

論文の内容の要旨

論文題目 大腸がんに対する腫瘍マーカーによる再発予測とウイルス療法の開発

氏名 阿部 真也

根治 (R0) 切除は大腸がんの治療における第一選択とされる。しかし、R0 切除が得られても癌の再発をきたす症例が少なからずあるため、再発の予防と早期発見が大腸がん治療の重要な課題である。一方で R0 切除が得られなければ現行の治療では十分な病態のコントロールが行えないため、予後が極めて悪く、より効果のある治療の開発が望まれている。

本研究ではまず R0 切除が得られた患者の再発の予測因子を検討した。Stage IV 大腸がんは肝転移、肺転移、遠隔リンパ節転移など多くの病態からなる多様な集団であることから Stage I-III とは病態が異なる。そこで R0 切除をなし得た大腸がん患者を 2 つに分け、Stage I-III と Stage IV の患者それぞれについて検討した。本邦で保険収載され、大腸がんの重要なマーカーとなっている CEA (carcinoembryonic antigen)、CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)、並びに抗 p53 抗体に着目した。次に R0 切除不能進行・再発大腸がん患者に対する遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) G47Δ を用いた、ウイルス療法による新規治療の開発を検討した。ウイルス療法とはがん細胞内でのみで複製するように遺伝子改変したウイルスを用い、ウイルスががん細胞内で複製する過程でその細胞を破壊する治療である。これまでに HSV やアデノウイルスなどの様々なウイルスを用いた開発が行われているが、本研究では最も開発の進むウイルスの 1 つである HSV-1 を用いた。G47Δ は本研究が行われた研究室で開発され、これまでの前臨床試験において、脳腫瘍、乳がん、悪性神経鞘腫、前立腺癌などで高い安全性と優れた治療効果が示され、2009 年 5 月から 5 年間にわたり、再発膠芽腫患者を対象に第 I/II 相臨床試験が東京大学で実施された。この試験で G47Δ の脳腫瘍内投与における安全性が確立し、一部の患者で腫瘍の縮小と長期生存がみられるなどの治療効果が示されたことより、2015 年 5 月からは第 II 相試験が医師主導治験として進行している。また、前立腺がんと嗅神経芽細胞腫に対する臨床試験が 2013 年より行われている。

第 1 章では Stage I-III 大腸がん患者における術前後の抗 p53 抗体価の臨床的意義を検討した。26.3% の患者において術前に抗 p53 抗体価の上昇を認め、こういった患者では術後の抗 p53 抗体価が再発時に上昇を認め、再発発見におけるサーベイランスマーカーとなることが示唆された。次にこれまで調査されていない抗 p53 抗体価の減少率に着目した。術前抗 p53 抗体高値群の患者の中で、術後に再発を認めた患者においては術後早期の抗 p53 抗体の減少率が低いことが示され、このことは微小であるが残存する p53 変異タンパクを含む腫瘍が残存している可能性を示している。また術前抗 p53 抗体高値群においては、術後 3 か月に血清抗体価が術前の 4 割以上の場合には再発率が高いことが示され、このような患者はより徹底したサーベイランスや強力な

術後補助化学療法を考慮すべきと考えられる。

第2章では Stage IV 大腸がん患者における術後の CEA 値および CA19-9 値の有用性を検討した。Stage IV 患者は R0 切除を行えたとしても再発率が非常に高いことから、再発を予測することは術後の治療戦略にとって重要である。転移臓器の個数、腹膜播種を有することなどは R0 切除後の Stage IV 患者における再発危険因子たりうるとの報告はあるが、Stage IV 患者は前述の通り多様な病態を含むため、再発を予測する確実なマーカーは未だ確立していない。Stage I-III に関しては CEA 値、CA19-9 値が予後予測因子となることは報告されているが、Stage IV に関しての報告はこれまでにないため検討を行った。全ての患者で R0 切除が得られたにも関わらず、数名の患者は術後 CEA 値、CA19-9 値が高値のままであった。CEA の半減期は約 4 日、CA19-9 の半減期は約 1 日であることから、再発を引き起こす遺残腫瘍が術後の CEA または CA19-9 高値に反映されている可能性があるとして仮説を立てた。単変量解析において CEA と CA19-9 はいずれも、術後に高値であった患者における再発は極めて多かったが、術前の CEA と CA19-9 値の上昇は再発との相関は認めなかった。さらに術後の腫瘍マーカーを組み合わせると無再発生存率が顕著に層別化され、術後 CEA と CA19-9 がともに高値であった患者は 2 年以内に全例で再発を認めた。多変量解析においても術後の CEA と CA19-9 が上昇していることは非常に強い再発危険因子として残り、再発率が高い患者群の選定に術後の CEA 値と CA19-9 値は有用である。

