

審査の結果の要旨

氏名 内藤 晶裕

本研究は、がん治療用 HSV-1 の G47Δ を基本骨格とし、血管新生抑制タンパクの ALK1-Fc を発現するがん治療用 HSV-1 (T-ALK1) による各種腎癌細胞株および動物モデルに対する抗腫瘍効果への影響を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 研究室において第 3 世代がん治療用 HSV-1 の G47Δ を基本骨格とし作製された bone morphogenetic protein 9 (BMP9) のシグナル伝達を阻害する activin receptor-like kinase 1 (ALK1) を可溶性にした ALK1-Fc を発現するがん治療用 HSV-1 (T-ALK1) の Southern Blotting による構造確認を行ない、適切に遺伝子組換えが行われていることを確認した。
2. T-ALK1 の発現タンパクである ALK1-Fc の機能確認を ELISA にて評価し、発現した ALK1-Fc と BMP9 の結合を確認した。
3. T-ALK1 と空の発現カセットを組み込んで ALK1-Fc を発現しない対照ウイルス T-01 のヒト腎癌細胞株における複製能比較試験を行なった。T-ALK1 は、T-01 といずれの細胞株に対しても同等の複製能があることを示した。
4. *In vitro* における殺細胞効果を評価するため、ヒト腎癌細胞株 6 種類を使用した。A498、786-O、OS-RC-2、Caki-1、Caki-2、VMRC-RCW で検討したところ、T-ALK1 が T-01 と同等かそれ以上の殺細胞効果をもつことが確認され、MOI (multiplicity of infection) 0.1 では、感染から 3 日目または 4 日目には、殆どの細胞が死滅したことを確認した。
5. *In vivo* においては、今後の臨床応用を想定して、BALB/c マウスと同系の RenCa 細胞株を用いたマウス腎癌同所モデルの安全な作製手順を確立した。G47Δ 投与群は mock 群に比べ有意に生存期間が延長した (Log-rank test  $P < 0.01$ )。マウス腎癌の同所モデルにおける G47Δ 腫瘍内投与による、生存期間の延長が初めて示された。
6. BALB/c *nu/nu* を用いたヒト腎癌細胞株 3 種の皮下腫瘍モデルに対して腫瘍内投与を行い、腫瘍体積を経時的に観察し、抗腫瘍効果の評価を行なった。A498 および OS-RC-2 の皮下腫瘍モデルでは、T-ALK1 群が T-01 群に比べ有意に高い抗腫瘍効果を示した。また、後者モデルでは、T-ALK1 群は T-01 群に比べ有意に生存期間が延長した (Log-rank test  $P < 0.05$ )。786-O の皮下腫瘍モデルでは、T-01 群は抗腫瘍効果を示さなかったが、T-ALK1 群は mock 群に対して有意な抗腫瘍効果を示した。

7. 血管内皮細胞を染色する抗マウス CD31 抗体で OS-RC-2 皮下腫瘍の免疫組織化学染色を行ったところ、CD31 抗体の陽性率が、T-01 群と mock 群に比較して、T-ALK1 群で減少していることが確認され、血管新生が抑制されていた可能性を示した。

以上、本論文では可溶性 ALK1 発現型がん治療用ウイルスは、ヒト腎細胞癌を用いたマウス腫瘍モデルにおいて、対照ウイルスに比べ強力な抗腫瘍効果を示した。血管新生が豊富な腎細胞癌に対して、T-ALK1 はウイルスの直接的な細胞破壊だけでなく、腫瘍内の血管新生抑制による効果増強が示唆された。T-ALK1 は、特に腎細胞癌に有用ながん治療用 HSV-1 であり、ウイルス療法の臨床応用の際に重要な貢献をなすことが期待される。よって、本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。