

腫瘍溶解性ヘルペスウイルスとシクロホスファミドを併用した子宮頸がん新規治療法の検討

川村英生^{1), 2)}, 利部正裕¹⁾, 佐々木裕²⁾,
村上一行¹⁾, 川村花恵¹⁾, 池田 浩²⁾, 阿保亜紀子³⁾,
吉野直人²⁾, 村木 靖²⁾, 杉山 徹¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 産婦人科学講座

²⁾ 岩手医科大学医学部, 微生物学講座: 感染症学・免疫学分野

³⁾ 岩手医科大学医学部, 病理学講座: 機能病態学分野

(Received on December 2, 2016 & Accepted on December 19, 2016)

要旨

子宮頸がんに対する新規治療法の開発を目的として, モデルマウスを用いて腫瘍溶解性ウイルス (T-01) とシクロホスファミド (CPA) の併用療法を検討した. 併用療法は T-01 単独および CPA 単独療法に比べ有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた. CPA を投与したマウス脾臓中の総リンパ球数は減少し, かつマイトジェンに対するリンパ球の反応性も低下していた. このことから併用療法は, CPA による免疫抑制によって抗 T-01 特異的免疫が抑制されて

いると推測した. 実際, モデルマウス腫瘍組織中の T-01 は T-01 単独療法に比べ併用療法で有意に増加していた. 併用療法では T-01 および CPA それぞれの抗腫瘍効果に加え, CPA による抗 T-01 特異的免疫の抑制により相乗効果を誘導したと考えられた. 本研究では CPA を併用することにより腫瘍溶解性ウイルス療法の治療効果を改善できることが示され, 将来の臨床応用が期待できると推察した.

Key words : cervical cancer, oncolytic herpes simplex virus, cyclophosphamide, combination therapy

I. 緒 言

先進国において子宮頸がんの発生率は劇的に減少しているが, 世界では年間約 52 万人の新規症例が報告されている¹⁾. 日本の年齢調整罹患率は人口 10 万人あたり 10.9 人で先進国の中では子宮頸がんの発症率が高く, 年間約 1 万人が発症し約 2,700 人が死亡している²⁾.

子宮頸がんはヒトパピローマウイルス (human papillomavirus; HPV) の感染が主な原因であるが³⁾, スクリーニングとワクチンの

開発で一定程度の予防が可能となった⁴⁻⁵⁾. 一方, 子宮頸がんに対する治療法は手術療法が中心であるが, 進行子宮頸がんや再発例に対しては手術適応がなく, 放射線療法や化学療法及びその併用が標準療法である⁶⁻⁹⁾. しかし, その効果は十分とは言えない.

我々は, 子宮頸がん新規治療法の開発が急務であると考え, 腫瘍溶解性ウイルス療法に着目した. 腫瘍溶解性ウイルス療法はがん細胞にウイルスが感染し, その細胞を破壊することによって抗がん作用をもたらす治療法である. これまで腫瘍溶解性ウイルス療法は様々ながん腫に対し単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-

1) ¹⁰⁾, アデノウイルス ¹¹⁾, レオウイルス ¹²⁾, 麻疹ウイルス ¹³⁾ などを用いた臨床試験が報告されている。しかし、子宮頸がんに対する腫瘍溶解性ウイルス療法は未だ行われていない ¹⁴⁾。

腫瘍溶解性ウイルスの中でも HSV-1 は多種の細胞に感染することができ、またアシクロビル等の抗ウイルス薬で治療を中断できるという利点を持っている ¹⁵⁾。T-01 は腫瘍溶解性ウイルス療法に用いる HSV-1 であり、ウイルス遺伝子の γ 34.5, infected cell proteins 6 (ICP6), α 47 を欠損させた三重変異型 HSV-1 である ¹⁶⁾。これらの遺伝子の欠失により T-01 はがん細胞内でのみ複製が可能となり、さらに T-01 感染細胞表面の MHC class I の発現を維持させることで抗腫瘍免疫を強化することが可能となる ¹⁶⁾。

我々は T-01 を用いた子宮頸がんに対する腫瘍溶解性ウイルス療法の有効性を検討してきた。まず、我々はヒト子宮頸がん由来の細胞に対する T-01 の細胞傷害効果を明らかにした。さらに、Hela 細胞を移入した担がんマウスを用い T-01 に腫瘍増殖抑制効果があることも明らかにした ¹⁷⁾。次に、HPV-16 型の E6/E7 遺伝子を導入したマウス由来 TC-1 細胞 ¹⁸⁾ を移入した子宮頸がんモデルマウスを用いた研究では、モデルマウス腫瘍内に T-01 を接種したところ有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた ¹⁹⁾。しかし、T-01 の腫瘍増殖抑制効果は腫瘍体積が約 320mm³ を超えたものでは減弱した ¹⁹⁾。そこで、T-01 の抗腫瘍効果を改善させるため T-01 と免疫チェックポイント阻害剤 (抗 CD274 抗体) の併用を検討したが併用による抗腫瘍効果の改善は認められなかった。その原因としては免疫チェックポイント阻害剤によって抗腫瘍免疫のみならず抗ウイルス免疫の活性化も維持され、その結果として T-01 の増殖が妨げられた可能性が示唆された ²⁰⁾。

シクロホスファミド (CPA) は抗がん剤の 1 つであり ²¹⁾、その作用機序は腫瘍細胞の細胞周

期停止およびアポトーシスの誘導である ²²⁻²³⁾。1960 年代には子宮頸がんに対する臨床試験が行われたが単剤での奏効率は低く ²⁴⁻²⁵⁾、現在では多剤併用療法の一剤として選択されることはあるがその頻度は低い ²⁶⁾。一方、CPA は免疫抑制作用を有し細胞性免疫および液性免疫を抑制することが報告されており ²⁷⁻²⁸⁾、免疫抑制剤として使用される既存医薬品である ²⁹⁾。我々は免疫抑制作用を有するシクロホスファミドと T-01 を併用することで T-01 に対する免疫が抑制され T-01 の増殖が促されると推察した。本研究では、子宮頸がんに適応のある抗がん剤であり免疫抑制作用のある CPA を T-01 と併用することによって抗腫瘍効果の改善が得られるか検討をおこなった。

