

論文の内容の要旨

論文題目 免疫刺激遺伝子発現型第三世代単純ヘルペスウイルス I 型の
腎細胞癌モデルにおける治療効果の検討と
免疫療法との併用に関する検討

指導教員 本間之夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士過程

外科学専攻

釣巻 ゆずり

序論

単純ヘルペスウイルス I 型(HSV-1)を用いたウイルス療法は、抗癌作用の強さと安全面から、ウイルス療法の中でも有望性が高く注目されている。抗癌作用は HSV-1 の癌細胞に対する強い殺細胞作用に加えて、癌細胞特異的な全身性免疫を惹起させて抗腫瘍効果をもたらすことから生じる。一遺伝子変異を有し、癌細胞で特異的に複製し殺細胞効果を表す、第一世代 HSV-1 による癌治療が 1991 年にはじめて提唱され、その後も複製数のグループにより検討が進められている。しかし、それらのウイルスにおける殺細胞効果は、野生型の HSV-1 に比べて大幅に減弱しており、癌治療の観点からは改良の余地がある。本研究で使用した T-01 ウイルスは、より強力な抗腫瘍効果を達成するべく、第二世代 HSV-1、G207 ウイルスの α 47 遺伝子をさらに欠失させ、癌細胞における複製能が増強し、宿主細胞における MHC-I の発現の抑制を回避して宿主の癌免疫を活性化

させる、第三世代 HSV-1 ベクターである。これまでに殺細胞効果を有するウイルス療法が腎癌に有効であるかを検討した報告はなく、本研究ではまず、T-01 ウイルスが腎癌で抗癌効果を示すかどうか検討する。また、腎細胞癌は免疫療法に反応する例があることから、現在最も一般的に行われている IFN との併用療法を試みる。併用により、より強力な抗癌効果が得られるかどうかを検討する。

次に、宿主の抗腫瘍免疫も有効に利用して抗腫瘍効果を高めるという戦略に則って作製された T-01 ウイルスにおいて、さらに抗腫瘍免疫を活性化させるべく、強力な NK および T 細胞活性作用を有する、インターロイキン 12 (IL-12) を発現する T-mfIL12 ウイルスを作製した。IL-12 単独静脈内投与は重篤な副作用のため臨床使用不可能であるが、IL-12 発現型ウイルスを用いることにより、安全性を担保した上で、抗腫瘍効果が高まることが期待される。本研究では、コントロールウイルス T-01 に対して、IL-12 発現型 T-mfIL12 ウイルスがより強力な抗癌作用をもたらすかどうかを検討する。

さらに、T-01 ウイルスにおいて免疫療法として共刺激を利用する検討を試みる。T 細胞が活性化されるには、T 細胞レセプターに MHC 分子と抗原が結合しただけでは不十分で、共刺激を必要とする。T 細胞表面の CD28 に抗原提示細胞上の CD80 (B7-1) ないし CD86 (B7-2) 分子が結合すると T 細胞は活性化されるが、共刺激なしに抗原刺激のみがおこると T 細胞は抑制される。一方で活性化 T 細胞表面に表出する CD125 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4) は、CD28 と同様に B7-1 および B7-2 分子をリガンドとしているが、T 細胞を抑制する。B7-1 分子や抗 CTLA4 抗体を利用した抗癌治療はそれぞれ研究されているが、B7-1 分子と抗 CTLA4 抗体とを同時に治療に利用した報告はなく、同時に存在させることでより強力な抗癌効果が得られると期待される。そこで、B7-1 分子発現型ウイルス、T-B7-1 を作製し、その抗腫瘍効果について検討し、

さらに抗 CTLA4 抗体との併用により抗癌効果が増強するか検討する。

結果

まず、*in vitro* における T-01 ウイルスの腎癌に対する殺細胞効果を、ヒト腎癌細胞株 5 種類(A498、ACHN、Caki-1、OS-RC-2、RCC10RGB)とマウス腎癌細胞株 RenCa で検討した。いずれの細胞においても T-01 の殺細胞効果を認め、MOI=0.1 にて感染 4 日目には殆どの細胞が死滅した。

ヌードマウスに作製したヒト腎癌 OS-RC-2 皮下腫瘍において、T-01 の腫瘍内投与は用量依存的に腫瘍の増大を抑制し、最少投与量の 4×10^4 pfu から有意な抑制効果を認めた (4×10^4 , 2×10^5 , 1×10^6 pfu 投与)。用量依存的な抗腫瘍効果は、RenCa 細胞を用いた検討においても認められた。これまでに他施設で臨床試験に応用された 5 種類の HSV-1 を使用した、他の癌種における報告と比較しても遜色のない結果が得られ、T-01 ウイルスが腎癌において治療手段としての可能性を持つことが示された。両側皮下腫瘍モデルでは、直接ウイルスを投与していない対側の腫瘍においても腫瘍の縮小を認め、遠隔の癌病巣にも効果が及ぶ可能性が示唆された。また、難治性の腎癌モデルとして作製した RenCa 肺転移モデルにおいて、T-01 ウイルスを静脈内投与した実験では、癌腫に直接ウイルスを投与しなくても、全身投与により効果が出ることを確認した。

