

Title	マウス舌癌モデルにおけるIL-12発現型第三世代がん治療用単純ヘルペスウイルスⅠ型のリンパ節転移に対する治療効果
Author(s)	栗岡, 恭子
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72225
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 (栗岡 恭子)

論文題名

マウス舌癌モデルにおけるIL-12発現型第三世代がん治療用単純ヘルペスウイルス I 型のリンパ節転移に対する治療効果

論文内容の要旨

<背景>

舌癌をはじめとする口腔扁平上皮癌 (以下 OSCC) は外科療法、化学療法および放射線療法などを組み合わせた集学的治療が行われている。しかしながら OSCC はしばしば頸部リンパ節転移を来し、既存の治療法が奏効しない場合が見受けられ、新規の治療法が切望されている。第三世代がん治療用単純ヘルペスウイルス I 型である G47Δ は、膠芽腫をはじめとする種々の固形癌において臨床試験あるいは前臨床試験が進められており、OSCCでも前臨床試験において高い抗腫瘍効果を認め、臨床応用が期待されている。本研究では、G47 を基本骨格とした 2 種類のがん治療用 HSV-1 である T-01、T-mfIL12 のOSCCに対する抗腫瘍効果、特に微小頸部リンパ節転移に対する効果の検討を行った。

<目的>

がん治療用ウイルスは選択的に癌細胞のみに感染し、細胞内で自己複製し宿主の癌細胞を死滅させることで抗腫瘍効果を示す。さらに死滅した癌細胞がウイルスと共に抗原提示細胞に貪食されることにより、癌細胞に対する特異的免疫が生じ、宿主のもつ抗腫瘍免疫は増強する。G47Δ は遺伝子組み換えシステム (BAC system) により、種々の遺伝子導入が可能であり、今回使用した T-01、T-mfIL12 はこのシステムを利用し作成されている。

T-mfIL12 はインターロイキン 12 (以下 IL-12) を発現するウイルスであり、T-01 は Shuttle vector のみを組み込んだコントロールウイルスである。IL-12 は NK 細胞および T 細胞活性化作用を有し、ナイーブ T 細胞からの Th1 への分化促進、さらに IFN- γ 分泌促進作用を有している。この IL-12 をがん治療用ウイルスに組み込むことで元来ウイルスが有する直接的な腫瘍の殺細胞作用に加え、IL-12 が持つ抗腫瘍免疫の賦活化により、特に周囲にリンパ球が豊富なリンパ節内においては抗腫瘍効果が増強するのではないかと考えた。今回使用したマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルは頸部リンパ節転移を起こす。頸部リンパ節転移の進行を観察するため、舌腫瘍を早期に切除すると、微小頸部リンパ節転移巣が増大し死に至る。この過程は実臨床の口腔癌の後発頸部リンパ節転移の過程と類似する。このモデルにおいて舌腫瘍内にウイルスを投与すると、腫瘍内のリンパ管に流入したウイルスが頸部リンパ節に到達する。本研究ではT-mfIL12の種々のマウスモデルにおける抗腫瘍効果、特にマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルの頸部リンパ節転移に対する抗腫瘍効果を検証した。

<方法>

1. T-01、T-mfIL12 のヒト OSCC 細胞に対する抗腫瘍効果の検討

i) ヒト OSCC 細胞株である HSC-2 での IL-12 の発現を確認するために、HSC-2 細胞および Vero 細胞に Mock, T-01, T-mfIL12 を multiplicity of infection (以下 MOI):1.0 にて感染後、上清を回収し検体として ELISA 法にて測定を行った。

ii) *In vitro* にて HSC-2 に T-01 または T-mfIL12 をそれぞれ MOI:0.1および 0.01 で 1 時間感染させ、その後の生細胞数を経日的に測定した。