II. 研究材料および方法

1. 研究倫理

動物実験は、岩手医科大学動物実験委員会の承認を受け (承認番号 27-039) 岩手医科大学動物実験規定を順守し実施した。マウスは飼育室の環境に馴化させるために、実験開始前 7 日間特定病原体除去下で飼育した。人道的エンドポイントは、腫瘍体積が 1,500mm³ を超えた場合、体重が 2-3 日間に 20% 以上減少した場合、被毛の汚れ、立毛、異常姿勢、うずくまり姿勢などの外観が見られた場合と設定し動物福祉に配慮した動物実験を行った。組換えウイルスを使用した実験は、大臣確認実験として岩手医科大学組換え DNA 実験安全委員会の承認後 (承認番号 360)、岩手医科大学組換え DNA 実験安全管理規則に従って実施した。

2. 腫瘍細胞、腫瘍溶解性ウイルスおよび抗がん剤

TC-1 細胞は Tzyy-Chou Wu 教授 (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) より供与された。TC-1 細胞は、RPMI1640 培地 (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) に 10% ウシ胎児血清、0.2mg/mL 硫酸ストレプトマ

イシン (Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京), 20 単位 /mL ペニシリン G カリウム (Meiji Seika ファルマ株式会社), 10mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; 同仁科学研究所, 熊本) を添加した培養液で, 37°C, 5%CO₂ 条件下で培養した. T-01 は藤堂具紀教授 (東京大学医学研究所先端医療研究センター先端がん治療部門医科学研究所附属病院脳腫瘍外科, 東京) より供与された. 抗がん剤は CPA 一水和物 (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた.

3. 子宮頸がんモデルマウスの作製

C57BL/6Njcl マウス 5 週齢の雌 (日本クレア株式会社, 東京) を用いた. TC-1 細胞はリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS) 中に 1×10^5 cells/100 μ L となるよう調整した. マウスにソムノペンチル (共立製薬株式会社, 東京) を 50mg/kg 腹腔投与し, 麻酔下でマウス背部の剃毛後に細胞懸濁液をマウス左側背部に皮下移入した. 覚醒までの間は体温維持のためヒーターマット (夏目製作所, 東京) 上で管理した¹⁹⁾.

4. ヘモグロビン (Hb) 値の測定

がんに対する化学療法ではしばしば骨髄抑制がみられる³⁰⁻³¹⁾. CPA を用いた化学療法でも骨髄抑制は誘導され³²⁻³³⁾, マウスモデルでも確認されている³⁴⁾. 貧血状態にあるマウスへの CPA 投与はより貧血を悪化させることが考えられたため, CPA を用いた治療スケジュールを策定するにあたり子宮頸がんモデルマウスでの貧血状態を確認した³⁵⁾. 無治療対照群に対し TC-1 細胞移入直前および移入から 7 日間隔で 28 日まで採血し, 血中 Hb 値を自動血球測定器 Celltac (日本光電工業株式会社, 東京) で測定した.

5. 治療スケジュール

子宮頸がんモデルマウスを無治療対照群, T-01 単独群, CPA 単独群, CPA+T-01 群の 4 群で検討した. T-01 は 50 μ L の PBS に 1×10^5 plaque forming unit (PFU) となるよう調

整し, TC-1 細胞移入後 7, 11, 16, 21, 25 日に腫瘍内接種した 20). CPA は, ジメチルスルホキシド (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で溶解後に PBS で希釈した. 投与時の DMSO の濃度は 1% で, 1 回の腹腔内投与 (500 μ L) での CPA 量は 50 mg/kg³⁶⁾ とし, TC-1 細胞移入後 7, 11, 14 日に投与した. CPA+T-01 群は, 上記のスケジュールで治療を行った. T-01 単独群は, T-01 の接種に加え CPA の代わりに 1%DMSO に調整した PBS を 500 μ L 腹腔内投与した. CPA 単独群は, CPA の投与に加え PBS を 50 μ L 腫瘍内接種した. 無治療対照群は CPA 投与と T-01 接種の代わりにそれぞれ 1%DMSO PBS を 500 μ L 腹腔内投与, PBS を 50 μ L 腫瘍内接種した. T-01 接種はソムノペンチル麻酔下で行い, 体温維持のため覚醒までの間ヒーターマット上で管理した. TC-1 細胞移入後は 2-3 日間隔で腫瘍径と体重を測定し, 腫瘍体積は Carlsson の公式 [腫瘍体積 (mm³) = 腫瘍の短径 (mm) \times 腫瘍の短径 (mm) \times 腫瘍の長径 (mm) \div 2] で算出した³⁷⁾. マウスに TC-1 細胞を移入し, 7 日目に腫瘍体積および体重が無治療対照群, T-01 単独群, CPA 単独群, CPA+T-01 群の 4 群間で有意差がないことを確認してから各群の治療を開始した.

6. フローサイトメトリー

TC-1 細胞移入後 18 日に無治療対照群および CPA 単独群のマウスから脾臓を採取し, 定法に従い ACK バッファー (0.826% NH₄Cl, 0.1% KHCO₃, 0.0037% EDTA-2Na, pH7.3) で赤血球を溶血し²⁰⁾, リンパ球数を自動血球測定器 Celltac で測定した. 得られたリンパ球を染色用バッファー³⁸⁾ に 1×10^6 cells/100 μ L となるように浮遊させ, phycoerythrin 標識抗 CD3 抗体 (clone: 17A2, BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), allophycocyanin 標識抗 CD4 抗体 (clone: RM4-5, BioLegend Inc.), fluorescein isothiocyanate 標識抗 CD8a 抗体 (clone: 53-

6.7, BioLegend Inc.), peridinin-chlorophyll proteins complex with cyanin-5.5 標識抗CD45 抗体 (clone: I3/2.3, BioLegend Inc.) を加え 15 分間暗所にて静置し染色を行った. 染色用バッファーでリンパ球を洗浄後, FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) で測定し, CellQuest™ Pro software version 6.0 (BD Biosciences) で解析した. フローサイトメーターによる測定は全て同一の条件設定で行った.

