

Title	免疫刺激因子発現型第三世代がん治療用HSV-1のマウス舌癌モデルにおける抗癌作用の検討
Author(s)	須河内, 昭成
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69482
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、 〈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

論文内容の要旨

氏名 (須河内 昭成)

論文題名

免疫刺激因子発現型第三世代がん治療用HSV-1の Maus 舌癌モデルにおける抗腫瘍作用の検討

論文内容の要旨

<背景>

口腔領域は呼吸、構音、咀嚼、嚥下と多くの機能を司り、整容面においても極めて重要であるため、口腔癌は著しい QOL (Quality of life) の低下を来す。その大半を占める口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma: OSCC) に対しては現在集学的治療が行われているが、局所進行症例や再発、転移症例に対しては不十分であることが多く、またその治療侵襲により QOL を著しく損なう。そのため、低侵襲かつ効果の高い新規治療法の開発が切望されている。その一つとしてウイルス療法は、現在わが国においても臨床試験が行われるなど、臨床応用に向けた研究が進められている。今回、第三世代のがん治療用 HSV-1 である G47 Δ をもとに作成された、2 種類のウイルスを用いて実験を行った。G47 Δ は、3 か所の遺伝子の機能を失活させることで、がん細胞でのみ複製可能となるよう遺伝子改変がなされている。また、本ウイルスは遺伝子組み換えシステム (T-BAC system) により、任意の遺伝子を導入することで遺伝子発現型のウイルスの作成が可能である。本研究では、上記システムを利用した 2 種類のがん治療用 HSV-1、T-01 および T-B7-1 を用いた。T-B7-1 は可溶性 B7-1 発現型としてマウスの B7-1 およびヒト IgG の Fc 部の遺伝子を導入した Shuttle vector を組み込んでおり、また T-01 は Control ウイルスとして Shuttle vector のみを組み込んだものである。ウイルス療法においては、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の作用が重要であるとされおり、その主たる役割を担う T リンパ球の活性化は、抗原提示細胞による MHC/TCR を介したシグナルに加え、共刺激シグナルによって補助されている。B7-1 はこの共刺激シグナルに必要なリガンドの 1 つであり、CD28 と結合することで T リンパ球の活性化を補助している。そのため、がん治療用ウイルスが B7-1 を可溶性にしたものを発現することで、ナイーブな T リンパ球に恒常的に発現する CD28 と結合し、T リンパ球の活性化を強力に惹起できると考えた。今回、マウスモデルでの検討を行うため、マウス可溶性 B7-1 発現型のがん治療用ウイルスである T-B7-1 を使用し、扁平上皮癌細胞株を用いた種々のマウスモデルに応用し、抗腫瘍効果が増強されるか検討を行った。その中でも、舌癌頸部リンパ節転移モデルにおいては、原発巣に局所投与したウイルスが免疫の主たる場であるリンパ節に流入するという報告もあるため、本研究では T-B7-1 がリンパ節転移巣に流入して抗腫瘍免疫を増強し、より強力にリンパ節転移を抑制し得ると考え、種々の検証を行った。

<方法>

実験 1. T-01 のヒト OSCC 細胞に対する抗腫瘍効果の検討

- i) *in vitro* における T-01 のヒト OSCC 細胞株に対する殺細胞効果の検討
2 種類のヒト OSCC 細胞株である、SAS および HSC-2 に T-01 を 1 時間感染させ、その後の生細胞数を経目的に測定した。
- ii) マウス舌癌モデルにおける生存延長効果の検討
HSC-2 を舌投与し、3 日後に T-01 を腫瘍内投与して経過観察を行った。

実験 2. T-B7-1 のマウス OSCC 細胞に対する抗腫瘍効果の検討

- i) *in vitro* における T-B7-1 の殺細胞効果の検討
2 種類のマウス SCC 細胞株、KLN205-MUC1 および SCCVII について同様に T-01、T-B7-1 を 1 時間感染させ、その後の生細胞数を経目的に測定した。
- ii) マウス皮下腫瘍モデルにおける腫瘍抑制効果の検討
KLN205-MUC1 を片側皮下投与し、投与後 7 日目を day 0 として、day 0、3 にウイルスを腫瘍内接種した。その後腫瘍径の測定を行った。
- iii) マウス舌癌頸部リンパ節転移モデルにおける抗腫瘍効果の検討
KLN205-MUC1 を舌投与し、3 日後にウイルスを腫瘍内投与、その後舌腫瘍部を切除し経過観察を行う舌癌リンパ節転移モデルを作成した。本モデルを使用し、リアルタイム PCR による頸部リンパ節に流入するウイルス DNA 量の測定、頸部リンパ節のサイズ計測及びリンパ節内に転移した腫瘍細胞数の測定を行った。また、本モデルにおける生存延長効果の検討も行った。

