

[過程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 高橋雅道

本研究は、次世代のがん治療法として注目されているものの一つである第三世代遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス I 型 (G47Δ) の、難治性悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果を複数の動物モデルを用いて検討したものである。難治性悪性腫瘍としては悪性胸膜中皮腫、及び膠芽腫を対象とした。悪性胸膜中皮腫についてはヒト由来の細胞株を用いた免疫不全マウスの胸腔内腫瘍モデルを用いて検討し、膠芽腫については近年その存在が明らかになりつつある脳腫瘍幹細胞を患者検体より樹立し、それを用いた免疫不全マウスの脳腫瘍モデルを用いて検討し、下記の結果を得ている。

1. 5 種類のヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対して G47Δ の *in vitro* cytotoxicity assay を行ったところ、4 種類において G47Δ は著明な殺細胞効果を示した。また、このうちヌードマウスへの移植で腫瘍を形成する事が知られている MSTO-211H と NCI-H226 へ G47Δ を感染後、48 時間後に回収して titer を測定したところ最初の titer に比べて約 200 倍の値を示し、これらの細胞内で G47Δ が良好に増幅する事が示された。
2. MSTO-211H、または NCI-H226 をヌードマウスの右胸腔へ移植した胸腔内腫瘍モデルを作成して G47Δ の胸腔内投与による抗腫瘍効果を検討するべく、コントロール群とウイルス治療群での生存期間を比較した。いずれの細胞株を移植したマウスも、複数の条件で行った G47Δ の単回治療により、コントロール群に比べてウイルス治療群は統計学的有意に生存期間が延長した。第三世代遺伝子組換え HSV-1 による悪性胸膜中皮腫胸腔内腫瘍モデルの抗腫瘍効果検討の報告は我々の報告が初めてであり、第一世代、第二世代の遺伝子組換え HSV-1 による従来への報告に比べ、その効果は非常に高かった。また、その際の病理学的検討にて G47Δ が腫瘍内で増幅していることが示された。
3. G47Δ と同様の骨格を持ち、ウイルス感染時に luciferase を発現するように設計した T-luc^{CMV} を用いた *in vivo* bioluminescence imaging の実験では、胸腔内腫瘍をもつマウスの胸腔へ投与されたウイルスは、腫瘍に持続して感染、増幅を繰り返していることが示された。
4. 膠芽腫患者の手術検体から得た細胞を無血清培地を用いた浮遊培養法にて培養して sphere cells を獲得し、これらが脳腫瘍幹細胞の必要条件を満たしている事を確認した。

この細胞を TGS (Todai Glioma Stem) 細胞と名付け、TGS-01、-02、... と番号をつけた。

5. TGS-01、TGS-02、TGS-04 に対して G47 Δ の *in vitro* cytotoxicity assay を行ったところ、何れの細胞に対しても G47 Δ は著明な殺細胞効果を示した。また、これらの細胞へ G47 Δ を感染後、48 時間後に回収して titer を測定したところ最初の titer に比べて約 20 倍～600 倍の値を示し、これらの細胞内で G47 Δ が良好に増幅する事が示された。
6. TGS 細胞をヌードマウスの右大脳半球へ移植した脳腫瘍モデルを作成して G47 Δ の脳腫瘍内投与による抗腫瘍効果を検討するべく、コントロール群とウイルス治療群での生存期間を比較した。TGS-01、TGS-02、TGS-04 を用いた脳腫瘍モデルマウスにおいて、いずれも G47 Δ の単回治療によりコントロール群に比べてウイルス治療群は統計学的有意に生存期間が延長する事を示した。また、その際の病理学的検討にて G47 Δ が腫瘍内で増幅していることが示された。
7. 膠芽腫の発育と脳腫瘍幹細胞の *in vivo* における増殖に重要な役割を担う vascular endothelial growth factor (VEGF) について、TGS 細胞が *in vitro* で VEGF を分泌していることを ELISA 法で確認した。また、TGS-01、または TGS-04 を移植した脳腫瘍モデルにおいて、G47 Δ の単回腫瘍内投与とベバシズマブ (VEGF の中和抗体である分子標的薬) の腹腔内投与の併用によってマウスの生存期間が延長する事を示し、脳腫瘍幹細胞を用いた脳腫瘍モデルに対してこれらの併用が有効であることを初めて見出した。
8. 脳腫瘍幹細胞に発現する事が知られる SOX2 について、TGS-01 を用いた脳腫瘍モデルマウスにおける G47 Δ の腫瘍内投与、及びベバシズマブの腹腔内投与後での SOX2 蛋白質の脳内変化を Western blotting 法によって比較したところ、SOX2 は G47 Δ 治療群で有意に減少しており、G47 Δ によって脳腫瘍幹細胞が死滅したことが示された。

以上、本論文は第三世代遺伝子組換え HSV-1 である G47 Δ が、悪性胸膜中皮腫細胞株を用いた胸腔内腫瘍モデルに対して著明な抗腫瘍効果を示す事、及び脳腫瘍幹細胞を用いた脳腫瘍モデルに対して単独でも抗腫瘍効果を示し、更にベバシズマブとの併用によりその効果が増強する事を明らかにした。本研究はこれまで明らかにされていなかった G47 Δ の悪性胸膜中皮腫、及び膠芽腫に対する治療開発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。