7. リンパ球幼若化試験

マイトジェン刺激による細胞増殖度 (stimulation index : SI) は個体の免疫能を *in vitro* で評価する指標の1つであり SI が低いと獲得免疫の免疫能が低下していることを示す³⁹⁾. TC-1 細胞移入後 18 日に無治療対照群および CPA 単独群のマウス脾臓から採取したリンパ球を 96-well 平面培養プレートに 5×10^5 cells/well になるように播種し, マイトジェンとして $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ フィトヘマグルチニン M (PHA-M; Lectin from Phaseolus vulgaris: Sigma-Aldrich) または $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ コンカナバリン A (Con-A; Concanavalin A from Canavalia ensiformis: Sigma-Aldrich) を添加し 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 48 時間培養した. マイトジェンによる細胞増殖は Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay キット (Promega Co., Madison, WI, USA) を用いて測定した. キット試薬添加 2 時間後に 490nm (OD_{490}) 及び参照波長として 630nm (OD_{630}) の吸光度をマイクロプレートリーダー (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) で計測した. マイトジェン非刺激に対する刺激後の細胞増殖度を stimulation index (SI) とし, SI は以下の計算式を用い求めた. $\text{SI} = (\text{マイトジェン刺激時の } \text{OD}_{490} - \text{OD}_{630}) \div (\text{マイトジェン非刺激時の } \text{OD}_{490} - \text{OD}_{630})$ ⁴⁰⁾.

8. プラークアッセイ

TC-1 細胞移入後 18 日に T-01 単独群およ

び CPA+T-01 群のマウスから腫瘍を採取し, 腫瘍はその重量を測定後に -80°C で凍結保存した. 腫瘍を解凍し Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Life Technologies Co.) を $200 \mu\text{L}$ 加え gentle MACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) で破碎した. 破碎液は 3 回の凍結 (-80°C , 10 分間) と融解 (37°C , 4 分間) を繰り返した後に遠心分離 ($8,000$ 回転, 5 分間, 4°C) し上清を回収した. 上清中の感染性ウイルスの定量は, アフリカミドリザル腎臓由来細胞株 (Vero 細胞) を用いたプラーク法で行った⁴¹⁾. Vero 細胞は DMEM に 10% ウシ胎児血清, $0.2 \text{mg}/\text{mL}$ 硫酸ストレプトマイシン, 20 単位/ mL ペニシリン G カリウムを添加した培養液を用い, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した. プラーク法に用いる Vero 細胞は, 6-well 平面培養プレートに 1.5×10^6 cells/well となるように播種し, 24 時間培養することで調整した. PBS で 2 回洗浄後, DMEM で 10 倍階段希釈した上清を $250 \mu\text{L}/\text{well}$ で添加し, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 1 時間ウイルスの吸着反応を行った. 吸着反応後, 細胞を PBS で 3 回洗浄した. 2% Seaplaque™ agarose (Lonza Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) と 2 倍濃度の DMEM (日水製薬株式会社, 東京) を等量混合後, 2% ウシ胎児血清を添加することで寒天培地を作製し, $3 \text{mL}/\text{well}$ の寒天培地を培養プレートに添加した. 室温で 10 分間静置することで寒天培地を固め, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 96 時間培養を行い, 培養後 5% ホルムアルデヒド含有クリスタルバイオレット溶液 (Sigma-Aldrich) で染色した. プラーク数を測定し, 腫瘍 1g あたりの PFU を算出した.

9. 統計

統計解析は GraphPad Prism version 6.0f (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を用いた. データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した. 独立した 2 群間の比較は, パラメトリック検定として両側 Student's t 検定, ノンパラ

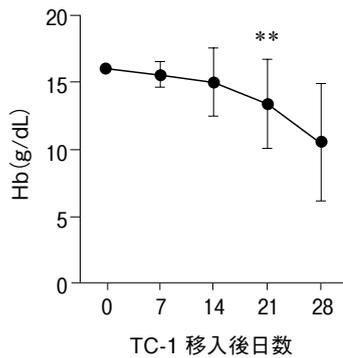


図1. 子宮頸がんモデルマウスでの血中Hb値の経時変化

無治療対照群（16匹）でTC-1細胞移入直前および移入後7、14、21、28日に採血を行い、Hb値を計測した。Hb値は平均値±SDで表した。TC-1細胞移入直前のHb値に対する移入後のそれぞれのHb値の有意差は両側Student's t検定（対応あり）を用いて解析した。有意差はアスタリスク（** $p<0.005$ ）で示した。

メトリック検定としてMann-Whitney U 検定またはYatesの修正による χ^2 検定を行った。2群間の腫瘍体積の経時変化の比較は、二元配置分散分析（two-way analysis of variance; two-way ANOVA）を行い、Bonferroni比較検定を行った。生存曲線は、Kaplan-Meier生存分析を行い、log-rank検定を行った。 $p<0.05$ を統計的に有意とした。

III. 結果

1. Hb値の測定および治療スケジュールの策定

無治療対照群で経時的にHb値を測定したところ、TC-1細胞移入直前のHb値は 16.1 ± 0.4 g/dLであった。TC-1細胞移入後徐々にHb値は低下し、移入後21日では 13.4 ± 3.3 g/dLとなり移入直前と比較して有意に低下した。移入後28日でもHb値は有意に低く観察期間中にHb値が回復することはなかった（図1）。そこで、CPAの投与はTC-1細胞移入後14日までとして治療スケジュールを策定した。

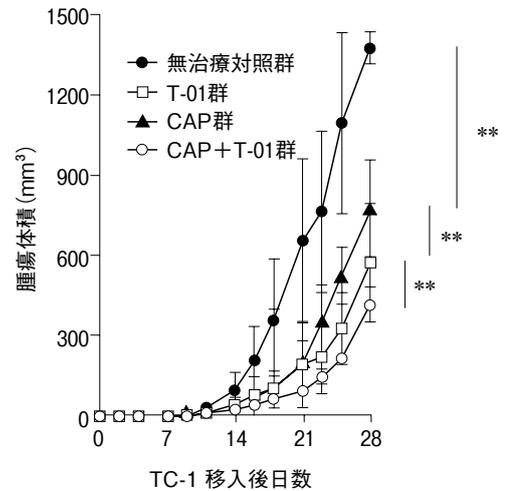


図2. 各群での腫瘍体積の比較

無治療対照群（14匹、黒丸）、T-01単独群（12匹、白四角）、CPA単独群（11匹、黒三角）、CPA+T-01群（11匹、白丸）の腫瘍体積の推移を表した。腫瘍体積は平均値±SDで表した。2群間の腫瘍体積の経時変化の比較はtwo-way ANOVAを行い、有意差がある場合はBonferroni比較検定を行った。有意差はアスタリスク（** $p<0.005$ ）で示した。

