

審査の結果の要旨

氏名 角谷 成紀

本研究は、従来の化療に難渋する精巣腫瘍、中でも大半を占める非セミノーマ精巣腫瘍に照準を置き、化学療法や放射線療法とは異なる新規治療として近年脚光を浴びているウイルス療法、第三世代遺伝子組み換え単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)の有効性を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト非セミノーマ精巣腫瘍細胞株である NTERA-2 を使用し、CDDP 耐性 NTERA-2 細胞株(NTERA-2R)を低濃度の CDDP に長期間暴露することにより樹立した。具体的には、NTERA-2 を CDDP 入り DMEM 培地で 48 時間培養した後、通常の DMEM 培地に置換、3 回継代後、CDDP 濃度を緩徐に上げ、同様の暴露、置換、継代を約 12 か月繰り返した。CDDP 濃度は、1 μ M から 2 μ M、4 μ M、8 μ M、16 μ M まで上げた後、CDDP 抵抗性維持目的に 2 μ M での暴露を継続した。CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation (MTS) assay を行い、CDDP 抵抗性獲得を証明した。

2. In vitro 実験で、細胞にウイルスを感染させ、ウイルスの殺細胞効果を検討した。細胞は、ヒト非セミノーマ精巣腫瘍細胞株である NTERA-2、NTERA-2R、マウス非セミノーマ精巣腫瘍株である F9、また、ウイルスは、第三世代遺伝子組み換え HSV-1 である、T-01(コントロールウイルス)と T-mfIL12(IL12 を発現するウイルス)を用いた。両方のウイルスは、MOI (ウイルスの感染力を表す単位)0.1 でも感染 3 日後で NTERA-2、NTERA-2R、F9 の生存細胞数率は、約 9%以下になり、強力な殺細胞効果を示した。

3. In vivo 実験を行う為、皮下腫瘍モデルを作成した。ヒト非セミノーマ精巣腫瘍細胞株である NTERA-2、NTERA-2R をそれぞれ 1.0×10^6 個含む細胞浮遊液をオスの BALB/c ノードマウス背側に皮下注射することによりそれぞれ NTERA-2 モデル、NTERA-2R モデルを確立した。また、マウス非セミノーマ精巣腫瘍細胞株 F9 を 5.0×10^5 個含む細胞浮遊液をオスの 129 マウス背側に皮下注射することにより確立した。これらのモデルを用いて、皮下腫瘍に対し、ウイルス治療を行った。腫瘍が径 5 mm 程度に達した時点で、ウイルスを腫瘍内に 2 回投与(初日と 3 日後)を行った。なお、ウイルスは、上記の 2 つ(T-01 と T-mfIL12)と G47 Δ (基本骨格となるウイルス)を用い、治療群と非治療群の腫瘍体積を統計学的に解析し、治療効果を判定した。

4. NTERA-2 モデルにおいて、T-01 用量設定試験を 1.0×10^6 pfu(ウイルスの力価を表す単位)群、 2.0×10^5 pfu 群、 4.0×10^4 pfu 群、mock 群(非治療群)の 4 群で行った。T-01 治療群は、mock 群に比して有意に腫瘍体積縮小を認め、最少力価(4.0×10^4 pfu)でも、有意に強い抗腫瘍効果を認めた。また、F9 モデルにおいて、同様の系を施行したところ、Day9 の時点で、T-01 (1.0×10^6 pfu)群は、mock 群に比して有意な腫瘍体積縮小を認めた。

5. NTERA-2 モデルにおいて、T-01 と CDDP 併用療法を、T-01&CDDP 群、mock&CDDP 群、T-01&生食群、mock 群&生食群の 4 群で行った。なお、CDDP と生食は、腹

腔内に単回投与(初日)を行った。T-01&CDDP 群は、mock&CDDP 群や mock 群&生食群に比して有意に強い腫瘍抑制効果を認め、T-01&生食群と比しても腫瘍抑制の傾向を認めた。低用量の CDDP でも T-01 と併用することにより抗腫瘍効果が増強することが示唆された。

6. NTERA-2R モデルにおいて、T-01(1.0×10^6 pfu)群と mock 群の 2 群で検討したところ、T-01 治療群では Day6 の時点で mock 群に比して有意な腫瘍抑制効果を認め、その効果はこの系が終わるまで持続した。また、G47 Δ (1.0×10^6 pfu)群と未治療の mock 群の 2 群間での検討でも、同様に、Day6 の時点以降 mock 群に比して有意に強力な腫瘍抑制効果を認めた。CDDP 抵抗性であっても、ウイルス治療が有効であることが示された。

7. F9 モデルにおいて、T-01(4.0×10^4 pfu)群、T-mfIL12(4.0×10^4 pfu)群、mock 群の合わせて 3 群で抗腫瘍効果を比較検討した。Day9 の時点以降で、T-01 群と T-mfIL12 群は、共に mock 群に比して有意に強力な抗腫瘍効果を認め、さらに、T-mfIL12 群は、T-01 群に比しても有意な腫瘍抑制効果を示した。なお、T-mfIL12 群では、腫瘍体積はほぼ変化せず、強力な腫瘍増殖抑制傾向を認めた。

以上、第三世代遺伝子組み換え HSV-1 を応用したウイルス治療が、非セミノーマ精巣腫瘍、特に CDDP 抵抗性であっても強力な抗腫瘍効果を発揮することを本論文は明らかにした。ウイルス治療が精巣腫瘍に有効であることを初めて示し、新規治療として選択肢になりうることが考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。