ウイルスを感染させるため、まず条件複製開始型の腫瘍溶解ウイルスベクターと神経幹細胞とを組み合わせ治療を検討する。即ち、薬剤誘導性に複製開始するヘルペスウイルスベクター（薬剤非存在下では、感染は成立するが複製しないため、この状態では基本的には細胞障害性無し）を神経幹細胞に感染させ、神経幹細胞を運搬役（cell carrier）として利用する方法である。神経幹細胞は脳内に浸潤する悪性脳腫瘍に集積する性質があるとされ、条件複製開始型ウイルスベクターを感染させた神経幹細胞が脳内に浸潤した腫瘍組織に到達したタイミングで薬剤投与しウイルス複製を開始させる。以上の治療デザインで、免疫不全マウスでのヒト悪性神経膠腫モデルに於いて、優れた抗腫瘍効果が発揮できるかどうかを検討することが第一段階の目的だった。実際、悪性黒色腫では systemic な抗腫瘍免疫が誘導されることが臨床試験で実証されている。脳腫瘍に於いても同様の抗腫瘍免疫が誘導されることは、以前から、非臨床試験（マウスモデル）レベルでは示唆されており、近年は脳腫瘍幹細胞由来の脳腫瘍モデルでの報告もある。

第二段階としては、腫瘍溶解ウイルス療法と免疫チェックポイント阻害剤の併用の効果を試験することである。治療ウイルスによる腫瘍選択的 lytic infection により生体内では局所的な炎症反応が生じ、これが契機となって抗腫瘍免疫が誘導されると想定されており（左図）、実際、悪性黒色腫では systemic な抗腫瘍免疫が誘導されることが臨床試験で実証されている。脳腫瘍に於いても同様の抗腫瘍免疫が誘導されることは、以前から、非臨床試験（マウスモデル）レベルでは示唆されており、近年は脳腫瘍幹細胞由来の脳腫瘍モデルでの報告もある。



## 3. 研究の方法

悪性脳腫瘍に対する治療として、有効な複合的ウイルス療法を確立するために、研究期間で以下を行う計画とした。(1)薬剤存在下で複製する条件複製開始型の新規OVの作成、(2)神経幹細胞を cell carrier として(1)を治療ウイルスとした複合的腫瘍溶解ウイルス療法の作成、(3)腫瘍溶解ウイルスと免疫チェックポイント阻害剤の併用、である。治療効果の判定には、全生存期間の他、ウイルス学的評価や、蛍光・免疫組織学的手法を用い、神経幹細胞および腫瘍溶解ウイルスの、脳内浸潤した腫瘍細胞への遊走能・集積能を評価する、脳腫瘍浸潤モデルには、脳腫瘍幹細胞を脳内移植し作成した免疫不全モデル、及び、(3)については免疫応答モデルを用いて、免疫応答関連細胞・因子について解析する、これらの検討を通して、安全で有効性の高い複合的ウイルス療法の開発を目指す計画とした。

## 4. 研究成果

(1) 薬剤存在下に複製調節可能な腫瘍溶解ウイルスの作成。ドキシサイクリン (Dox) 存在下に ICP4(ウイルスの複製に必須のウイルス遺伝子産物)を発現する様にデザインしたシャトルプラスミド pFLSICP4V1rtTA を作成した。これは、基盤となる Flip-Flop HSV-BAC システムのシャトルプラスミド pFLSe-ICP4 から LacZ 配列を除去し、 $\text{I}\mu\text{B}$ -ステロイド制御性トランス活性化因子 (rtTA) と tetO 反復配列を持つトランスクリプション応答因子 (TRE) 配列とを挿入し、更にマーカーとして mVenus 配列を PGK プロモーター下流に組み込んだもので、mVenus と rtTA は IRES 配列を挟んで PGK プロモーターで発現し、TRE の下流で ICP4 が発現する様デザインした。pFLSICP4V1rtTA は、in vitro で、

