

論文の内容の要旨

論文題目 前立腺特異的プロモータ活用型のがん治療用遺伝子組換え
単純ヘルペスウイルス I 型の開発

氏名 竹島 雄太

前立腺癌は先進国の男性の固形癌で最も多い癌で、年齢調整死亡率も最も高い悪性疾患の一つに数えられる。限局癌は 5 年生存率が 100% 近くであるものの、初期治療後の再発例を含めると全体の 40% もの症例が転移癌へと進行するとも言われ、その 5 年生存率は 29% にも低下する。特にホルモン除去療法後に再発したホルモン抵抗性前立腺癌の出現は近年の前立腺癌治療の大きな課題となっており、ここ 2 年で次々と新薬が米国 FDA に認可されている。ただしこれらの新薬でも生命予後の延長効果は数か月に過ぎず、異なった機序による新たな治療戦略が求められている。

近年固形癌の治療において、癌細胞で特異的に複製するよう遺伝子改変された増殖型ウイルスの有効性が数々の臨床試験を通し示されてきている。増殖型ウイルス療法はウイルス自体が癌細胞特異的に増殖して癌細胞を死滅させる新しい発想の治療法である。前立腺癌もその高い罹患率、second-line・third-line の治療法の不足、経直腸的なアプローチの簡便さ、PSA による病勢評価が簡易であることなどよりウイルス療法の良い標的であると考えられる。近年のウイルスゲノム解明や遺伝子組み換え技術の目覚ましい進歩により、ウイルスの病原性を人為的に制御することが可能となり、現在までにアデノ・単純ヘルペス 1 型・ワクシニアなどの様々な癌治療用ウイルスが開発されてきた。特に我々のグループが研究を行っている HSV-1 は①ウイルスゲノムが大きく複数の外来遺伝子を組み込むことができる②ゲノムの安定性が高く宿主(ヒト)ゲノムに取り込まれない③アデノウイルスなどと比較し元来の殺細胞効果が非常に強い④増殖能が強く、高力価のウイルス抽出が可能⑤有効な抗ウイルス薬が複数存在する⑥従来の治療法と併用可能で、相乗効果が証明された組み合わせも存在するなど癌治療用ウイルスとしての使用に適する特徴を多く持ち合わせている。

1991 年に *tk* 遺伝子を不活化し腫瘍特異性を獲得させた世界初の遺伝子組換え HSV-1 が開発されて以来、遺伝子操作により HSV-1 の病原性を除去し腫瘍細胞への特異性を高める手法が複数開発された。特に有効で最も多く使用された遺伝子欠失には、 $\gamma 34.5 \cdot ICP6 \cdot \alpha 47$ が挙げられる。 $\gamma 34.5$ は HSV-1 の病原性を司ると同時に、ウイルス感染時の免疫応答によりウイルスのタンパク合成が阻害される宿主細胞の防御機構を回避する働きを持つ。 $\gamma 34.5$ の欠失により HSV-1 は病原

性を失い脳炎を起こさなくなるのみならず、特異な酵素活性の上昇を有する腫瘍細胞でのみ複製が可能となる。ただし $\gamma 34.5$ 欠失株はこの様な安全性・腫瘍特異性獲得と同時に野生株と比較して複製能も少なからず減少する欠点が指摘された。*ICP6* は遺伝子の DNA 合成に必須なリボヌクレオチド還元酵素(RR)の大サブユニットをコードしているため、*ICP6* を欠失したウイルスは正常細胞では複製が不可能となるが、腫瘍細胞では RR が過剰発現されているため欠失が代償され複製が可能となり *ICP6* 欠失 HSV-1 は腫瘍特異性を獲得する。 $\alpha 47$ は抗原提示関連トランスポーター(TAP)の働きを阻害することにより宿主の免疫サーベイランスから逃れる働きを司る。 $\alpha 47$ の欠失 HSV-1 では宿主細胞の MHC class I 抗癌提示が維持されるため抗腫瘍免疫惹起に寄与する。同時に、 $\alpha 47$ とゲノムの重なるプロモータの欠失により下流の US11 の発現時期が immediate-early プロモータの制御へと移行し、 $\gamma 34.5$ が欠失した状態でもタンパク合成が可能となる。よって $\alpha 47$ 欠失 HSV-1 は $\gamma 34.5$ 欠失株の複製能低下の欠点を補いつつ、病原性除去という安全性は保持する。これら遺伝子欠失を 1 つ又は 2 つ有する第 1・第 2 世代遺伝子組換え HSV-1 の有効性は多くの臨床試験で証明され、すでに第 III 相まで進んでいるものがある。主なものとして、2 重の腫瘍特異性を獲得させ高い安全性が証明された $\gamma 34.5 \cdot ICP6$ 欠失 G207 や、 $\gamma 34.5$ 欠失の欠点を克服しメラノーマ・頭頸部癌に対する高い有効性を示した $\gamma 34.5 \cdot \alpha 47$ 欠失 OncoVEX などが挙げられる。我々が臨床開発を進める唯一の第三世代遺伝子組換え HSV-1 は *ICP6*・ $\gamma 34.5$ ・ $\alpha 47$ の 3 つの遺伝子機能を欠落させることによって、G207 の高い安全性と OncoVEX の強力な抗腫瘍効果を兼ね備えたウイルス療法を実現させた。現在脳悪性膠芽腫に対する臨床治験が進行中、来年より前立腺癌に対する臨床試験が開始予定となっている。ただし理論的には、癌細胞特異的なウイルス複製は欠失した *ICP6* 機能を代償する宿主細胞の RR 活性に依存するため、宿主細胞の増殖能と強い相関関係を持つ RR 活性がやや低い緩徐に増殖する前立腺癌などの一部ではウイルス複製に不利となる可能性がある。そこで本研究では、*ICP6* 遺伝子を前立腺癌特異的なプロモータで制御することにより、細胞の RR 活性に依存せずに、前立腺癌で常に高いウイルス複製能を呈する新規 HSV-1 を開発した。具体的には、 $\gamma 34.5$ 遺伝子と $\alpha 47$ 遺伝子を欠失し、かつ *ICP6* 遺伝子をオステオカルシン(OC)プロモータもしくは PSES エンハンサー (PSA エンハンサー・プロモーター AREc および PSMA エンハンサー片 PSMEdel2 のキメラプロモータ) の制御下においた 2 種類の遺伝子組換え HSV-1、T-OC・T-PSES を作製した。新規ウイルスは 2005 年に福原らにより開発された T-BAC system を利用し作成された。