実験 3. ウイルスと抗 CTLA-4 抗体の併用による治療効果の検討

- i) マウス皮下腫瘍モデルにおける腫瘍抑制効果の検討
KLN205-MUC1 を片側皮下投与し、投与後 7 日目を day 0 として、day 0、3 にウイルスを腫瘍内接種した。また day 0、3、6、9 に抗 CTLA-4 抗体を腹腔内投与し、その後腫瘍径の測定を行った。
- ii) マウス舌癌頸部リンパ節転移モデルにおける抗腫瘍効果の検討
2. iii) で用いたモデルに対して、day 0、3 にウイルスを腫瘍内投与、day 0、3、6、9 に抗 CTLA-4 抗体を腹腔内投与し、その生存延長効果の検討を行った。

<結果・考察>

G47A は T-BAC system により任意の遺伝子の導入が可能であり、目的の遺伝子を組み込んでいない Shuttle vectorのみを導入したT-01はコントロールウイルスとして用いられる。実験 1. i) の結果より、T-01 はヒト OSCC 細胞株に対して優れた殺細胞効果を示し、また実験 1. ii) の結果よりマウス舌癌モデルにおいても有意な生存延長効果を示した。このことから、T-BAC system により新規に作成された第3世代のがん治療用 HSV-1 である T-01 は、ヒト OSCC 細胞株に対して十分な抗腫瘍効果を示すことが分かった。このことから、目的遺伝子を導入することで抗腫瘍効果の増強を図り、さらにはがんの種類別に有効なウイルスの作成も可能となることが期待された。そこで、今回免疫賦活化因子の1つであるB7-1発現型のウイルスである T-B7-1 の効果を検討することとした。

T-B7-1 は、実験 2. i) では T-01 とほぼ同等の効果を発揮した。このことから、目的遺伝子の組み込みによる抗癌作用の減弱はないことが確認された。また、実験 2. ii) の免疫正常能を有するマウスを用いた皮下腫瘍モデルでの検討では、T-01 と比較し有意な腫瘍増大の抑制効果を示す傾向にあった。そのため、T-B7-1 は *in vivo* での免疫正常能を有するマウス SCC 細胞株を用いたモデルに対し T-01 よりも有効であることが示された。

そこで、舌癌、特に頸部リンパ節転移に対する本ウイルスの有効性について検討することとした。KLN205-MUC1 を舌に投与後、経過観察を行うとリンパ節転移を来すことが確認されていたが、原発巣の増大に伴い死滅していた。そこで、舌に腫瘍細胞を投与後3日目に舌腫瘍を切除することにより、転移巣のみを評価するモデルを作成した。本モデルは舌腫瘍部分を切除後およそ 40～50 日程度で頸部リンパ節転移、および肺転移を来し死に至る、実臨床に類似した経過を呈する。リンパ節内に多くの T リンパ球が存在し、T-B7-1 の発現するマウス可溶性 B7-1 が直接これらを賦活化することでより強力にリンパ節転移を抑制できるのではと考え、KLN205-MUC1 マウス舌癌頸部リンパ節転移モデルにおける T-B7-1 の抗腫瘍効果の検討を行った。

実験 2. iii) の結果、頸部リンパ節転移モデルに流入するウイルス DNA 量は T-B7-1、T-01 で差がないことが確認された。しかし、同モデルにおけるリンパ節転移巣を観察してみると、その大きさや転移した腫瘍細胞数に関しては T-B7-1 投与群のほうが T-01 投与群と比較し高い抗腫瘍効果を示す傾向にあった。生存期間の観察においても、ウイルス間で有意な差はみられなかったものの、最終的な生存数はT-B7-1投与群のほうが多い傾向にあった。リンパ節に到達したウイルスの量は T-01、T-B7-1 で差がなく、その抗腫瘍効果により予後に差が出ているため、免疫能の正常なマウスモデルにおいて T-B7-1 はその免疫賦活化作用により、T-01 よりも効果を発揮したことが示された。マウスのリンパ節の解析は、極めて微小な環境であるため、現段階ではマウス可溶性 B7-1 の発現により実際に T リンパ球が活性化し、抗腫瘍効果が増強されたことを裏付ける検討を行うことは困難である。実際に可溶性 B7-1 が T リンパ球を活性化したか確認する手段として、ヌードマウスを用いた皮下腫瘍モデルでのウイルス間の比較や、CD4 もしくは CD8 陽性 T 細胞の不活化による T-B7-1 の効果の変動を検討する等が挙げられる。これらの検証方法は今後の検討課題である。

