

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Tumor-specific delivery of biologics by a novel T-cell line HOZOT

(新規 T-細胞株 HOZOT による生物製剤の腫瘍特異的デリバリー)

大西哲平、田澤 大、橋本悠里、竹内誠人、大谷健司、中村修治、櫻井文教、水口裕之、岸本浩行、榎田祐三、白川靖博、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義

Scientific Reports 6 : 38060, 2016

平成 24 年 9 月 第 71 回日本癌学会学術総会に発表

平成 25 年 7 月 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会に発表

主 論 文

Tumor-specific delivery of biologics by a novel T-cell line HOZOT

(新規 T 細胞株 HOZOT による生物製剤の腫瘍特異的デリバリー)

【緒言】

腫瘍特異的に増殖して腫瘍細胞を融解するアデノウイルス製剤は次世代のがん治療薬として期待されている。しかし、アデノウイルス製剤の全身投与においては、アデノウイルス自身に腫瘍特異的なホーミング機能がないこととアデノウイルス抗体による中和による治療効果の減弱を克服することが課題であり、アデノウイルス製剤の腫瘍組織への効率的なデリバリー技術の開発が必要である。その一つとしてキャリアー（運び屋）としての細胞に搭載してデリバリーする方法がある。「HOZOT（ホゾティー）」はヒト臍帯血より誘導される新規ヒト T 細胞株であり、腫瘍細胞特異的に、細胞内へ侵入して（cell-in-cell 活性）、腫瘍細胞を死滅させるキラー活性があり、新たな癌免疫療法やドラッグデリバリーのツールとして期待されている。本研究ではテロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルス製剤を HOZOT 細胞に感染させ、腫瘍細胞へデリバリーするモデルを作成し、*in vitro*ならびに *in vivo*における抗腫瘍効果について検討した。

【材料と方法】

細胞株

ヒト大腸癌細胞株 SW620、HCT116、HCT116-RFP、ヒト胃癌細胞株 MKN45、正常ヒト皮膚線維芽細胞株 NHDF を使用した。

HOZOT 細胞

HOZOT はヒト臍帯血の単核球全画成分をマウスのストローマ細胞と共培養することで誘導される。凍結保存された HOZOT 細胞を解凍し、マウスストローマ細胞株 ST2 と IL-2 存在下で共培養し、拡大培養して実験に用いた。ST2 細胞との共培養の後に HOZOT 細胞は Ficoll-Paque PLUS を用いて分離した。

フローサイトメトリー

FACS array (BD) を用いて各種腫瘍細胞、HOZOT 細胞におけるコクサッキー/アデノウイルスレセプター (CAR)、インテグリン $\alpha v \beta 3 / \alpha v \beta 5$ 、CD46 の発現を解析した。

遺伝子改変アデノウイルス

- 1) OBP-401 : 5 型アデノウイルスの E1 領域にヒトテロメラーゼ逆転写酵 *hTERT* 遺伝子プロモーター、E3 領域に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現カセットを組み込み、CAR への結合を介して感染し、テロメラーゼ依存的にウイルスが増殖して GFP を発現する制限増殖型アデノウイルス。
- 2) OBP-401/F35: 上述した OBP-401 のファイバーを 35 型アデノウイルスのファイバーに改変し、

CD46 への結合を介して感染し、テロメラーゼ依存的にウイルスが増殖して GFP を発現する制限増殖型アデノウイルス。

3) Ad/RGD-GFP : E1 領域が欠損した 5 型アデノウイルスの E3 領域に GFP 発現カセット、ファイバーに RGD ペプチドを組み込み、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ への結合を介して感染し、GFP を発現する非増殖型アデノウイルス。

4) Ad/F35-GFP : E1 領域が欠損した 5 型アデノウイルスの E3 領域に GFP 発現カセット、ファイバーを 35 型アデノウイルスのファイバーに改変し、CD46 への結合を介して感染し、GFP を発現する非増殖型アデノウイルス。

OBP-401/F35 搭載 HOZOT 細胞 (HOZOT-401/F35 細胞) の作製

Ficoll 法で単離した HOZOT 細胞に 5 MOI の濃度で OBP-401/F35 を感染させ、24 時間後に洗浄と遠心分離を 2 回施行し、*in vitro* で腫瘍細胞、およびマウスの腹腔内へ投与した。

タイムラプスイメージング

アデノウイルスを感染させた HOZOT 細胞を、2 次元培養で接着させた MKN45、SW620 細胞および 3 次元培養で浮遊した SW620 細胞のスフェアに対して投与して、HOZOT 細胞の動態と腫瘍細胞における GFP の発現を共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i ; オリンパス) を用いて経時的に観察した。

細胞生存率アッセイ

各種腫瘍細胞を培養した 96 ウェルプレートに 1) PBS、2) HOZOT 細胞、3) HOZOT-401/F35 細胞を投与して 48 時間後に細胞生存率を XTT アッセイで評価した。

