

博士論文（要約）

論文題目      がん治療用ウイルス（第三世代遺伝子組み換え  
                         HSV-1）の非セミノーマ精巣腫瘍への応用

氏名              角谷 成紀

精巣腫瘍は、若年から壮年期男性に発生する比較的稀な固形腫であり、組織型は、大きく分けてセミノーマと非セミノーマ (NSGCT) に分類される。NSGCT は、初診時より有転移症例が 30%程度を占めるが、シスプラチン (CDDP) を含む抗癌剤による全身化学療法が奏功し、80%が完全寛解を長期間持続できることが知られている。しかしながら、多角的な治療戦略が施行可能となった現在でも、難治性精巣腫瘍症例が少なからず存在し、いったん CDDP 耐性になると、既存の治療では根治できず、抗癌剤長期暴露による合併症も大きな課題となってきた。

遺伝子組み換えウイルスは、多岐に亘り、特に遺伝子組み換えヘルペスウイルスの歴史は最長で、第一世代の開発に始まり、第三世代の G47Δ に至っている。G47Δ は、唯一の第三世代遺伝子組み換え HSV-1 であり、その抗腫瘍効果および安全性は、当初悪性膠芽腫で検討され、神経鞘腫、聴神経腫瘍、さらに泌尿器科悪性腫瘍では、前立腺癌、尿路上皮癌、腎細胞癌で確認されている。また、G47Δ は、悪性膠芽腫と去勢抵抗性前立腺癌に対し臨床試験まで進み、現在進行中である。

遺伝子組み換えウイルスは、従来の化学療法や放射線療法に代わる、新規の癌治療用選択肢として脚光を浴びているが、従来の治療法と併用することにより抗腫瘍効果を相乗効果が期待されることも報告されている。G47Δ は、前立腺癌細胞においてタキサン系薬剤との併用が有効であったことが報告されているが、CDDP との併用に関する具体的な報告はなかった。さらに、胚細胞腫瘍、特に泌尿器悪性疾患の一つである精巣腫瘍に対し、遺伝子組み換えウイルスを使用した報告も今までなかった。NSGCT は、CDDP が著効した場合でも、CDDP 投与量が多いため、抗癌剤減量による副作用軽減が可能であれば、その意義は小さくない。CDDP とウイルス併用により、抗癌剤減量が可能になれば、副作用を軽減しつつ、治療効果は増強されることが期待できる。この点からも、CDDP 耐性になった場合、癌ウイルス療法が選択肢となることの意義は、臨床的に極めて大きい。また、NSGCT の予後不良因子の一つである、脳転移症例は、癌ウイルス療法の絶好の対象である。

以上の背景をふまえて、精巣腫瘍の中でも、従来の治療に抵抗性を示すことがある、NSGCT に焦点を置き、G47Δ の抗腫瘍効果を *in vitro* 実験、*in vivo* 実験により検討した。ウイルスは、G47Δ の他、G47Δ を基本骨格とするコントロールウイルス T-01 および T-mfIL12 の 2 種類を使用した。T-mfIL12 は、マウス IL12 遺伝子である p35 と p40 遺伝子が、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター下に発現する、機能付加型、「武装型」G47Δ である。

本研究では、ヒト非セミノーマ精巣腫瘍細胞株である NTERA-2、Tera-1、ITO-II およびマウス非セミノーマ精巣腫瘍株である F9 を使用した。また、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、1μM から 2μM、4μM、8μM、16μM まで上げた後、CDDP 抵抗性維持目

