

審査の結果の要旨

氏名 釣巻 ゆずり

本研究は根治手術が適応とならない転移性、再発性の癌、特に放射線療法や抗癌剤治療に抵抗性である腎癌などの難治性癌に対する有効な抗癌治療の確立と、再発の抑制を目的として、遺伝子改変型の単純ヘルペスウイルス I 型(HSV-1)、T-01 を癌治療に応用することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. **In vitro cytotoxicity assay** の結果、T-01 ウイルスはヒト腎癌細胞株 A498、ACHN、Caki-1、OS-RC-2、RCC10RGB に対して殺細胞効果を示した。MOI=0.1 において day 4 における死細胞率は 48.6 から 96.4%であった。殺細胞効果はマウス腎癌細胞株 RenCa においても認められた。T-01 ウイルスが腎癌に対しても抗腫瘍効果を持つ可能性が示された。
2. ヒト腎癌細胞株 OS-RC-2 の皮下腫瘍モデルで、T-01 ウイルスを 4×10^4 , 2×10^5 , 1×10^6 pfu 腫瘍内投与し、腫瘍体積を測定して検討したところ、用量依存的な腫瘍の増大抑制効果を認めた。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。T-01 ウイルスが腎癌に対しても治療手段としての可能性を持つことが示された。さらに、両側皮下腫瘍モデルを用いた検討では、直接ウイルスを投与していない対側においても腫瘍の増大が抑制され、T-01 ウイルスの投与が、直接の投与部位だけでなく、遠隔の癌病巣に対しても抗腫瘍効果を発揮することが示された。次に、マウス腎癌 RenCa 細胞を使用して難治性の腎癌モデルとしての肺転移モデルを作製し、T-01 ウイルスを 5×10^5 pfu 静脈内投与し、肺における転移数を墨汁染色、測定した結果、肺転移数は有意に減少した。肺転移巣に対する治療においては、直接投与でなく経静脈的な全身投与によっても効果がえられることを示した。
3. RenCa 肺転移モデルにおいて、現在転移性の腎癌に対して標準的治療薬として使用されている IFN を腹腔内投与し、T-01 ウイルス 5×10^5 pfu の静脈内投与と併用する検討を行ったところ、IFN の単独投与はマウス肺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。よって T-01 ウイルスと IFN を併用すると、T-01 ウイルスの抗腫瘍効果が減弱されてしまう可能性が示された。

4. 次に T-01 ウイルスの抗腫瘍効果を増強させるため、T 細胞・NK 細胞活性化作用を有するサイトカイン、IL-12 の cDNA を pORF-mIL12 プラスミドから切り出し、シャトルベクター pVec9 の Avr II サイトに挿入し、Cre/ loxP 遺伝子組み換えにて T-01 ウイルスの ICP6 遺伝子領域に組み込んだ。新規に作成したウイルスを T-mfIL12 とし、HindIII 制限酵素消化による DNA 泳動パターンと Southern blot 法にて構造確認した。T-mfIL12 ウイルスは、virus replication assay にて親ウイルス T-01 と同等の複製力を持ち、in vitro cytotoxicity assay の結果、in vitro における殺細胞効果は T-01 と同等であった。RenCa 皮下腫瘍モデルで T-mfIL12 ウイルスを 2×10^5 pfu 腫瘍内投与し、T-01 ウイルス投与群と腫瘍体積を比較して検討したところ、すでに有意な抗腫瘍効果を示す T-01 ウイルスと比較しても T-mfIL12 ウイルスは有意な腫瘍増大抑制効果を示した。両側皮下腫瘍モデルにおける検討では、直接ウイルスを投与していない対側の腫瘍においても 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 T-mfIL12 ウイルス 5×10^5 pfu または 5×10^6 pfu を静脈内投与した検討では、T-01 ウイルス投与と比べても肺転移数が有意に減少し、かつマウス生存期間が有意に延長した。マウス脾細胞における ELISpot assay の結果、T-mfIL12 ウイルス静脈内投与群において RenCa 細胞抗原刺激に対する IFN γ 分泌の有意な亢進を認め、腫瘍抗原特異的な細胞性免疫の活性化が示唆された。一方、Th2 細胞を反映する IL-4 に関しては有意差を認めなかった。肺組織および血清サンプル中のサイトカインを ELISA 法で検討したところ、T-mfIL12 ウイルス静脈内投与群において血清中に IL-12 を一過性に高く認め、肺組織中でも day 4 まで高く認めた。Day 6 には T-mfIL12 ウイルス静脈内投与群で肺組織中における IFN γ を有意に高く認め、IL-12 の発現、上昇に引き続いて IFN γ が分泌されたと考えられた。T-mfIL12 ウイルス投与群で効果的な抗腫瘍免疫の活性化がおこっていることが示された。

5. T-01 ウイルスの抗腫瘍効果を増強させるため、T 細胞の免疫寛容を回避させる B7-1(CD80)分子の cDNA を B7.1-pIg プラスミドから切り出し、シャトルベクター pVec92 の Avr II サイトに挿入し、Cre/ loxP 遺伝子組み換えにて T-01 の ICP6 遺伝子領域に組み込んだ。新規に作成したウイルスを T-B7-1 とし、Hind III 制限酵素消化による DNA 泳動パターンと Southern blot 法にて構造確認した。

T-B7-1 ウイルスは virus replication assay にて親ウイルス T-01 と同等の複製力を持ち、in vitro cytotoxicity assay の結果、in vitro における殺細胞効果は T-01 と同等であった。Neuro2a 皮下腫瘍モデルで T-B7-1 ウイルスを 1×10^4 pfu 腫瘍内投与した検討では、T-01 ウイルス投与と比較しても有意な腫瘍増大抑制効果を認めた。一方、RenCa 肺転移モデルでは T-01 ウイルス投与と比較してマウスの生存期間に有意差を認めなかった。Neuro2a 皮下腫瘍モデルにおいて、T-B7-1 ウイルス 1×10^4 pfu 腫瘍内投与と、活性化 T 細胞抑制化因子、CTLA4(CD125)に対する阻害抗体、抗 CTLA4 抗体を併用投与(腹腔内投与)した検討では、併用群において腫瘍の増大が著しく抑制され、13 匹中 9 匹で腫瘍が消失した。RenCa 肺転移モデルにおいても併用群におけるマウスの生存期間が著しく延長した。T 細胞サブセット depletion study 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ることが示された。

以上、本論文は遺伝子改変型の HSV-1、T-01 ウイルスが腎癌に対して有効な治療手段となりうることを示した。また、抗癌効果を増強させる目的にて免疫刺激遺伝子を発現する新規のウイルスベクター2種を作製し、疾患モデルにおける抗癌効果の増強を証明した。HSV-1 を使用した癌治療において、抗腫瘍免疫機構を有利に活用した戦略が、抗癌効果を飛躍的に増強させることを証明し、疾患モデルにおける強力な抗癌効果の発現を達成した。臨床における HSV-1 を使用したウイルス療法の実用化に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。