



Title	増殖型レトロウイルスシステムを用いた肺癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療に関する研究
Author(s)	櫛谷, 洋樹
Description	配架番号 : 2797
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15571号
Issue Date	2023-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15571
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90405
Type	doctoral thesis
File Information	KUSHIYA_Hiroki.pdf



学位論文

増殖型レトロウイルスシステムを用いた

肺癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療に関する研究

(Strategy for prodrug activator gene therapy of lung cancer
by retroviral replicating vector)

2023年6月

北海道大学

櫛谷洋樹

学位論文

増殖型レトロウイルスシステムを用いた

肺癌に対するプロドラッグ活性化遺伝子治療に関する研究

(Strategy for prodrug activator gene therapy of lung cancer
by retroviral replicating vector)

2023年6月

北海道大学

櫛谷洋樹

目次

発表論文目録および学会発表目録	1頁
要旨	2頁
略語表	5頁
緒言	6頁
方法	10頁
結果	16頁
考察	27頁
結論	30頁
謝辞	31頁
利益相反	32頁
引用文献	33頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Hiroki Kushiya, Kei Hiraoka, Tomohiro Suzuki, Kazuho Inoko, Akihito Inagaki, Hiroki Niwa, Katsunori Sasaki, Toru Nakamura, Takahiro Tsuchikawa, Toshiaki Shichinohe, Douglas J Jolly, Noriyuki Kasahara, Satoshi Hirano. “Retroviral replicating vector Toca511 (*vocimagene amiretrorepvec*) for prodrug activator gene therapy of lung cancer”, *Cancers*, 2022, 14: 5820

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Hiroki Kushiya, Kei Hiraoka, Tomohiro Suzuki, Kazuho Inoko, Akihito Inagaki, Toru Nakamura, Takahiro Tsuchikawa, Toshiaki Shichinohe, Douglas J Jolly, Noriyuki Kasahara, Satoshi Hirano “Therapeutic activity of prodrug activator gene therapy with Toca 511 in experimental models of lung cancer” Japan Society of Gene Therapy, 25th Annual Meeting, July 23th, 2019. Tokyo
2. Hiroki Kushiya, Kei Hiraoka, Tomohiro Suzuki, Kazuho Inoko, Akihito Inagaki, Hiroki Niwa, Katsunori Sasaki, Toru Nakamura, Takahiro Tsuchikawa, Toshiaki Shichinohe, Douglas J Jolly, Noriyuki Kasahara, Satoshi Hirano “Therapeutic activity of prodrug activator gene therapy with Toca 511 in experimental models of lung cancer” Japanese Cancer Association, 79th Annual Meeting, October 1st-3rd, 2019. Hiroshima

要旨

【背景と目的】

肺癌は世界の癌関連死の中で最も多い癌腫とされており、我が国の統計においても癌による死因の第1位となっている。手術による切除が第一選択となるが、遠隔転移を伴う症例や多臓器浸潤を来した症例では、集学的治療が必要となる。しかし、進行肺癌では局所浸潤や遠隔転移による症状に伴い全身状態不良となり、抗癌剤治療が適応にならないことも多い。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の登場により肺癌治療の選択肢は増えたが、生存期間中央値は2年前後となっており効果は十分ではない。したがって、副作用の少ない新規治療の開発は急務である。そこで私は増殖型レトロウイルスベクター(Retroviral replicating vector: RRV)を用いた癌遺伝子治療に着目した。レトロウイルスベクターは多くの遺伝子導入に利用されているが、その特徴としてウイルス構成配列は一本鎖RNAであり宿主細胞内で二本鎖DNAに逆転写され、宿主細胞のDNAに組み込まれるため、安定した遺伝子発現が可能となる。しかし、従来より使用されてきた非増殖型レトロウイルスベクターは自己増殖能を欠き、遺伝子導入効率が低いという弱点があった。その点を補うため自己増殖能を持つRRVが開発され多くの癌腫でその有効性が示されてきた。RRVはガンマレトロウイルスに属するMolonyマウス白血病ウイルスを遺伝子改変し開発されたもので、レトロウイルスの基本構造を維持し、自己増殖力を有することが大きな特徴である。したがって、従来の増殖能欠損型レトロウイルスベクターと異なり、宿主細胞への高い感染力、遺伝子導入効率を有している。また、レトロウイルスは細胞溶解性を持たず、一度感染した宿主細胞は恒久的な遺伝子発現細胞となる。導入する治療遺伝子としては酵母菌由来のシトシン脱アミノ化酵素(yeast cytosine deaminase: yCD)が組み込まれている。yCDは宿主細胞内で哺乳類動物に無毒なフルオロシトシン (5-fluorocytosine: 5-FC)を抗癌剤であるフルオロウラシル (5-fluorouracil: 5-FU)に変換する酵素である。5-FUは主要な化学療法剤の一つであるが全身投与が原則であり、骨髄抑制などの重篤な副作用を引き起こす。RRVを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の利点は、無毒な5-FCを全身投与するとyCDを発現する癌細胞内でのみ5-FCが5-FUに変換され、全身性の副作用をきたすことが少ないことである。そこで本研究では上述のRRVを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の肺癌に対する有効性を前臨床試験として評価することとした。

【材料と方法】

RRVの感染能、遺伝子導入効率、治療効果を評価するため、ヒト肺癌細胞株であるA549、H226、SBC-3およびマウス肺癌細胞株であるEx-3LLを用いた。また、yCD遺伝子を有しているRRV (Toca511)、GFP遺伝子を有しているRRV (RRV-GFP)

を使用した。

*In vitro*でのRRVの感染効率、遺伝子導入効率を評価するためRRV-GFPを multiplicity of infection (MOI)=0.01で投与しGFPの発現をフローサイトメトリーで解析した。また解析の際に一部の細胞から genomic DNA (gDNA)を抽出しqPCR (TaqManプローブ法)を用い各サンプルのRRVコピー数を評価した。また、*in vitro*での細胞毒性は未感染細胞、RRV-GFP感染細胞、Toca511感染細胞の3群を用い MTS assayで評価した。続いて*in vivo*でのRRV感染能、治療効果を評価するため肺癌皮下腫瘍モデルを作成した。A549異種移植モデル、Ex-3LL同種移植モデルを用い皮下腫瘍内でのRRV感染能をフローサイトメトリー解析で評価し、5-FCの治療効果は腫瘍縮小率で評価した。続いて、前臨床モデルとしてマウスの胸腔内に肺癌細胞を投与し胸膜播種モデルを作成し、マウスの胸腔内にRRVを直接投与し感染能を検討した。さらに、胸膜播種モデルに対する治療効果を検討するため、5-FC投与群とPBS投与群で生存期間を比較した。安全性の評価として胸膜播種モデルにおけるToca511の生体内分布を全身臓器のgenomic DNAを抽出しqPCR法で検討した。

【結果】

*In vitro*においてRRVは肺癌細胞への高い感染能と効果的な遺伝子導入効率を示した。また、5-FCの投与によりToca511感染細胞では優れた殺細胞効果が得られた。*in vivo*においてもRRVは皮下腫瘍内で高い感染能を示し、Toca511に感染させた皮下腫瘍モデルではプロドラッグである5-FCの投与により著明な抗腫瘍効果が得られた。前臨床試験モデルとして作成した胸膜播種モデルにおいて、RRVは胸腔内直接投与により肺癌胸膜播種細胞に感染した。また、5-FCの投与により胸膜播種モデルにおいてもコントロール群と比較し有意に生存期間を延長させた。安全性の評価としてRRVの生体分布を評価したが、腫瘍細胞を除き全ての検討した生体組織においてRRVコピー数は低レベルに抑制されていた。

【考察】

In vitro、および*in vivo*においてRRVは高い感染能を示し、RRVを用いたプロドラッグ活性化システムにより優れた殺細胞効果を示した。*In vivo*の同種移植モデルにおいては、感染効率は異種移植モデルより低かったが、5-FCの投与により腫瘍の完全消退が得られた個体もあった。これは5-FUの殺細胞効果に加え、Bystander効果や、プロドラッグ活性化システムにより惹起された獲得免疫による抗腫瘍効果も加わった結果と考えられる。胸膜播種モデルにおいては実臨床に則し、胸腔内経路でRRVの投与を行ったが、優れた感染能を示した。また、腫瘍細胞を除く各組織でのRRV生体分布も低レベルに抑えられており、臨床試験に向けて安全性が示唆される結果とな

った。

【結論】

本研究では、Toca511、5-FCを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の肺癌に対する有効性と安全性が示唆された。また、肺癌胸膜播種モデルに対するウイルス投与経路を確立し、プロドラッグ活性化遺伝子治療の有用性を示し臨床応用への重要な知見の一つとなった。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AZT	3'-azide-3' deoxythymidine
BLS	bioluminescent signals
5-FC	5-fluorocytosine
5-FU	5-fluorouracil
gDNA	genomic DNA
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
ICI	immune checkpoint inhibitor
IRES	internal ribosome entry site
IVIS	in vivo living imaging system
MOI	multiplicity of infection
qPCR	quantitative PCR
RRV	retroviral replicating vector
SD	standard deviation
TU	transducing unit
yCD	yeast cytosine deaminase

緒言

世界で毎年、182万人が肺癌と診断され、160万人が肺癌で死亡しており、肺癌は癌関連死の中で最も多い癌種とされている(Ferlay et al., 2015)。その中でも非小細胞癌(non-small cell lung cancer: NSCLC)と診断された約40%は進行癌の状態で見られている(Goldstraw et al., 2016)。さらに、肺癌胸膜播種を呈すると有効な治療法はなく、生存期間中央値は6-9ヶ月と極めて予後不良である(Simone and Jones, 2013)。我が国の癌統計では肺癌は男性の癌による死因の第1位、女性においては第2位、男女合計では第1位となっている

(https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html, 2022.10.10)。臨床病期、II期は手術が第一選択となるが、III期、IV期では手術も含めた集学的治療が必要となる(https://www.haigan.gr.jp/modules/guideline/index.php?content_id=3, 2022.10.10)。2019年の我が国における肺癌切除例の検討では、全体の5年生存率は74.7%となっており、2004年の統計と比較すると改善を認めるものの、まだ十分とは言えない(Okami et al., 2019)。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が進行肺癌に対して有用性が示唆されているが、生存期間中央値は2年前後となっており効果は十分ではない(Socinski et al., 2018; Yang et al., 2015)。さらに、肺癌胸膜播種の病態になると手術適応はなく、標準的治療は化学放射線療法、分子標的薬、免疫療法とされている(Ettinger et al., 2018)。しかし、多くの胸膜播種患者は病勢の進行により呼吸困難、倦怠感、痛みなどの症状を抱え、performance status不良となり抗癌剤による副作用が容認できないことが多い(Brule et al., 2016; Lee et al., 2012)。したがって、治療目標が症状の緩和となることが多く、極めて予後不良である(Ettinger et al., 2018; Spiro et al., 2004)。このように、肺癌に対する新規治療法の開発は急務であり、特に進行した肺癌患者に対する副作用の少ない治療が求められている。

近年、癌に対する新たな治療法としてウイルスを用いた癌遺伝子療法の効果期待されている。19世紀末よりウイルスの自然感染が癌を縮小させ得ることが報告され(Bierman et al., 1953)、ウイルスを癌治療に応用する試みがなされてきたが、多くの場合、ウイルスが患者の正常免疫により不活化され十分な腫瘍縮小効果を得られなかった。一方、免疫不全患者ではウイルスの病原性を抑制できず、臨床応用には至っていなかった(Sinkovics and Horvath, 1993)。しかし、近年の遺伝子工学の進歩により、ウイルスゲノムを人工的に操作し、腫瘍選択性を向上させることが可能となり臨床化への道が開けた(Kelly and Russell, 2007)。ウイルス療法はその作用機序により、①ウイルスにより直接細胞を障害する治療法、②腫瘍の微小環境を調整する治療法、③遺伝子組換え細胞によって癌に対する免疫応答を高める治療法、④プロドラッグ代謝酵素遺伝子による治療法の4つに大きく分類される(Brenner et al., 2013)。

