

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 博崇

本研究は、遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) である G47 $\Delta$  を用いたウイルス療法の治療効果を高めるために、蛋白 X 発現型 G47 $\Delta$  (T-X) を作製し、ヒト脳腫瘍細胞株を用いてその効果の検証を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. X 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 G47 $\Delta$  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、T-X の発現蛋白が目的とする X であることが示された。さらにマウス皮下腫瘍モデル、脳内腫瘍モデルを用いて、それぞれ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発現が示された。蛋白機能評価試験で、T-X の発現蛋白が目的とする効果を持つことが示された。
3. *in vitro* cytotoxicity assay および *in vitro* replication assay では、T-X の殺細胞効果・複製能はコントロールウイルス T-01 と同等であることが示された。一方で、U87MG および膠芽腫の手術検体から樹立した glioma initiating cell である TGS を用いた皮下腫瘍・脳内腫瘍モデルでの抗腫瘍効果の検討実験では、T-X の抗腫瘍効果は T-01 と比較して増強を示した。
5. *in vivo* における T-X の抗腫瘍効果増強の原因検討のために行った 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は、T-X と T-01 の間には病理所見の明らかな差は認めなかった。
6. U87MG を用いたマウス脳内腫瘍モデルにおけるフローサイトメトリーを用いたマクロファージの分画の経時的検討では、ウイルス投与によるマクロファージの M1 への移行および X によるその遷延効果が示された。一方で、U87MG を用いたマウス皮下腫瘍モデルにおける *in vivo* replication assay ではウイルス力価への影響は認めなかった。これらの結果から、T-X は X を腫瘍局所で発現することで、ウイルス複製能に対して影響を与えることなく、ウイルス投与に伴うマクロファージの M1 への移行を遷延し、このことが抗腫瘍効果増強の一因となった可能性が示された。

以上、本論文は、蛋白 X 発現型 G47 $\Delta$  を作製し、増強した抗腫瘍効果を示すことを明らか

にした。また、腫瘍局所で発現した X は G47 $\Delta$  投与に伴うマクロファージの M1 への移行を遷延することで、抗腫瘍効果の増強に作用した可能性が示された。本研究は、蛋白 X 発現型 G47 $\Delta$  を作製し、その効果の検討を通じて、ウイルス療法で起こる腫瘍環境の変化に対する X の影響の解明に寄与し、抗腫瘍効果の増強によって、より効果的なウイルス療法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。