Dox 存在下に ICP4 を発現することをウエスタンブロット法で確認した。また、ICP4 を欠失した複製不能型ウイルス(d120)が、pFLSICP4VirtTA をトランスフェクションした細胞に於いて、Dox 存在下にプラーク形成能を有することを確認した。以上の過程は計画通り進行し、Flip-Flop HSV-BAC システムを用いて、Dox 誘導性に複製開始する新規の腫瘍溶解ウイルスベクター作成へ進む前段階を完了した。続いて、Flip-Flop HSV-BAC システムを用いた新規ウイルスベクター作成作業を進めた。Cre-recombination を用いて ICP4VirtTA 配列を BAC 配列内に挿入するステップで試行錯誤が必要だった。ウイルス DNA の制限酵素による切断パターンの確認、シークエンスでの配列確認などトラブルシューティング作業を行った。In vitro では、各種ヘルペスベクター (hrR3, MG18L, d120) のヒト iPS 由来神経幹細胞(hNSC)に対する細胞障害効果を検証した。hNSC を各 HSV ベクター (hrR3, MG18L, d120) に感染させ 4 日後に WST-8 を用いて cell viability を測定した。想定通り、d120 は細胞障害効果の少ない HSV ベクターであり、IC<sub>50</sub>=3.66 [MOI]だった。

(2)治療効果同定のため In vivo では、ヒトグリオーマモデルマウスを樹立した。既知の U87 細胞株の他に、治療抵抗性のグリオーマ幹細胞株をヒト神経膠芽腫検体より樹立し、びまん性浸潤能を組織学的に確認した(hG008 株)。同時に抗腫瘍免疫増強作用を有する oncolytic virus (OV)と抗 PD1 抗体との併用を検討したため、マウスグリオーマ細胞株 GL261 によるモデルも樹立し、抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果も確認した。またヒト脳腫瘍幹細胞 (MGG8) に於いても免疫不全マウスへの脳内移植により、境界が不鮮明で非常に浸潤性の高い脳腫瘍を形成することを確認した。MGG8 は腫瘍の増大に伴い、脳梁を介して対側半球へ浸潤し、経過に伴い両側大脳は肉眼的にも著名に腫脹する。Ki67 染色や、抗 Human nuclear antigen 抗体を用いた免疫染色での観察でも、右半球では腫瘍細胞の密度が高いが、両半球ともに明らかな腫瘍と正常脳との境界は認めず、非常に浸潤性の高い脳腫瘍モデルであることが確認された。病理学的にもヒト膠芽腫と酷似した像を示すモデルであり、今後の in vivo 治療実験に有用であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1.Tamura R, Tanaka T, Ohara K, Miyake K, Morimoto Y, Yamamoto Y, Kanai R, Akasaki Y, Murayama Y, Tamiya T, Yoshida K, Sasaki H. Persistent restoration to the immunosupportive tumor microenvironment in glioblastoma by bevacizumab. *Cancer Sci.* 2019 Feb;110(2):499-508. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

該当なし。

〔図書〕(計 0 件)

該当なし。

〔産業財産権〕

該当なし。

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：峯 裕

ローマ字氏名：MINE, Yutaka

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：訪問研究員

研究者番号(8桁): 10306730

(2)研究協力者

研究協力者氏名：脇本 浩明

ローマ字氏名：WAKIMOTO, Hiroaki

研究協力者氏名：佐々木 光

ローマ字氏名：SASAKI, Hikaru

研究協力者氏名：黒田 俊彦

ローマ字氏名：KURODA, Toshihiko

研究協力者氏名：三好 浩之

ローマ字氏名：MIYOSHI, Hiroyuki

研究協力者氏名：田村 亮太

ローマ字氏名：TAMURA, Ryota

研究協力者氏名：長島 秀明

ローマ字氏名：NAGASHIMA, Hideaki

研究協力者氏名：戸田 正博

ローマ字氏名：TODA, Masahiro

研究協力者氏名：吉田 一成

ローマ字氏名：YOSHIDA, Kazunari

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。