

論文の内容の要旨

論文題目 上部消化管癌に対する第三世代がん治療用ヘルペスウイルス (G47Δ) の治療効果の検討

氏名 菅原弘太郎

1.背景

上部消化管癌（胃癌、食道癌）は世界的に癌死亡の上位（胃癌：3位、食道癌：6位）を占め、アジア地域に多く認められる。手術を中心とした集学的治療に加え、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の発展により生存成績は改善しているが、特に難治性胃癌であるスキルス胃癌や食道扁平上皮癌に対する既存治療の抗腫瘍効果は限定的であり、新規治療の開発が待たれている。

がん治療用ウイルスはがん細胞選択的に複製し、正常細胞を害することなくがん細胞のみを殺傷することができる斬新な治療方法である。がん治療用ウイルスは直接的な腫瘍細胞破壊に加え、腫瘍抗原の産生、腫瘍微小環境の改善と長期的な抗腫瘍特異的免疫の誘導作用を有し、強力な抗腫瘍効果を発揮する。免疫チェックポイント阻害薬の効果が限定的である「免疫原性が低く」「腫瘍浸潤リンパ球が乏しく」「免疫抑制細胞が多い」腫瘍、いわゆる”cold tumor” に対してウイルス療法を行うと活性化 T 細胞の動員と腫瘍微小環境改善により”hot tumor” に調節することができるため、ウイルス療法と免疫チェックポイント阻害薬の組み合わせは非常に合理的と考えられる。

G47Δは、本邦発、世界初の三重変異を有する第3世代のがん治療用遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス 1 型であり、非常に高い安全性と優れた治療効果を有する。再発性腫瘍患者を対象にした第II相医師主導治験においては明らかな生命予後の延長が確認されたため2018年8月の時点で有効中止となっており、様々な癌腫への臨床応用が目前に迫っている。

上部消化管癌に対するがん治療用ウイルスの効果を検討した研究は少ない。特にスキルス胃癌は多くの場合腹膜播種を伴いとりわけ予後が悪いが、スキルス胃癌に対するがん治療用ウイルスの効果を検証した報告は認めない。同様に食道扁平上皮癌モデルに対してがん治療用ウイルスと免疫チェックポイント阻害薬の併用効果を検討した研究は過去に認められない。上部消化管癌に対するG47Δの臨床応用を目指し、本研究を行った。

2.方法

2-1. ヒト胃癌に対する G47Δ の治療効果

始めにスキルス胃癌細胞株 (MKN45, 44As3) を含む複数のヒト胃癌細胞株について、*in vitro*にてG47Δの感染能、複製能、殺細胞能を検証した。次にヌードマウスにおいて異種皮下腫瘍モデル (MKN45, MKN74, 44As3) を作成し *in vivo*におけるG47Δ腫瘍内投与による治療効果を検討した。さらにヒト難治性スキルス胃癌の臨床病態をよく反映し、*in vivo imaging*

systemにて非侵襲的にマウス体内の腫瘍増殖を評価することができる胃壁同所腫瘍モデル(44As3Luc)、腹膜播種モデル(MKN45-luc, 44As3Luc)を確立し、G47Δの同所腫瘍内投与・腹腔内投与による治療効果を検討した。最後にMKN45皮下腫瘍モデルを用いG47Δ腫瘍内投与により腫瘍内macrophageやnatural killer(NK)細胞を主として腫瘍内リンパ球動態がどのように変化するかをFACSで解析した。

2-2. マウス食道扁平上皮癌に対するG47Δと免疫チェックポイント阻害薬併用療法の治療効果

始めにマウス食道扁平上皮癌細胞株(AKR, HNM007)を用いC57BL/6マウスにおいて同種皮下腫瘍モデルを作成し*in vivo*におけるG47Δの抗腫瘍効果を検討した。次にAKR皮下腫瘍モデルに対するG47Δと免疫チェックポイント阻害薬(抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体)の併用による治療効果を検討した。

さらにAKR皮下腫瘍モデルを用い、G47Δと抗CTLA-4抗体の併用療法開始後7日目の時点で腫瘍浸潤リンパ球をFACSにて解析するとともに、治療開始後3, 7日目の時点での腫瘍内免疫関連mRNAの発現変化を網羅的にqPCRにて解析した。G47Δと抗CTLA-4抗体の併用療法による抗腫瘍特異的免疫増強の検証には併用療法後14日の時点でIFN-γ ELISpot assayにて対象細胞(AKR)に対するIFN-γ spot数を治療群間で比較するとともに、併用療法により治療した個体に対して90日後にAKR細胞を再接種し生着するかどうかを検討した。最後に併用療法の治療効果への各リンパ球の寄与を検討すべく、CD4+, CD8+, NK細胞のdepletion assayを行った。