iii) *In vivo* にてヌードマウスの舌に HSC-2 を接種し舌腫瘍を作成し、5 日後にウイルスを腫瘍内投与し生存期間を検討した。

2. T-01、T-mfIL12 のマウス SCC 細胞に対する抗腫瘍効果の検討

i) *In vitro* にてマウス SCC 細胞株である KLN205-MUC1 に、T-01 または T-mfIL12 をそれぞれ MOI:1.0 および 0.1 で 1 時間感染させ、その後の生細胞数を経日的に測定した。

ii) *In vivo* においては、免疫正常マウスである DBA/2 マウスに KLN205-MUC1 を左側の側背部皮下へ接種し、皮下腫瘍を形成後、接種後 7 日目を day0 として day0、day3 にウイルスを腫瘍内投与し、その後の腫瘍体積を経日的に測定した。また DBA/2 マウスの舌に KLN205-MUC1 を接種し舌腫瘍を形成し、3 日後にウイルスを腫瘍内投与し、直後に舌腫瘍を切除し、頸部リンパ節転移におけるウイルスの効果を検討するために生存期間の観察を行った。さらに頸部リンパ節転移の検討のために、ウイルス投与後 14 日目のリンパ節を摘出し、頸部リンパ節内の腫瘍細胞数の比較、ウイルス投与後 30 日目のリンパ節体積について比較検討を行った。

3. マウス舌癌モデルの原発巣へのウイルス投与後の頸部リンパ節内のリンパ球の抗腫瘍効果の検討

マウス舌癌頸部リンパ節転移モデルの頸部リンパ節内のリンパ球の抗腫瘍効果をさらに検討するために、頸部リンパ節内のリンパ球を抽出し、皮下腫瘍モデルの腫瘍内へ投与し腫瘍体積変化を観察した。KLN205-MUC1 舌癌頸部リンパ節転移モデルを作成するために DBA/2 マウスの舌に KLN205-MUC1 を接種しこれを day0 とした。Day2 に KLN205-MUC1 皮下腫瘍モデルの作成のために DBA/2 マウスの左側側背部に KLN205-MUC1 を接種した。day3 で舌癌頸部リンパ節転移モデルの舌腫瘍内にウイルスを投与し、舌腫瘍を切除した。ウイルス投与 5 日後の day8 で頸部リンパ節を摘出しリンパ球の懸濁液を作成した。このリンパ球の懸濁液をマウス 1 匹あたり 20 μ l となるように腫瘍内投与し、腫瘍体積の経時的変化をみることで間接的に、ウイルス流入により感作された頸部リンパ節内の抗腫瘍免疫効果を検討した。

<結果>

1. T-01、T-mfIL12 のヒト OSCC 細胞に対する抗腫瘍効果の検討

- i) ELISA 法にて HSC-2 で強く IL-12 発現を認め、ウイルス複製時に IL-12 が発現することを確認した。
- ii) *In vitro* においてヒト OSCC 細胞に対する T-01、T-mfIL12 の殺細胞効果は同等であった。
- iii) マウス舌腫瘍モデルにおいて Mock 群と比してウイルス投与群の生存期間はどちらのウイルスにおいても有意に延長した。

2. T-01、T-mfIL12 のマウス SCC 細胞に対する抗腫瘍効果の検討

- i) *In vitro* においてマウス SCC 細胞に対する T-01、T-mfIL12 の殺細胞効果は同等であった。
- ii) マウス皮下腫瘍モデルにウイルス投与を行うと、Mock 群と比して有意に抗腫瘍効果を認めた。さらに、ウイルス間では T-mfIL12 群は T-01 群と比して抗腫瘍効果を認める傾向にあった。

マウス舌癌頸部リンパ節転移モデルでは、ウイルス投与群は Mock 群と比して有意に生存期間は延長した。ウイルス間では T-mfIL12 群は T-01 群と比して生存期間が延長する傾向であった。このマウスモデルにおいてウイルス投与、舌腫瘍切除 14 日目に頸部リンパ節を摘出しリンパ節内の腫瘍細胞を培養し、リンパ節内の抗腫瘍効果を検討すると、ウイルス投与群は Mock 群と比較し抗腫瘍効果を示す傾向にあった。また、ウイルス投与後 30 日目のマウスの転移リンパ節の体積を計測したところ、Mock 群と比して T-01 群、T-mfIL12 群は有意にリンパ節転移抑制効果を認め、ウイルス間でも T-mfIL12 群は T-01 群と比してリンパ節転移抑制効果を認める傾向にあった。

