

論文の内容の要旨

新規機能付加型単純ヘルペスウイルス I 型の開発と治療効果の検討

伊藤博崇

グリオーマ（神経膠腫）はグリア細胞を発生母地とする腫瘍で、原発性脳腫瘍の約 30%を占める。そのうちの約半数を最も悪性度の高い膠芽腫が占め、その 5 年生存率は 10%以下と非常に予後が悪い。膠芽腫は脳実質内に浸潤性に発育するため、外科的治療による根治は難しく、可及的広範囲な外科的切除に続いて、放射線治療と化学療法を併用する集学的治療が現在の標準治療となっているが、ここ数十年での予後の改善はほとんど見られておらず、既存の治療法とは抜本的に異なる新しいアプローチが必要である。がん治療用ウイルスは腫瘍細胞に感染した後、その細胞内の分子機構を利用して自己複製を行い、その過程で宿主となった腫瘍細胞を破壊する。複製したウイルスは周囲の腫瘍細胞に感染して更に腫瘍細胞を破壊しながら複製するというサイクルを繰り返して抗腫瘍効果を発揮する。単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）はウイルス療法に有利な以下の特徴を持つ。すなわち、①ヒトのあらゆる種類の細胞に感染可能である。②ウイルスの生活環とゲノム配列が解明されている。③比較的低い感染多重度ですべての細胞の死滅が可能である。④チミジンキナーゼを欠損していない場合、抗ウイルス薬による増殖抑制が可能で、安全性が確保しやすい。⑤ウイルス遺伝子が解明されており、遺伝子操作を加えることが可能である。⑥ウイルスゲノムが大きく、挿入できる遺伝子の制約が少ない。⑦ウイルス遺伝子の安定性が高く、ヒトゲノムに組み込まれない。⑧ウイルス感受性を示す実験動物が存在し、前臨床的評価を行える。⑨ウイルスの細胞間伝播に血中の抗ウイルス抗体が影響せず、繰り返し投与が可能である。G47Δは、HSV-1 の 3 つの遺伝子に遺伝子組換え操作によって人為的な変異を導入することで、腫瘍細胞特異的な殺細胞効果と全身の抗腫瘍免疫を惹起して強力な抗腫瘍効果を呈する第三世代遺伝子組換え HSV-1 である。G47Δは膠芽腫に対する新規治療法の一つの有力な選択肢として注目され、2009 年 11 月から 5 年間実施された第 I・II a 相試験での安全性の確認の後、2015 年 5 月より第 II 相試験が医師主導治験として開始され、現在進行中である。本研究では G47Δに蛋白 X 発現遺伝子を挿入し、腫瘍局所におけるウイルス複製と同時に X を発現する新規ウイルス T-X を作製し、その効果の検討を行った。

はじめに、T-X の作製、X の発現と機能評価を行い、以下の結果を得た。

①X をエンコードする cDNA を作製の後、細菌人工染色体と 2 つのリコンビナーゼを利用した遺伝子組換えシステムである T-BAC システムを用いて G47Δ の ICP6 遺伝子欠失部位に挿入することで、T-X を作製した。

②*in vitro* での感染細胞上清を用いた Western blotting および ELISA によって、発現蛋白が目的とする X であることを確認した。さらに皮下腫瘍および血清中の X の ELISA を行い、腫瘍局所に限局した X の発現を確認した。

③*in vitro* における蛋白機能評価試験で、X に目的とする機能があることを確認した。

一方で、ヒトグリオーマ細胞株 U87MG を用いたマウス脳内腫瘍モデルにおける免疫組織化学染色での検証実験を行ったところ、T-X 群ではコントロールウイルスである T-01 と比較して、病理所見の明らかな差は認められなかった。

次に抗腫瘍効果に関する評価実験を行い、以下の結果を得た。

①*in vitro* における U87MG およびグリオーマ幹細胞 TGS に対するウイルスの殺細胞効果に関しては、T-01 と同等であった。

②*in vivo* における抗腫瘍効果に関して、U87MG を用いたマウス皮下腫瘍モデルおよび脳内腫瘍モデルに対する治療実験では、T-01 と比較して腫瘍増大抑制効果や生存期間延長効果に有意差は認めなかったが、TGS を用いたマウス脳内腫瘍モデルに対する治療実験では有意な生存期間延長効果を認めた。

これらの結果から、T-X の *in vivo* における抗腫瘍効果の増強の可能性が示唆された。

さらに、抗腫瘍効果の増強の原因検索のため、U87MG 脳内腫瘍モデルを用いた腫瘍浸潤マクロファージについてフローサイトメトリーによる解析を行い、以下の結果を得た。

①U87MG 脳内腫瘍は通常 pro-tumoral phenotype である M2 マクロファージが優位な状態であり、ウイルス投与によって一時的に cytotoxic phenotype である M1 マクロファージ優位な状態へ移行した後、ウイルス投与後 6 日目までに、もとの M2 マクロファージ優位な状態に戻った。

②T-X 投与によって、この一時的な M1 マクロファージ優位な状態が遷延した。

これらの結果より、M1 マクロファージは抗腫瘍効果を持つことから、抗腫瘍効果増強の原因のひとつとして、T-X 投与による M1 マクロファージ優位な状態の遷延作用が考えられた。

一方で、M1 マクロファージは抗ウイルス効果を持つことから、T-X 投与によるウイルス力価の低下が懸念されたが、U87MG 皮下腫瘍モデルを用いたウイルス複製能の経時的評価では、ウイルス投与後 7 日目までに、ウイルス力価の有意な低下は認めなかった。

以上より、本研究では、ウイルス感染局所における蛋白 X の発現によって、グリオーマに対する抗腫瘍効果の増強が示され、その一因として、マクロファージの M1/M2 移行に対する作用が考えられた。