的に  $2\mu\text{M}$  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。

In vitro 実験では、NTERA-2、NTERA-2R、Tera-1 を 6-well プレート の各 well に  $2.0 \times 10^5$  個の細胞密度で生着させ、 $37^\circ\text{C}$  で一晚培養した。もう一種類のヒト非セミノーマ精巣腫瘍細胞株である ITO-II は、 $5.0 \times 10^5$  個、また、マウス非セミノーマ精巣腫瘍株である F9 は  $2.0 \times 10^4$  個の細胞密度で生着させた。1%IFBS 添加 DPBS で希釈したウイルスを、MOI (multiplicity of infection) = 1.0、0.1、0.01 で  $700\mu\text{L}$  ずつ各 well に感染させた。感染翌日から 4 日後まで、各 well の生細胞数をカウントし、同日にカウントした mock 群の生細胞数との比率 (生細胞率) をグラフ化した。NTERA-2 と NTERA-2R では T-01 MOI=0.1 で、また F9 では T-01 MOI=1.0 で感染 3 日後の生細胞率は約 9% 以下となり、高い殺細胞効果を示した。また、T-01 MOI=0.1 では、ITO-II と Tera-1 の感染 4 日後の生細胞率はそれぞれ約 17% と約 45% と、中等度の殺細胞効果を示した。また、T-mfIL12 の殺細胞効果は、T-01 とほぼ同様の結果であった。これらの結果は、複数の NSGCT 細胞で T-01、T-mfIL12 は共に高い殺細胞効果を発揮することを示した。

In vivo 実験では、作成しえた 3 つの皮下腫瘍モデル、ヒト NSGCT 細胞由来の NTERA-2 モデルと NTERA-2R モデル、およびマウス NSGCT 細胞由来の F9 モデルにおいて、ウイルス治療を行い、ウイルス治療群と mock (ウイルス未治療) 群の腫瘍体積を比較し、統計学的に解析した。NTERA-2 モデルと NTERA-2R モデルは、各々  $1.0 \times 10^6$  個の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確立した。また、F9 モデルは、 $5.0 \times 10^5$  個の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。

治療は、ウイルスを腫瘍内に直接投与する手法と、CDDP を腹腔内に投与する方法により行った。具体的には、腫瘍径  $\phi 5\text{ mm}$  前後に達した時点で、全マウスをウイルス投与群および mock 群に振り分け、ウイルスまたは mock を含む  $20\mu\text{L}$  の希釈液を腫瘍内投与した。1 回目の投与を Day0 とし、3 日後の Day3 に同様の治療を行った。また、CDDP は、マウス 1 匹あたり  $0.05\text{ mg}/0.1\text{ mL}/25\text{ g}$  (マウスの重量) の用量を Day0 にのみ腹腔内投与した。

NTERA-2 モデルでは、まず、T-01 用量設定試験を  $1.0 \times 10^6$  pfu (plaque forming unit : ウイルスの力価を表す単位) 群、 $2.0 \times 10^5$  pfu 群、 $4.0 \times 10^4$  pfu 群、mock 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 ( $4.0 \times 10^4$  pfu) でも、有意に強い抗腫瘍効果を認めた。次いで、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。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。これは、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を示唆している。

また、NTERA-2R モデルでは、T-01  $1.0 \times 10^6$  pfu 群と未治療の 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 $\Delta$   $1.0 \times 10^6$  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。

さらに、F9モデルでも、上記と同様の T-01 用量設定試験を行ったところ、Day9の時点で、T-01  $1.0 \times 10^6$  pfu 群は、mock 群に比して有意な腫瘍体積縮小を認めた。Day12の時点で、T-01  $1.0 \times 10^6$  pfu 群は、T-01  $2.0 \times 10^5$  pfu 群と T-01  $4.0 \times 10^4$  pfu 群に比して、有意差はなかったものの腫瘍体積抑制の傾向を認めた。また、T-01  $4.0 \times 10^4$  pfu 群、T-mfIL12  $4.0 \times 10^4$  pfu 群の2つの群と T-01 未治療の mock 群の合わせて3群で IL-12 発現ウイルスとコントロールウイルス T-01 との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。

以上の *in vitro* 実験、*in vivo* 実験の結果、唯一の第三世代遺伝子組み換え HSV-1 は、その抗腫瘍効果を NSGCT においても強力に発揮することが示された。また、その効果は、CDDP 併用および IL-12 発現により増強した。さらに、CDDP 抵抗性 NSGCT であっても、抗腫瘍効果は強力に発揮され、今後の臨床応用が期待される。第三世代遺伝子組み換え HSV-1 は NSGCT の有効な治療戦略となりうることが、示唆された。