第3章ではまず、ヒト大腸がん細胞株の皮下腫瘍及び肝転移モデルに対する G47Δ の抗腫瘍効果を検討した。*In vitro* において検討した 5 種類の大腸がん細胞株に対し、感染効率と複製能に依存した殺細胞効果を認めた。また、BALB/c ノードマウスに作成した HCT116 皮下腫瘍及び BALB/c マウスに作成した CT26 皮下腫瘍に対し、ウイルス量に依存した抗腫瘍効果を示し、免疫が正常なモデルでも治療効果が示された。CT26 皮下腫瘍内に投与した G47Δ は投与後早期に排除されるが、ウイルスの直接的ながん細胞の破壊に加え、CT26 細胞株への腫瘍特異的免疫を獲得することをマウスの脾臓から採取したリンパ球を用いて、Enzyme-Linked ImmunoSpot assay にて示した。この抗腫瘍免疫による全身性の抗腫瘍効果は、BALB/c マウスの両側側腹部に作成した CT26 皮下腫瘍の片側のみに G47Δ を腫瘍内投与することで、非投与側の皮下腫瘍の成長が有意に抑制されたことから示された。さらに本研究では、immunogenic cell death (ICD) に着目した。ICD とは、放射線やある種の抗癌剤により通常のアポトーシスやネクローシスに比べ、免疫応答を惹起しやすい形でがん細胞が殺傷されることである。近年ではコクサッキー B 群ウイルス、アデノウイルスなどのウイルス療法が ICD を誘導することが報告されている。ICD にはカルレチクリン、High Mobility Group Box 1 (HMGB1) などの傷害関連分子パターンと呼ばれる細胞内物質が関与し、免疫を惹起する。大腸がん細胞株において G47Δ がカルレチクリンの細胞膜への発現と HMGB1 の細胞外分泌を起こすことが *in vitro* で示された。*In vivo* においても CT26 皮下腫瘍マウスモデルにおける G47Δ 群の血清中の HMGB1 濃度が上昇して

いたことから G47Δ の ICD 誘導が示唆された。また、G47Δ の皮下腫瘍内投与は腫瘍微小環境の変化を起こし、腫瘍内への CD8⁺細胞と CD4⁺細胞の誘導や PD-1⁺/CD8⁺細胞や制御性 T 細胞の浸潤を抑制することをフローサイトメトリーによる解析で示した。このことは、G47Δ により CD3⁺/CD8⁺細胞の活性が維持される環境が作られていることを示しており、ICD がもたらすがん微小環境変化にも矛盾しないものであった。

続いて大腸がんの転移、再発臓器で最も多い肝転移の治療への応用を検討した。BALB/c マウスを用いた CT26 経門脈的肝転移モデルにおいて、G47Δ の転移巣への腫瘍内投与及び尾静脈投与はともに対照群より有意に予後を延長させた。以上より、多発あるいは再発の多い肝転移の治療に抗腫瘍免疫を誘導する G47Δ を用いたウイルス療法は新たな治療方法となると期待される。

さらに G47Δ の治療効果を増大させることを目的に抗がん剤との併用を検討した。大腸がん全身化学療法第 1 線に用いられる 5-FU とオキザリプラチンに着目し、本研究で検討したヒト大腸がん細胞株 HCT116 とマウス大腸がん細胞株 CT26 を用いて併用効果を検討した。In vitro 実験において、HCT116 に対する 5-FU 及びオキザリプラチンと G47Δ 併用においては相乗効果を認めた。一方で CT26 に対しては、5-FU 及びオキザリプラチンともに併用時に拮抗作用が示された。しかし、低濃度の抗がん剤はウイルスの複製能へ影響を与えないことから至適濃度での併用により上乗せ効果が期待された。マウス皮下腫瘍モデルを用いた in vivo 実験により、各抗がん剤との併用は上乗せ効果を認めたことから集学的治療にも応用できる可能性が示唆された。次に抗がん剤治療が根治療法とならない原因の 1 つである、抗がん剤耐性大腸がんへの治療応用を検討した。がん細胞が抗がん剤耐性を獲得するメカニズムは十分には解明されていないが、本研究では暴露する抗がん剤濃度を低濃度から高濃度へ段階的に変えることで 5-FU 耐性 CT26 細胞株 (CT26FuR) を樹立し、in vitro 及び in vivo で耐性が得られたことを確認した。CT26FuR に対し、in vitro における G47Δ の殺細胞効果と複製能は親株の CT26 に対するものと同等であり、in vivo における抗腫瘍効果も同等であることが示された。以上から G47Δ は抗癌剤の感受性の有無によらずに大腸がんの治療に有力な治療法となると思われる。

以上、外科的に切除し得た大腸がんの再発の早期発見 (第 1,2 章) 及び切除不能又は再発を来した大腸がんの治療 (第 3 章) における新たな知見を得ることができた。本研究が大腸がん治療の発展に寄与することが期待される。