

論文の内容の要旨

論文題目 複数の腫瘍モデルを用いた第三世代遺伝子組換え

単純ヘルペスウイルス I 型の治療効果の検討

指導教員 齊藤延人教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

高橋雅道

【序文】

悪性腫瘍の治療法は近年めざましい進歩を遂げ、完治するがんも散見されてきた一方で、難治性の悪性腫瘍においてはその生存率はほぼ変化しておらず、新しい治療法の開発が求められている。

ウイルス療法はウイルスゲノムに遺伝子組換えを施してウイルスが正常細胞の中で複製できないように改変し、その一方で目標とするがん細胞の中でのみ複製できるようにデザインした遺伝子組み換えウイルスを用いることで正常細胞を傷害することなくがん細胞を特異的に殺傷する。現時点で有効な治療法のない難治性悪性腫瘍においては最も期待される次世代の治療法の一つである。

第三世代遺伝子組み換え単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) である G47 Δ は、そのゲノムに三重変異を持たせたがん治療用遺伝子組み換え HSV-1 であり、これまでに欧米で既に臨床試験が行われた第一世代 HSV-1、第二世代 HSV-1 と比べて更に安全性と抗腫瘍効果の双方を高める事に成功したがん治療用ウイルスである。

一方、近年種々の固形がんの組織中に、放射線療法や化学療法などの従来の治療に抵抗性を示して再発の原因になっていると考えられる細胞集団が存在する事が明らか

になった。このような細胞はがん幹細胞と呼ばれ、神経膠腫の中で最も悪性度が高い膠芽腫にも脳腫瘍幹細胞が含まれているとの報告が相次ぎ、その治療標的としての重要性が高まってきている。脳腫瘍幹細胞についてはいまだ厳密な分離方法が確立しておらず、現時点では①自己再生する、②神経細胞系統、および神経膠細胞系統の細胞に分化する能力を持つ、③免疫不全マウスの脳内移植にて腫瘍形成能を持つ、の3点を満たす細胞とされる。

本研究では、膠芽腫患者の臨床検体から脳腫瘍幹細胞を分離培養し、樹立した脳腫瘍幹細胞ラインを用いてマウス脳腫瘍モデルを作成して G47Δ の抗腫瘍効果を検討した。更に、近年米国で医薬品として再発膠芽腫に対して承認された vascular endothelial growth factor (VEGF) 中和抗体であるベバシズマブとの併用による効果を検討した。また、これらの実験に先行して、難治性がんである悪性胸膜中皮腫に対する G47Δ の抗腫瘍効果について、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株によるマウス胸腔内腫瘍モデルを用いて検討した。

【方法】

1. ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株のマウス胸腔内腫瘍モデルにおける G47Δ の抗腫瘍効果の検討

G47Δ のヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対する殺細胞効果を調べるため、MSTO-211H、NCI-H226、NCI-H2052、NCI-H2452、NCI-H28 の5種類を用いて *in vitro* にて G47Δ による殺細胞効果、及び G47Δ の増幅能について検討した。続いて、ヌードマウスの胸腔内に MSTO-211H、または NCI-H226 を移植 (day 0) して胸腔内腫瘍モデルを作成し、各々後述の実験スケジュールに合わせたタイミングで mock または各実験で設定した量の G47Δ を胸腔内投与してマウスの生存を観察した (各群6匹)。また、前述のモデルにおける胸腔内での G47Δ の分布、動態を病理学的にも観察した。生体内でのウイルスの分布と動態を観察するため、G47Δ とほぼ同じ骨格を持ち、luciferase を発現する T-luc^{CMV} を用いて *in vivo* bioluminescence imaging を行った。

2. ヒト膠芽腫由来がん幹細胞を用いたマウス脳腫瘍モデルにおける G47Δ の抗腫瘍効果の検討

27例の脳腫瘍患者の手術検体を無血清培地で培養し、sphere として5回以上継代して樹立したラインを TGS-01、TGS-02…と順に名付けた。また同時に、同じ検体の半量を血清を含む培地で培養し、継代した細胞を TGS-serum 細胞と名付けた。これらの細胞における CD133 陽性サブセットの測定をフローサイトメトリーにて行った。また、TGS 細胞を血清存在下で培養し、免疫細胞染色を行って発現する蛋白質を前後で比較した。更に TGS 細胞と TGS-serum 細胞をヌードマウスの脳内に移植して腫瘍形成を観察した。その上で *in vitro* にて G47Δ とベバシズマブが TGS 細胞の増殖と幹細胞性

