

Title	変異型単純ヘルペスウイルスによる腫瘍免疫誘導に関する研究
Author(s)	飯井, 孝年
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59302
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	飯井孝年
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第25016号
学位授与年月日	平成24年3月22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	変異型単純ヘルペスウイルスによる腫瘍免疫誘導に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 豊澤 悟 講師 福田 康夫 講師 相川 友直

論文内容の要旨

【目的】

腫瘍融解性ウイルス療法は弱毒化ウイルスを腫瘍細胞に感染させ、細胞変性効果によって細胞を破壊する治療法である。この治療で用いる単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)ベクターの多くは、神経毒性遺伝子 $\gamma_134.5$ を欠失したものを基本として構築されている。一方、自然変異体HF10は複数の遺伝子変異で病原性は低下しているが、細胞融合能を持ち強い抗腫瘍作用を示すため、臨床研究が進められている。

近年、ペプチドを用いたワクチン療法や免疫細胞療法といった特異的免疫賦活化をめざす研究が進んでいる。ウイルス療法の領域でも腫瘍免疫賦活化の観点からの研究もみられるようになってきている。HF10は $\gamma_134.5$ 遺伝子を維持しているが、これを欠失した新規のベクターRH2は脳腫瘍などより幅広い腫瘍に適応可能と考えられる。RH2はヒト口腔扁平上皮癌細胞とヌードマウスの系で抗腫瘍効果が明らかにされているが、免疫能が正常な生体では研究されていない。そこで、本研究では近交系マウスの実験系を用いて、RH2の抗腫瘍効果と腫瘍免疫誘導能について検討を行った。

【材料および方法】

1. 細胞として、マウス扁平上皮癌由来SCCVII細胞、マウス肉腫由来NFSa Y83細胞、マウスリンパ腫由来YAC-1細胞、サル腎由来Vero細胞を、ウイルスとしてはRH2を使用した。Vero細胞を用いてplaque assayを行い、ウイルスの感染力価を(PFU/ml)を求めた。RH2感染後の細胞生存率はMTT assayで測定した。

2. C3H/HeJJc1 マウスの左右背部皮下に SCCVII 腫瘍を形成し、右側にのみ RH2 を 1.0×10^6 PFU/50 μ l 投与した。RH2 非投与マウスには、右側腫瘍に PBS(-) を投与した。ウイルスを 2 回投与し、経時的に投与側と非投与側の腫瘍径を測定した。ウイルス投与腫瘍を摘出し、HE 染色および抗 HSV-1 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。Balb/c ヌードマウスに対しても同様に SCCVII 細胞を接種して腫瘍を形成した。

3. マウス SCCVII 腫瘍に、RH2 を 3 回投与したのち、脾臓リンパ球を分離した。その細胞傷害性は LDH release assay にて測定した。CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞の除去には抗体結合磁気ビーズを用いた。除去後のリンパ球をフローサイトメトリーにて解析した。

【結果】

1. SCCVII 細胞に RH2 を感染多重度(MOI)=0.01,0.1,1,2 で感染させると、いずれの場合も 24 時間と比較して 48 時間でやや増加するが、72 時間では低下した。感染による顕著な細胞変性効果はみられなかった。MTT assay では、MOI=1、2 の場合、細胞生存率は非感染対照の 18%、9%まで低下した。

2. C3H マウスの SCCVII 腫瘍に RH2 を投与して、組織像を観察したところ、中心部に壊死がみられ、免疫組織化学染色でその周辺に HSV-1 抗原を検出した。非投与の左側腫瘍では HSV-1 抗原を認めなかった。

3. C3H マウス SCCVII 腫瘍に PBS(-) を投与した右側腫瘍とその反対側の腫瘍の体積は 3 週後にそれぞれ 1736 mm³ に 1687 mm³ に達した。RH2 を投与した右側腫瘍は 287 mm³ と低下し、非投与の左側でも 947 mm³ に低下した。ヌードマウス SCCVII 腫瘍では、RH2 を投与しても反対側腫瘍の増殖抑制はみられなかった。

4. RH2 腫瘍内投与マウスから調整した脾臓リンパ球は RH2 非投与マウスのものと比較して、より強い細胞傷害性を示した。脾臓リンパ球は RH2 投与にかかわらず、NFSa Y83 細胞、YAC-1 細胞に対しても傷害性を示したが、これらは SCCVII 細胞に対する傷害性と比較して低かった。CD4⁺T 細胞よりも CD8⁺T 細胞を除去した方が、脾臓リンパ球の SCCVII 細胞に対する傷害性は減弱した。

【考察】

ヒト HSV-1 である RH2 はマウス SCCVII 細胞では、ヒト扁平上皮癌細胞でみられたような細胞融合を示さなかったが、ウイルス力価が高い場合には、細胞生存率の低下をきたした。近交系マウス腫瘍でも細胞変性と HSV-1 抗原を発現するが、ウイルス感染が腫瘍内で広範に拡大することはないと考えられた。RH2 を投与したマウスでは、投与していない反対側の腫瘍でも腫瘍増殖が抑制されたことから、腫瘍免疫が賦活化されたものと考えられた。実際、SCCVII 腫瘍内に RH2 を投与したマウスの脾臓リンパ球を用いて、SCCVII に対する細胞傷害性を調べたところ、高い活性が認められた。RH2 非投与のマウス脾臓リンパ球

にもマウス肉腫細胞やリンパ腫細胞に対する傷害性はみられたが、その活性は低かった。さらに、ヌードマウスでは RH2 投与による反対側腫瘍の増殖抑制もみられないことから、NK 細胞といった自然免疫の賦活化でなく、T 細胞が RH2 投与による強い抗腫瘍効果には必要であると考えられた。そして、CD8⁺T 細胞除去実験から、CD8⁺T 細胞が最も重要な働きをすることが分かった。以上より、RH2 を用いた腫瘍融解性ウイルス療法は直接的な腫瘍融解作用に加えて T 細胞による特異的腫瘍免疫を誘導し抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、免疫能が正常な生体において、新規の腫瘍融解性ウイルスである単純ヘルペスウイルス 1 型 RH2 の抗腫瘍効果と腫瘍免疫誘導能を解明することを目的に、近交系マウスおよびその腫瘍細胞を用いて実験的に検討したものである。

その結果、RH2 はマウス腫瘍に対して直接的な腫瘍融解作用に加え、T 細胞による特異的腫瘍免疫を誘導し、高い抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

以上の研究成果は、RH2 を用いた腫瘍融解性ウイルス療法が扁平上皮癌の治療に有用である事を明らかにする上で重要な示唆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。