複製試験により従来の G47 Δ は *ICP6* 未欠失株と比較し前立腺癌や腎癌など増殖速度が緩徐な複数の細胞株で複製能が減弱する現象が確認された。T-OC と T-PSES はヒト前立腺癌細胞株 DU145 で G47 Δ に対し複製能の向上をみとめ、*ICP6* 欠失の欠点が補完されたと考えられた。Western Blotting にて T-OC・T-PSES はヒト前立腺癌細胞株 DU145・PC-3・LNCaP で高レベルの *ICP6* 発現を認めたもののヒトグリオーマ細胞株 U87 では *ICP6* 発現を認めなかった。*In vitro* の殺細胞効果検討では、使用した 3 種類のヒト前立腺癌細胞株すべてで T-OC・T-PSES はコントロールウイルスと比較し殺細胞効果の増強を認めた。*In vivo* では、無胸腺マウスに作製した DU145

および LNCaP の皮下腫瘍にそれぞれ T-OC, T-PSES (力価 2×10^5 pfu) の腫瘍内投与をおこなった結果、T-01 と比較し有意に高い抗腫瘍効果を示した一方、非前立腺癌(U87)に対する抗腫瘍効果は従来のウイルスとの有意差を認めず前立腺癌モデルに特異的な抗腫瘍効果の増強が確認された。

癌治療用 HSV-1 の開発戦略は多岐に及び、ここ 10 年で様々な外来遺伝子(サイトカイン、プロドラッグ代謝酵素、放射線性物質輸送体など)を発現させるウイルスが開発されている。当グループでも G47 Δ をベースに IL-12 や B7.1 などを発現する HSV-1 を作成し、様々な動物モデルにおいて抗腫瘍効果の増強を確認している。一方、ウイルス自体の抗腫瘍効果を高めることはもちろんのこと、新しい治療戦略であるこれら外来遺伝子の安定した発現と抗腫瘍効果を引き出すためには、安全性を損なう事なく backbone となるウイルス自体の複製能を極限まで高める必要がある。 $\alpha 47$ の欠失で $\gamma 34.5$ 欠失による複製能減弱が補われ、高い有効性と安全性を誇る最新世代 HSV-1 の G47 Δ も、ICP6 の欠失により増殖が緩徐な癌に対し複製能が減弱するという側面を持つことが本研究で明らかとなった。我々はこの減弱を補完すべく組織特異的プロモータにより ICP6 制御を行う初の遺伝子組換え HSV-1 を作成し、前立腺癌細胞株での複製能向上を確認した。また、*in vitro* での殺細胞効果・*in vivo* での抗腫瘍効果の増強も確認された。従来の研究では宿主細胞の RR 活性を上昇させるために放射線照射・代謝拮抗剤・プラスミド導入などを利用してきたが、本研究では HSV-1 自体が ICP6 発現を上昇させるため、全身副作用を引き起こす危険性なく感染細胞すべてで複製能上昇が得られるという利点を持つ。また、組織特異的プロモータを利用した既存の遺伝子組換え HSV-1 も複数報告されているが、これらは必須遺伝子の ICP4 や病原性を司る $\gamma 34.5$ を直接制御していた。本研究では OC プロモータ・PSES エンハンサーともに前立腺癌細胞株の種類によっては従来の研究より特異性が低い現象が確認されたが、上記のように従来の研究では安全性がこのようなプロモータの特異性に完全に依存してしまっていたのに対し、本研究では $\gamma 34.5$ 欠失が保持されるため安全面でも有利であると考えられた。つまり、当研究で見られたプロモータの特異性の低さはあくまで前立腺癌細胞株の種類に対するものであり、非前立腺癌細胞株では活性を認めなかったが、例え一部正常細胞でプロモータ活性が出現してしまったとしても T-OC・T-PSES は OncoVEX などの $\gamma 34.5$ ・ $\alpha 47$ 欠失 HSV-1 と同等以上の安全性は確保されたと考えられた。

従来の遺伝子組換え HSV-1 の安全性を損なうことなく緩徐に進行する癌に対する高い治療効果を獲得させた万能型 HSV-1 の開発は、今後さらに高い組織特異性を有するプロモーターや複数の癌種で活性を持つプロモーターなどの研究を進めることにより HSV-1 の有効性・安全性のさらなる向上につながると考えられ、前立腺癌治療におけるウイルス療法の実用化を更に促進すると期待される。