これまで多くのウイルスを用いた癌遺伝子治療の臨床試験が行われており(Ginn et al., 2018)、その安全性が示されている(Lara-Guerra and Roth, 2016)。一方で、前臨床試験から期待される治療効果が実際の臨床では再現されないものがほとんどであり、実際に新薬として承認されたウイルス療法はメラノーマに対するTalimogene Laherparepvec (T-Vec) (Hu et al., 2006) (2015年に米国食品医薬品局により承認)や脳腫瘍に対するTeserpaturev (Todo et al., 2001) (2021年に厚生労働省により承認)など極めて少数である。多くのウイルスベクターが臨床応用に至らない一因として、ウイルスに腫瘍選択性を持たせつつ腫瘍組織に広範囲にウイルス感染を引き起こすことが困難なことが挙げられる。本研究の対象疾患である肺癌に関しても、非増殖型アデノウイルスを用いた国内の臨床試験が報告されているが、高力価のウイルスベクターを使用したにもかかわらず治療効果は限定的であった(Fujiwara et al., 2006)。このように、正常細胞を障害せず腫瘍細胞のみに必要十分作用するウイルスベクターの開発は重要課題であると考えられ、今回、私は新たに開発された増殖型レトロウイルスベクター (Retroviral replicating vector: RRV)の肺癌治療への応用可能性を検討することとした。

RRVはこれまで多くの癌腫で有効性が示され(Hiraoka et al., 2007; Inoko et al., 2018; Tai et al., 2005; Twitty et al., 2016)、臨床試験においても有用性が確認された(Cloughesy et al., 2016; Hogan et al., 2018)。RRVはマウス白血病ウイルス由来であり、核移行シグナルを持たないため、静止期の細胞に感染・増殖することはできず、活発に分裂している細胞にのみ感染・増殖が可能となる。癌細胞は正常細胞と比べ活発な分裂能を有しており、極めて効果的な腫瘍選択的増殖を期待できる。さらに、正常細胞ではRRVはAPOBEC3タンパクやDDX41などの酵素によって複製は抑制されているが(Harris et al., 2012; Stavrou et al., 2018; Takeuchi and Matano, 2008)、腫瘍環境ではこれらのウイルス排除機構が正常に働かないことも腫瘍選択性を高めている。また、これまで使用されてきた増殖型ウイルスベクターは腫瘍溶解性のものが多く、増殖に際して宿主細胞となる癌細胞を死滅させるため、高い遺伝子導入効率は得られなかった。一方、本研究で用いたRRVは非腫瘍溶解性であり安定した遺伝子発現が得られる。また、今回用いた導入遺伝子は酵母菌由来のシトシン脱アミノ酵素 (yeast cytosine deaminase: yCD)であり、これは抗真菌薬として用いられているフルオロシトシン (5-fluorocytosine:5-FC)を抗癌剤であるフルオロウラシル (5-fluorouracil: 5-FU)に変換する酵素である(図1)。

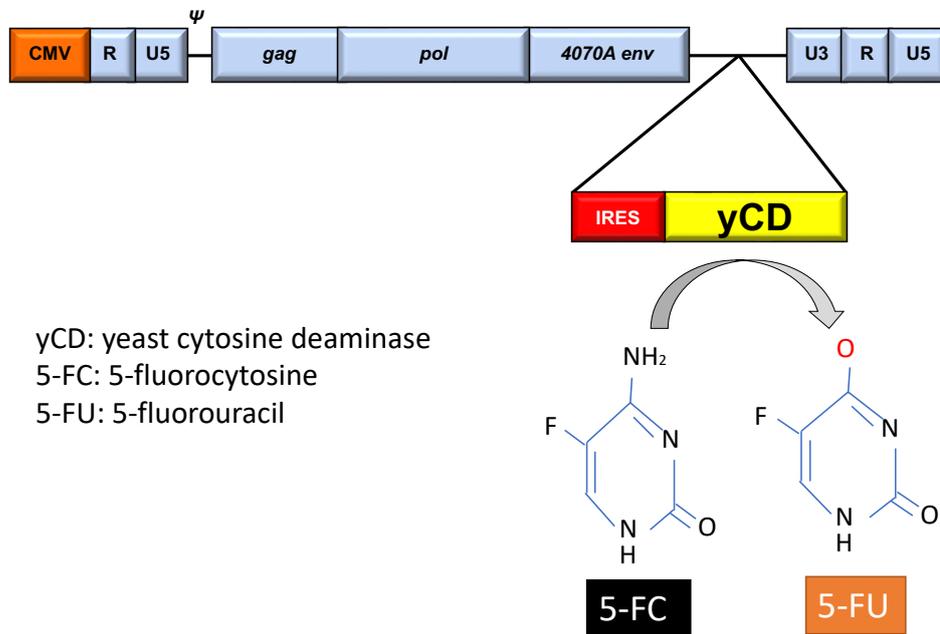


図1. yCDを用いたプロドラッグ活性化

酵母菌由来のシトシン脱アミノ酵素 (yCD) は薬物前駆体である5-fluorocytosine (5-FC) のカルボニル基を脱アミノ化し、抗癌剤である5-fluorouracil (5-FU) へ変換する。

このyCDは動物細胞には存在しないため、RRV感染細胞でのみ低毒性の5-FCから抗癌剤である5-FUへの変換が起こり、いわゆる選択的腫瘍細胞内抗癌剤治療が可能となる (図2)。

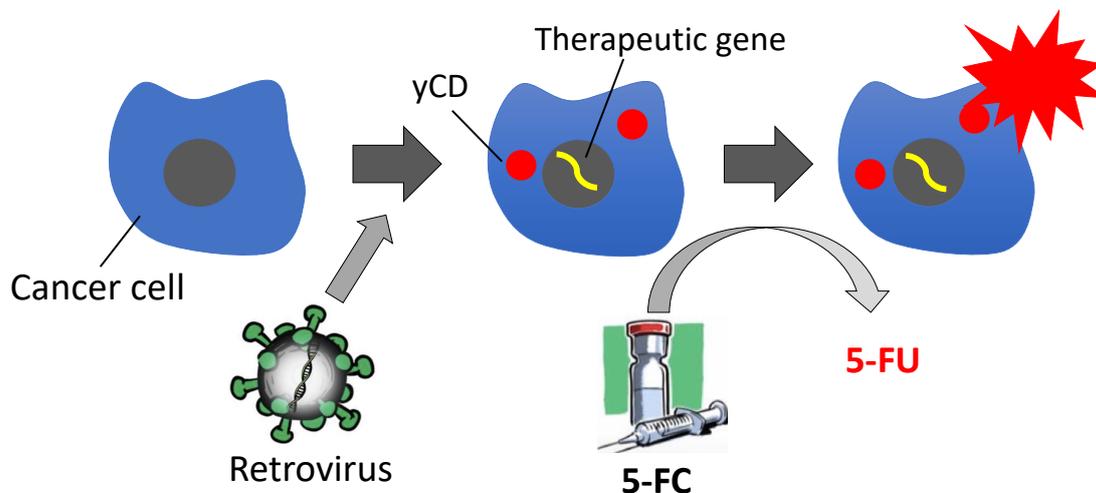


図2. RRVを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療のシエーマ

RRVは腫瘍細胞に感染し、遺伝子内に治療遺伝子が組み込まれる。感染した癌細胞内ではyCDが産生され、プロドラッグである5-FCを投与すると、yCDが存在する細胞内でのみ5-FCが5-FUに変換され、殺細胞効果を示す。

近年、5-FU系抗癌剤は広く用いられており (Miyake et al., 2018; Saglam et al., 2011)、肺癌においては術後化学療法としてその有効性が示されている (Hamada et al., 2009; Kato et al., 2004)。RRVを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療ではRRV感染腫瘍細胞内で高濃度の5-FUを発現できる一方、正常組織での5-FU濃度は低濃度に保たれる。したがって、既存の5-FU全身投与と比較して高い抗腫瘍効果を期待でき、血液毒性などの抗癌剤由来の副作用を著しく減少させることができる。

上述したRRVを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療は脳腫瘍に対して米国で臨床試験が行われ、安全性と治療効果が示唆された (Cloughesy et al., 2020; Hogan et al., 2018)。現在まで肺癌に対してのRRVの効果は検討されておらず、本研究ではRRVを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の肺癌に対する有効性を、*in vitro*、*in vivo*においてRRVの感染効率の評価、プロドラッグ投与による腫瘍増殖抑制効果の評価により明らかにすること、また、安全性の評価としてRRVの生体内分布の評価を行うことを目的とした。

実験方法

1) 細胞株

実験に使用したヒト肺癌細胞株 A549、H226、SBC-3、マウス肺癌細胞株 Ex-3LLはJapanese Cancer Research Resources Bank (茨城、日本)から購入した。ヒト胎児腎臓細胞株 293TはAmerican Type Culture Collectionから購入した。細胞培地は、A549、SBC-3、293TはDulbecco's Modified Eagle's Medium (NACALAI TESQUE, JAPAN)を、H226、Ex-3LLはRoswell Park Memorial Institute Medium (NACALAI TESQUE, JAPAN)を使用した。両培地ともウシ胎児血清 (Cell culture Bioscience, Tokyo)とペニシリン-ストレプトマイシン(NACALAI TESQUE, JAPAN)を付加し、それぞれ濃度を10%、1%として5%CO₂を含む37°Cの加湿環境で培養した。

2) Retroviral Replicating Vector (RRV)の構造と作成

今回使用した増殖型レトロウイルスベクター (RRV)はMoloneyマウス白血病ウイルス由来である。Moloneyマウス白血病ウイルスの同種指向性エンベロープから置換された両種指向性エンベロープ (4070A envelope)を有しており、ヒト細胞への感染も可能になっている。また、internal ribosome entry site (IRES)の3'側に治療遺伝子としての yeast cytosine deaminase (yCD) 遺伝子、もしくはレポーター遺伝子としてのGFP遺伝子を有している。yCD遺伝子を有しているRRVを以下Toca511とし、GFP遺伝子を有しているRRVを以下RRV-GFPと表記する。Toca511、RRV-GFPのシェーマを図3に示す。

Toca511、RRV-GFPの作成方法は、Tocagen Inc. (San Diego, CA, USA)より提供されたプラスミド、pAC3-yCD2、pAC3-GFPをFugene HD®(Promega, Madison, WI, USA)を用いて293T細胞にトランスフェクションし、一定期間の培養後にその上清を0.45 μmのフィルターで濾過した。また、胸腔内に直接投与する際に用いた濃縮されたRRV (高力価RRV)はTocagen Inc. (San Diego, CA, USA)より提供され、その濃度は 3.31×10^8 transducing units (TU)/mlであった。

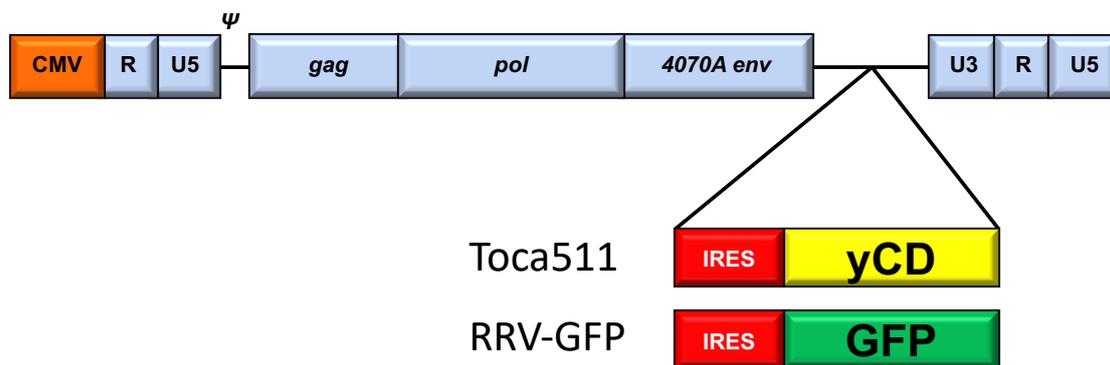


図3. Retroviral Replicating Vector (RRV)の構造

CMV: cytomegalovirus由来プロモーター (5'U3領域を置換)、 Ψ : パッケージングシグナル配列、gag/pol: レトロウイルス構造遺伝子、4070A env: 4070A amphotropic遺伝子、U3/R/U5: 末端リピート配列、IRES: internal ribosome entry site、yCD: yeast cytosine deaminase遺伝子、GFP: GFP遺伝子