T-01の接種はこれまでの研究で有害事象はみられなかったため、同じ接種スケジュールとした。

2. 併用による腫瘍増殖抑制効果

各群で体重を測定したところ、CPA単独群とCPA+T-01群のマウスは他の2群と比較し体重が低い傾向にあったが、人道的エンドポイントに関わるような体重減少はなかった（Data not shown）。無治療対照群と各治療群を比較したところ、いずれの治療群でも有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。無治療対照群とCPA単独群またはCPA+T-01群間ではTC-1細胞移入後16日、無治療対照群とT-01単独群間ではTC-1細胞移入後18日から有意差がみられた。T-01単独群とCPA+T-01群との比較では、TC-1細胞移入後21日でそれぞれの腫瘍体積は、 193.1mm^3 と 94.5mm^3 で有意にCPA+T-01群で腫瘍体積が小さかった。同様にCPA単独群とCPA+T-01群を

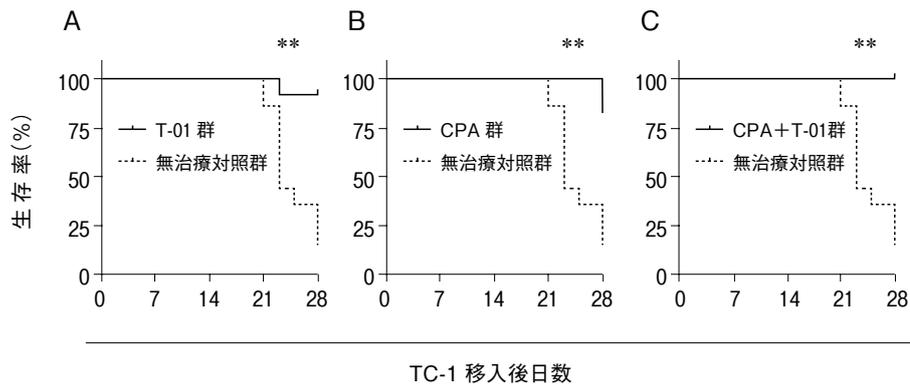


図3. 無治療対照群と各治療群での生存率の比較

A: 無治療対照群 (14 匹) と T-01 単独群 (12 匹) の生存率の比較.

B: 無治療対照群と CPA 単独群 (11 匹) の生存率の比較.

C: 無治療対照群と CPA+T-01 群 (11 匹) の生存率の比較.

生存解析は Kaplan-Meier 生存分析を行った. 無治療対照群と各治療群の生存率の比較を log-rank 検定を用いて解析した. 有意差はアスタリスク (** $p < 0.005$) で示した.

比較すると, TC-1 細胞移入後 21 日以降では CPA+T-01 群で有意な腫瘍増殖抑制効果がみられ, 観察期間終了の 28 日での腫瘍体積はそれぞれ 769.6mm^3 と 419.5mm^3 であった. さらに, 28 日目の CPA+T-01 群の腫瘍体積は最小で 319.8mm^3 , 最大でも 573.3mm^3 でありいずれのマウスも CPA 単独群の平均腫瘍体積よりも小さかった (図 2). これらの比較から T-01 と CPA の抗腫瘍作用は拮抗せず, 併用により腫瘍増殖抑制効果が増強されることが明らかになった.

一方, 生存率では無治療対照群で最も早く死亡したマウスは TC-1 細胞移入後 21 日に認められ, 23 日後までに 14 匹中 8 匹が死亡 (生存率 42.9%) した. さらに, TC-1 細胞移入後 28 日まで生存したマウスは 2 匹で生存率は 14.3% であった. これに対し T-01 単独群および CPA 単独群で TC-1 細胞移入後 28 日でのそれぞれの生存率は 91.7% と 81.8% であった. 特筆すべきことに, CPA+T-01 群では 11 匹全例が観察期間終了の 28 日まで生存した. また, 無治療対照群と比較し各治療群では有意な生存期間の延長が認められた (図 3). 各単独治療群と CPA+T-01 群では生存率に有意差はないが,

腫瘍体積の成績を考慮すれば, CPA と T-01 の併用は 4 つの実験群の中で最も高い抗腫瘍効果を有していた.

3. CPA のリンパ球に対する影響

TC-1 細胞移入後 18 日頃から各群の腫瘍体積に有意差が認められ始めることから, TC-1 細胞移入後 18 日の免疫能を比較した. 無治療対照群と CPA 単独群の脾臓中の総リンパ球数はそれぞれ 5.30×10^7 個と 1.06×10^7 個で, CPA 単独群は無治療対照群と比較し総リンパ球数が 79.9% 減少し有意差を認めた (図 4A). リンパ球に占める CD3 陽性 T 細胞の割合は無治療対照群で 32.7% であったのに対し CPA 単独群では 40.5% であった (図 4B). 同様に CD4 陽性 T 細胞のリンパ球に占める割合も CPA 単独群で増加しており, 無治療対照群と CPA 単独群でそれぞれ 19.5% と 26.5% であった (図 4C). このように, CPA 投与群は無治療対照群に対し CD3 陽性 T 細胞, CD4 陽性 T 細胞の占める割合が有意に高い値であった. 一方, CD8 陽性 T 細胞の占める割合は無治療対照群で 13.2% に対し CPA 単独群で 14.0% であり, 2 群間に有意差は認めなかった (図 4D).

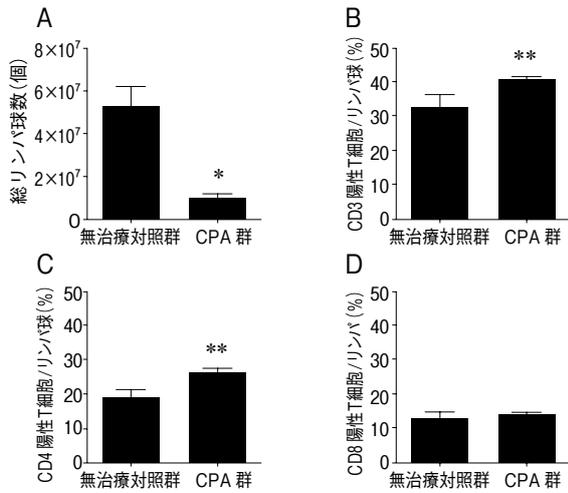


図 4. 無治療対照群と CPA 単独群での脾臓中のリンパ球の比較

TC-1 細胞移入後 18 日における無治療対照群 (3 匹) と CPA 単独群 (3 匹) の脾臓中の総リンパ球をフローサイトメーターで解析した。

A: 脾臓中の総リンパ球数。

B: リンパ球中の CD3 陽性 T 細胞 (CD3+ CD45+) の割合。

C: リンパ球中の CD4 陽性 T 細胞 (CD3+ CD4+ CD45+) の割合。

D: リンパ球中の CD8 陽性 T 細胞 (CD3+ CD8+ CD45+) の割合。

細胞数および存在率を平均値 ± SD で表した。有意差は両側 Student's t 検定 (対応なし) を用いて解析した。有意差はアスタリスク (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$) で示した。

