



Title	腫瘍融解性ウイルス療法に用いる変異型単純ヘルペスウイルスの作製とその性状に関する研究
Author(s)	高岡, 洋生
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49773">https://hdl.handle.net/11094/49773</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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

氏名	高岡洋生
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第22828号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	腫瘍融解性ウイルス療法に用いる変異型単純ヘルペスウイルスの作製とその性状に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 阪井 丘芳 准教授 小川 裕三 准教授 大倉 正也

## 論文内容の要旨

## 【目的と意義】

腫瘍融解性ウイルス療法は、複製能を有するウイルスを腫瘍に感染させ、その直接的な細胞変性効果によって腫瘍を破壊する治療法である。この治療法で用いられる単純ヘルペスウイルスⅠ型(HSV-1)としては、神経毒性遺伝子 $\gamma_1$ 34.5を欠失させたものが多く用いられているが、病原性の低下に伴って腫瘍融解作用も減弱することが指摘されている。一方、HSV-1の自然変異体であるHF10は、複数の遺伝子変異をもち、病原性が低下しているにもかかわらず強い抗腫瘍作用を維持しているとされ、臨床研究が進められている。さらに、 $\gamma_1$ 34.5遺伝子を欠失させたHSV-1と細胞融合能を有するHSV-1を併用することで、口腔扁平上皮癌(OSCC)に対するHSV-1腫瘍融解作用が増強することも報告されている。そこで本研究では、HSV-1で神経毒性遺伝子 $\gamma_1$ 34.5遺伝子を欠失したR849と細胞融合能を有するHFを重感染させることによって神経毒性がなく、細胞傷害性が強い組換え体が形成される可能性について検討を行った。

## 【材料と方法】

1. 細胞として、ヒトOSCC由来SAS細胞、サル腎由来Vero細胞を用いた。ウイルスとしては、HSV-1の $\gamma_1$ 34.5遺伝子欠失部位にLac Zを挿入したR849株とHF株を用いた。ウイルスの感染力価はVero単層細胞でのブラック形成により測定した。
2. 遺伝子解析はウイルスDNAを制限酵素処理後アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色して切断パターンを観察した。また、HSV-1の遺伝子構造の

うちunique long(U<sub>L</sub>), unique short (U<sub>S</sub>)領域に存在する遺伝子に対して、プライマーを設定してpolymerase chain reaction (PCR)で増幅し、PCR産物についてシーケンシングを行った。3. Lac Z遺伝子の発現は5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal)染色にて検出した。4. 細胞傷害性は3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)法および遊離LDH量測定法にて測定した。

#### 【結果】

1. Vero 細胞に R849 と HF を重感染させ、産生ウイルスを回収し、Vero 細胞でブラック形成を行って X-gal 染色陽性で細胞融合を示すウイルスを分離した。クローニング操作を繰り返し、安定した表現形質と増殖能を示すクローン RH1, RH2 を分離した。
2. ウイルス粒子 DNA の制限酵素切断パターンでは、R849 と RH2, HF と RH1 が近似したパターンを示したが、RH2 には特有の切断片もみられた。Lac Z 遺伝子に対して PCR を行ったところ、R849, RH1, RH2 で検出され、HF では検出されなかった。サザンブロット法で、RH1 の検出濃度は R849, RH2 よりも低下していた。γ<sub>1</sub>34.5 遺伝子は、HF, RH1 で検出された。
3. U<sub>L</sub> から internal repeat 領域にかけて設計されたプライマーを用いて PCR を行ったところ、RH1 と RH2 の増幅物は HF と同様に予想よりも短く、U<sub>L</sub> の末端から IR<sub>L</sub> にかけて遺伝子を欠失していた。シーケンシングの結果、U<sub>L</sub> 領域では、RH1 と RH2 には親株である R849 と HF の遺伝子が混在していた。U<sub>S</sub> 領域は HF と近似していたが、U<sub>L</sub>53 と U<sub>S</sub>6 では親株とは違った塩基配列がみられた。
4. SAS 細胞に R849, HF, RH1, RH2 を感染させたところ、RH1 と RH2 は R849 や HF よりも大きなブラックを形成した。ウイルス産生量は、感染後 96 時間において RH1 および RH2 は R849 や HF よりも高かった。また、感染後 72 時間で RH2 は細胞外へのウイルス産生が顕著となった。
5. MTT 法において、RH2 感染細胞での生存率が顕著に低下した。遊離 LDH 量測定法においては、RH1, RH2 ともに親株と比較して細胞生存率の低下が顕著となった。

#### 【考察と結論】

培養細胞を用いて重感染を行い、安定して Lac Z 遺伝子を発現し、しかも細胞融合を示すウイルスクローンを分離した。これら分離したウイルスは、制限酵素切断パターンでは、RH1 は HF と、RH2 は R849 と近似しており、R849 の Lac Z と HF の細胞融合性遺伝子を合わせ持つ組換え体が形成されたものと考えられる。U<sub>L</sub> 領域と IR<sub>L</sub> 領域の PCR 解析では、RH1 と RH2 はいずれも HF と同じ欠失を生じており、シー

ケンシングでは、組換え体に特有の変異も認められた。これらの遺伝子構造が OSCC 細胞において、RH1 および RH2 が示す HF よりも強い細胞変性効果に寄与するものと思われる。

固形癌に対する腫瘍融解性ウイルス治療では、腫瘍内に投与したウイルスが細胞間を連続して伝播することが感染を拡大する上で重要である。重感染系で作製された組換え体ウイルスは、口腔癌治療における腫瘍融解性ウイルスベクターとして有用性が高いと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、腫瘍融解性ウイルス療法に用いる新規の単純ヘルペスウイルス I 型を培養細胞の重感染系で作製しようとしたものである。その結果、親株ウイルスである R849 と HF の遺伝子を保持する組換え体を分離した。この組換え体は神経毒性遺伝子を欠失し、ヒト口腔扁平上皮癌に対する強い細胞融合能と細胞傷害性を示した。

以上の結果は、腫瘍融解性ウイルス療法を発展させる上で重要な知見を与えるものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。