

審査の結果の要旨

氏名 烏依罕

本研究は癌治療用第三世代遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス 1 型 (G47?) の生体における分布及び動態を明らかにするため、ルシフェラーゼ発現型の第三世代遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス (T-luc<sup>CMV</sup>) を用いた生体分子イメージングシステムを開発し、正常或は担癌マウスに種々の経路で T-luc<sup>CMV</sup> を投与した後に IVIS (in vivo imaging system) にてウイルスの分布と経時的変化を追跡し、下記の結果を得ている。

1. 異なるプロモータに制御されるルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ二種類のウイルス (T-luc<sup>CMV</sup> 及び T-luc<sup>US11</sup>) の配列、性質を確認した結果、それらの増殖能、殺細胞効果と抗腫瘍作用は、*in vitro*、*in vivo* 共に G47? と有意差がなく、ルシフェラーゼ発現がウイルス複製に影響しないことが示された。
2. *in vitro* ルシフェラーゼアッセイにて T-luc<sup>CMV</sup> と T-luc<sup>US11</sup> のシフェラーゼ発現を確かめたところ、immediate early CMV プロモータに制御されるルシフェラーゼを組み込んだ T-luc<sup>CMV</sup> は細胞に感染した直後から大量にルシフェラーゼを発現し、ウイルスの感染を反映することが分かった。一方、T-luc<sup>US11</sup> の場合、ルシフェラーゼ遺伝子が US11 という strict late プロモータに制御されているにもかかわらず、感染直後にも少量発現していることが確認され、ウイルスの複製のタイミングを正確に反映できないことが分かった。
3. Neuro2a もしくは U87MG の皮下腫瘍モデルに T-luc<sup>CMV</sup> を腫瘍内投与したところ、腫瘍に限局して長期のルシフェラーゼ発現が見られ、A/J マウスでは投与後 7 日間、ヌードマウスでは 14 日間以上検出された。また、腫瘍以外の組織でのルシフェラーゼ発現はいずれのマウスモデルにおいても認められなかった。
4. 正常な A/J マウスもしくはヌードマウスに T-luc<sup>CMV</sup> を尾静脈内投与し、ウイルスの体内分布を調べた結果、投与直後に肝臓に高いルシフェラーゼ発現を観察するものの 2 日間で消失した。尾静脈にて T-luc<sup>CMV</sup> を投与されたマウスの肝臓を摘出し、感染性ウイルスを調べた結果、投与翌日以降の肝臓組織からは感染性ウイルスが検出されなかった。同サンプルを用いてリアルタイム PCR を行ったところ、検出される HSV-1 の DNA 量は投与当日より著しく減少することが示され、T-luc<sup>CMV</sup> が肝臓では複製しないことが分かった。
5. U87MG 皮下腫瘍を有するヌードマウスへの尾静脈内投与では、皮下腫瘍におけるルシフェラーゼ発現が 15 日以上検出され、T-luc<sup>CMV</sup> は尾静脈内投与でも、皮下腫

- 瘍に到達し、特異的に複製することが分かった。
6. 正常な A/J マウスもしくはヌードマウスに T-luc<sup>CMV</sup> を脳内投与したところ、ルシフェラーゼ発現量は投与二日後から著しく減少するが、持続的なルシフェラーゼ発現が観察された。しかし、脳組織から感染性ウイルスは検出されなかったことから、正常脳組織におけるルシフェラーゼ発現はウイルス複製によるものではないと考えられた。
  7. U87MG 脳腫瘍を有するヌードマウスへの腫瘍内投与では、脳腫瘍を移植した部位に持続的な発光が見られ、投与一週間後の時点で、発光の増強が観察され、T-luc<sup>CMV</sup> が脳腫瘍内で複製していることが分かった。
  8. Neuro2a 皮下腫瘍を持つ A/J マウスにインターロイキン 18 (IL-18) と T-luc<sup>CMV</sup> の併用療法を行ったところ、IL-18 による T-luc<sup>CMV</sup> のルシフェラーゼ発現量及び発現のタイムコースへの影響が認められなかったため、IL-18 による抗腫瘍効果の増強はウイルスの複製が促進されたからではないということが確認できた。

以上、本論文はルシフェラーゼ発現型遺伝子組み換え HSV-1 のルシフェラーゼ発現を生体分子イメージングシステムにて継時的に観察することから、実験動物における第三世代のがん治療用 HSV-1 の分布と動態を明らかにした。本研究は第三世代がん治療用 HSV-1 の臨床応用に有用な情報を提供し、また本研究で開発されたイメージングシステムは今後の研究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。