

博士論文（要約）

Development of oncolytic virotherapy for multiple myeloma  
using recombinant vaccinia virus

（多発性骨髄腫に対する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）

佐藤 広太

多発性骨髄腫は、骨髄における異常形質細胞のクローン性増殖を特徴とする難治性の造血器腫瘍である。高齢者に多く、貧血や腎機能障害、溶骨病変、高カルシウム血症など様々な臓器障害をもたらす。近年、自家造血幹細胞移植や免疫調節薬、プロテアソーム阻害薬といった新規治療法の導入によりその予後は大きく改善しつつあるが、未だ治癒を得ることは極めて困難な疾患である。

腫瘍溶解ウイルス療法は、感染した細胞内で増殖しながら宿主細胞を死滅させるというウイルス本来の性質を利用した治療法である。直接的な腫瘍溶解作用だけでなく、2 次的な抗腫瘍免疫の誘導など、従来の化学療法や放射線療法にはないメカニズムによって腫瘍を攻撃できる、難治性腫瘍に対しても有望な治療法である。ポックスウイルス科に属するワクシニアウイルスは、腫瘍溶解ウイルスの一つであり、他のウイルスと比較し、速い増殖サイクルや哺乳類組織に対する高い親和性、宿主細胞への遺伝子挿入が起こらないことなど、様々な利点を備えている。腫瘍溶解ウイルス療法は固形癌領域では広く研究され臨床応用も始まっているが、血液がん領域では、腫瘍細胞の感受性が一般に低いこともあり、その研究は進んでいない。我々の行ったスクリーニングでは造血器腫瘍の中で、多発性骨髄腫が例外的にワクシニアウイルスに対し高い感受性を示したことから、今回多発性骨髄腫を対象として腫瘍溶解ウイルス療法の開発に取り組んだ。

本研究では、純国産ワクシニアウイルスワクチン株の安全性に注目し、これをもとに腫瘍特異性を持たせるための改変を行った。まずウイルス増殖の際に必要なチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現ユニットを挿入して、TK を不活化した。さらに、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'非翻訳領域へ、マイクロ RNA (miRNA) の一つである let-7a の標的配列を挿入した。miRNA は 20 塩基程度の非翻訳性 RNA で、標的となるメッセンジャーRNA の 3'非翻訳領域へ結合して当該遺伝子の発現を抑制する。miRNA は、臓器ごとに異なる発現パターンを示し、種々のがんにおいても特徴的な発現異常が知られている。今回用いた let-7a は、正常細胞では高発現しているが骨髄腫細胞では発現が低下している miRNA の一つである。我々の検討した miRNA の中でも、let-7a が最も正常細胞と骨髄腫細胞との発現レベルの差が大きかった。これらの改変により、TK 活性が高く、かつ let-7a 発現が低下している腫瘍細胞においてのみ高率に増殖する、miRNA (let-7a)/TK 制御性ワクシニアウイルス；MDVV (miRNA/TK-doubly regulated vaccinia virus) を作製した。

まず *in vitro* では、正常細胞において let-7a 制御性ワクシニアウイルスの感染性が、野生型と比較して低下する一方、骨髄腫細胞株では同等の感染性を示すことが確認された。次に、*in vivo* での抗腫瘍効果・腫瘍特異的増殖性を評価するため、ウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) 発現ヒト骨髄腫細胞株 (RPMI8226) を免疫不全 (SCID) マウスの皮下へ移植し (異所性モデル)、28 日後にウイルスを経静脈投与して継時的にバイオイメージングを行った。比較対象として元来のワクシニアウイルス (Wild-type) および TK 遺伝子のみ不活化したウイルス ( $\Delta$ TK) を感染させた場合には、いずれも抗腫瘍効果は見られたものの、特に前者では体毛のない皮膚を中心に腫瘍以外の部位にも感染が拡がり、マウスは死に至った。一方 MDVV では、皮下腫瘍に極めて特異性の高いウイルス増殖と腫瘍縮小効果、および担がんマウスの生存期間の延長が確認された。

骨髄腫細胞は高い骨髄指向性・依存性を示し、骨髄微小環境との相互作用がその増殖や治療抵抗性に重要な役割を果たしている。このため次に、全身の骨・骨髄病変を有する同所性モデルを用いて MDVV の有効性を検証した。SCID マウス骨髄に生着するヒト骨髄腫細胞株 (KPMM2) に Rluc を発現させ、マウスへ移植して 28 日後に MDVV を経静脈投与した。しかし異所性モデルと異なり、ウイルスは腫瘍特異的な集積は示さず、明らかな抗腫瘍効果も得られなかった。その大きな原因として、経静脈投与した際にウイルスが病変部へ十分に到達していない可能性が考えられた。同様の現象は固形癌領域においても認識されており、ウイルスを効率的に運搬するため様々な工夫がなされてきたが、今回我々は細胞にウイルスを運搬させる方法を試みた。KPMM2 はワクシニアウイルスに対して高い感受性を示し、ウイルス感染後も骨髄へのホーミングに重要な CXCR4 の発現を保っていた。In vitro では、MDVV 感染 KPMM2 は標的細胞に 2 次的なウイルス感染を引き起こし、抗腫瘍効果を発揮した。この効果は、骨髄環境を模倣した、間葉系細胞および単核細胞存在下においても認められた。さらに MDVV 感染 KPMM2 は、SCID マウスへ経静脈的に投与した後、48~72 時間後に骨髄を中心とした分布を示した。これらの結果に基づき、腫瘍細胞によるウイルスの運搬を同所性モデルにおいて検証した。キャリアとなる細胞の数は、 $10^5$  と  $10^6$  の 2 条件を検討した。特に後者では、マウスに 2 次的なウイルス感染が十分惹起されることが示されたが、骨髄への集積は一時的であり、経時的な観察では感染の拡がりは皮膚中心となり、有意な腫瘍量の減少や生存期間の延長効果はみられなかった。その原因として、キャリア細胞がうまく骨髄内へ到達し、そこでウイルスを放出したとしても、骨髄中では皮下腫瘍と異なり標的腫瘍

細胞との間に様々な介在物や物理的な距離があり、十分な感染を生じ得なかった可能性が考えられる。骨髄腫細胞に対し高い細胞障害活性を持ち、正常細胞への毒性が大きく軽減された MDVV;miRNA (let-7a)/TK 制御性ワクシニアウイルスは、新規骨髄腫治療法として有力な候補と考えられるが、臨床への応用には、骨・骨髄病変に対する効率的なウイルス運搬法のさらなる工夫が必要である。

すでに固形癌領域で示されているように、腫瘍細胞の溶解は抗腫瘍免疫を惹起する「きっかけ」であり、誘導される免疫こそが、がんウイルス療法の主な柱とも言える。骨髄腫においても最初の腫瘍溶解がうまく引き起こせれば、抗腫瘍免疫の誘導による治療効果が期待できると考えられる。免疫不全マウスを用いた今回の検討ではこの抗腫瘍免疫の評価が出来ないという制限があり、これを再現し得るモデルを用いてさらなる検討を重ねることも今後の課題である。