Renca 肺転移モデルで、T-01 ウイルスを静脈内投与、mIFN を腹腔内投与するというプロトコールにおいて、IFN の単独投与は転移数に有意な影響を与えなかった。一方、T-01 ウイルス投与群において肺転移数が有意に減少したが、T-01 に IFN を併用すると、T-01 単独投与群と比較して肺の転移数はむしろ増加した。結果より、IFN の併用による増殖型 HSV-1 ウイルスの抗癌効果の増強は期待できないと考えられた。

次に、BAC および Cre/ loxP と FLP/ FRT の二つの遺伝子組み換え酵素を活用したシステムを利用して、pORF-mIL-12 (InvivoGen, CA, USA)から 1.6kb の Nhe I -Nco I フラグメントを組み込んで、IL-12 発現型ウイルス T-mfIL12 を作製した。RenCa 皮下腫瘍モデルにて、T-01 または T-mfIL12 ウイルス (2×10^5 pfu)を腫瘍内投与した検討では、すでに有意な抗癌効果を持つことが確認された T-01 と比較しても、T-mfIL12 ウイルスで抗癌効果が有意に増強した。また、Neuro2a の両側皮下腫瘍モデルにおいて、片側の腫瘍のみに T-01 または T-mfIL12 (5×10^5 pfu)ウイルスを腫瘍内投与した検討でも、直接ウイルスを投与していない対側の腫瘍についても、T-01 ウイルス投与における場合と比較して有意な腫瘍の増大抑制効果を認めた。Renca 肺転移モデルにおいても、T-01 と比較して T-mfIL12 ウイルス静脈内投与でさらに抗癌効果が有意に増強した。生体内でのサイトカインを検討した実験では、T-mfIL12 ウイルス静脈内投与群で、マウス脾臓における RenCa 細胞抗原刺激に対する IFN γ 分泌能の有意な亢進を認めた。また、T-mfIL12 ウイルス投与後、IL-12 を血中で一過性に高く認め、同様に肺組織中でも day4 まで高く認めた。その後 day6 には肺組織中の IFN γ が T-mfIL12 ウイルス投与群で高値となった。肺組織中では IL-12 の上昇に引き続いて IFN γ が分泌されたと考えられ、T-mfIL12 ウイルスによる抗癌効果の増強にはこれらのサイトカインも関与していると考えられた。

さらに、先に述べた BAC システムを利用して、B7.1-pIg プラスミドから 2.4kb の Hind III-Not I フラグメントを組み込んで、B7-1 発現型ウイルス、T-B7-1 を作製した。Neuro2a の皮下腫瘍モデルにおいて T-B7-1 ウイルスは T-01 ウイルス (1×10^4 pfu 腫瘍内投与) と比較して有意に腫瘍の増大を抑制した。一方、RenCa 肺転移モデルでは、T-B7-1 ウイルスと T-01 ウイルス (5×10^6 pfu 静脈内投与) との間でマウス生存期間に有意差を認めなかった。T-B7-1 ウイルスと抗 CTLA4 抗体(腹腔内投与)の併用投与における検討では、

Neuro2a 皮下腫瘍モデルにおいて、T-B7-1(1×10^4 pfu)と抗 CTLA4 抗体(25 μ g)の併用群で著しく腫瘍の増大が抑制され、13 匹中 9 匹の腫瘍が消失した。また、肺転移モデルにおいても、T-B7-1(5×10^6 pfu)と抗 CTLA4 抗体(100 μ g)の併用群で著しく生存期間が延長し、12 匹中 7 匹が 90 日をこえて生存した。なお、Neuro2a 皮下腫瘍モデルにおける T 細胞サブセット depletion 実験の結果、T-B7-1 ウイルスと抗 CTLA4 抗体の併用投与における抗腫瘍効果の発現には、CD8 陽性細胞および NK 細胞の存在が不可欠であった。

まとめ

これまで、増殖型の抗癌ウイルスが腎癌において検討されたことはなかったが、本研究において増殖型 HSV-1、T-01 ウイルスを用いたウイルス療法が腎癌に有効であることを見出した。また、T-01 によるウイルス療法では、直接のウイルス投与部位のみでなく、遠隔の癌病巣においても効果が期待できることを確認し、肺転移モデルにおける実験では、ウイルスの静脈内投与によっても効果が得られることを見出した。本実験で使用した α 47 遺伝子欠失型の第三世代増殖型 HSV-1、T-01 ウイルスは、免疫刺激因子などの遺伝子を組み込んで付加価値を与えるウイルスとして有効と考えられた。T-01 ウイルスに mIL-12 遺伝子を組み込んだ T-mfIL12 ウイルスで、抗腫瘍効果が増強することを証明した。特に強力な抗腫瘍効果から、IL-12 発現型 HSV-1 ウイルスは、今後実際に難治性の癌を克服するという実用面で非常に期待される。また、T-01 に mB7-1 遺伝子を組み込んだ T-B7-1 ウイルスでも、抗腫瘍効果が増強することを証明した。特に T-B7-1 ウイルスと抗 CTLA4 抗体の併用により、強い抗腫瘍効果が達成されることを証明した。HSV-1 を使用したウイルス療法において、免疫機構を有利に活用した抗腫瘍免疫の賦活化が効果的であることを証明した。