アデノウイルス中和抗体存在下における実験

各種腫瘍細胞を培養した 96 ウェルプレートに 5 型アデノウイルス中和抗体 (デンカ生研) を各ウェルに 0.5 単位ずつ加え、OBP-401/F35 ウイルスや HOZOT-401/F35 細胞を投与して 48 時間後に細胞生存率を XTT アッセイにて評価した。

スフェアの作成と HOZOT-401/F35 の投与

超低接着性 6 ウェルプレートにて SW620 細胞を培養してスフェアを形成させ、これに 1) PBS、2) HOZOT 細胞、3) HOZOT-401/F35 細胞を投与して 14 日後に、蛍光顕微鏡 (IX71 ; オリンパス) を用いて写真を撮影してスフェアの大きさを比較した。

腹膜播種マウスモデル

6 週齢のヌードマウスの腹腔内に 5×10^6 個の HCT116-RFP 細胞を移植し、7 日後に 3 群 (各群 10 匹ずつ) に分けて 1) PBS、2) HOZOT 細胞 (2×10^7 個)、3) HOZOT-401/F35 細胞 (2×10^7 個) を腹腔内投与した。腹腔内投与から 14 日後に開腹して蛍光実体顕微鏡 (SZX16 ; オリンパス) で写真を撮影し、RFP の蛍光強度を ImageJ ソフトウェアを用いて比較した。各群のマウスの生存日数も検討した。

免疫組織染色

マウス腹膜播種モデルに対して HOZOT-401/F35 細胞を腹腔内投与した後に腹膜播種巣を採取し、アデノウイルスのヘキソンを検出する 1 次抗体を用いて免疫組織染色を行った。

統計解析

2 群間以上の比較には 1 元配置分散分析と Bonferroni の方法を用いた。マウスの Kaplan-Meier 生存曲線の比較には log-rank テストを用いた。P 値 < 0.05 をもって統計学的に有意差ありとした。

[結果]

HOZOT 細胞の表面マーカーと各種アデノウイルス製剤の HOZOT 細胞への感染効率

フローサイトメトリーにて HOZOT 細胞の表面マーカーを解析した。HOZOT 細胞は CAR の発現はなく、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ の発現もわずかであったが、CD46 の発現は高かった (Fig. 1a)。HOZOT 細胞に OBP-401 (500 MOI)、Ad/RGD-GFP (500 MOI) を感染させても GFP の発現はほとんど認めなかった。一方、HOZOT 細胞に Ad/F35-GFP を感染 (10 MOI) させると GFP の発現を認めた (Fig. 1b)。これらの結果より、35 型アデノウイルスファイバーに改変した遺伝子改変アデノウイルスは CD46 への結合を介して HOZOT 細胞に取り込まれる事が示唆された。

ウイルスが感染した状態でも HOZOT 細胞は腫瘍細胞へ侵入する

次に、ウイルスを搭載した HOZOT 細胞の腫瘍細胞への cell-in-cell 活性について検討した。Ad/F35-GFP を感染させ、GFP を発現した HOZOT 細胞を MKN45 細胞と SW620 細胞に投与すると、緑色蛍光を発した HOZOT 細胞が腫瘍細胞に侵入する cell-in-cell 現象を認めた (Fig. 1c, d)。これらの結果から、ウイルスを搭載した HOZOT 細胞は、HOZOT 細胞と同様に cell-in-cell 活性を有する事が示唆された。

テロメラーゼ依存的腫瘍融解アデノウイルス製剤 (OBP-401/F35) を搭載した HOZOT 細胞による抗腫瘍効果

次に、腫瘍融解ウイルスを搭載した HOZOT-401/F35 細胞の抗腫瘍効果について検討した。OBP-401/F35 を HOZOT に感染させると GFP の発現を認めた事から、腫瘍融解ウイルスを搭載した HOZOT-401/F35 細胞を作成できた (Fig. 2a, b)。HOZOT-401/F35 細胞は HCT116-RFP 細胞へ侵入し、GFP の発現を誘導した (Fig. 2c, d)。OBP-401/F35 ウイルスに感受性がある SW620、MKN45、HCT116 に対して HOZOT-401/F35 細胞を投与すると、HOZOT 細胞単独投与よりも有意に強い抗腫瘍効果を示したが、正常細胞株である NHDF 細胞には殺細胞効果は示さなかった (Fig. 3, Suppl. Fig. 1)。HOZOT 細胞における腫瘍融解ウイルスの増殖を確認したところ、低い *hTERT* 発現に一致して OBP-401/F35 感染後のウイルス DNA の E1A コピー数は緩やかな増加を認めた (Suppl. Fig. 2)。これらの結果から、腫瘍融解ウイルスを搭載した HOZOT-401/F35