4. CPA による免疫能の低下

リンパ球幼若化試験はフローサイトメーターで用いたマウスと同じ個体の脾臓中のリンパ球を用い SI を算出した。PHA-M 刺激に対する SI は無治療対照群が 1.58 ± 0.14 であったのに対し CPA 単独群では 1.20 ± 0.04 となり、CPA 投与群で有意に低い値であった (図 5A)。Con-A 刺激に対しても同様の傾向にあり無治療対照群で 2.35 ± 0.26 であったのに対し CPA 単独群では 1.46 ± 0.30 で有意差がみられた (図 5B)。これらの結果から、子宮頸がんモデルマウスの免疫能は CPA により低下することが明らかになった。

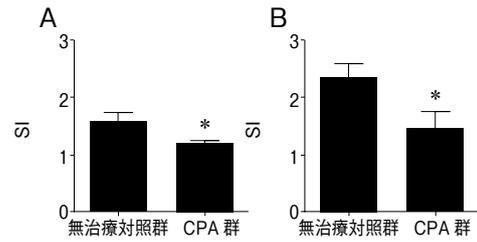


図 5. 無治療対照群と CPA 単独群でのリンパ球幼若化の比較

TC-1 細胞移入後 18 日における無治療対照群 (3 匹) と CPA 単独群 (3 匹) の脾臓中のリンパ球を用いて幼若化試験を行った。

A: PHA-M 刺激による各群の SI。

B: Con-A 刺激による各群の SI。

SI は平均値 ± SD で表し、有意差は両側 Student's t 検定 (対応なし) を用いて解析した。有意差はアスタリスク (* $p < 0.05$) で示した。

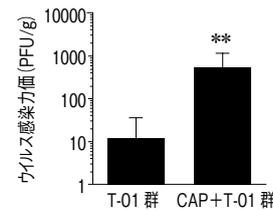


図 6. T-01 単独群と CPA+T-01 群での感染性ウイルス力価の比較

TC-1 細胞移入後 18 日における T-01 単独群 (9 匹) および CPA+T-01 群 (10 匹) の腫瘍組織中の感染性ウイルス力価を測定した。各群の腫瘍 1g あたりの PFU を平均値 ± SD で表した。有意差は Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。有意差はアスタリスク (** $p < 0.005$) で示した。

5. CPA による腫瘍組織中の感染性 T-01 の増加

CPA 投与によりマウスの免疫能が低下していることが示唆されたため (図 5)、次に腫瘍組織中の感染性ウイルス力価を定量した。T-01 単独群で感染性 T-01 が検出されたのは 9 匹中 2 匹であったのに対し CPA+T-01 群では 11 匹中 10 匹の腫瘍組織から感染性 T-01 が検出され、腫瘍組織から感染性 T-01 が検出されたマウスの個体数は CPA+T-01 群で有

意に多かった ($p < 0.01$, オッズ比 35.0). ウイルス感染力価で比較すると, T-01 単独群は 12.2PFU/g であったのに対し, CPA+T-01 群では 539.0PFU/g であった (図 6). 免疫能およびウイルス感染力価の結果から, CPA により免疫能の低下した子宮頸がんモデルマウスでは有意に T-01 が増殖していることが明らかになった.

IV. 考 察

我々は, T-01 による腫瘍溶解性ウイルス療法抗腫瘍効果の改善を目指し検討を行ってきた. T-01 と免疫チェックポイント阻害剤との併用では, 抗腫瘍免疫とともに T-01 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が増強され T-01 による腫瘍溶解効果は減弱されてしまった²⁰⁾. ヒト子宮頸がん浸潤した CTL は病態の進行を抑制し⁴²⁾, 腫瘍浸潤リンパ球とヒト子宮頸がんの病態進行には強い関連が示されている⁴³⁻⁴⁴⁾. このように子宮頸がんの増殖抑制と腫瘍免疫には強い関連があるが, 本研究では T-01 の腫瘍増殖抑制効果をより促すため, 免疫抑制作用を有する抗がん剤である CPA との併用を検討した. 治療スケジュールの策定では, T-01 は腫瘍増殖抑制効果が明らかになっているこれまでの研究に用いた接種スケジュール²⁰⁾とした. CPA は有害事象として骨髄抑制が報告されているため⁴⁵⁾, 貧血状態にあるマウスへの CPA 投与は貧血の増悪を惹起することが予測された. 子宮頸がんモデルマウスで経時的な Hb 値の測定を行ったところ, TC-1 細胞移入後 21 日以降では有意に Hb 値が低下していた (図 1). メスの C57BL/6 マウスの貧血の Hb 値の指標は 13.9g/dL であるため³⁵⁾, TC-1 細胞移入後 21 日以降での子宮頸がんモデルマウスは貧血状態であったと考えられた. メスの C57BL/6 マウスでは循環血流量の 25% を 7 日間隔で採血を行っても貧血にならないことが明らかになっている³⁵⁾. マウスの循環血流量は体重の 6%⁴⁶⁾

であることから本研究で用いたマウスの循環血流量は約 1.2mL であり, その 25% は約 300 μ L である. Hb 値測定のための採血量は 7 日間隔で 50-100 μ L であるため, TC-1 細胞移入後 21 日以降でみられた貧血は頻回採血によるものではないと考えられた. 貧血の原因は明らかではないが, CPA 投与は Hb 値の低下を認めていない 14 日までの投与が望ましいと考え, CPA 投与は 7, 11, 14 日での投与とした.