3) 肺癌細胞株におけるRRVの感染・増殖能, 遺伝子導入効率

ヒト肺癌細胞株 (A549, H226, SBC-3) およびマウス肺癌細胞株 (Ex-3LL) にRRV-GFPをmultiplicity of infection (MOI)=0.01で投与した。2, 3日毎にこれらの細胞をトリプシン処理し、約4分の1の細胞をフローサイトメトリー解析に、もしくは継代に用いた。また、逆転写酵素阻害薬である3'-azido-3' deoxythymidine (AZT) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)を初回継代時に終濃度25 μ Mで付加したものをコントロールとして用いた。フローサイトメトリーはMACSQuant[®] Analyzer 10 (Milteni Biotec, Germany)を使用し、解析はFlowJo software V7.6.5 (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA)を使用した。

また、A549およびEx-3LLは継代の際に一部の細胞を凍結保存し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いgenomic DNA (gDNA)を抽出した。qPCR (TaqManプローブ法)を用い各サンプルのRRVコピー数を評価した。RRVに対する特異的プライマーはCustom TaqMan Copy Number Assaysを用いてカスタムデザインし、4070A envelopeを標的とし、また内在性コントロール遺伝子としてhuman RNasePもしくはmouse Trfcを使用した (表1)。qPCRおよびその解析はduplicateで行い、light cycler[®]96 System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用した。

表1 プライマーリスト

Target	Forward primer	Reverse primer	Probe
4070A	5'-GCGGACCCGGACTTTTGA-3'	5'-ACCCCGACTTTACGGTATGC-3'	FAM TM -CAGGGCACACGTAAAA-NFQ
Human RNaseP	TaqMan Copy Number Assay, human, Rnase P (Applied Biosystem)		
Mouse Tfrc	TaqMan Copy Number Assay, mouse, Tfrc (Applied Biosystem)		

NFQ: nonfluorescent quencher

4) RRV感染肺癌細胞株における5-FCによる細胞毒性の評価

RRV-GFP、Toca-511をヒト肺癌細胞株 (A549)およびマウス肺癌細胞株 (Ex-3LL)にdish上で感染させ、4週間継代を行い感染がプラトーに達した細胞集団 (以下をそれぞれ、RRV-GFP、Toca-511感染細胞とする)を作成した。これらの細胞と未感染細胞を96-well plateに 1×10^3 cells/wellの細胞数で撒き、段階的な5-FC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 濃度下 (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10mM) で3日間培養した。計測はtriplicateにて行い、生細胞数をOptimal Density 490値としCell titer96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS assay) (Promega, Medison, WI, USA)を使用した。得られた値は比較対照に対して百分率で示した。

5) 肺癌皮下腫瘍モデルにおけるRRV感染・増殖能の評価

以下の動物実験において、A549異種移植モデルではBALB/c-nu/nuマウス、Ex-3LL同種移植モデルではC57BL/6マウスを使用した。いずれもCLEA (Tokyo)から購入し6-8週齢の雌を用いた。RRV未感染細胞 (99%)にRRV-GFP感染細胞 (1%)を混合し、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Life technologies, Tokyo) で 5×10^6 細胞/100 μ lに調整してマウスの右側腹部に移植した。各群9匹ずつマウスを作成し、移植後7、14、21日に解析する群に無作為に振り分けた (3匹/群)。摘出した皮下腫瘍はTumor dissociation Kit, gentle MACSTM Dissociator (Miltenyi Biotech, Germany) を用い腫瘍細胞を選択分離し、フローサイトメトリー解析を行った。

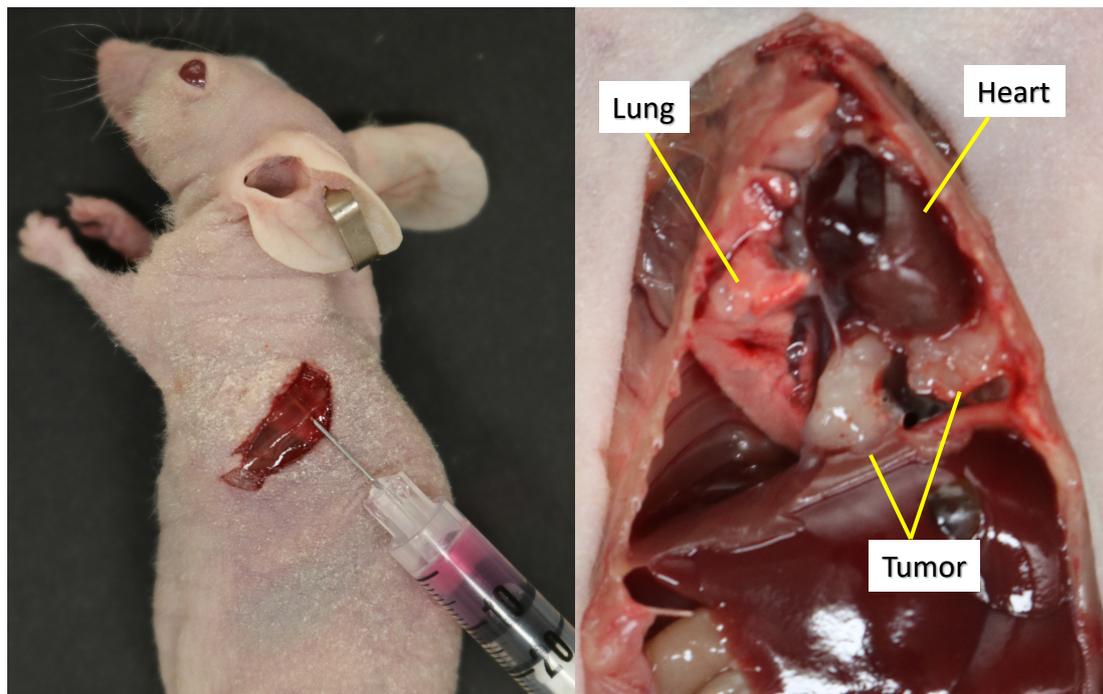
6) 肺癌皮下腫瘍モデルにおけるRRVプロドラッグ活性化遺伝子治療

RRV未感染細胞 (99%)にToca511感染細胞 (1%)を混合し、 5×10^6 細胞/100 μ l (HBSS)に調整してマウス右側腹部に移植した。A549異種移植モデルおよびEx-3LL同種移植モデル、それぞれ10匹の皮下腫瘍モデルを作成した。また、コントロールとしてRRV未感染細胞 (100%)の皮下腫瘍モデルも同様に10匹ずつ作成した。A549異種移植モデルでは移植後第21日に5-FC投与群とPBS投与群に無作為に振り分け、Ex-3LL同種移植モデルでは移植後第14日に同様に振り分けた (5匹/群)。5-FC投与群では500mg/kg/dayの5-FC腹腔内投与を治療開始日より7日間連日投与して7日間休薬するというサイクルで繰り返した。PBS投与群では5-FCと同容量のPBSを投与

した。腫瘍体積は $\text{volume}=\text{length} \times \text{width}^2/2$ により算出し、A549異種移植モデルでは60日、Ex-3LL同種移植モデルでは42日まで観察した。また、腫瘍が完全消退したEx-3LL同種移植モデルの2匹を用い、左側腹部にEx-3LL (5×10^6 細胞/ $100 \mu\text{l}$)を再移植した (re-challenge test)。腫瘍体積は $\text{volume}=\text{length} \times \text{width}^2/2$ により算出し、再移植後28日まで観察した。

7) 肺癌胸膜播種モデルの作成

肺癌胸膜播種モデルの治療に先行し、IVIS optical imaging system (Xenogen(Caliper), Waltham, MA, USA)を使用し治療評価を行うためにA549、およびEx-3LLにpGL4.50[luc2/CMV/Hygro] (Promega, Madison, WI)を用いてホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した。以下これらの細胞をそれぞれA549-luc、およびEx-3LL-lucとする。はじめに細胞数とbioluminescent signals (BLS)が相関関係にあることを確認するため、細胞を4段階の密度(10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cells/well)で撒き、D-luciferin (Goryochemical, Sapporo, Japan)添加10分後にexposure time 30秒で各wellのBLSを評価した。続いて、A549-luc、およびEx-3LL-lucを用いて肺癌胸膜播種モデルを作成した。方法は、マウスをケタミン100mg/kg (Fujita, Pharmaceutical, Tokyo) + キシラジン10mg/kg (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)で麻酔後に左側胸部に約1.5cmの皮膚切開を加えた。RRV未感染細胞 (99%)とToca511感染細胞 (1%)を混合し、 1×10^5 細胞/ $100 \mu\text{l}$ (HBSS)に調整した。肋間の胸膜を通して肺実質を透見し、29G針を用いて胸腔内に細胞浮遊液を投与した (図4)。



腫瘍細胞投与時

腫瘍細胞投与後28日目

図4. 肺癌胸膜播種モデル作成方法

左側胸部に約1.5cmの皮膚切開を加え、RRV未感染細胞（99%）とToca511感染細胞（1%）を混合し、 1×10^5 細胞/100 μ l (HBSS)に調整し胸腔内に投与した。腫瘍細胞投与後28日目に胸腔内に腫瘍細胞が生着していることを確認した。

8) 肺癌胸膜播種モデルにおけるプロドラッグ活性化遺伝子治療の効果

前項7)で述べたように肺癌胸膜播種モデルを作成した。A549異種移植モデルでは移植後第14日、Ex-3LL同種移植モデルでは移植後第7日より5-FC投与群、PBS投与群に無作為に振り分けた（5匹/群）。5-FC投与群では、5-FC（500mg/kg/day）の腹腔内投与を治療開始日より7日間連日行い、7日間休薬するというサイクルを繰り返した。PBS投与群では5-FCと同容量のPBSを投与した。IVISによる解析はA549異種移植モデルでは7日毎、Ex-3LL同種移植モデルでは3、4日毎に行った。解析はケタミンとキシラジン併用による麻酔下でD-luciferin（150mg/kg）を腹腔内投与し、10分後にexposure time 30秒で行った。

9) 肺癌胸膜播種モデルにおける高力価RRVウイルス胸腔内投与による感染能の評価

肺癌胸膜播種モデルにおいて高力価RRVウイルスの胸腔内投与による感染能の評価を行うため、RRV未感染のA549-luc細胞を 1×10^5 細胞/100 μ l (HBSS)に調整しA549-luc胸膜播種モデルを3匹作成した。作成方法は前項8)に準じた。移植後第2日

に 5×10^6 TU/500 μ l (PBS) に調整したRRV-GFPを胸膜播種作成時と同様の経路で投与した。移植後第16日目にケタミンとキシラジン併用による麻酔下で腫瘍を摘出し、Tumor dissociation Kit, gentle MACS™ Dissociator (Milteni Biotech, Germany) を用いて腫瘍細胞を選択分離しフローサイトメトリー解析を行った。

10) 肺癌胸膜播種モデルにおけるRRVプロドラッグ活性化遺伝子治療

前項9)と同様にA549-luc胸膜播種モデルを12匹作成した。移植後第2日にPBSで 5×10^6 TU/500 μ lに調整したToca511を胸膜播種作成時と同様の経路で投与した。移植後第16日目にマウスを5-FC投与群 (6匹)、PBS投与群 (6匹) に無作為に振り分けた。5-FC投与群では、5-FC (500mg/kg/day)の腹腔内投与を治療開始日より7日間連日行い、7日間休薬するというサイクルを繰り返した。マウスは連日観察し、生存期間を記録した。

11) 肺癌胸膜播種モデルにおけるRRVの生体内分布

前項10)と同様にA549-luc胸膜播種モデルを3匹作成し、移植後第2日に 5×10^6 TU/500 μ l (PBS) に調整したToca511を胸膜播種作成時と同様の経路で投与した。移植後第16日より5-FC投与を3サイクル行い、安楽死の後に全身臓器 (肝臓、腎臓、卵巣、膵臓、直腸、脾臓、心臓、肺、食道、骨髄、腫瘍)を採取した。DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を使用しgDNAを採取した。前項3)述べたqPCRと同様にRRVコピー数を評価した。その際、内在性コントロールはmouse Trfcを用いた。

12) 統計解析

統計学的解析はStudent's t testを適用した。また、生存期間の解析にはKaplan-Meier法にて生存曲線を描き、2群間の比較にはLog-rank検定を用いた。数値は平均値 \pm standard deviation (SD)で示し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。また、決定係数 (r^2) > 0.9 を強い相関とした。解析ソフトはGraphPad prism 8 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA)を用いた。

13) 研究指針, 研究倫理

本研究は「北海道大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に従って行った(19-0032)。また本研究の動物実験は「北海道大学動物実験に関する規定」に則って行った (20(1)⑤)。