に及ぼす影響を検証した。これら *in vitro* の実験に続き、*in vivo* での G47 Δ とベバシズマブの TGS 細胞由来脳腫瘍に対する抗腫瘍効果を検証した。TGS 細胞をヌードマウスの脳内に移植 (day 0) し、TGS-01 と TGS-04 は day 10 に、TGS-02 は day 20 に mock または G47 Δ を腫瘍内に投与して生存期間を観察した (各群 10 匹)。更に、TGS-01 または TGS-04 を用いた同様の脳腫瘍モデルに対して、G47 Δ とベバシズマブの併用効果を観察した。また、TGS 脳腫瘍モデルの脳における G47 Δ 複製能に対するベバシズマブの影響を評価するため、*in vivo* viral replication assay を行った。最後に G47 Δ とベバシズマブ併用治療が *in vivo* において脳腫瘍幹細胞の SOX2 発現に及ぼす影響を評価するため、治療後のマウスの脳から蛋白質を抽出し、SOX2 蛋白発現量を Western blot 法で比較した。

【結果】

1. ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株のマウス胸腔内腫瘍モデルにおける G47 Δ の抗腫瘍効果

調査した 5 種類の細胞株のうち、NCI-H28 を除く 4 種類において G47 Δ は著明な殺細胞効果を示し、MSTO-211H と NCI-H226 内では感染 48 時間後に約 200 倍の titer を示し、良好に増幅した。MSTO-211H を用いた胸腔内腫瘍モデルにおける G47 Δ 胸腔内投与実験では、day 5 に 1.0×10^5 、 10^6 、 10^7 plaque forming units (pfu) の G47 Δ を投与したマウスは、mock 投与群が全例 day 35 までに死亡したのに対して G47 Δ 治療群は 3 群とも day 107 まで死亡例が出現せず、著明に生存期間が延長した ($p < 0.001$)。次に G47 Δ の量を 1.0×10^5 pfu に固定し、投与日を day 5、day 8、day 11、day 14、day 21 としたところ、day 21 群以外の全ての群で mock 群に比べて有意に生存期間が延長した。類似の実験を NCI-H226 でも行ったが結果は同様で、day 5 に 1.0×10^5 、 10^6 、 10^7 pfu の G47 Δ を投与した群は 3 群とも mock 投与群に比べ生存期間が延長し ($p < 0.001$)、 1.0×10^5 pfu の G47 Δ を day 10、day 20、day 30 に投与したところ、全ての群で有意に生存期間が延長した。病理学的にも G47 Δ が腫瘍に一致して複製している事が確認され、MSTO-211H を 14 日前に胸腔内へ移植したマウスへ 5.0×10^6 pfu の T-luc^{CMV} を投与して発光を観察したところ、ルシフェラーゼは day 14 でも発現しており、胸腔内でウイルスの新たな感染が起り続けていることが示された。

2. ヒト膠芽腫由来がん幹細胞を用いたマウス脳腫瘍モデルにおける G47 Δ の抗腫瘍効果

27 例の脳腫瘍患者のうち、13 例の膠芽腫患者の臨床検体から sphere を継代培養することが出来た。このうち TGS-01、TGS-02、TGS-04 について検討を進めたところ、フローサイトメトリーにて TGS 細胞は全て CD133 陽性であったが、TGS-serum 細胞は CD133 陰性だった。また、免疫細胞染色では TGS 細胞は血清存在下で培養すると、陰

性だった Tuj1 が発現するようになり、GFAP を発現する細胞も認め、神経細胞系統と神経膠細胞系統に分化していると考えられた。TGS 細胞と TGS-serum 細胞をヌードマウスの脳内へ移植すると、TGS 細胞では 5.0×10^3 個を移植すると腫瘍を形成してマウスが全例腫瘍死したのに対し、TGS-serum 細胞は 5.0×10^5 個を移植しても腫瘍の形成を認めなかった。以上から TGS 細胞が脳腫瘍幹細胞の性質を満たしていることを示した。*in vitro* の実験結果では、G47 Δ が TGS 細胞を強く障害する事が示されたが、ベバシズマブは TGS 細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。しかし *in vivo* では、ベバシズマブの併用によって TGS 脳腫瘍モデルに対する G47 Δ の抗腫瘍効果は増強し、マウスの生存期間が有意に延長した。治療後の SOX2 蛋白発現量は、G47 Δ 治療群で有意に低下し、ベバシズマブの投与によって差は認められなかった。

【考察】

MSTO-211H 及び NCI-H226 胸腔内モデルに対する G47 Δ の胸腔内投与による抗腫瘍効果は、これまで報告された遺伝子組換え HSV-1 による結果よりもはるかに優れた結果を示し、悪性胸膜中皮腫に対する有効な治療法と考えられた。

ヒト膠芽腫由来の複数のがん幹細胞ラインに対して G47 Δ は顕著な殺細胞作用を示した。またがん幹細胞を用いた脳腫瘍モデルにおいても G47 Δ の脳腫瘍内投与は単独で有意に生存期間を延長した。更にベバシズマブとの併用ではその効果が増強することを見出した。G47 Δ で治療後の脳では SOX2 蛋白発現が有意に低下した。これらの結果はいずれも、G47 Δ が、がん幹細胞にも高い治療効果を発揮し、膠芽腫の根治的治療になり得ることを示唆している。