



Title	第三世代がん治療用HSV-1を用いた口腔・食道重複癌に対する新規治療法の開発
Author(s)	日尾, 清太郎
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101533
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (日尾清太郎)

論文題名 第三世代がん治療用 HSV-1 を用いた口腔・食道重複癌に対する新規治療法の開発

論文内容の要旨

【序論】

口腔癌と他の臓器の癌を併発する重複癌の症例は増加しており、なかでも食道は最も頻度の高い臓器である。重複癌症例では治療が複雑化し、治療成績を悪化させる。よって口腔・食道重複癌に対する低侵襲な新規治療法の開発が切望されている。がんウイルス療法は、がん細胞でのみ複製するよう遺伝子改変したウイルスを用いるがん治療の新しい分野である。ウイルスの直接的な殺細胞効果に加え宿主の抗腫瘍免疫を惹起することでがんの制御を図る。基となるウイルスにはヒト単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）などがあり、HSV-1の病原性に関する三つの遺伝子 $\gamma 34.5$ 、 $ICP6$ 、 $\alpha 47$ を不活化した第三世代がん治療用HSV-1であるG47 Δ は、悪性膠芽腫の治療薬として2021年に薬事承認されている。さらに、G47 Δ の基本骨格にインターロイキン12などの免疫賦活因子を導入した武装型がん治療用HSV-1も研究されており、それらのコントロールとしてシャトルベクターのみを導入したT-01が作製された。

先行研究より、扁平上皮癌細胞をマウスの舌や食道に接種して作成したモデルで、G47 Δ の腫瘍内投与の有効性が示されている。そこで本研究では口腔・食道重複癌に対する新たな低侵襲治療法の開発を目的として、T-01の新規投与法による口腔・食道重複癌モデルマウスへの感染確認や抗腫瘍免疫の賦活効果について検証を行った。

【方法】

- ・4NQO化学発がんモデルマウス作成：6週齢のメスのCBAマウスに4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO) を最終濃度1 mg / Lとなるよう飲用水に添加して16週間飼育し、続けて通常の飲用水で飼育を継続した。4NQO投与開始から20週、24週、28週で安楽死させ、舌・咽頭および食道を採取した。
- ・安全性試験：新規投与法を用いて6週齢のメスのA/JマウスにT-01、mock、Strain F（野生型HSV-1）を 5.0×10^6 pfu / mouseとなるよう1回投与し、体重、行動の変化および生存期間を記録した。行動観察の項目は〈外見（毛並みや姿勢、削瘦）／自発的活動性／刺激への反応性〉としてそれぞれ0～4の5段階で点数化し、合計点（0～12点）を評価した。観察期間は30日間とした。
- ・T-01の感染実験：4NQOモデルマウス（4NQO投与開始から24週）に、T-01または同量のmockを、新規投与法を用いて24時間間隔で2回投与した。T-01の力価は 5.0×10^6 pfu / mouse/回とした。最終投与から36時間もしくは7日の時点で安楽死させ、舌から食道までを摘出し、病理組織学的検討を行った。

【結果】

1. CBAマウスを用いた4NQO化学発がんモデルマウスは、舌および食道に扁平上皮癌を多発し上皮内癌から浸潤癌に至る過程を再現した

開始から20週、24週、28週のいずれの時点においても、舌および食道に肉眼的に観察可能な外向性や表在性の病変を多数認めた。病理組織学的に扁平上皮癌の組織像を認めた。

2. A/Jマウスにおいて、新規投与法でのT-01投与後、30日の観察期間中に致死的作用は示されず、体重減少は認められず、観察される行動に影響を生じなかった

T-01群とmock群は、全ての個体が全観察期間生存し、体重減少を示さず、行動観察上の変化を認めなかった。Strain F群は4個体中3個体が6日以内に死亡し、生存個体は体重減少傾向を示した。

3. 新規投与法でのT-01投与後36時間で、舌および食道の腫瘍への感染を認めた

舌の上皮内癌および扁平上皮癌に、ヘルペスウイルス感染に特徴的な細胞形態の変化を伴う組織像、およびHSV-1免疫染色の陽性反応を認め、T-01の感染が確認された。9個の標本中4個に感染を認めた。また食道の扁平上皮癌においても、ヘルペスウイルス感染特有の細胞形態変化を伴う組織像、およびHSV-1免疫染色の陽性反応

を認め、T-01の感染が確認された。感染部位に偏在は認めなかった。9個の標本中4個に感染を認めた。

4. T-01投与後36時間では、舌および食道の腫瘍へのCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞浸潤数に関して、感染の有無による差は認めなかった

舌、食道のそれぞれについて、ウイルス感染のある腫瘍と、感染のない腫瘍について比較した。いずれのサンプルでも腫瘍にCD4陽性T細胞の浸潤を認め、その内の少数がfoxp3陽性T細胞であった。CD8陽性T細胞はごく少数か、もしくは観察されなかった。いずれの群間でも有意差は認めなかった。

