The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	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
Author(s)	髙橋, 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、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

【9】

氏　　名	髙　橋　　元（たかはし げん）
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$\gamma_1$34.5 を欠失したものを基本として構築されている。R849 の場合は，親株である野生型 strain F の$\gamma_1$34.5 を欠失させ，そこに Lac Z 遺伝子が挿入された構造をとる変異型ウイルスである。一方，HSV-1 の自然変異体である HF10 は$\gamma_1$34.5 遺伝子を保持しているが病原性は低下している。しかし，強い抗腫瘍作用があり臨床研究が実施されている。HF10 の特徴として細胞融合能が挙げられる。そこで，R849 と HF10 の長所を併せ持つ新規の HSV-1 ベクターを作製するため，$\gamma_1$34.5 遺伝子を欠失し感染細胞を円形化させる R849 と細胞融合性を示す HF10 がクローニングされる前の HF を培養細胞に重感染させ，両ウイルスの組み換え体である RH2 を分離した。PCR で調べたところ，RH2 は LacZ 遺伝子を持つが神経毒性遺伝子$\gamma_1$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】

1. 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のデーターベースと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 を投与し経時的に腫瘍を切除し，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 strain17 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的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かった。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，$\gamma_1$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，しかも神経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領域では神経毒性遺伝子$\gamma_1$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。