実験結果

1) RRVは肺癌細胞株において速やかな感染能と高い遺伝子導入効率を示した

*In vitro*でRRVが肺癌細胞株に感染し、複製されているかを検討するため、一定割合の細胞集団にRRV-GFPを感染させた後のGFP陽性細胞の割合をフローサイトメトリー解析した。MOI=0.01でRRV投与後14日以内にA549、H226、SBC-3ではGFP陽性率が80%に達した。マウス肺癌細胞のEx-3LLでは感染後21日でGFP陽性率が80%に達した。一方で、逆転写酵素阻害薬であるAZTを添加した細胞株ではGFP陽性率は5%以下を維持していた。RRVの複製は逆転写酵素阻害薬AZTで抑制されることから、このGFP陽性細胞率の経時的な増加はRRVの増殖による腫瘍細胞内での感染の拡大であることが示された (図5)。

続いて、図5と同様の細胞集団からA549、Ex-3LLのgDNAを抽出しqPCRを用いRRVコピー数の評価を行った。A549ではRRV-GFP陽性率の曲線と同様にRRVコピー数は上昇し、やがてプラトーに達した。Ex-3LLでもRRV-GFP陽性率の曲線と同様に上昇し、その後プラトーに達した (図6)。

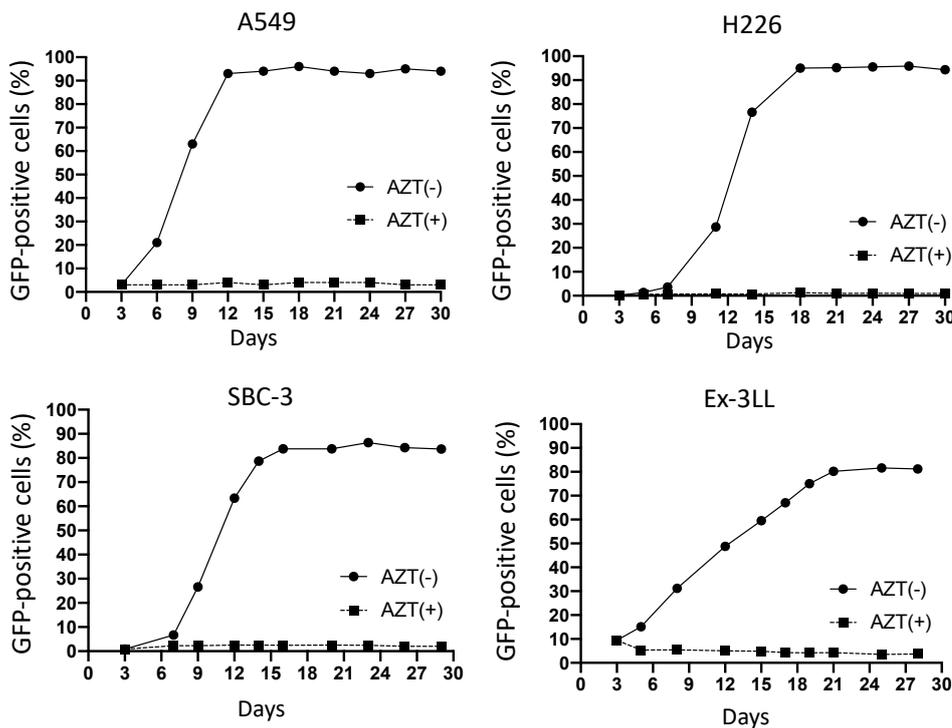


図5. 肺癌細胞におけるRRV-GFPの感染効率

各細胞株にRRV-GFPをMOI=0.01で投与した。2、3日毎にこれらの細胞のGFP陽性率をフローサイトメトリー解析した。また、逆転写酵素阻害薬である3'-azide-3' deoxythymidine (AZT) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)を初回継代時に終濃度25 μ Mで付加したものをコントロールとして用いた。

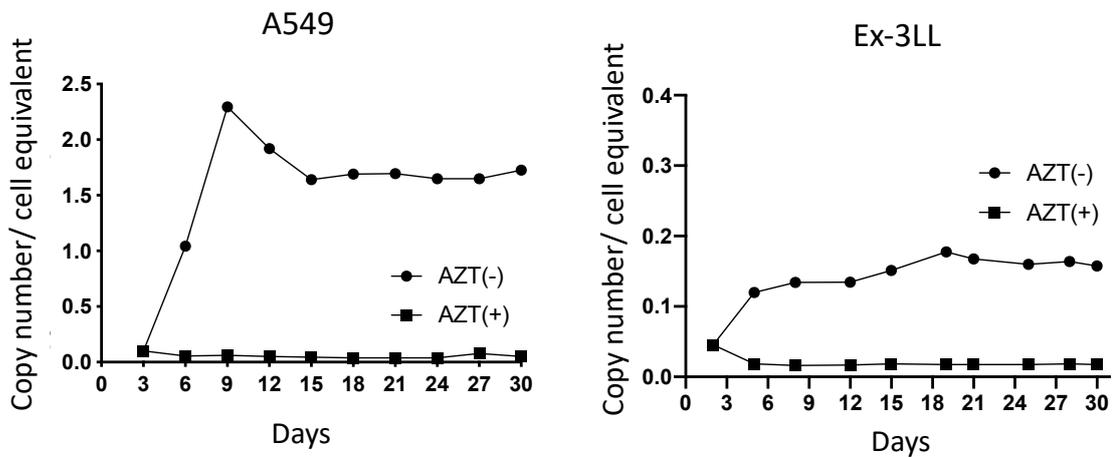


図6. 肺癌細胞におけるRRV-GFPの遺伝子導入効率

A549およびEx-3LLはgenomic DNA (gDNA)を抽出し、qPCR (TaqManプローブ法) を用い RRVコピー数を評価した。

2) 肺癌細胞株においてRRVはプロドラッグ投与による優れた増殖抑制効果を *in vitro* cytotoxicity assayで示した

Toca511によりyCD遺伝子が導入された肺癌細胞株において、プロドラッグである5-FCの殺細胞効果を評価するため、段階的な5-FC濃度下での細胞毒性をMTS assayで検討した。RRV未感染、RRV-GFPを感染させたコントロール群のA549では、10mMの5-FC濃度で約30%の細胞死を認めた。一方、Toca511を感染させたA549では0.1mMで約60% ($63 \pm 0.01\%$)、1mMで約90% ($91.8 \pm 0.0001\%$)の細胞死を認めた。Ex-3LLではRRV未感染、RRV-GFPを感染させたコントロール群において0.1mMの5-FC濃度で約60%の細胞死を認めた。一方、Toca511を感染させたEx-3LLでは0.001mMと、より低濃度の5-FCで約80% ($80.8\% \pm 0.03\%$)の細胞死を認めた。以上より、Toca511と5-FCの併用療法は *in vitro*において肺癌細胞株に対して優れた殺細胞効果を示した(図7)。

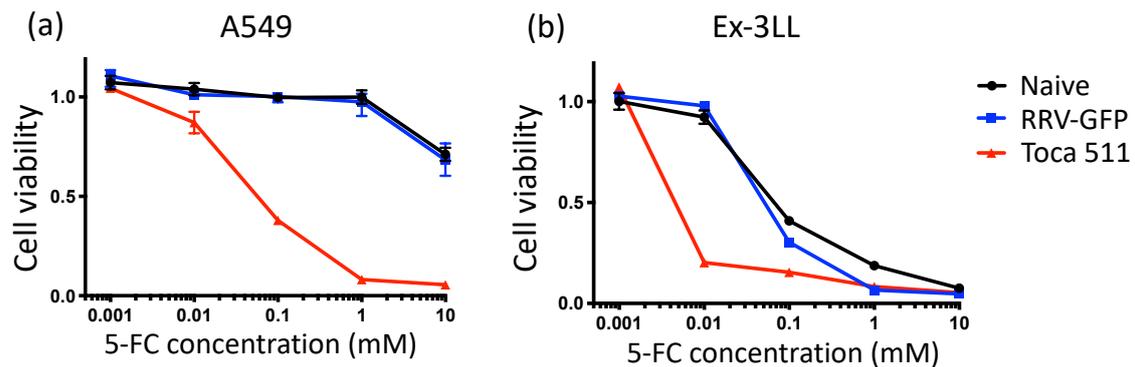


図7. RRV感染肺癌細胞株における5-FUによる細胞毒性の評価

RRV-GFP、Toca-511をA549および Ex-3LLに感染させ、段階的な5-FU濃度下で3日間培養した。MTS assayを用いCell viabilityをtriplicateで解析し、数値は平均値±SDで示した。

Naive: RRV未感染細胞、RRV-GFP: RRV-GFP感染細胞、Toca 511: Toca 511 感染細胞

3) RRVは肺癌皮下腫瘍モデルにおいて効果的な感染・増殖能を示した

*In vivo*の腫瘍内において、RRVの肺癌細胞における感染能を検討するため1%のRRV-GFP陽性細胞を含んだ肺癌皮下腫瘍モデルを作成した。移植後7、14、21日後の腫瘍内GFP陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。A549異種移植免疫不全皮下腫瘍モデルでは移植後14日でGFP陽性細胞の割合は $78.1 \pm 1.7\%$ であった。また、Ex-3LL同種移植正常免疫皮下腫瘍モデルでは移植後21日でGFP陽性細胞の割合は $51.1 \pm 1.7\%$ となり、A549皮下腫瘍モデルと比較し緩徐な感染率の増加を示した。以上より、RRVは*in vivo*の腫瘍内において免疫不全マウス、免疫正常マウスの両方で感染能、および増殖能があることが示された (図8)。

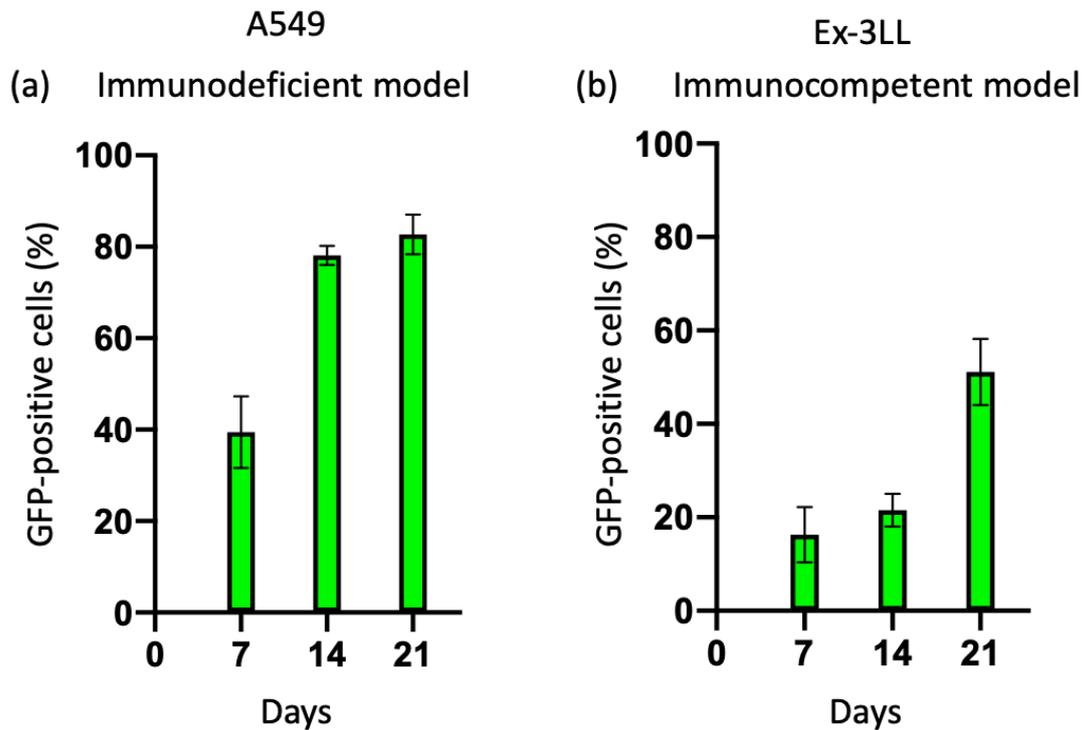


図8. 肺癌皮下腫瘍モデルにおけるRRV感染・増殖能

1%のRRV-GFP陽性細胞を含んだ肺癌皮下腫瘍モデルを作成し、移植後7、14、21日に無作為に振り分けた (3匹/群)。皮下腫瘍を摘出しフローサイトメトリー解析を行った。数値は平均値±SDで示した。