5. 新規投与方法でのT-01投与後7日で、舌扁平上皮癌においてCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞浸潤数がmockに比して有意に増加した

舌腫瘍においてCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞の有意な増加を認めた。foxp3陽性T細胞は有意な差はなかった。またTUNEL陽性反応を認め、CD8陽性細胞が特異的抗腫瘍免疫を獲得した可能性が示唆された。一方食道腫瘍ではCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞浸潤数の増加は認められず、TUNEL陽性反応も認めなかった。

【考察】

4NQO化学発がんマウスモデルは口腔と食道に腫瘍形成を認め、組織学的に扁平上皮癌であることが確認された。実際の口腔・食道癌重複癌の発生機序がfield cancerizationの概念に基づき発がん性物質の暴露によると考えられていることから、本モデルは口腔・食道重複癌モデルとして適切であると考えた。この4NQOモデルに対し、新規投与方法でのT-01投与で舌、食道の両病変へウイルスが感染した。しかし観察した腫瘍の感染率は舌、食道ともに4割程度であり、感染効率の改良が必要である。また安全性試験より、新規投与方法でのT-01の投与は為害性がなことが示された。

また、CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞に関して免疫染色で腫瘍への局在を検出することで、T-01投与による抗腫瘍免疫の賦活化について検証した。投与後36時間では変化は見られず、7日後に舌ではCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞ともに有意な増加が認められた。また、CD8陽性T細胞が誘導したアポトーシスと考えられるTUNEL陽性反応も確認された。よって舌においては抗腫瘍免疫が惹起されたことが示唆された。一方で、食道では腫瘍浸潤T細胞の増加を認めなかった。この理由として、抗腫瘍免疫賦活の機序はがん治療用HSV-1による細胞死が、免疫原性細胞死immunogenicity cell death (ICD) と呼ばれるがん抗原等の物質を産生する様態であることによると考えられているが、本結果では食道のHSV-1免疫染色でシグナルが弱かったことから、食道は舌と比較して感染巣が小さく、ICD産物の量が少なかった可能性が考えられる。またがん治療用HSV-1によって賦活された抗腫瘍免疫は、免疫系を介してウイルス感染のない遠隔腫瘍にも作用することがマウス腫瘍移植モデルにおいて報告されているが、本結果から舌と食道では腫瘍の抗原性が異なり、抗腫瘍免疫が働かなかったことが考えられた。さらに、臓器の違いによる腫瘍間質量の差などが抗腫瘍免疫応答の差となった可能性が考えられた。

本研究では、舌においてCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞の著明な増加を認めた一方、制御性T細胞regulatory T Cell (Treg) のマーカーであるfoxp3陽性T細胞については明らかな増加を認めなかった。がん免疫療法の視点から治療が奏功するか否かでHot tumorまたはCold tumorとする概念があり、Hot tumorでは腫瘍浸潤リンパ球tumor infiltrate lymphocyte(TIL)が多く、その中でもCD8陽性T細胞が多く、Cold tumorではTILが少ない一方Tregは多いとされる。第三世代がん治療HSV-1は、腫瘍を‘Cold’から‘Hot’に変えることが知られており、今回も舌においてfoxp3陽性T細胞の割合は低値のままCD8陽性T細胞の増殖を認めたことから、舌腫瘍をHotに変化させたことが示唆された。そのため、頭頸部癌や食道癌に適応のある免疫チェックポイント阻害剤との併用による相乗効果も期待できると考えられた。

【結語】

新規投与方法による第三世代がん治療用HSV-1の使用は、口腔・食道重複癌に対する新しい低侵襲治療法となる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (日尾清太郎)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 田中 晋
	副 査	教授 川端 重忠
	副 査	准教授 前田 隆史
	副 査	講師 宇佐美 悠
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、第三世代がん治療用ヘルペスウイルス (T-01) の新規投与法による口腔・食道重複癌に対する有効性を明らかにする目的で、4NQO 化学発がんモデルマウスを用いて検討を行った。その結果、T-01 を新規投与法にてモデルマウスに投与すると、舌および食道に発生した扁平上皮癌にウイルスの感染を認め、舌では抗腫瘍免疫の賦活化を示唆する所見が観察された。また、安全性試験により新規投与法による T-01 の使用は生体への為害性を示さなかった。</p> <p>以上の結果は、がん治療用 HSV-1 の新規投与法が口腔・食道重複癌に対する低侵襲な治療法となる可能性を示唆しており、博士 (歯学) の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		