3. 結果

3-1. ヒト胃癌に対するG47Δの治療効果

いずれのヒト胃癌細胞株に対しても*in vitro*にてG47Δは十分な感染能、複製能、殺細胞能を示し、*in vivo*においてもG47Δの腫瘍内投与は腫瘍増大を顕著に抑制した。スキルス胃癌同所腫瘍モデル(44As3Luc)に対するG47Δの腫瘍内投与は腫瘍増大を有意に抑制し、生存期間を延長させた。さらにスキルス胃癌腹膜播種モデル(MKN45-luc, 44As3Luc)に対してG47Δを腹腔内投与すると、G47Δは選択的に腹腔内腫瘍にて複製し、腫瘍進行を有意に抑制、生存期間を延長させた。G47Δ投与により腫瘍内においてNK細胞とM1 macrophageが有意に増加する一方でM2 macrophageは顕著に減少し、M1/M2比は有意に上昇していた。

3-2. マウス食道扁平上皮癌に対するG47Δと免疫チェックポイント阻害薬併用療法の治療効果

AKR, HNM007皮下腫瘍モデルにおいてG47Δ投与は腫瘍増大を有意に抑制した。AKR皮下腫瘍モデルに対してG47Δと抗CTLA-4抗体の併用療法は単剤療法と比べて顕著に腫瘍増大を抑制し、半数以上(5/8匹)の個体にて治療を達成、生存期間を有意に延長させた。一方、G47Δと抗PD-1抗体の併用療法と抗PD-1抗体単剤療法の抗腫瘍効果は同等であった。

G47Δと抗CTLA-4抗体の併用療法後7日目の時点において、併用群では他3群と比べて

CD3+, CD4+, CD8+ 細胞の有意な上昇に加え、CD4+ 細胞における制御性 T 細胞 (Treg) の割合の顕著な減少を認め、結果として CD8+/Treg 比が顕著に上昇していた。治療開始後 3 日目の時点で腫瘍内免疫関連 mRNA の発現変化はわずかであったが、治療開始後 7 日目の時点では併用療法において多くの mRNA 発現が変動しており、特に炎症 (*Ccl5*, *Il1a*, *Il1b*)、一般リンパ球 (*Cd4*, *Cd8a*) に関連する mRNA 発現が著明に上昇していた。併用群においては活性化マーカーである *Gzmb*, *Prfl* の発現が有意に上昇していた一方で疲弊因子である *Cd274* の発現も有意に増加していた。

AKR 細胞に反応する IFN- γ の spot 数は併用治療群において他群よりも有意に多く、さらに併用療法において治癒した個体においては AKR 細胞生着を全例において拒絶 (対照マウスでは全例生着) した。CD8+, NK 細胞の depletion では併用療法の治療効果が減弱したものの部分的に残存していた一方で、CD4+細胞の depletion により併用療法の治療効果は完全に消失した。

4. 考察

ヒト胃癌細胞株を用いた検討では難治性胃癌の臨床的特徴を多く有する有用なモデルを構築し、G47 Δ がヒト胃癌に対して様々な投与経路 (腫瘍内投与、腹腔内投与) において有効であることが示された。実臨床では胃内腔の腫瘍に対して効率よく G47 Δ を腫瘍内投与するために専用の内視鏡デバイスが必要であることや、マウスよりはるかに体積が大きいヒト腹腔内への G47 Δ 投与でどの程度効果があるか、など検証すべき課題は残るが、G47 Δ は難治性胃癌の治療成績向上に有用であると考えられる。G47 Δ 腫瘍内投与により免疫抑制性かつ腫瘍促進性作用を持つ M2 macrophage は顕著に減少していた。今回は免疫不全マウスにおける検討であり、今 M2 macrophage の減少がその後の獲得免疫・治療効果にどう影響を与えるかについては今後さらなる検討が必要である。

マウス食道扁平上皮癌同種皮下腫瘍モデルにおいて、G47 Δ と抗 CTLA-4 抗体との併用療法は相乗的に腫瘍内の effector T 細胞を増やすとともに Treg を減少させることによって腫瘍内の免疫学的微小環境を改善、結果として強い抗腫瘍効果が得られた。本研究では G47 Δ と抗 PD-1 抗体との併用による相乗効果を認めなかったが、両者の投与タイミングが結果に影響を及ぼした可能性が考えられ、併用療法の最適な投与スケジュールは更なる検討が必要である。加えて G47 Δ と抗 CTLA-4 抗体併用療法により増強された抗腫瘍特異的免疫が長期間にわたって維持されていること、併用療法の治療効果には様々な免疫細胞、特に CD4+ T 細胞の複雑な相互作用が寄与していることも明らかになった。

抗 CTLA-4 抗体の効果がヒトとマウスの間で異なることは広く知られており、今回マウス実験において確認された G47 Δ と抗 CTLA-4 抗体の併用効果がヒトでも同様に得られるかについては慎重に検証する必要がある。

5. 結語

G47 Δ はヒト進行胃癌の臨床的特徴を有するマウスモデルにおいて高い治療効果を有し、

腹膜播種を有するような胃癌に対しても腫瘍内投与・腹腔内投与共に有用なアプローチである。さらに G47Δ と抗 CTLA-4 抗体の併用療法は相乗的に腫瘍内免疫学的微小環境を改善、抗腫瘍免疫を増強し、優れた抗腫瘍効果を発揮するため食道扁平上皮癌を含めた固形癌の新たな治療戦略として非常に有望である。これらの結果はヒトにおける臨床試験にて慎重に吟味・評価する必要がある。