

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 広太

本研究は、難治性の造血器腫瘍である多発性骨髄腫に対する新たな治療戦略として、遺伝子組み換えワクシニアウイルスを用いた腫瘍溶解ウイルス療法の開発を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 弱毒化ワクシニアウイルス株 LC16m8Δ-B5R-flucIRESgfp を様々な造血器腫瘍細胞株に感染させたところ、骨髄腫細胞株において高い感受性が認められ、低いウイルス価から骨髄腫細胞に対する細胞障害活性が認められた。感染細胞内でワクシニアウイルスが実際に増殖していることも確認された。またワクシニアウイルスは患者由来骨髄腫細胞に対しても感染性を示した。
2. ワクシニアウイルスの増殖・伝播に重要な役割を果たす B5R 遺伝子の 3'非翻訳領域(UTR)に、様々な骨髄腫細胞株で一様に発現が低下しているマイクロ RNA (miRNA) の一つである let-7a の標的配列を 4 コピー挿入した LC16m8Δ-B5Rgfp-let-7a target×4 を作製した。In vitro でこのウイルスは、let-7a の変異標的配列を挿入した LC16m8Δ-B5Rgfp-let-7a-mut target×4 と比較して、骨髄腫細胞株では感染率が変わらなかったが、正常細胞では感染率が低下した。すなわち、let-7a による制御によって正常細胞への感染性が低下することが示された。
3. ワクシニアウイルスの TK 遺伝子にホタルルシフェラーゼ(Fluc)および GFP の発現ユニットを挿入することで TK を不活化し、B5R 遺伝子の 3'UTR に let-7a 標的配列を 4 コピー挿入した miRNA (let-7a)/TK 制御性ワクシニアウイルス(MDVV)を作製し、骨髄腫異種移植モデル(異所性モデル)を用いて効果を検討した。比較対象として元来のワクシニアウイルス(Wild-type)、TK のみ不活化したウイルス(ΔTK)を感染させた場合は、腫瘍の縮小は認められたがウイルスが皮膚を中心に全身に拡がり、その毒性によりマウスは死に至った。一方 MDVV では、腫瘍特異性の高い分布と腫瘍縮小効果、およびマウスの生存期間の延長が認められた。
4. SCID マウス骨髄に生着するヒト骨髄腫細胞株 KPMM2 へ、ウミシイタケルシフェラーゼ(Rluc)および GFP を遺伝子導入し、生体内イメージングで腫瘍増殖が評価可能な同所性骨髄腫モデルを作製した。MDVV は in vitro では KPMM2 細胞に対し高い感染性を示し、低いウイルス価においても細胞障害活性を示した。しかし KPMM2 を用いた同所性モデルに MDVV を経静脈投与しても、腫瘍量の減少や生存期間の延長はもたらさなかった。GFP 陽性 MDVV 投与の 72 時間後、骨髄内の腫瘍細胞をフローサイトメリーで解析したところ、GFP 陽性細胞

(ウイルス感染細胞)は認められず、骨髄内の腫瘍細胞までウイルスが十分に到達していない可能性が考えられた。

5. この問題点を克服するため、ウイルスを細胞に感染させ標的の病巣へ運ぶ「cell-based viral delivery」のコンセプトを、KPMM2 細胞を用いて検討した。*In vitro* では MDVV 感染 KPMM2 は、単核細胞や間葉系細胞の存在下においても標的の腫瘍細胞に 2 次感染を引き起こし、抗腫瘍効果を発揮した。しかし同所性モデルへ 10^5 個、 10^6 個の MDVV 感染 KPMM2 細胞を経静脈投与した際には、特に後者においてマウス内に感染を起こすことはできたが、MDVV の腫瘍特異的分布や抗腫瘍効果、延命効果は認められなかった。皮下腫瘍と異なり、骨髄内では標的細胞との間に物理的な距離や様々な介在物があることが、効率的な感染を引き起こせない原因と考えられた。

以上、本論文は let-7a/TK 制御性ワクシニアウイルスが、正常組織への毒性を大幅に軽減しながら骨髄腫細胞に対して高い細胞障害活性を發揮することを示した。また、骨髄腫の主病変である骨髄内へウイルスを到達させ、効率的に感染を引き起こすことの困難さも明らかにした。本研究は、let-7a 制御性ワクシニアウイルスを初めて骨髄腫に応用した点、また、同所性異種移植モデルを用いて、骨髄病変へのワクシニアウイルスの応用に課題があることを初めて示した点で新規性があり、学位の授与に値するものと考えられる。