4) RRVプロドラッグ活性化遺伝子治療は肺癌皮下腫瘍モデルにおいて優れた抗腫瘍効果を示した

*In vitro*でのToca511/5-FC療法の抗腫瘍効果が示唆されたため、*in vivo*での効果を検討するため肺癌皮下腫瘍モデルを作成して治療実験を行った。A549異種移植免疫不全モデル、Ex-3LL同種移植モデルの両者において、Toca511未感染腫瘍では5-FC投与による抗腫瘍効果は得られなかった。図2で前述したように、Ex-3LLは*in vitro*においてToca511未感染細胞でも0.1mMの5-FC濃度で細胞毒性が認められていたが、*in vivo*では5-FC単独での抗腫瘍効果は認められなかった。一方、A549異種移植免疫不全モデル、Ex-3LL同種移植モデルのいずれにおいても、Toca511感染腫瘍では5-FC投与により著明な腫瘍増殖抑制効果を示した (図9)。免疫能のあるEx-3LL同種移植モデルでは最終的に大部分のマウス (n=4/5)で腫瘍は完全消退した。

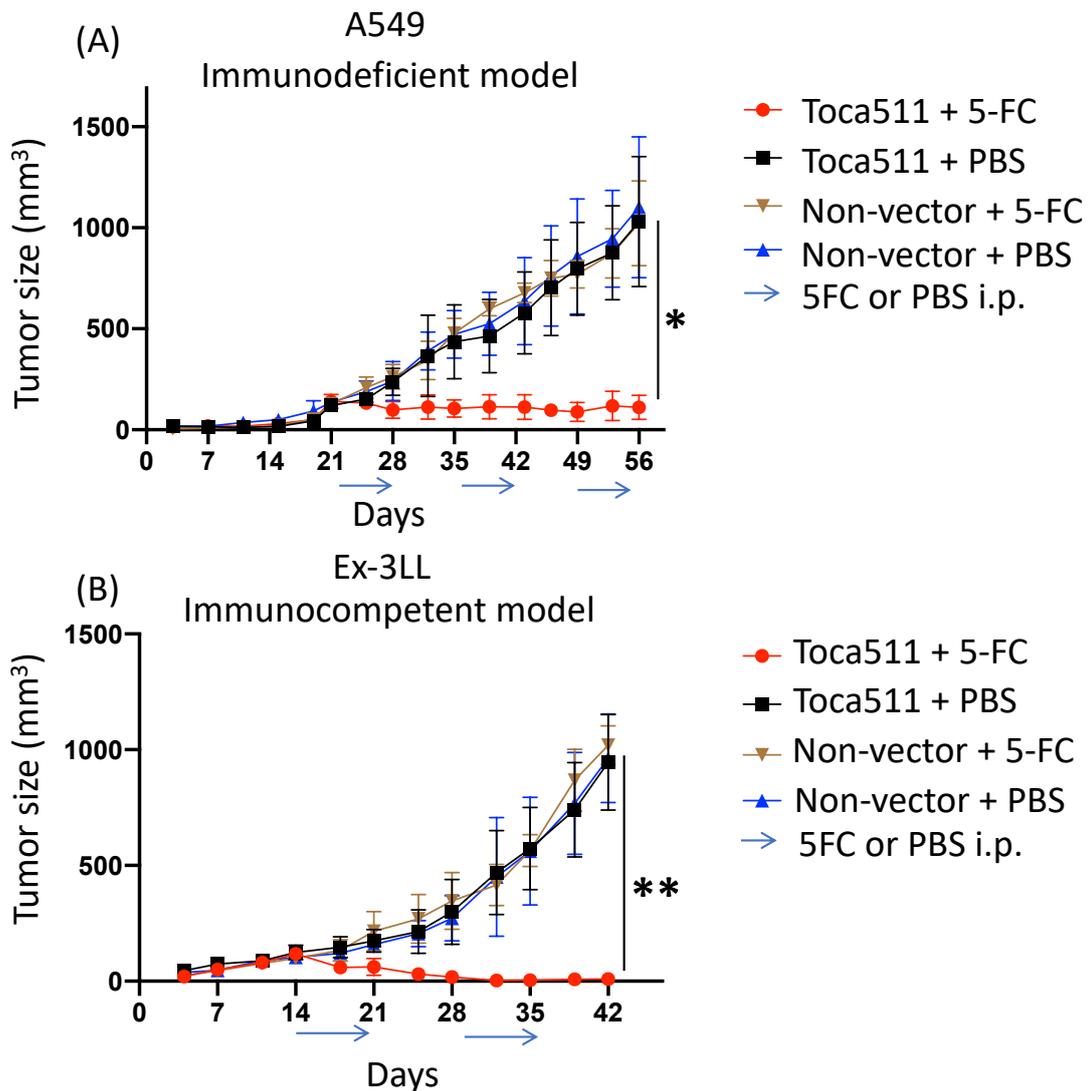


図9. 肺癌皮下腫瘍モデルにおけるRRVプロドラッグ活性化遺伝子治療

RRV未感染細胞 (99%)にToca511感染細胞 (1%)を混合し 5×10^6 細胞/ $100 \mu\text{l}$ に調整し右側腹部に移植した。5-FC投与群 (500mg/kg/day)とPBS投与群に無作為に振り分けた。各群、解析は $n=5$ で行い、腫瘍体積は $\text{volume} = \text{length} \times \text{width}^2 / 2$ により算出した。数値は平均値 \pm SDで示した。

5) 腫瘍が完全消退した個体において、再移植した肺癌細胞は生着しなかった

前項4)のEx-3LL同種移植モデルにおいて、腫瘍が完全消退した2個体を用い、皮下にEx-3LLを再投与した(re-challenge test)。コントロール群と比較して治療後のマウスでは腫瘍の生着が認められなかった。これは、Toca511/5-FC療法により、抗腫瘍免疫が惹起されたことを示唆している(図10)。

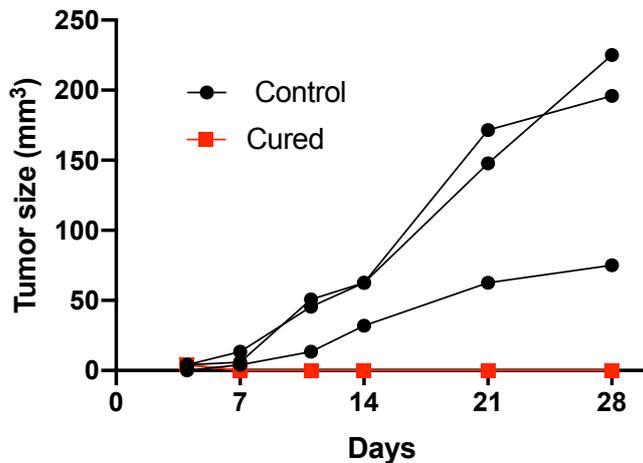


図10. Toca511/5-FC療法後のEx-3LL同種移植モデルを用いたre-challenge test

図9(B)の治療群において腫瘍が完全消退した2個体を用いて、re-challenge testを行った。左側腹部に 5×10^6 細胞/ $100 \mu\text{l}$ に調整したEx-3LLを投与した。コントロールとして未治療マウスの皮下腫瘍モデルも同様に作成した (n=3)。腫瘍体積は $\text{volume} = \text{length} \times \text{width}^2 / 2$ により算出し、28日まで観察した。

6) RRVプロドラッグ活性化遺伝子治療は肺癌胸膜播種モデルにおいて優れた抗腫瘍効果を示した

ルシフェラーゼを導入した肺癌細胞 (A549-luc, Ex-3LL-luc)における細胞数とBLSの相関を確認するために、まず*in vitro*でIVISによる評価を行った。いずれの細胞においても、細胞数とBLSは相関関係にあることが示された (図11)。次に、肺癌胸膜播種モデルにおけるToca511/5-FC療法の効果を評価するため、あらかじめToca511を1%で感染させた腫瘍細胞を胸腔内に投与し治療経過をIVISにより評価した。A549異種移植免疫不全モデルでは、PBS投与群に比べ5-FC投与群で著明にBLSは減弱し腫瘍縮小効果が認められた。また、Ex-3LL同種移植モデルのPBS投与群は全例 (n=5)が、day28のIVIS評価の前に死亡した。一方、5-FC投与群では、PBS投与群と比較して複数の個体でBLSの増強は抑制され、腫瘍縮小効果による観察期間の延長が認められた (図12)。

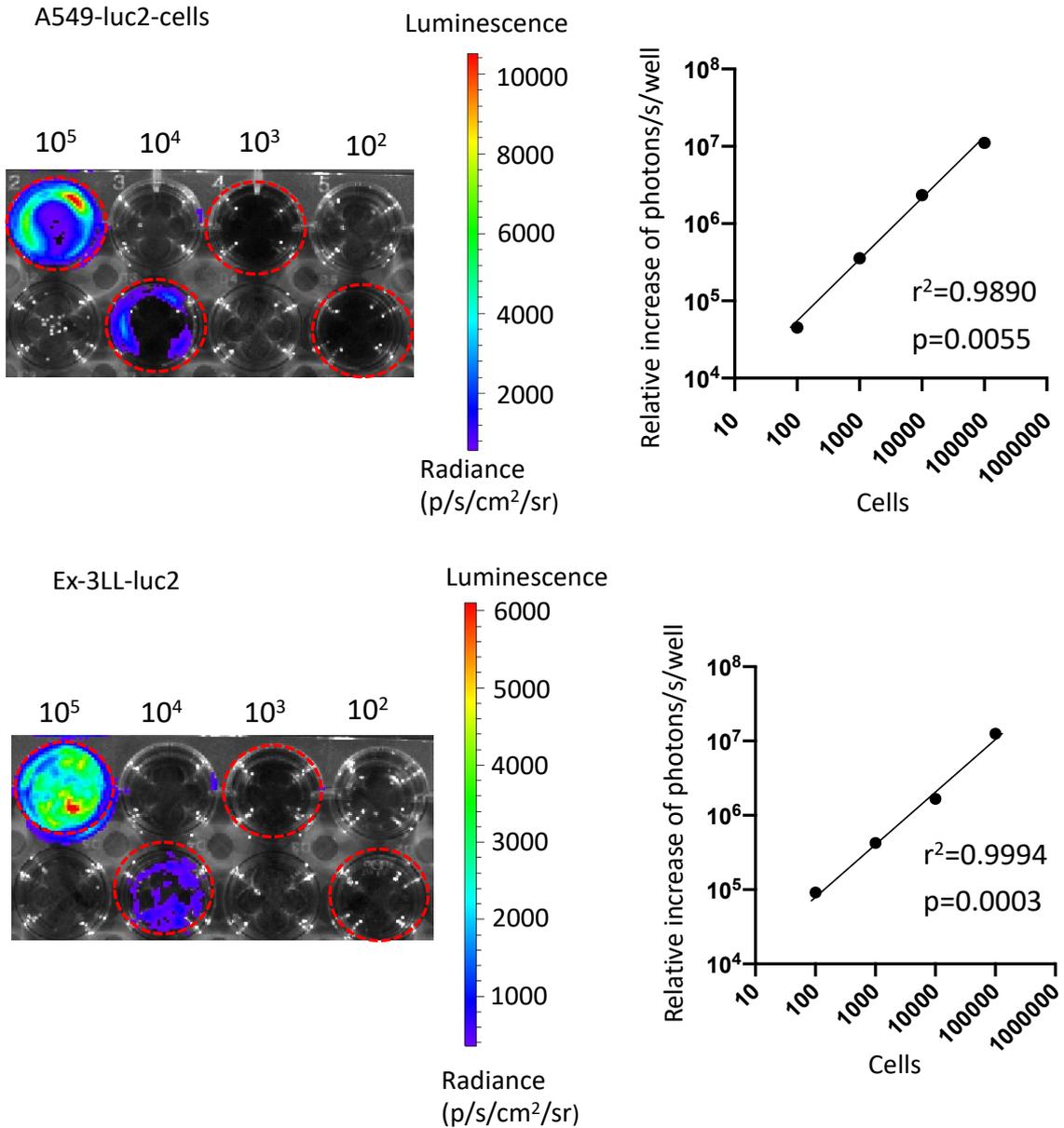


図11. ホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した肺癌細胞株の生物発光による定量評価
4段階の密度 (10⁵, 10⁴, 10³, 10² cells/well)でA549-luc、Ex-3LL-lucを撒き、D-luciferin
(Goryochemical, Sapporo, Japan)添加10分後にexposure time 30秒で各wellのBLSを評価した。

