

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

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

齋藤達憲¹⁾，吉野直人²⁾，三浦雄吉¹⁾，松川直美²⁾，
竹下良輔¹⁾，利部正裕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

Running title：子宮頸がんに対する新規ウイルス療法の基礎検
討

齋藤達憲，他

要旨

腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (Oncolytic herpes simplex virus: oHSV) とは, 分子生物学的手法を用いて弱毒化し選択的に腫瘍内だけで増殖し細胞を死に至らしめる単純ヘルペスウイルス 1 型である. 我々は第 3 世代 oHSV である T-01, T-mfIL12 を使用し, *in vitro* および *in vivo* にて子宮頸がんへの効果を検証した. *in vitro* において T-01 および T-mfIL12 はともに強い殺細胞効果が得られた. また, T-mfIL12 では IL-12 の強い発現を認めた. *in vivo* では, TC-1 によりマウスに形成された腫瘍に対し T-01 および T-mfIL12 の投与を行い, ともに腫瘍増殖抑制効果を認めた. また, 腫瘍増殖抑制効果は T-01 と T-mfIL12 の間には統計学的有意差は認めなかった. T-01 および T-mfIL12 に強い抗腫瘍効果を認めたことにより, oHSV を用いたウイルス治療が子宮頸がんに対して新規治療法として有用である可能性が

示唆された。

Key words: oncolytic herpes simplex virus, cervical cancer,
oncolytic virotherapy, T-01, T-mfIL12

I. 緒言

子宮頸がんは、全世界の女性では年間の罹患率が第3位、死亡率も第7位を占めている¹⁾。また、2008年には約530,000人が発症し、275,000人が死亡している¹⁾。子宮頸がんの発癌にはヒトパピローマウイルス（HPV）の感染が関与することが近年の研究で明らかになり、HPV感染の予防としてワクチンが開発され、子宮頸がんの罹患者減少が期待されている。現在、子宮頸がんに対する治療方法は手術療法、化学療法および放射線療法など集学的治療がおこなわれている。しかし、進行もしくは再発の患者に対する治療成績をみると必ずしも良好とは言えないのが現状である。そのためこれらの治療法に加え新たな治療法を模索、開発することが婦人科悪性腫瘍領域において課題となっている。そこで我々は、新規治療法として腫瘍溶解性ヘルペスウイルス（oncolytic herpes simplex virus : oHSV）を使用した治療法に注目した。

oncolytic virus とは, 分子生物学的手法を用いてウイルスを弱毒化し, 選択的に腫瘍内のみにはしか増殖できないように作製されたウイルスである. oncolytic virotherapy とは, 腫瘍にウイルスを接種することで, 腫瘍溶解あるいは細胞変性を引き起こし, 抗腫瘍効果をもたらす治療方法である. この治療法は, 1991年に脳腫瘍に対してチミジンキナーゼ欠損単純ヘルペスウイルスを用いた治療効果が報告され²⁾, その後は様々なウイルスを用いた研究が進行している. oHSV には 1716, G207, NV1020, OncoVexGM-CSF などがあり, これまで種々の悪性腫瘍を対象に臨床試験が行われているが, その効果は限定的である³⁻⁹⁾. ここで我々の共同研究者である藤堂らは, T-01 (G47 Δ) を開発した. T-01 (G47 Δ) は, γ 34.5 遺伝子の欠失と ICP6 遺伝子の不活化の 2 カ所の遺伝子変異に加え, 新たに α 47 遺伝子を欠失させたウイルスである. α 47 遺伝子は宿主細胞の抗原提示関連トランスポーター (TAP) を阻害し細胞表面の MHC class I の発現

を抑制する。α 47 遺伝子を欠失させることで腫瘍細胞での MHC class I の発現が保持され抗原提示が可能となる。これによりウイルスによる腫瘍溶解性に加え、生体の腫瘍免疫を増強させる効果が期待されている¹⁰⁾。これまで子宮頸がんに対し oHSV の効果を検証した報告は少ない¹¹⁾。そこで我々は、子宮頸がんにおける T-01 の効果を検証する目的で本研究を行った。

