



| | |
|--------------|--|
| Title | 腫瘍融解性変異型単純ヘルペスウィルスの遺伝子構造と抗腫瘍効果に関する研究 |
| Author(s) | 高橋, 元 |
| Citation | 大阪大学, 2011, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/58466 |
| 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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|--|
| 氏 名 | 高 橋 元 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 第 24466 号 |
| 学位授与年月日 | 平成23年3月25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 | 腫瘍融解性変異型単純ヘルペスウイルスの遺伝子構造と抗腫瘍効果に関する研究 |
| 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 和田孝一郎 |

論文内容の要旨

【背景と目的】

腫瘍融解性ウイルス療法は弱毒化ウイルスを腫瘍に感染させ、その細胞変性効果で腫瘍を破壊する治療法である。腫瘍融解治療に用いられるHSV-1ベクターの多くは、神経毒性遺伝子 γ 34.5を欠失したものを基本として構築されている。R849の場合は、親株である野生型strain Fの γ 34.5を欠失させ、そこにLac Z遺伝子が挿入された構造をとる変異型ウイルスである。一方、HSV-1の自然変異体であるHF10は γ 34.5遺伝子を保持しているが病原性は低下している。しかし、強い抗腫瘍作用があり臨床研究が実施されている。HF10の特徴として細胞融合能が挙げられる。そこで、R849とHF10の長所を併せ持つ新規のHSV-1ベクターを作製するため、 γ 34.5遺伝子を欠失し感染細胞を円形化させるR849と細胞融合性を示すHF10がクローニングされる前のHFを培養細胞に重感染させ、両ウイルスの組み換え体であるRH2を分離した。PCRで調べたところ、RH2はLacZ遺伝子を持つが神経毒性遺伝子 γ 34.5は持たない組換え体ウイルスであり、さらにRH2を培養口腔扁平上皮癌細胞に感染すると広範な細胞融合能と細胞傷害性を示すことも明らかとなった。今後、本ウイルスの臨床応用を考えた場合、その構造の詳細を明らかにする必要があるため、本研究ではこのRH2の遺伝子構造を解析し、in vivoでの感染様式について明らかにすることを目的として研究を行った。

【材料と方法】

- 細胞として、サル腎由来Vero細胞、ヒト口腔扁平上皮癌細胞SASを用いた。HSV-1としてはR849とHF10がクローニングされる前の親株であるHFおよびRH2を使用した。

ウイルスの感染力価は plaque 形成法で Vero 細胞から感染力価 plaque forming unit (PFU) / ml を算定した。RH2 から抽出した DNA を用いて Genome Sequencer FLX System による高速シーケンシングを行った。**2.** RH2 のシーケンシングデータをアッセンブルし, BLAST のデータベースと DNASIS PRO のプログラムソフトを使用し, 遺伝子配列が公表されている strain F および HF10 との間で, UL と US 領域に存在する open reading frame (ORF)を比較検討した。**3.** 5 週齢雌ヌードマウス皮下に SAS 細胞を接種し腫瘍を形成した。腫瘍に 1×10^5 PFU の HSV-1 を腫瘍内に投与し, 腫瘍体積を経時的に測定した。**4.** ヌードマウス腫瘍に 1×10^6 PFU の HSV-1 を投与し経時に腫瘍を切除し, 腫瘍からウイルスを調整し Vero 細胞上に接種し感染力価 (PFU / ml) を求めた。**5.** 切除した腫瘍からパラフィン切片を作成し, H-E 染色と抗 HSV-1, 抗 cleaved caspase-3 を用いた免疫組織化学染色を行った。

【結果】

1. GS-FLX 解析により得られた配列を用いて, strain F と HF10 にマッピングを行い RH2 の塩基配列を決定し, UL36 を除く UL および US 領域の全ての ORF を決定した。RH2 は, strain F の 83% をカバーし, その一致率は 99.1% であった。また HF10 とでは 94% をカバーし, 一致率は 99.6% であった。**2.** ORF の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し, RH2 と比較して 100% 一致した UL 領域の ORF 数は, strain F では 21/58 (36.2%), HF10 では 24/53 (45.3%) であった。US 領域の ORF 数は strain F とでは 1/13 (7.7%), HF10 では 9/13 (69.2%) であった。この解析から, 11 個の遺伝子が, いずれの親株とも一致しなかった。野生型 strain 17 との比較でも, これら 11 個の異なるアミノ酸を検出した。**3.** 細胞融合に関与する gB をコードする UL27 についてアミノ酸配列を比較すると, 細胞融合をきたさない strain F と strain 17 でみられる 817 番目の Leu が, 細胞融合を示す HF10 と RH2 では, Pro に置換していた。また, RH2 のみで 459 番目アミノ酸が Thr から Ala の置換がみられた。**4.** ヌードマウス腫瘍に R849, HF あるいは RH2 を投与し, 腫瘍内ウイルス量を測定したところ, いずれのウイルスも経時に感染ウイルス量は低下した。腫瘍増殖は HSV-1 投与で抑制され HF と RH2 では対照群との間で有意差を認めた。**5.** HSV-1 を投与したヌードマウス腫瘍では, R849 の場合は円形化細胞, HF と RH2 では細胞融合による多核巨細胞が認められた。RH2 投与でより特徴的な大型の多核巨細胞がみられた。**6.** ヌードマウス腫瘍におけるアポトーシスを検出するため抗 cleaved caspase-3 染色陽性部面積の割合を計測したところ, 対照では腫瘍中心部で壊死が進行するのに伴いアポトーシス細胞の占める面積が増加したが, RH2 ではアポトーシス細胞は低いレベルであり対照群との間で有意差を認めた。

【考察と結論】

RH2 の UL ならびに US 領域は HF10 と一致率の高い遺伝子が多く、F 株との一致率は低く、特に US 領域では低い値を示した。そのため, RH2 は R849 と HF が混在するウ

イルスであるが, US 領域は HF に由来する構造をとり, γ 34.5 の代わりに LacZ を持つと考えられた。また, 糖蛋白質をコードする RH2 の遺伝子は HF10 との高い相同性を持つことから, これが細胞融合能の増強に関与している可能性がある。腫瘍体積では, RH2 は HF と同様に有意に増殖を抑制するものと考えられた。以上より, RH2 は強い細胞融合能を持ち, しかも神經毒性遺伝子を欠失し, 遺伝子構造が決定された新規の HSV-1 であることがわかった。また, 口腔癌だけでなく HF10 の適応でない脳腫瘍に対しても使用可能な, 幅広い適応を持つ腫瘍融解性ウイルスといえる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、単純ヘルペスウイルス 1 型の R849 と HF の組み換え体として作製した RH2 の遺伝子解析および in vivo における抗腫瘍効果を検討したものである。

その結果、RH2 の UL 領域は R849 と HF の遺伝子が混在し、US 領域では HF に由来する構造をとり、RL 領域では神經毒性遺伝子 γ 34.5 の代わりに LacZ を持つ構造であると考えられた。また RH2 は親株より強い細胞融合能をもち、優れた抗腫瘍効果を示した。

以上の研究結果は、ヒト口腔扁平上皮癌に対する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、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。