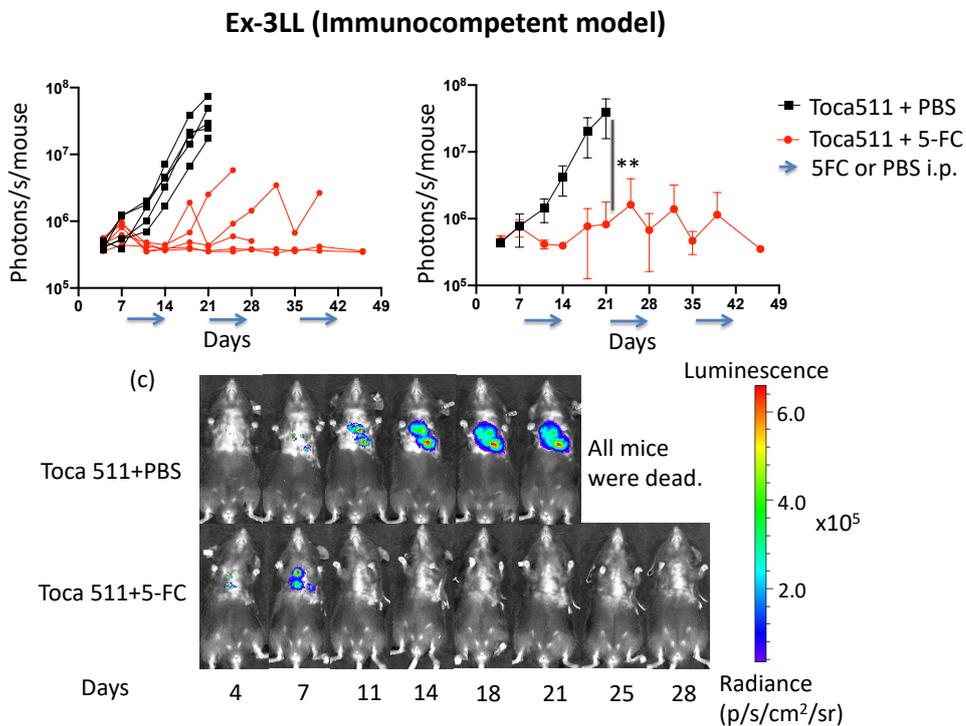
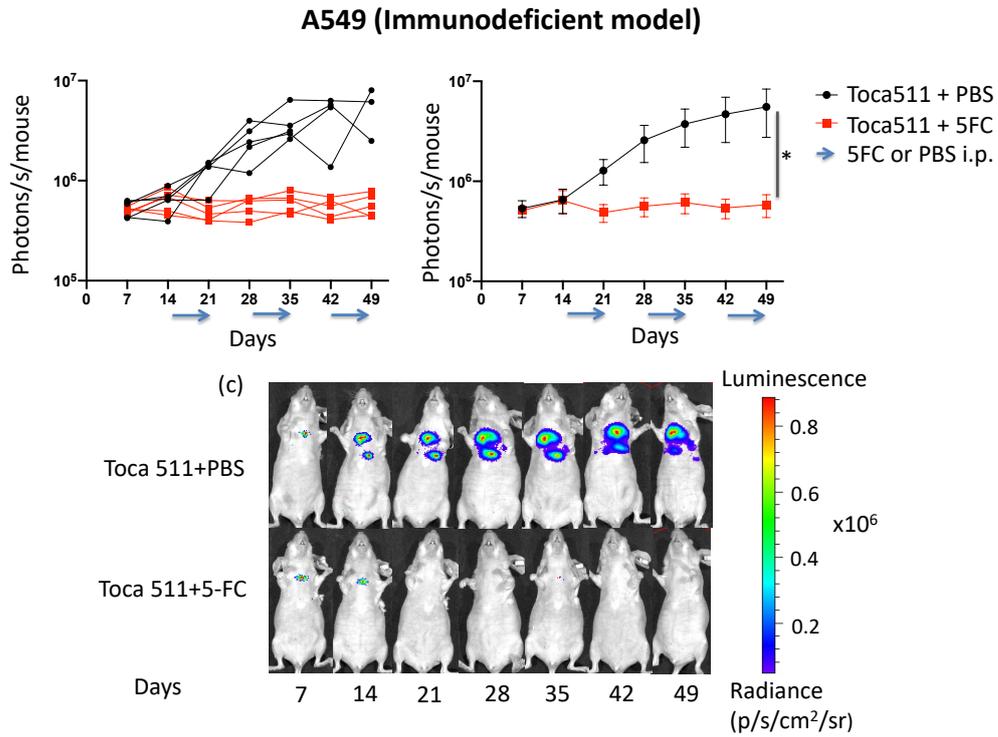


図12. 肺癌胸膜播種モデルにおけるプロドラッグ活性化遺伝子治療の効果

肺癌胸膜播種モデルを作成し5-FC投与群 (500mg/kg/day)、PBS投与群に無作為に振り分けた (5匹/群)。IVISによる解析はA549異種移植モデルでは7日毎、Ex-3LL同種移植モデルでは3、4日

毎に行い、腫瘍成長曲線を作成した。(a) 各マウスデータ、(b) 平均値±SD、(c) 肺癌胸膜播種の生物発光イメージ。各群、解析はn=5で行った。

7) 肺癌胸膜播種モデルにおいて、高力価RRV-GFPの胸腔内直接投与によりRRVの高い感染能が示された

前述した実験は、RRVをあらかじめ僅かに感染させた腫瘍細胞（1%）を用いたが、本実験では、前臨床モデルとして高力価のRRVを胸腔内に直接投与した際の胸膜播種病変におけるRRVの感染能、抗腫瘍効果を評価した。RRV未感染のA549をマウス左胸腔内に投与し、移植後2日目に同様の経路から高力価のRRV-GFPを投与した。移植後16日目に腫瘍を摘出しフローサイトメトリーで解析した（n=3）。GFP陽性細胞の割合はそれぞれ、65.2、71.2、61.1%であった。以上の結果から、高力価のRRV-GFPは、胸腔内に直接投与することで肺癌胸膜播種病変に優れた感染能を示した（図13）。

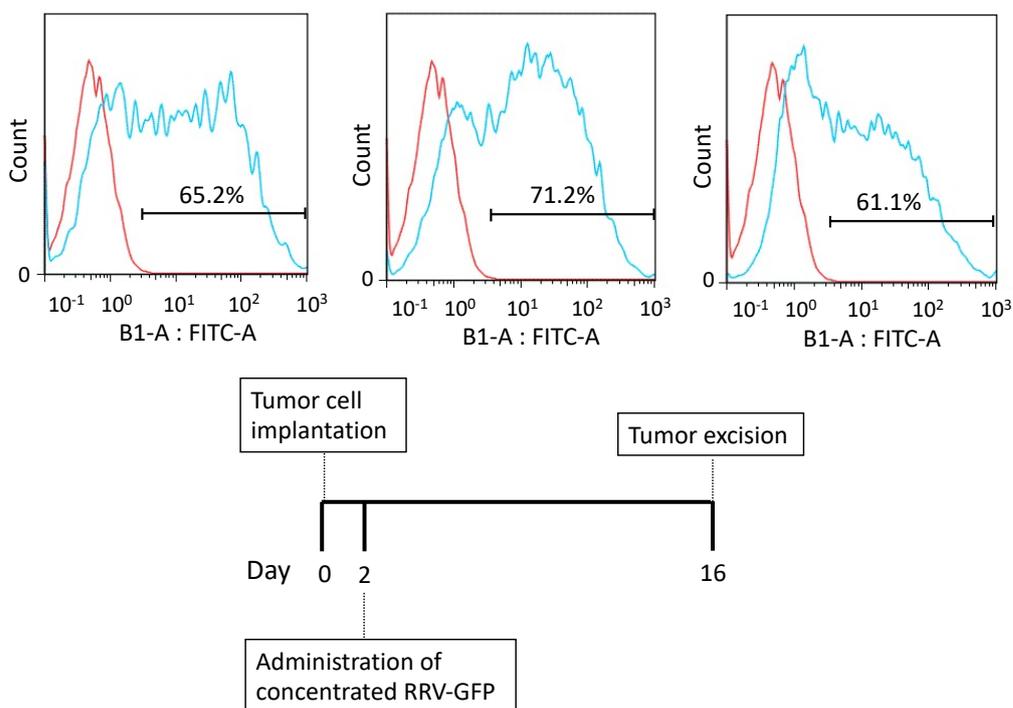


図13. 肺癌胸膜播種モデルにおけるRRVウイルス胸腔内投与による感染能の評価

RRV未感染のA549-luc細胞を 1×10^5 細胞/ $100 \mu\text{l}$ に調整しA549-luc胸膜播種モデルを3匹作成した。移植後第2日に 5×10^6 TU/ $500 \mu\text{l}$ に調整したRRV-GFPを胸膜播種作成時と同様の経路で投与した。移植後第16日目に腫瘍を摘出し、腫瘍細胞を選択分離しフローサイトメトリー解析を行った。

8) 肺癌胸膜播種モデルにおいて、Toca511（胸腔内直接投与）/5-FC（全身投与）併用療法により有意に生存期間が延長した

Toca511/5-FC併用療法の効果を見るため、前項7)と同様にToca511未感染の肺癌細胞を用いて肺癌胸膜播種モデルを作成した。移植後2日目に同様の経路から高力価のToca511を胸腔内に投与し、移植後16日目より5-FC投与群、およびPBS投与群に割り付けた。PBS投与群に比べ5-FC投与群では有意に生存期間が延長し、3例が100日以上生存した。以上の結果から、高力価Toca511を胸腔内へ直接投与することで、5-FC投与による抗腫瘍効果が得られ生存期間が延長することが示唆された（図14）。

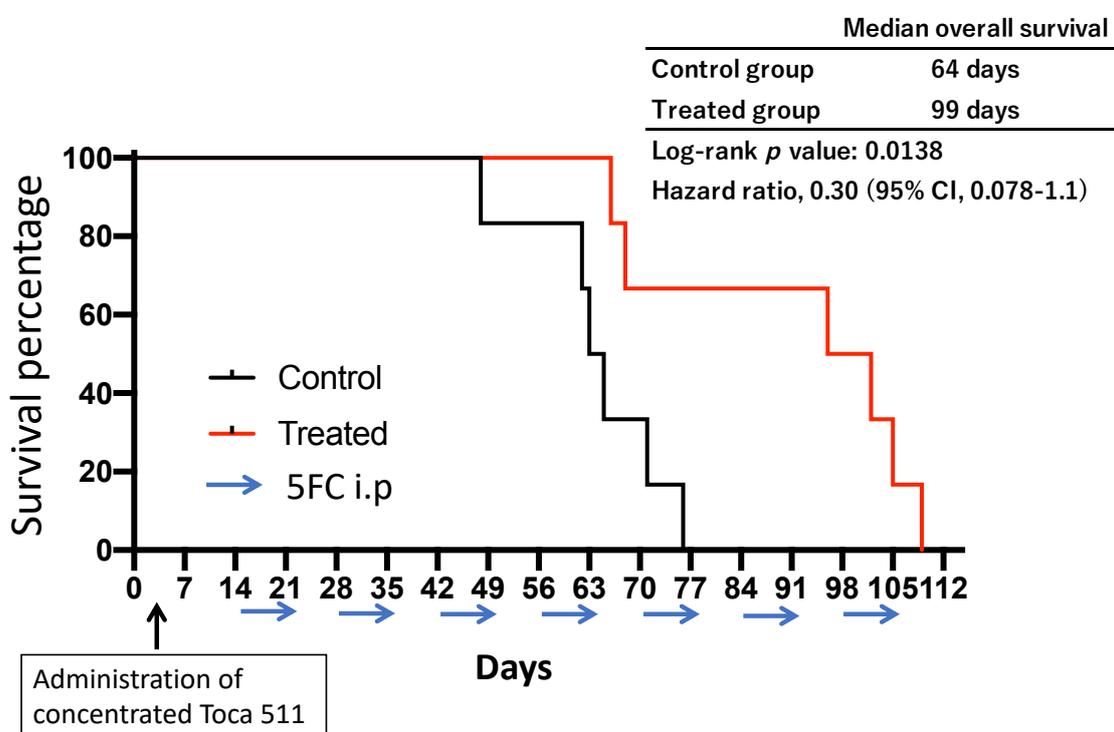


図14. 肺癌胸膜播種モデルにおける高力価RRVウイルス胸腔内投与後のRRVプロドラグ活性化遺伝子治療

A549-luc胸膜播種モデルを作成し、移植後第2日に 5×10^6 TU/500 μ lに調整したToca511を胸腔内投与した。移植後第16日目にマウスを5-FC投与群（500mg/kg/day）、PBS投与群に無作為に振り分けた。マウスは連日観察し、生存期間を記録した。各群、解析は $n=6$ で行った。