細胞は、ウイルスのデリバリーを介して腫瘍特異的な抗腫瘍効果を発揮する事が示唆された。

中和抗体存在下における HOZOT-401/F35 による抗腫瘍効果

次に、ウイルス中和抗体による HOZOT-401/F35 細胞の抗腫瘍効果への影響を検討した。ウイルス中和抗体の存在下では OBP-401/F35 ウイルスによる抗腫瘍効果は阻害されたが、HOZOT-401/F35 細胞による抗腫瘍効果は阻害されなかった (Fig. 4)。これらの結果から、腫瘍融解ウイルスを搭載した HOZOT-401/F35 細胞はウイルス中和抗体による阻害に対して抵抗性である事が示唆された。

腫瘍細胞のスフェアに対する HOZOT-401/F35 細胞の抗腫瘍効果

次に、腫瘍細胞の3次元培養によって得られたスフェアに対する HOZOT-401/F35 細胞の抗腫瘍効果を検討した。タイムラプスイメージングによって、HOZOT-401/F35 細胞はスフェアに向かって遊走して攻撃した後に、スフェアに GFP 発現が拡がりながら細胞死が誘導される様子を観察した (Fig. 5a, Suppl. Video 1, 2)。HOZOT-401/F35 細胞の投与は、mock および HOZOT 細胞投与群と比較して有意にスフェアの増大を抑制した (Fig. 5b, c)。これらの結果から、腫瘍融解ウイルスを搭載した HOZOT-401/F35 細胞は腫瘍塊を模倣する腫瘍細胞のスフェアに対して十分に抗腫瘍効果を発揮する事が示唆された。

腹膜播種マウスモデルに対する HOZOT-401/F35 細胞の治療効果

最後に、腹膜播種転移マウスモデルを用いて HOZOT-401/F35 細胞の抗腫瘍効果を検討した。HOZOT-401/F35 細胞の投与は、mock 群や HOZOT 細胞投与群と比較して有意に腫瘍の増殖を抑制した (Fig. 6a, b)。HOZOT-401/F35 細胞投与群の腹膜播種巣では広範囲な壊死が認められ、免疫組織病理検査でアデノウイルスのヘキソン染色によるウイルスの存在が観察された。さらに、HOZOT-401/F35 細胞投与群の生存期間中央値 (46.5 日) は、mock 群 (25.5 日) や HOZOT 細胞投与群 (38 日) に比べて有意に延長していた。これらの結果から、腫瘍融解ウイルスを搭載した HOZOT-401/F35 細胞は、腹膜播種を抑制するために有効なウイルスのデリバリー技術である事が示唆された。

[考察]

HOZOT 細胞は、cell-in-cell 活性を介して腫瘍細胞特異的なキラー活性を發揮するために、新たな癌免疫療法として、また抗腫瘍活性を持つ薬剤のデリバリーツールとして期待されている。本研究では、キャリアー細胞として HOZOT 細胞に腫瘍融解アデノウイルス製剤を感染させて腫瘍細胞へウイルスをデリバリーすることを確認した。

これまでキャリアー細胞として用いられた正常間葉系あるいは神経系幹細胞は、腫瘍細胞から放出される化学物質によって腫瘍特異的にウイルスを伝播する事が知られているが、cell-in-cell 活性がないために腫瘍細胞近傍の間質へのデリバリーに限られている。本研究では、cell-in-cell 活性を有する HOZOT 細胞が腫瘍細胞へ侵入する現象を確認し、腫瘍細胞内へウイルスを伝播して細胞死を誘導することを示した。

HOZOT 細胞によるウイルスの腫瘍細胞への伝播はウイルス中和抗体によって阻害されず、中和抗体の影響を回避できる理想的なキャリアー細胞であることが示唆された。HOZOT 細胞は自ら死滅しながら腫瘍細胞を殺傷する為、その抗腫瘍効果は一定の限界があるものと考えられる。しかし、腫瘍細胞の塊であるスフェアに対してウイルスが伝播したのちは腫瘍全体にウイルスが拡がり細胞死を誘導した。

HOZOT 細胞は allogenic な細胞であり、患者へ投与しても拒絶されるものと考えられるが、患者本人の血液から HOZOT に類似した性質をもった細胞を誘導することが可能になれば、臨床応用につながる事が期待できる。

腹膜播種は悪性腫瘍疾患において予後不良因子であり、抗癌剤の腹腔内投与も試みられているが、確立された治療法はない。アデノウイルス製剤の腹腔内投与は、腹腔内のマクロファージによる貪食や抗体による中和により効果が減退することが問題点であるが、中和抗体による阻害を受けない HOZOT をキャリアー細胞としたウイルスによる治療は、腹膜播種に対しても高い治療効果が期待できる。

【結論】

HOZOT 細胞をキャリアー細胞として用いた腫瘍融解アデノウイルス製剤によるウイルス治療は、腹膜播種転移の腫瘍組織への効率的なデリバリーと高い抗腫瘍効果が期待でき、癌に対する新たな治療戦略となり得る。