また、oHSV はウイルス自体の腫瘍溶解性効果だけでなく遺伝子療法のベクターとしても注目されている。現在のところ、サイトカインや GM-CSF 遺伝子を搭載し、oHSV 自体が引き起こす抗腫瘍免疫をさらに増強することが報告されている^{8,12-19)}。そこで我々は、腫瘍免疫を活性化させる観点から、T 細胞や NK 細胞に対し細胞傷害活性誘導、IFN-γ 産生誘導の作用を示す IL-12 に着目し、IL-12 遺伝子を搭載した T-mfIL12 の効果についても検証した。

II. 研究材料および方法

1. cell lines

HPV16-E6/7 遺伝子を導入したマウス肺がん細胞 TC-1²⁰⁾ (Johns Hopkins 大学, Tzyy-Chou Wu 教授より供与) を使用した. 細胞培養は RPMI1640 培地 (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) に 10% ウシ胎児血清, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, 同仁化学研究所, 熊本), 0.2mg/ml ストレプトマイシン, 200 U/ml ペニシリンを添加した培養液で, 37°C, 5%CO₂ 条件下で培養した. 細胞増殖の測定は, 1×10⁵個の TC-1 細胞を T-25 フラスコ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) で培養し, 72 時間後および 96 時間後に TC20™ 全自動セルカウンター (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて生存細胞数を測定した.

2. virus

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）より提供された。T-01 は HSV-1 を遺伝子組み換えし作成した α HSV であり，また γ 34.5 遺伝子， α 47 遺伝子，ICP6 遺伝子を欠失させたウイルスである¹⁰⁾。T-mfIL12 には，T-01 の ICP6 遺伝子欠失領域にマウス IL-12 の cDNA が挿入されており，CMV プロモータにより発現される。¹⁹⁾

3. 細胞増殖能の測定

1×10^5 個/well に調整し培養した細胞を 72 時間後および 96 時間後にそれぞれトリパンブルー色素排除試験法を用い，TC20™ 全自動セルカウンター（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）を用いて生存細胞数を計測した。

4. ウイルスの殺細胞効果の検討

oHSV を使用する研究は、DNA 遺伝子組み換え実験委員会の承諾を得た後に行った。96-well 平面培養プレート (Thermo Fisher Scientific K.K., 横浜) に 1×10^4 cell/well に調節し、それぞれの細胞を播種させた。播種 48 時間後に T-01 および T-mfIL12 を 0.1, 1, 10 multiplicity of infection (MOI) で細胞に感染させ、感染後 48 時間後の細胞生存率を測定し、非感染群と比較した。測定は 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。試薬添加 2 時間後に 490nm (OD490) および参照波長として 630nm (OD630) の吸光度をマイクロプレートリーダー (Tecon Austria GmbH, Leobersdorf, Austria) で測定した。細胞生存率は以下の計算で求めた。細胞生存数 (%) =

$$\frac{\text{(ウイルス添加 well の OD490-ウイルス添加 well の OD630)}}{\text{(ウイルス非添加 well の OD490-ウイルス非添加 well の OD630)}}$$

OD630). 正常細胞およびウイルス感染細胞は光学顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE, TE300, 東京) を用いて観察した.

5. IL-12 発現の検討

96-well 平面培養プレート (Thermo Fisher Scientific K.K., 横浜) に 1×10^4 cell/well に調節しそれぞれの細胞を播種させた. 播種 48 時間後に T-01 および T-mfIL12 を 0.1, 1, 10 MOI で細胞に感染させ, 感染後 48 時間後に上澄を採取し, IL-12 を測定し, 非感染群と比較した. 測定は Quantikine Mouse IL-12/IL-23 p40 (allele-specific) Immunoassay キット (R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した.

6. 抗腫瘍効果

担がんマウスの動物実験は岩手医科大学動物実験委員会の承認後 (承認番号 23-061), 本学動物研究センターで, 本学動物

実験センター利用規約を順守して実施した。oHSV の抗腫瘍効果は動物研究センターの感染実験室で行った。実験動物には 5 週齢の雌の C57BL/6NJcl マウス（日本クレア株式会社, 東京）を用いた。飼育室の環境に馴化させるため, Specific pathogen free 施設で 10 日間の飼育後に実験を開始した。TC-1 細胞を Phosphate buffered saline (PBS) 中に 1×10^5 個/100 μ l に調整し, 細胞懸濁液を剃毛したマウス背部に皮下接種した。10, 14, 19, 24, 28, 33 日後に PBS に懸濁した 1×10^5 Plaque-forming unit (PFU) /50 μ l の T-01 または T-mfIL12 を腫瘍内接種した。細胞接種時およびウイルス接種時は, マウスにソムノペンチル（共立製薬株式会社, 東京）を 50mg/kg 腹腔投与し不動化した。細胞接種後 2-3 日間隔で腫瘍径および体重を測定した。腫瘍体積は以下の計算で求めた。腫瘍体積 (mm^3) = 腫瘍の短径 (mm) \times 腫瘍の短径 (mm) \times 腫瘍の長径 (mm) $\div 2$ ^{22,23}。

