

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 田口 慧

本研究は、がん治療用ウイルスの G47Δ をベースとする、より効果的かつ臨床応用可能なウイルス療法の開発を行うため、マウス膀胱癌モデルにおいて IL-12 発現型がん治療用ウイルス(T-mfIL12) と iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDC) の併用療法を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. ウイルスは、T-mfIL12 (G47Δ の ICP6 欠失領域に、マウス IL-12 を CMV プロモータとともに挿入したもの) 及び T-01 (同部位に CMV プロモータのみを挿入したコントロールウイルス) を用いた。マウス膀胱癌細胞株 MB49 を用いた *in vitro* の検討では、T-mfIL12・T-01 とも高力価(MOI 1.0)で感染させると 4 日目にはほとんどの細胞を死滅させた。また ELISA での検討から、T-mfIL12 を感染した細胞 (MB49 及びアフリカミドリザル腎細胞株 Vero)の上清中には、マウス IL-12 が発現していることを確認した。さらに C57BL/6 マウスに作製した MB49 皮下腫瘍モデルにおいて、T-mfIL12 の腫瘍内投与が用量依存性に腫瘍の増大を抑制することを示した。
2. MB49 皮下腫瘍モデルを用いて、ウイルスと、iPSDC の陽性対照である骨髓由来樹状細胞(BMDC)の併用効果を検討した。ウイルス(T-mfIL12 もしくは T-01) 及び BMDC をそれぞれ腫瘍内投与したところ「T-mfIL12 + BMDC 群」で著明な腫瘍縮小を認め、それには及ばないものの「T-01 + BMDC 群」及び「T-mfIL12 群」も有意な腫瘍縮小を示した。皮下腫瘍の免疫染色では「T-mfIL12 + BMDC 群」次いで「T-01 + BMDC 群」で腫瘍内に浸潤する CD8 陽性リンパ球数の増加を認めた。また、脾臓細胞を用いた IFN-γ ELISpot では、同 2 群で IFN-γ 産生細胞数の有意な上昇を認めた。以上より、「ウイルスと BMDC の併用がウイルス単独より強い抗腫瘍効果を示す」という既報の知見を確認するとともに、IL-12 発現型ウイルス(T-mfIL12)を用いることで併用効果がさらに増強することを新たに見出した。
3. マウス胎児線維芽細胞由来 iPS 細胞株 2A-4F-100 より iPSDC を分化誘導し、様々な形態・機能的評価を行った (形態評価、共刺激分子の発現解析、抗原取り込み能試験、mixed lymphocyte reaction、popliteal lymph node assay)。いずれの検討においても iPSDC は陽性対照である BMDC とほぼ同等の結果を示し、今回我々が作製した iPSDC が、形態・機能の両面で「樹状細胞様」の特徴を有する細胞であることを確認した。
4. 以上を踏まえ、本実験であるウイルスと iPSDC の併用実験を、MB49 皮下腫瘍モデルを用いて行った。T-mfIL12 及び、iPSDC もしくは BMDC をそれぞれ腫瘍内投与したところ、「T-mfIL12 + iPSDC 群」は「T-mfIL12 + BMDC 群」と同等の著明な腫瘍抑制

を認めた。両群は、皮下腫瘍の免疫染色にて腫瘍内に浸潤する CD8 陽性リンパ球数の増加と、脾臓細胞の IFN- γ ELISpot にて有意な IFN- γ 産生脾臓細胞数の増加を認めた。さらに樹状細胞の存在・成熟マーカー(CD11c・CD86 等)の免疫染色も行ったところ、同 2 群ではウイルスと樹状細胞の共存により樹状細胞の「成熟促進」が起こっている可能性が示唆された。以上より、「ウイルスと iPSDC の併用が通常の樹状細胞(BMDC)の併用と同等の高い抗腫瘍効果を示す」ことを新たに見出した。

以上、本論文はマウス膀胱癌 MB49 皮下腫瘍モデルにおいて、IL-12 発現型がん治療用ウイルス(T-mfIL12) と iPS 細胞由来樹状細胞(iPSDC)の併用が、骨髄由来樹状細胞(BMDC)の併用と同等の強い抗腫瘍効果を示すことを初めて証明した。iPSDC は理論上、大量培養・ストック化が可能なことから、本戦略は高い効果と臨床応用性を兼ね備えた理想的なウイルス免疫療法になり得ると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。