無治療対照群と T-01 単独群の腫瘍体積を比較すると T-01 単独群は有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた (図 2). これは, これまでの結果¹⁹⁻²⁰⁾と一致するものであり, 子宮頸がんモデルマウスに対する T-01 の抗腫瘍効果が改めて示された. 無治療対照群と CPA 単独群を比較すると CPA 単独群は有意な腫瘍増殖抑制効果を認めており, CPA の投与量が子宮頸がんモデルマウスに対して適切な量であることが示唆された. CPA+T-01 群でも同様に無治療対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果がみられ, さらに CPA と T-01 の併用は CPA 単独群または T-01 単独群と比較しても有意な腫瘍増殖抑制効果をもたらした (図 2). T-01 と免疫チェックポイント阻害剤との併用は互いにその効果を阻害してしまったが²⁰⁾, 本研究結果から CPA と T-01 とはそれぞれの効果を阻害することはないと考えられた. CPA の抗腫瘍作用はアルキル化であるため²³⁾, CPA が T-01 のウイルス DNA に作用し抗腫瘍効果に影響を及ぼすことが懸念されたが, CPA と T-01 との併用によりそれぞれの作用が拮抗しないことが明らかになった. DNA に架橋反応を起こす抗がん剤であるシスプラチンの HSV への作用では, ウイルスタンパクである ICP8 によるバイパス経路が誘導され, HSV はシスプラチンにより複製が阻害されないことが報告されている⁴⁷⁾. さらに, CPA でも HSV の複製を阻害しないことが明らかになっている⁴⁸⁾. 詳細な検討は行っていないが, T-01 と CPA においても同様の機序によ

り拮抗作用が回避されたと考えられた。

TC-1細胞移入後28日における無治療対照群の腫瘍体積に対する各治療群の腫瘍体積の比率はT-01単独群で41.3%、CPA単独群で56.0%、CPA+T-01群で30.5%とCPA+T-01群は治療群の中で最も高い腫瘍増殖抑制効果を認めた。生存率からみても無治療対照群に対してCPA+T-01群は有意に生存期間が延長された。それぞれの単独治療群と比較してもCPA+T-01群は生存率が高い傾向にあり、観察期間にマウスが死亡することはなかった(図3)。これらの結果から、CPAを併用したT-01の腫瘍溶解性ウイルス療法はこれまでのT-01単独での治療効果を改善させることが可能であることを明らかにした。

T-01とCPAとの併用でより強い腫瘍増殖抑制効果が得られた機序を検討するため、子宮頸がんモデルマウスの免疫能および腫瘍組織中のウイルス力価を解析した。無治療対照群とCPA単独群の脾臓中のリンパ球数を測定するとCPA単独群で有意に減少していた(図4)。CPAによるリンパ球減少症はヒトにおいても報告されている⁴⁹⁾。CPAが末梢リンパ球を減少させることで抗ウイルス免疫が低下しT-01による腫瘍溶解効果が高まった可能性があるが、同時に腫瘍特異的CTLも減少したと推察される。そのため、末梢リンパ球の減少だけが腫瘍増殖抑制効果を増強させる機序であるとは考えにくい。

興味深いことに、CPAを投与された担がんマウスでは腫瘍特異的CTLが増強されることが明らかになっている⁵⁰⁾。CPAの免疫抑制作用と矛盾するようと思われるが、CPAはナイーブT細胞にのみ作用し、CTLには作用しないためである⁵¹⁾。脾臓中のCD3陽性T細胞およびCD4陽性T細胞の比率は無治療対照群と比較してCPA単独群で有意に高かった(図4)。PHA-MおよびCon-AはT細胞マイトジェンでありT細胞を増殖させる作用があるが⁵²⁾、

どちらのマイトジェンでもT細胞の比率はCPA単独群の方が高いにも関わらずSIは無治療対照群の方が高かった(図5)。これらのマイトジェンを用いたリンパ球幼若化試験では、T細胞中のナイーブT細胞の比率が低ければSIの値は小さくなる⁵³⁾。さらに、末梢のリンパ球が一時的に急速な減少するとリンパホメオスタシス(lymphoid homeostasis)維持のため末梢に残存するリンパ球が増殖する⁵⁴⁾。CPA単独群ではCPAによりナイーブT細胞が減少し、それを補うため末梢のCTLが増殖したと考えられた。

腫瘍増殖抑制効果を考える上で、この増殖したと考えられるCTLが重要になる。治療スケジュールはTC-1細胞移入後7日目にCPAを投与しT-01を接種している。CPA投与前にはT-01を接種していないことから、CPA投与時には腫瘍細胞特異的CTLの誘導が開始されていると考えられるがT-01特異的CTLは存在しない。即ち、CPAの作用によりマウス生体内に腫瘍細胞特異的CTLが選択的に増幅されるとともにナイーブT細胞の減少によりT-01特異的CTLへの誘導が抑制され、腫瘍内のウイルス量がT-01単独群と比較して有意に高まり(図6)、結果としてCPA+T-01群でより高い腫瘍増殖抑制効果が観察されたと考えられた。CPAを事前投与した動物ではHSV-1の個体内でのウイルス複製効率の増強や期間の延長がみられ^{55, 56)}、このような現象はアデノウイルスやHSV-2でも報告されている^{50, 57)}。本研究では、CPAによる腫瘍免疫や抗ウイルス免疫の調節に対する詳細な検討は行っていないが、将来これらの研究を行うことでヒトへの応用に向けより適切な治療スケジュールを構築できると考えられた。

本研究ではCPAの併用により子宮頸がんモデルマウスでの腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍効果が増強されることを明らかにした。腫瘍溶解性ウイルスとCPAの併用は神経膠腫や横紋筋

肉腫で検討されており^{36, 48, 56)}, また, 抗がん剤であるパクリタキセルやシスプラチンにも CPA と同様の併用効果があることが報告されている^{58, 59)}. 今後, 臨床での子宮頸がん治療に向け, T-01 に最も適した抗がん剤との併用も検討していくべきであると考えられた.

近年, 免疫チェックポイント阻害剤は複数の悪性腫瘍で治療が試みられている. 免疫チェックポイント阻害剤によるがん治療は, 免疫能の正の調節による治療法だが, 死亡例を含め重篤な有害事象が報告されている^{60, 61)}. 本研究は, 逆に免疫能の負の調節によるがん治療法である. T-01 と CPA の併用による抗腫瘍効果は, T-01 の腫瘍溶解作用と CPA の抗がん作用との相加作用ではなく, CPA による抗ウイルス免疫の抑制と腫瘍免疫の増強による相乗作用でより強い腫瘍増殖抑制効果が得られたと考えられた. T-01 は安全性の高い腫瘍溶解性ウイルスであり⁶²⁾ CPA は既存医薬品であるため, これらによる併用療法は有効で安全性の高い新規子宮頸がん療法になり得ると推察された.

稿を終えるにあたり T-01 の提供を賜りました東京大学医学研究所先端医療研究センター先端がん治療部門医科学研究所附属病院脳腫瘍外科の藤堂具紀教授, 稲生靖准教授に深く感謝致します. TC-1 細胞の提供を賜りました Johns Hopkins University の Tzyy-Chou Wu 教授に深く感謝致します.