3. マウス舌癌モデルの原発巣へのウイルス投与後の頸部リンパ節内のリンパ球の抗腫瘍効果の検討

KLN205-MUC1 舌癌頸部リンパ節転移モデルを作成し、ウイルス投与 5 日目に頸部リンパ節を摘出し、リンパ球を抽出した。抽出したリンパ球を皮下腫瘍モデルの腫瘍内に投与し、経時的に腫瘍体積の測定を行ったところ、Mock 投与群および T-01 投与群と比較し T-mfIL12 投与群では有意に腫瘍抑制効果を認めた。

<考察>

In vitro にて HSC-2 および KLN205-MUC1 へのウイルスの殺細胞効果を検討したところ、T-01 と T-mfIL12 の間に有意差を認めず、またヌードマウス HSC-2 舌癌モデルに対するウイルス投与において、両者はともに極めて高い生存延長効果を示したが、ウイルス間では有意差は認められなかったことから、免疫の介在しない環境下では両者はほぼ同等の OSCC に対する抗腫瘍効果を示すことが示された。一方、免疫正常マウスでの KLN205-MUC1 皮下腫瘍モデルの結果より、腫瘍内投与によりその局所では、T-mfIL12 は T-01 より有効な腫瘍抑制効果を示す傾向にあることが示唆された。また、舌癌頸部リンパ節転移モデルにおいて、Mock 群とウイルス投与群では有意にウイルス投与群が生存期間延長を認め、ウイルス間では T-01 群と比して T-mfIL12 群 が生存期間延長傾向にあったことから、後発頸部リンパ節転移が高率で起こる口腔癌において、術前のウイルス投与が極めて効果的であることが示唆された。さらに皮下腫瘍に頸部リンパ節に流入したウイルスにより感作された後のリンパ球を投与した実験結果より、T-mfIL12 群は他の 2 群と比較し有意に抗腫瘍効果を認めたことから、T-mfIL12 は、頸部リンパ節転移に感染した後、リンパ節内のリンパ球を賦活化し、転移巣に対する抗腫瘍免疫を増強していることが示唆された。

<結論>

本研究より、第三世代がん治療用ウイルスは OSCC に有効な治療法となり得ることが示された。特に IL-12 発現型第三世代がん治療用単純ヘルペスウイルス I 型は、癌細胞でのみ複製時に発現する IL-12 の抗腫瘍免疫効果もありマウス舌癌頸部リンパ節転移モデルにおいて、微小頸部リンパ節転移に対して T-01 よりさらに優れた抗腫瘍効果を示したことから、頸部リンパ節転移が予後を大きく左右する OSCC においては画期的な治療法となり得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 (栗岡恭子)		
	(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 前田隆史
	副 査	講 師 宇佐美悠
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究はマウス舌癌モデルを用い、IL-12 発現型第三世代がん治療用単純ヘルペス I 型(T-mfIL12)の口腔癌のリンパ節転移に対する治療効果について検討したものである。</p> <p>その結果、Mock と比較し、同ウイルスの投与は有意に抗腫瘍効果を示した。さらに頸部リンパ節転移に関してもコントロールウイルスである T-01 よりも強い抗腫瘍作用を認めた。T-mfIL12 がより効果を示したのはウイルス自体の殺細胞効果に加え、ウイルスに感染した腫瘍細胞より発現した IL-12 による抗腫瘍免疫の相乗効果によると示唆された。この結果は、同ウイルス療法が口腔癌のリンパ節転移に対し非常に有効であることが明らかになり、博士(歯学)の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		