7. 免疫学的解析

細胞接種 26 日後（4 回目のウイルス接種から 2 日後）にマウス脾臓を採取した。脾臓は 70 μ m-セルストレーナーで（BD, Franklin Lakes, NJ, USA）で解した後, ACK バッファー（蒸留水に 0.826% NH_4Cl , 0.1% KHCO_3 , 0.0037% EDTA-2Na を溶かし pH7.3 に調整）で赤血球を溶解した。フローサイトメーター解析を行うため, 細胞を染色用バッファー中で FITC-標識抗マウス CD8a 抗体（BD）, PE-標識 H-2Db HPV16 E7 テトラマー-RAHYNIVTF（株式会社医学生物学研究所, 名古屋）, PerCP-Cy5.5-標識抗マウス CD4 抗体（BD, Biosciences, 東京）および APC-標識抗マウス CD3 ϵ 抗体（BD, Biosciences, 東京）で 30 分染色した。染色用バッファーで細胞を洗浄後, FACS Calibur（BD, Biosciences, 東京）で測定し, Cell Quest software（BD, Biosciences, 東京）で解析した。

8. 統計処理

3 群間の比較は医学統計解析ソフト・GraphPad Prism ver6.0b を用いて one-way ANOVA（一元配置分散分析）を行い,有意差を認めた場合は,群間の差を Tukey's multiple comparison test で確認した. p 値が 0.05 未満を有意差ありとした.

III. 結果

1. TC-1 の細胞増殖能

本研究で T-01 および T-mfIL12 の腫瘍溶解性を検討するために標的細胞である TC-1 の細胞増殖能を測定した。培養開始後 48 時間までは急激な細胞増殖は認めなかった。72 時間後には培養開始時の 10.8 倍、96 時間後には 20.7 倍に細胞が増加した(図 1) 。 TC-1 が 2 分裂するのに要する倍加時間は 48 時間から 72 時間および 72 時間から 96 時間での倍加時間はそれぞれ 10.6 時間および 25.5 時間であった。

2. oHSV の細胞傷害効果

TC-1 に対する T01 および T-mfIL12 の細胞傷害効果を *in vitro* で確認した。TC-1 に種々の MOI で T-01 および T-mfIL12 を感染させたところ、24 時間後に 10MOI で感染させた細胞では、T-01、T-mfIL12 とともに広範に細胞変性効果(細胞形態の円形化、

集合、崩壊) が起こり, 1MOI でも中等度の細胞変性効果が観察された(図 2). それぞれの生存細胞数を測定したところ, 10MOI で T-01 および T-mfIL12 を感染させた群では非感染群と比較して約 80%の細胞が傷害されていた. 24 時間後, 48 時間後において, T-01 と T-mfIL12 を比較すると両群間に細胞変性効果には有意差は認めなかった(図 3A, B). また, 細胞生存率の結果から, 24 時間後に 50%の細胞を傷害させるために必要な MOI は, T-01 で 3.3MOI, T-mfIL12 で 3.7MOI であった.

3. IL-12 発現の検討

T-01 および T-mfIL12 感染後の IL-12 産生について, *in vitro* において ELISA で検討した. T-01 感染後では, すべての濃度において IL-12 の産生を認めなかった. しかしながら, T-mfIL12 では, 0 および 0.1 MOI で IL-12 の産生を認めなかったが, 1 および 10 MOI では濃度依存性に IL-12 の産生を認めた(図 4).