また御指導, 御協力を賜りました岩手医科大学微生物学講座感染症学・免疫学分野の八重樫寿美子女史, 高橋尚子女史に深く感謝致します.

動物実験にあたりましては御指導, 御協力賜りました岩手医科大学医歯薬総合研究所動物実験センターの技術員諸兄に深く感謝致します.

本研究は学術研究助成基金助成金 [科研費: 利部正裕 (挑戦的萌芽, JP16K15711)] および一部は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S1491001, 2014 - 2018) の助成によって行われた.

利益相反: 著者には開示すべき利益相反はない.

References

- 1) **Stewart BW and Wild CP:** World cancer report 2014. USA, 2014.
- 2) 厚生労働省大臣官房統計情報部: 人口動態統計 2014 年, 2014.
- 3) **Hausen HZ:** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**, 342-350, 2002.
- 4) **Goldhaber-Fiebert JD, Stout NK, Ortendahl J, et al.:** Modeling human papillomavirus and cervical cancer in the United States for analyses of screening and vaccination. *Popul Health Metr* **5**, 11, 2007.
- 5) **El-Zein M, Richardson L and Franco EL:** Cervical cancer screening of HPV vaccinated populations: Cytology, molecular testing, both or none. *J Clin Virol* **76**, 62-68, 2016.
- 6) **Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, et al.:** Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* **340**, 1154-1161, 1999.
- 7) **Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al.:** Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* **340**, 1137-1143, 1999.
- 8) **Peters WA 3rd, Liu PY, Barrett RJ 2nd, et al.:** Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* **18**, 1606-1613, 2000.
- 9) **Whitney CW, Sause W, Bundy BN, et al.:** Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* **17**, 1339-1348, 1999.
- 10) **Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD et al.:** Conditionally replicating herpes simplex virus

- mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* **10**, 867-874, 2000.
- 11) **Xia ZJ, Chang JH, Zhang L, et al.**: Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. *Ai Zheng* **23**, 1666-1670, 2004.
 - 12) **Vidal L, Pandha HS, Yap TA, et al.**: A phase I study of intravenous oncolytic reovirus type 3 Dearing in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 7127-7137, 2008.
 - 13) **Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, et al.**: Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* **70**, 875-882, 2010.
 - 14) **Pol J, Bloy N, Obrist F, et al.**: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* **3**, e28694, 2014.
 - 15) **Sokolowski NA, Rizos H and Diefenbach RJ**: Oncolytic virotherapy using herpes simplex virus: how far have we come? *Oncolytic Virther* **4**, 207-219, 2015.
 - 16) **Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, et al.**: Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 6396-6401, 2001.
 - 17) 三浦雄吉, 利部正裕, 齋藤達憲, 他: 婦人科癌に対する新規腫瘍溶解性単純ヘルペス治療の検証. *岩手医誌* **65**, 293-305, 2013.
 - 18) **Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, et al.**: Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* **56**, 21-26, 1996.
 - 19) 齋藤達憲, 吉野直人, 三浦雄吉, 他: oncolytic herpes simplex virus-1 を用いた子宮頸がんに対する新規ウイルス療法の基礎的研究. *岩手医誌* **66**, 143-152, 2014.
 - 20) 村上一行, 利部正裕, 佐々木裕, 他: 腫瘍溶解性ウイルスと免疫チェックポイント阻害剤を併用した子宮頸がんに対する新規治療法の検討. *岩手医誌* **65**, 113-131, 2016.
 - 21) **Emadi A, Jones RJ and Brodsky RA**: Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 638-647, 2009.
 - 22) **Bullock G, Tang C, Tourkina E, et al.**: Effect of combined treatment with interleukin-3 and interleukin-6 on 4-hydroperoxycyclo-phosphamide-induced programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Exp Hematol* **21**, 1640-1647, 1993.
 - 23) **Hengstler JG, Hengst A, Fuchs J, et al.**: Induction of DNA crosslinks and DNA strand lesions by cyclophosphamide after activation by cytochrome P450 2B1. *Mutat Res* **373**, 215-223, 1997.
 - 24) **Omura GA, Vélez-García E and Birch R**: Phase II randomized study of doxorubicin, vincristine, and 5-FU versus cyclophosphamide in advanced squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer Treat Rep* **65**, 901-903, 1961.
 - 25) **Smith JP, Rutledge F, Burns BC, et al.**: Systemic chemotherapy for carcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol* **97**, 800-807, 1967.
 - 26) **Scatchard K, Forrest JL, Flubacher M, et al.**: Chemotherapy for metastatic and recurrent cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **10**, CD006469, 2012.
 - 27) **Berenbaum MC and Brown IN**: Dose-response relationships for agents inhibiting the immune response. *Immunology* **7**, 65-71, 1964.
 - 28) **Salvin SB and Smith RF**: The specificity of allergic reactions. VII. Immunologic unresponsiveness, delayed hypersensitivity, and circulating antibody to proteins and haptent-protein conjugates in adult guinea pigs. *J Exp Med* **119**, 851-868, 1964.
 - 29) **Binotto G, Trentin L and Semenzato G**: Ifosfamide and cyclophosphamide: effects on immunosurveillance. *Oncology* **65**, 17-20, 2003.
 - 30) **Balducci L**: Myelosuppression and its consequences in elderly patients with cancer. *Oncology (Williston Park)* **17**, 27-32, 2003.
 - 31) **Othieno-Abinya NA, Waweru A and Nyabola LO**: Chemotherapy induced myelosuppression. *East Afr Med J* **84**, 8-15, 2007.
 - 32) **Gallicchio VS**: Lithium and hematopoietic toxicity. I. Recovery in vivo of murine hematopoietic stem cells (CFU-S and CFU-Mix) after single-dose administration of cyclophosphamide. *Exp Hematol* **14**, 395-400, 1986.
 - 33) **Scinto AF, Ferraresi V, Campioni N, et al.**: Accelerated chemotherapy with high-dose epirubicin and cyclophosphamide plus r-met-HUG-CSF in locally advanced and metastatic breast cancer. *Ann Oncol* **6**, 665-671, 1995.
 - 34) **Feng L, Huang Q, Huang Z, et al.**: Optimized animal model of cyclophosphamide-induced bone