9) Toca511（胸腔内直接投与）/5-FC（全身投与）併用療法を行った肺癌胸膜播種モデルにおいて、RRVの組織分布は低いレベルに抑制されていた

安全性の評価として、Toca511（胸腔内直接投与）/5-FC（全身投与）併用療法を行った胸膜播種モデルにおいてRRVの生体内分布をgenomic PCRで評価した。移植後第16日より5-FC投与を3サイクル行った後に全身臓器（肝臓、腎臓、卵巣、脾臓、直

腸、脾臓、心臓、肺、食道、骨髄、腫瘍)から、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を使用しgDNAを採取した。qPCRでRRVコピー数を評価し、解析はduplicateで行った。腫瘍細胞を除く全ての対象とした生体組織においてRRVコピー数は低レベルに抑制されており(表2)、Toca511の腫瘍選択性が示された。

表2 各生体組織のRRVコピー数

	Mouse		
	No.1	No.2	No.3
Heart	0.302	0.318	0.189
Esophagus	0.708	1.054	0.486
Lung	0.877	6.538	4.303
Rectum	0.352	0.435	0.529
Spleen	1.594	1.116	1.168
Ovary	0.682	0.597	0.454
Bone marrow	6.670	0.500	1.244
Kidney	0.311	0.353	0.329
Pancreas	0.595	1.034	0.508
Liver	0.171	0.340	0.339
Tumor	248.390	319.020	316.716

Copy number of RRV/ 100 cells

考察

本研究ではToca511/5-FC併用療法が肺癌の新たな治療法として有用であることを前臨床研究として示すことができた。具体的には本研究で以下の知見が明らかになった。① RRVは*in vitro*、*in vivo*のいずれにおいても腫瘍細胞で安定した感染能・増殖能を示す。② 治療用RRVであるToca511は腫瘍細胞に感染し、プロドラッグである5-FCの投与により選択的な抗腫瘍効果が示される。③ 前臨床モデルとして作成した胸膜播種モデルにおいても、Toca511は極めて高い腫瘍選択性を示し、安全性が示唆された。

今回、*in vitro*実験ではMOI: 0.01という非常に低い初期感染率にも関わらず、RRVはヒト・マウス肺癌細胞いずれにおいても効率的な感染・増殖能を示した。すなわち、初期感染細胞が非常に少ない状況下においても、RRVは周囲の非感染腫瘍細胞に効率的に感染することを示唆している。また、qPCR解析において感染細胞のgDNAにRRVが導入されていることも確認された。以上より、肺癌細胞に感染したRRVはgDNAに効率的に取り込まれ、そこから産生、放出される新たなRRVが周囲の非感染細胞へと感染し、新たなRRV産生肺癌細胞が作られることで相乗的にRRV感染細胞が増加していると考えられる。

*In vivo*実験におけるRRVの感染動態はA549異種移植皮下腫瘍モデルとEx-3LL同種移植皮下腫瘍モデルで異なっていた。A549異種移植皮下腫瘍モデルでは*in vitro*とほぼ同様な感染動態を示したが、Ex-3LL同種移植皮下腫瘍モデルでは*in vitro*と比較して緩徐な感染動態を示した。この一因として、C57BL/6マウスがもつ自然免疫や獲得免疫によりRRVが排除された可能性が考えられる(Li et al., 2014; Littwitz-Salomon et al., 2017; Okeoma et al., 2009)。また、Ex-3LL同種移植皮下腫瘍モデルは皮下移植後42日目で腫瘍体積が1000mm³前後に達し、A549異種移植皮下腫瘍モデルに比べ腫瘍の増大スピードが速かった。これはEx-3LLの増殖能の速さを示しており、相対的にRRVの産生能よりも細胞増殖能が勝り、緩徐な感染動態になったと考えられる。しかしながら、皮下腫瘍モデルに対するToca511/5-FC併用療法の治療効果はいずれのモデルにおいても得られた。Ex-3LL同種移植皮下腫瘍モデルでは、低いRRV感染率にも関わらず2サイクルの5-FC投与で腫瘍の完全消退が得られた個体もあった。この結果は5-FUそのものの効果に加え、Bystander効果や、Toca511/5-FC併用療法により惹起された獲得免疫による抗腫瘍効果も加わった結果と考えられる。

近年、免疫チェックポイント阻害薬などの癌免疫療法が着目されている。しかしながら、肺癌におけるPD-1阻害薬の奏効率は約20-30%とされており未だ十分とはいえない。また、抗腫瘍免疫が賦活化される一方、自己免疫の賦活化により引き起こされる有害事象により薬剤の中断を余儀なくされることもある(Lipson et al., 2015; Postow et al., 2018)。このように、PD-1阻害薬の効果を高めることは臨床的課題と

なっている中で、Toca511/5-FC療法は抗腫瘍免疫を惹起することが報告されている。Mitchell(Mitchell et al., 2017) らはToca511/5-FC療法を行ったマウスの腫瘍内でCD4+T細胞、CD8陽性T細胞が未治療群と比較し有意に増加していることを示した。さらにHiraokaら(Hiraoka et al., 2017)はToca511/5-FC療法で治療後のマウスに対して再度、皮下に腫瘍を投与する実験 (re-challenge test)を行い、再生着しないことを示した。肺癌細胞を用いた本研究でも同様の結果が得られた。このre-challenge testの結果はToca511/5-FC療法で治療後のマウスには抗腫瘍免疫が確立されたことを示唆している。さらに、上述したようにEx-3LL同種移植皮下腫瘍モデルにおいては、RRVの感染形態がやや緩徐であるにも関わらず、腫瘍が完全消退した個体もあった。この理由は未だ明らかになってはいないが、何らかの免疫経路を介して抗腫瘍免疫が誘導されたと考えられる。本研究の肺癌胸膜播種モデルのように、Toca511/5-FC療法のみでは腫瘍が完全消退しない個体に対しては、免疫チェックポイント阻害薬の投与により奏効率を改善できる可能性があり、さらなる免疫経路の解析が必要である。

本研究では胸膜播種モデルを用いてToca511/5-FC療法の安全性評価を行った。腫瘍を除く解析対象とした全ての生体組織でRRVコピー数は低レベルに抑制され、Toca511の腫瘍選択性とその安全性が示唆された。本研究で用いたモデルは異種移植免疫不全モデル (immunodeficient model)であるが、個体の免疫が保たれている同種移植モデル (immunocompetent model)ではさらに生体内のRRVコピー数は抑制されると考えられる。レトロウイルスの増殖を抑制する因子としてはAPOBEC3やDDX41などの先天性宿主因子、および獲得免疫がその役割を担っているとされている (Littwitz-Salomon et al., 2017; Stavrou et al., 2018)。実際に同種移植モデルを用いた先行研究において、全臓器でRRVはほとんど検知されていない (Inoko et al., 2018)。また、アカゲザルを用いた両種指向性マウス白血病ウイルスの安全性実験においても、ウイルスは速やかに血清から除去され、その後の観察期間においてもウイルス血症などの有害事象は認められなかった (Cornetta et al., 1990)。さらに、米国で行われた脳腫瘍に対する第I相試験においても、既存の薬剤であるロムスチンよりも高い安全性を示した (Cloughesy et al., 2016)。また、RRVが少数の正常細胞に感染した際にも、逆転写酵素阻害薬の投与や5-FCの投与により感染細胞の増殖を抑制することが可能である。これらのことから、RRVの正常細胞遺伝子への挿入変異によって生じる有害事象リスクは低く、本治療法の安全性は高いと考えられる。

本研究では、実臨床における肺癌胸膜播種患者を想定した肺癌胸膜播種モデルを作成し実験を行った。RRVの投与経路は臨床でも比較的簡便に行える胸腔内投与を選択した。この前臨床モデルにおいてもRRVの高い腫瘍選択性と優れた感染能が示され、治療群においてはコントロール群と比較し有意に生存期間が延長した。これら

の結果は、実臨床においてchest tubeからのRRV投与でRRVが胸腔内の腫瘍病変に選択的に感染し、5-FC投与により生存期間が延長できる可能性を示唆している。さらに、肺癌手術で主流となっている胸腔鏡手術において胸膜播種結節にRRVを直接投与することも可能である (Nakazawa et al., 2018; Vannucci and Gonzalez-Rivas, 2016)。

本研究においては、共同研究先から提供されたウイルス量が限られていたため、細胞集団に一定割合のRRVを感染させた実験モデルを多く用いた。RRVの感染形態や、癌細胞内でのRRVの均一性が実際の臨床とは異なっている点が問題であった。そのため胸膜播種モデルを用いた実験でRRVの胸腔内直接投与を行い、実臨床に則した結果を得られたと考えている。しかし、本来ならばEx-3LL胸膜播種モデルを用い前臨床試験としての安全性評価を行う予定だったが、ウイルス量の制限があり行えなかった。さらに、RRVの生体内copy数を用いて安全性の評価を行ったが、マウス実験であり症状を含めた副作用のデータが得られていない。また、全ての実験モデルにおいて細胞株移植モデルを用いており、実際の癌細胞の性質を反映していない可能性がある。今後、前臨床研究モデルとして癌細胞の性質を反映した患者腫瘍移植モデルを用いてToca511/5-FC療法の効果を検証する必要がある。これに関連して、Toca511/5-FC療法が有効な肺癌遺伝子異常の検討も治療の個別化の側面から必要になる。さらに、免疫賦活化を検討するためにre-challenge testを行ったが、詳細な検討として腫瘍内や脾臓内のT細胞の評価が今後必要となると考えられる。

多くの進行肺癌患者は痛み、咳嗽、食欲低下、抑うつなどの癌の進行に関連した様々な症状を訴え、症状緩和や生存期間の延長を目的に化学療法が適応となることがある (Sacher et al., 2015; Simone and Jones, 2013)。しかし、年齢、腎機能障害、performance status不良、患者選択などで実際に化学療法の対象となるのは約半数ほどであり、生存期間が短縮する一因となっている (Brule et al., 2016)。しかしながら、上述してきたToca511/5-FC療法は、その安全性に基づく有害事象の低さが期待され、進行肺癌患者に対する新たな治療選択肢の一つとなる可能性がある。現在、進行肺癌に対しては手術、化学療法、放射線療法、免疫療法などを組み合わせる集学的治療を行うことが一般的になっている (Antonia et al., 2018; Curran et al., 2011)。このように、進行肺癌患者の予後を改善するために様々な治療法が開発されている中で、本研究結果ではToca511/5-FC療法と免疫療法の併用療法が有用な治療選択肢になることが示唆された。今後、肺癌に対する新規治療法としての確立を目指し更なる検証を進めていきたい。

結論

1) 本研究から得られた新知見

- ① RRVは*in vitro*、*in vivo*いずれにおいても肺癌細胞において安定した感染能・増殖能を示す。
- ② 本治療用RRVであるToca511を肺癌細胞に感染させることで、5-FCの投与により効果的な抗腫瘍効果を示す。
- ③前臨床モデルとして作成した肺癌胸膜播種モデルにおいても、Toca511は極めて高い腫瘍選択性を示し、安全性が示唆された。

2) 新知見の意義

本研究では、Toca511、5-FCを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療の肺癌に対する有効性と安全性が示唆され、臨床応用への可能性が示された。また、前臨床モデルとして作成した肺癌胸膜播種モデルでは、RRVの胸腔内投与でRRVが腫瘍選択的に感染することを示し、臨床試験に向け有用な知見となった。

3) 今後の展開と課題

RRVを用いた肺癌に対する臨床試験に向け、患者腫瘍移植モデルにおけるToca511/5-FC療法の治療効果の検討、遺伝子組み替えウイルス使用の申請、研究チームの組織化、資金調達が必要となる。また、基礎研究においてはToca511、5-FCを用いたプロドラッグ活性化遺伝子治療による免疫反応の解析を行い、ICIとの併用療法などの新たな治療方法の検証が必要である。さらに、Toca511/5-FC療法が有効な肺癌遺伝子異常の検討も臨床応用に向けて必須である。RRVは分裂期の細胞に感染する特性から多くの癌腫に応用できる可能性がある。基礎研究においては脳腫瘍、膵癌で有効性が示唆されているが、臨床では投与経路が問題になる可能性が考えられる。腫瘍への直接投与が簡便な皮膚悪性腫瘍への応用なども考慮していく必要がある。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院外科学分野消化器外科学教室II、平野 聡 教授に深く感謝致します。また研究全般にわたり直接御指導いただきました消化器外科学教室II客員研究員、平岡 圭 先生に深く感謝致します。また研究期間中に実験方法や科学的考察方法に関し御指導いただきました、北海道大学大学院消化器外科学教室II、中村 透 講師、佐々木 勝則 学術研究員に深く御礼申し上げます。また、国際的共同研究先である Department of Neurological Surgery, University of California, San Francisco, California, USA, 笠原典之 教授、Tocagen Inc. Douglas J. Jolly氏に心から感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり御協力いただいた、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室IIの皆様心より御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Antonia, S.J., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Kurata, T., Chiappori, A., Lee, K.H., de Wit, M., et al. (2018). Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med* *379*, 2342-2350.

