

博士論文（要約）

可溶性ALK1発現型HSV-1のヒト腎細胞癌における治療効果の検討

内藤 晶裕

## 【序論】

近代の遺伝子解析や遺伝子組換え技術などの医療における様々な技術進歩により、遺伝子操作によって、ウイルスの毒性を抑制しつつ、がん細胞への殺細胞効果を維持できるようにウイルスを改変することが技術的に可能となった。ウイルス療法は注目されているがんの新規治療法であり、中でも単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) はがん治療に適した特徴を多く備えている。特に、2001 年に藤堂らにより開発された第三世代のがん治療用 HSV-1 である G47Δ は、三重変異により高い安全性と高い抗腫瘍効果を同時に実現した。当研究室では、G47Δ を使用して、膠芽腫に対する第 I-IIa 相試験と医師主導治験 (第 II 相)、去勢抵抗性前立腺癌、嗅神経芽細胞腫、悪性胸膜中皮腫に対する第 I 相試験を行ってきた。腎細胞癌は、放射線および殺細胞性抗がん剤への感受性が低く、手術が唯一根治を期待できる治療選択肢であるが、高齢や合併症などの手術不耐例には、ウイルス療法のように安全性が高く侵襲性の低い治療の需要は今後高まると考えられている。当研究室でも、腎細胞癌に対して G47Δ と同じウイルス遺伝子に三重変異を持つ T-01 で *in vitro* での殺細胞作用と *in vivo* での抗腫瘍効果を報告してきた。腎細胞癌は他の悪性腫瘍と比較して血管新生が豊富な悪性腫瘍であり、転移を有する症例に対する既存の治療薬は、血管新生抑制を機序とするものが多く、各種の VEGF をターゲットにした分子標的治療薬が治療の軸を担ってきた。研究室では、近年注目されつつある 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) を作製した。一般的な分子標的治療薬は、各種の副作用を伴うものが多く、全身投与における副作用の対応が臨床応用の際に重要になっているが、T-ALK1 を用いることで、ALK1-Fc の産生と蓄積が腫瘍内局所に留まって全身性の副作用を回避でき、一方で抗血管新生を介した更なる抗腫瘍効果が得られることが期待される。本研究では、ヒト腎癌細胞株を用いて、コントロールウイルスの T-01 と比較して、T-ALK1 がより強力な抗腫瘍効果を呈することが可能かを *in vitro*、*in vivo* で検討する。また同系マウス腎癌同所モデルを用いて G47Δ の有用性を検討する。

## 【方法】

T-ALK1 は、G47Δ の基本骨格に、ALK1 とヒト IgG Fc の融合遺伝子を組み込んで研究室で作製された。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、および mock と比較した。T-ALK1 の発現タンパクである ALK1-Fc の機能確認を行う。また、*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。*In vivo* においては、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、腫瘍に G47Δ を直接投与した。また、ヌードマウス (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は T-ALK1 の腫瘍内投与を行い、腫瘍体積を経時的に観察し、抗腫瘍効果および、各種の評価を行なった。

## 【結果】

*In vitro* では、ヒト腎癌細胞株 6 種類 (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。また、皮下腫瘍実験に使用した 3 種類のヒト腎癌細胞株 (A498、786-O、OS-RC-2) におけるウイルス複製能に関しては、いずれも T-01 と比較して同等であることが確認できた。

*In vivo* では、今後の臨床応用を想定して、同系マウス腎癌同所モデルにおいて、G47Δを用いたウイルス療法が有効であるかを検討した。その結果、mock 群で 22 日目に初死亡例を確認以後、38 日以内までに mock 群は全て死亡した。一方で、G47Δ 投与群は、31 日目に初死亡例が確認され、以降も死亡例が続いたものの、平均生存期間 (腫瘍作製からの生存日数) は、mock 群が 32.3 日であったのに対し、G47Δ 投与群は 39 日で、2 匹が最長 45 日間生存した。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。

皮下腫瘍実験においては、まず A498、786-O をヌードマウスに移植し、T-01 の腫瘍内投与を行い、用量依存的に抗腫瘍効果を示せた。この結果を基に用量を決め、A498、786-O、OS-RC-2 の 3 種類の皮下腫瘍モデルで、T-ALK1 の *in vivo* の抗腫瘍効果を検討した。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。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。

#### 【まとめ】

これまで、ウイルス療法による腎細胞癌を含む各種悪性腫瘍の抗腫瘍効果の報告を行ってきたが、今回は、腎癌同所モデルにおいてもその有効性を示すことが出来た。また、腎細胞癌に特徴的な血管新生に注目し、局所での血管新生を阻害する機能を付加することで、ウイルスによる直接的殺細胞に加えた抗腫瘍効果の増強を試みた。その結果、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、臨床応用が期待される。