- marrow suppression. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **119**, 428-435, 2016.
- 35) **Raabe BM, Artwohl JE, Purcell JE, et al.:** Effects of weekly blood collection in C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **50**, 680-685, 2011.
- 36) **Currier MA, Gillespie RA, Sawtell NM, et al.:** Efficacy and safety of the oncolytic herpes simplex virus rRp450 alone and combined with cyclophosphamide. *Mol Ther* **16**, 879-885, 2008.
- 37) **Carlsson G, Gullberg B and Hafström L:** Estimation of liver tumor volume using different formulas - an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* **105**, 20-23, 1983.
- 38) **Yoshino N, Takizawa M, Akiba H, et al.:** Transient elevation of intracellular calcium ion levels as an early event in T-2 toxin-induced apoptosis in human promyelotic cell line HL-60. *Nat Toxins* **4**, 234-241, 1996.
- 39) **Dean JH, Connor R, Herberman RB, et al.:** The relative proliferation index as a more sensitive parameter for evaluating lymphoproliferative responses of cancer patients to mitogens and alloantigens. *Int J Cancer* **20**, 359-370, 1977.
- 40) **Robinson JH and Owen JJ:** Generation of T-cell function in organ culture of foetal mouse thymus I. Mitogen responsiveness, 1975. *J Immunol* **181**, 7437-7433, 2008.
- 41) **Cantatore A, Randall SD, Traum D, et al.:** Effect of black tea extract on herpes simplex virus-1 infection of cultured cells. *BMC Complement Altern Med* **13**, 139, 2013.
- 42) **Woo YL, Sterling J, Damay I, et al.:** Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG* **115**, 1616-1621, 2008.
- 43) **Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, et al.:** High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res* **67**, 354-361, 2007.
- 44) **Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, et al.:** Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res* **14**, 2028-2035, 2008.
- 45) **Que L, He L, Yu C, et al.:** Activation of Nrf2-ARE signaling mitigates cyclophosphamide-induced myelosuppression. *Toxicol Lett* **16**, 17-26, 2016.
- 46) **Joslin JO:** Blood collection techniques in exotic small mammals. *J Exot Pet Med* **18**, 117-139, 2009.
- 47) **Le Gac NT, Villani G and Boehmer PE:** Herpes simplex virus type-1 single-strand DNA-binding protein (ICP8) enhances the ability of the viral DNA helicase-primase to unwind cisplatin-modified DNA. *J Biol Chem* **273**, 13801-13807, 1998.
- 48) **Chase M, Chung RY and Chiocca EA:** An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. *Nat Biotechnol* **16**, 444-448, 1998.
- 49) **Munyangango EM, Le Roux-Villet C, Doan S, et al.:** Oral cyclophosphamide without corticosteroids to treat mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol* **168**, 381-390, 2013.
- 50) **Li H, Zeng Z, Fu X and Zhang X:** Coadministration of a herpes simplex virus-2 based oncolytic virus and cyclophosphamide produces a synergistic antitumor effect and enhances tumor-specific immune responses. *Cancer Res* **67**, 7850-7855, 2007.
- 51) **Hermans IF, Chong TW, Palmowski MJ, et al.:** Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model. *Cancer Res* **63**, 8408-8413, 2003.
- 52) **Dwyer JM and Johnson C:** The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clin Exp Immunol* **46**, 237-249, 1981.
- 53) **Brunnsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, et al.:** Proliferative responses of blood mononuclear cells (BMNC) in a cohort of elderly humans: role of lymphocyte phenotype and cytokine production. *Clin Exp Immunol* **119**, 433-440, 2000.
- 54) **Jameson SC:** Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2**, 547-556, 2002.
- 55) **Kambara H, Saeki Y and Chiocca EA:** Cyclophosphamide allows for in vivo dose reduction of a potent oncolytic virus. *Cancer Res* **65**, 11255-11258, 2005.
- 56) **Fulci G, Breyman L, Gianni D, et al.:** Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 12873-12878, 2006.
- 57) **Lamfers ML, Fulci G, Gianni D, et al.:** Cyclophosphamide increases transgene expression

- mediated by an oncolytic adenovirus in glioma-bearing mice monitored by bioluminescence imaging. *Mol Ther* **14**, 779-788, 2006.
- 58) **Machiels JP1, Reilly RT, Emens LA, et al.:** Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res* **61**, 3689-3697, 2001.
- 59) **Song CK, Han HD, Noh KH, et al.:** Chemotherapy enhances CD8+ T cell-mediated antitumor immunity induced by vaccination with vaccinia virus. *Mol Ther* **15**, 1558-1563, 2007.
- 60) **Postow MA:** Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, pp. 76-83, 2015.
- 61) **Hofmann L, Forschner A, Loquai C, et al.:** Cutaneous, gastrointestinal, hepatic, endocrine, and renal side-effects of anti-PD-1 therapy. *Eur J Cancer* **60**, 190-209, 2016.
- 62) **Todo T and Fukuhara H:** Recombinant herpes virus and pharmaceutical composition containing recombinant herpes virus. WO Patent 2011101912 A1. 2011-08-25.

A study of combination therapy using
oncolytic virus and cyclophosphamide for
cervical cancer model mice

Hideki KAWAMURA^{1), 2)}, Masahiro KAGABU¹⁾, Yutaka SASAKI²⁾,
Kazuyuki MURAKAMI¹⁾, Hanae KAWAMURA¹⁾,
Koji IKEDA²⁾, Akiko ABO³⁾, Naoto YOSHINO²⁾,
Yasushi MURAKI²⁾ and Toru SUGIYAMA¹⁾

¹⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

²⁾ Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Microbiology,
School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba, Japan

³⁾ Division of Pathology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

(Received on December 2, 2016& Accepted on December 19, 2016)

Abstract

Advanced or recurrent cervical cancer is often difficult to treat. Development of therapeutics for these cervical cancers is an urgent issue. We examined a combination therapy of oncolytic viral therapy (T-01) and cyclophosphamide (CPA) to develop a new therapy using cervical cancer model mice. The combination therapy significantly controlled the growth of tumors compared with T-01 or CPA monotherapy. Next, we analyzed the immunocompetence of the model mice to clarify the mechanisms of the combination therapy, as CPA exhibits not only anticancer activity but also an immunosuppressive action. The number of lymphocytes in the spleen and the lymphoproliferative

reactions of CPA-treated mice were significantly reduced as compared with untreated control mice. It was supposed that CPA suppressed T-01 specific cytotoxic T lymphocytes. Indeed, titers of T-01 in the tumors of mice subjected to combination therapy were larger than in the case of T-01 monotherapy. The increased titer of T-01 might produce higher antitumor effects. These results suggested that the immunosuppressive effect of CPA brought out a more potent oncolytic effect of T-01. This study showed that combination of T-01 and CPA could lead to improved oncolytic viral therapy, and we anticipate clinical application of this combination in the future.