また、少量のウイルスの複数回投与により単回投与よりも抗腫瘍効果が増強されるという報告もあるため、KLN205-MUC1 舌癌頸部リンパ節転移モデルにおける T-B7-1、T-01 の複数回投与の実験を行った。結果、T-B7-1 投与群は T-01 投与群と比較し、有意に頸部リンパ節の増大を抑制した。このことから、転移巣において流入したウイルスの抗腫瘍効果が、単回投与の場合よりも有意に増強されたと考えられる。

B7-1 は CD28 と結合し、共刺激シグナルを伝達することで T リンパ球の活性化を補助しているが、一方で共抑制シグナルを伝達するレセプターである CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen) とも結合する。CTLA-4 は活性化した T リンパ球表面に発現し、B7-1 と結合することで T リンパ球の活性化を抑制している。そこで、抗 CTLA-4 抗体を併用することで抑制系のシグナル伝達を遮断し、より効率的な T リンパ球の活性化が可能であると考え、がん治療用ウイルスと抗 CTLA-4 抗体の併用実験を行った。実験 3. i), ii) の結果、KLN205-MUC1 を用いた皮下腫瘍モデル、および舌癌頸部リンパ節転移モデルいずれにおいてもがん治療用ウイルスと抗 CTLA-4 抗体の併用群が比較的高い抗腫瘍効果を示した。このことは、ウイルスによる抗腫瘍免疫の惹起に加え、抗 CTLA-4 抗体による抑制系の免疫シグナルを阻害することで治療効果が増強されたと考えられる。さらに、併用実験の結果から T-B7-1 と抗 CTLA-4 抗体の併用群が最も腫瘍抑制効果を示していた。これは、投与後 24 時間以内に発現する可溶性 B7-1 がナイーブな T 細胞の表面上に恒常的に発現している CD28 に作用し、その後抗 CTLA-4 抗体がウイルスに惹起された宿主の抗腫瘍免疫の活性化の際に、制御系のシグナルを抑制したためと考えられる。以上のことから、ウイルス療法と免疫チェックポイント阻害剤の併用によるメリットは大きいものと考えられる。

<結語>

本研究より、新たに開発された第3世代のがん治療用 HSV-1 である T-01 は、今後口腔癌に対する新規治療薬の 1 つとなりうることが示された。また、武装型の可溶性 B7-1 発現型がん治療用ヘルペスウイルスは、口腔癌、特に予後を大きく左右する頸部リンパ節転移における有効な治療手段の一つとなりうることを示唆された。さらに、ウイルス療法と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法は、既存の治療法では制御不能な口腔癌に対する強力な治療法の 1 つとして応用されることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (須 河 内 昭 成)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 古郷 幹彦
	副 査 教授 鶴澤 成一
	副 査 准教授 中澤 敬信
	副 査 講師 村上 智彦
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、口腔扁平上皮癌に対する、第三世代のがん治療用 HSV-1 を用いた新規治療法の開発を目的として、種々の扁平上皮癌細胞株を用いたマウスモデルに 2 種類の新規がん治療用 HSV-1 である T-01 および武装型の T-B7-1 を応用し、その抗腫瘍効果を検討したものである。</p> <p>その結果、いずれのウイルスも舌癌、頸部リンパ節転移モデルに対し明らかな抗腫瘍効果を示したことから、口腔癌、特に頸部リンパ節転移における有効な治療手段の一つとなる可能性を示唆した。また、T-01 より T-B7-1 の方がより有効と考えられた。</p> <p>この結果は、新規第三世代がん治療用 HSV-1 が、治療困難である口腔癌の新規治療法となる可能性を示した点で有意義であり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>	