Bierman, H.R., Crile, D.M., Dod, K.S., Kelly, K.H., Petrakis, N.L., White, L.P., and Shimkin, M.B. (1953). Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer* *6*, 591-605.

Brenner, M.K., Gottschalk, S., Leen, A.M., and Vera, J.F. (2013). Is cancer gene therapy an empty suit? *The Lancet Oncology* *14*, e447-e456.

Brule, S.Y., Al-Baimani, K., Jonker, H., Zhang, T., Nicholas, G., Goss, G., Laurie, S.A., and Wheatley-Price, P. (2016). Palliative systemic therapy for advanced non-small cell lung cancer: Investigating disparities between patients who are treated versus those who are not. *Lung Cancer* *97*, 15-21.

Cloughesy, T.F., Landolfi, J., Hogan, D.J., Bloomfield, S., Carter, B., Chen, C.C., Elder, J.B., Kalkanis, S.N., Kesari, S., Lai, A., et al. (2016). Phase 1 trial of vocimagene amiretrorepvec and 5-fluorocytosine for recurrent high-grade glioma. *Sci Transl Med* *8*, 341ra375.

Cloughesy, T.F., Petrecca, K., Walbert, T., Butowski, N., Salacz, M., Perry, J., Damek, D., Bota, D., Bettegowda, C., Zhu, J.J., et al. (2020). Effect of Vocimagene Amiretrorepvec in Combination With Flucytosine vs Standard of Care on Survival Following Tumor Resection in Patients With Recurrent High-Grade Glioma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* *6*, 1939-1946.

Cornetta, K., Moen, R.C., Culver, K., Morgan, R.A., McLachlin, J.R., Sturm, S., Selegue, J., London, W., Blaese, R.M., and Anderson, W.F. (1990). Amphotropic murine leukemia retrovirus is not an acute pathogen for primates. *Hum Gene Ther* *1*, 15-30.

Curran, W.J., Jr., Paulus, R., Langer, C.J., Komaki, R., Lee, J.S., Hauser, S., Movsas, B., Wasserman, T., Rosenthal, S.A., Gore, E., et al. (2011). Sequential vs. concurrent chemoradiation for stage III non-small cell lung cancer: randomized phase III trial RTOG 9410. *J Natl Cancer Inst* *103*, 1452-1460.

Ettinger, D.S., Aisner, D.L., Wood, D.E., Akerley, W., Bauman, J., Chang, J.Y., Chirieac, L.R., D'Amico, T.A., Dilling, T.J., Dobelbower, M., et al. (2018). NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer,

Version 5.2018. J Natl Compr Canc Netw 16, 807-821.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.

Fujiwara, T., Tanaka, N., Kanazawa, S., Ohtani, S., Saijo, Y., Nukiwa, T., Yoshimura, K., Sato, T., Eto, Y., Chada, S., et al. (2006). Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24, 1689-1699.

Ginn, S.L., Amaya, A.K., Alexander, I.E., Edelstein, M., and Abedi, M.R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* 20, e3015.

Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W.E., Nicholson, A.G., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., et al. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 11, 39-51.

Hamada, C., Tsuboi, M., Ohta, M., Fujimura, S., Kodama, K., Imaizumi, M., and Wada, H. (2009). Effect of postoperative adjuvant chemotherapy with tegafur-uracil on survival in patients with stage IA non-small cell lung cancer: an exploratory analysis from a meta-analysis of six randomized controlled trials. *J Thorac Oncol* 4, 1511-1516.

Harris, R.S., Hultquist, J.F., and Evans, D.T. (2012). The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 287, 40875-40883.

Hiraoka, K., Inagaki, A., Kato, Y., Huang, T.T., Mitchell, L.A., Kamijima, S., Takahashi, M., Matsumoto, H., Hacke, K., Kruse, C.A., et al. (2017). Retroviral replicating vector-mediated gene therapy achieves long-term control of tumor recurrence and leads to durable anticancer immunity. *Neuro Oncol* 19, 918-929.

Hiraoka, K., Kimura, T., Logg, C.R., Tai, C.K., Haga, K., Lawson, G.W., and Kasahara, N. (2007). Therapeutic efficacy of replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in a multifocal colorectal cancer metastasis model. *Cancer Res* 67, 5345-5353.

Hogan, D.J., Zhu, J.J., Diago, O.R., Gammon, D., Haghighi, A., Lu, G., Das, A., Gruber, H.E., Jolly, D.J., and Ostertag, D. (2018). Molecular Analyses Support the Safety and Activity of Retroviral Replicating

Vector Toca 511 in Patients. *Clin Cancer Res* 24, 4680-4693.

Hu, J.C., Coffin, R.S., Davis, C.J., Graham, N.J., Groves, N., Guest, P.J., Harrington, K.J., James, N.D., Love, C.A., McNeish, I., et al. (2006). A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 12, 6737-6747.

Inoko, K., Hiraoka, K., Inagaki, A., Takahashi, M., Kushibiki, T., Hontani, K., Takano, H., Sato, S., Takeuchi, S., Nakamura, T., et al. (2018). Therapeutic activity of retroviral replicating vector-mediated prodrug activator gene therapy for pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* 25, 184-195.

Kato, H., Ichinose, Y., Ohta, M., Hata, E., Tsubota, N., Tada, H., Watanabe, Y., Wada, H., Tsuboi, M., Hamajima, N., and Ohta, M. (2004). A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 350, 1713-1721.

Kelly, E., and Russell, S.J. (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther* 15, 651-659.

Lara-Guerra, H., and Roth, J.A. (2016). Gene Therapy for Lung Cancer. *Critical Reviews™ in Oncogenesis* 21, 115-124.

Lee, S.M., Khan, I., Upadhyay, S., Lewanski, C., Falk, S., Skailes, G., Marshall, E., Woll, P.J., Hatton, M., Lal, R., et al. (2012). First-line erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer unsuitable for chemotherapy (TOPICAL): a double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 13, 1161-1170.

Li, S.X., Barrett, B.S., Heilman, K.J., Messer, R.J., Liberatore, R.A., Bieniasz, P.D., Kassiotis, G., Hasenkrug, K.J., and Santiago, M.L. (2014). Tetherin promotes the innate and adaptive cell-mediated immune response against retrovirus infection in vivo. *J Immunol* 193, 306-316.

Lipson, E.J., Forde, P.M., Hammers, H.J., Emens, L.A., Taube, J.M., and Topalian, S.L. (2015). Antagonists of PD-1 and PD-L1 in Cancer Treatment. *Semin Oncol* 42, 587-600.

Littwitz-Salomon, E., Schimmer, S., and Dittmer, U. (2017). Natural killer T cells contribute to the control of acute retroviral infection. *Retrovirology* 14, 5.

Mitchell, L.A., Lopez Espinoza, F., Mendoza, D., Kato, Y., Inagaki, A., Hiraoka, K., Kasahara, N., Gruber, H.E., Jolly, D.J., and Robbins, J.M. (2017). Toca 511 gene transfer and treatment with the prodrug, 5-fluorocytosine, promotes durable antitumor immunity in a mouse glioma model. *Neuro Oncol* *19*, 930-939.

Miyake, Y., Nishimura, J., Kato, T., Ikeda, M., Tsujie, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Sekimoto, M., et al. (2018). Phase III trial comparing UFT + PSK to UFT + LV in stage IIB, III colorectal cancer (MCSGO-CCTG). *Surg Today* *48*, 66-72.

Nakazawa, S., Shimizu, K., Mogi, A., and Kuwano, H. (2018). VATS segmentectomy: past, present, and future. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* *66*, 81-90.

Okami, J., Shintani, Y., Okumura, M., Ito, H., Ohtsuka, T., Toyooka, S., Mori, T., Watanabe, S.I., Date, H., Yokoi, K., et al. (2019). Demographics, Safety and Quality, and Prognostic Information in Both the Seventh and Eighth Editions of the TNM Classification in 18,973 Surgical Cases of the Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry Database in 2010. *J Thorac Oncol* *14*, 212-222.

Okeoma, C.M., Petersen, J., and Ross, S.R. (2009). Expression of murine APOBEC3 alleles in different mouse strains and their effect on mouse mammary tumor virus infection. *J Virol* *83*, 3029-3038.

Postow, M.A., Longo, D.L., Sidlow, R., and Hellmann, M.D. (2018). Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine* *378*, 158-168.

Sacher, A.G., Le, L.W., Lau, A., Earle, C.C., and Leighl, N.B. (2015). Real-world chemotherapy treatment patterns in metastatic non-small cell lung cancer: Are patients undertreated? *Cancer* *121*, 2562-2569.

Saglam, S., Aykan, N.F., Sakar, B., Gulluoglu, M., Balik, E., and Karanlik, H. (2011). A pilot study evaluating the safety and toxicity of epirubicin, cisplatin, and UFT (ECU regimen) in advanced gastric carcinoma. *J Gastrointest Oncol* *2*, 19-26.

Simone, C.B., 2nd, and Jones, J.A. (2013). Palliative care for patients with locally advanced and metastatic non-small cell lung cancer. *Ann Palliat Med* *2*, 178-188. 10.3978/j.issn.2224-5820.2013.08.02.

Sinkovics, J., and Horvath, J. (1993). New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology* *36*, 193-214.

Socinski, M.A., Jotte, R.M., Cappuzzo, F., Orlandi, F., Stroyakovskiy, D., Nogami, N., Rodriguez-Abreu, D.,

Moro-Sibilot, D., Thomas, C.A., Barlesi, F., et al. (2018). Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med* *378*, 2288-2301.

Spiro, S.G., Rudd, R.M., Souhami, R.L., Brown, J., Fairlamb, D.J., Gower, N.H., Maslove, L., Milroy, R., Napp, V., Parmar, M.K., et al. (2004). Chemotherapy versus supportive care in advanced non-small cell lung cancer: improved survival without detriment to quality of life. *Thorax* *59*, 828-836.

Stavrou, S., Aguilera, A.N., Blouch, K., and Ross, S.R. (2018). DDX41 Recognizes RNA/DNA Retroviral Reverse Transcripts and Is Critical for In Vivo Control of Murine Leukemia Virus Infection. *mBio* *9*.

Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., et al. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* *4*, 263-275.

Tai, C.K., Wang, W.J., Chen, T.C., and Kasahara, N. (2005). Single-shot, multicycle suicide gene therapy by replication-competent retrovirus vectors achieves long-term survival benefit in experimental glioma. *Mol Ther* *12*, 842-851.

Takeuchi, H., and Matano, T. (2008). Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol* *52*, 318-325.

Todo, T., Martuza, R.L., Rabkin, S.D., and Johnson, P.A. (2001). Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6396-6401.

Twitty, C.G., Diago, O.R., Hogan, D.J., Burrascano, C., Ibanez, C.E., Jolly, D.J., and Ostertag, D. (2016). Retroviral Replicating Vectors Deliver Cytosine Deaminase Leading to Targeted 5-Fluorouracil-Mediated Cytotoxicity in Multiple Human Cancer Types. *Hum Gene Ther Methods* *27*, 17-31.

Vannucci, F., and Gonzalez-Rivas, D. (2016). Is VATS lobectomy standard of care for operable non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* *100*, 114-119.

Yang, J.C.-H., Wu, Y.-L., Schuler, M., Sebastian, M., Popat, S., Yamamoto, N., Zhou, C., Hu, C.-P., O'Byrne, K., Feng, J., et al. (2015). Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *The Lancet Oncology* *16*, 141-151.