4. 担癌マウスモデルの作製

生体での T-01 および T-mfIL12 の腫瘍溶解効果を確認するため、TC-1担癌マウスモデルを作製した。マウス背部に TC-1 を接種し、その後 2-3 日間隔で腫瘍体積および体重の測定を行い、全身兆候を観察した。観察期間中、体重の急激な減少は無く(図 5)、いずれのマウスも、被毛の汚れ、立毛、うずくまり姿勢は見られなかった。腫瘍形成は、最短で TC-1 接種 5 日後に確認され、12 日後にはすべてのマウスで腫瘍形成が確認された。TC-1 接種後 35 日目に平均体重 22g のマウスに腫瘍体積が最大 1.904mm³ (平均 1.532 mm³) に増殖した腫瘍を認めた。腫瘍実験における動物の福祉に関する UKCCCR (United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research) ガイドライン 1997 では、固形腫瘍の重量を宿主の体重の 10%以下に制限することを勧告しており、35 日目を人道的エンドポイントとした。

5. 担癌マウスモデルにおける腫瘍体積の経時変化

TC-1 担癌マウスモデルおよびそのエンドポイントが確立できたので、T-01 および T-mfIL12 の腫瘍溶解効果をそれぞれ 5 匹ずつのマウスを用いて検討した。T-01 または T-mfIL12 接種群において、非接種群（コントロール群）の体重と比較して有意な変動は無く（図 5）、観察期間中に外観および行動に異常は認められなかった。1 日目の接種から 4 日後までは T-01、T-mfIL12 接種群ではコントロール群の腫瘍体積と比較して有意な縮小効果は見られなかったが、2 回目の接種から 5 回目の接種に T-01、T-mfIL12 とともに有意に縮小した。その後、観察終了まで T-01 および T-mfIL12 の腫瘍溶解効果は維持された（図 6）。

6. 腫瘍溶解ウイルスの接種回数比較

T-01 および T-mfIL12 の接種回数により接種直前と次接種直

前までの腫瘍体積に差があるかを検討した。その結果、3-4回の接種でコントロール群に比べ有意に腫瘍体積の増大を抑制できた。また T-01 投与群と T-mfIL12 投与群の間では接種回数による腫瘍体積増大の抑制効果については明らかな有意差は認められなかった (図 7)。

7. 免疫学的解析

ウイルス接種 26 日後 (4 回目のウイルス接種から 2 日後) に脾臓を採取し、HPV16 E7 テトラマーを使用してフローサイトメーターで E7 特異的な細胞障害性 T 細胞を計測した。コントロール群と比較して、T-01 および T-mfIL12 投与群では CD8 陽性細胞は増加したが、有意差は認めなかった。また、CD8 陽性細胞中の E7 特異的な細胞の割合には、コントロール群と比較して有意な増加は認めなかった (表 1)。

IV.考察

今回、我々は子宮頸がんに対する α HSV 療法の臨床応用の可能性を模索するための基礎的検討を行った。マウスによる動物実験に先立ち、今回使用する TC-1 の細胞増殖能を観察した。その結果から、TC-1 は特に 48～72 時間での細胞増殖速度が極端に高い細胞であることが確認された。また 96 時間後の増殖細胞数を他の文献の²²⁾ヒト由来培養細胞と比較を行うと、ヒト子宮頸がん細胞 SKGIIIa では 1.5 倍、ヒト卵巣がん細胞 CaOV-3 では 7.3 倍に細胞数が増殖していたのに対し、TC-1 では 20.7 倍の増殖能をもつことが確認された。この結果をもとに、T-01、T-mfIL12 の細胞傷害効果を検討した。今回我々は G207 に改良を加えた T-01(G47 Δ)、T-mfIL12 を使用した。T-01 は、G207 に α 47 遺伝子の欠失を加えてのものである。 α 47 遺伝子を欠失させることで感染細胞での MHC class I の発現が保持され、腫瘍免疫の活性化を期待されている。藤堂らの G207 を用いたマウス

神経関連腫瘍（N18, SR-B10.A, 203GL）の報告²³⁾と比較すると、感染 24 時間後の細胞生存率は明らかに低かった。細胞増殖能が高い TC-1 に対して強い殺細胞効果を認めた理由としては、T-01 および T-mfIL12 の α 47 遺伝子の欠失が MHC class I の発現だけに関与するだけでなく、ウイルスの細胞内増殖を活性化させている可能性があると考えられた。また、マウス神経関連腫瘍（N18, SR-B10.A, 203GL）と比較して、TC-1 へのウイルス感染効率が良いことも強い殺細胞効果を認めた理由として考えられた。しかしながら、48 時間後において比較した場合、N18, SR-B10.A が生存細胞数を減少させているのに対し、TC-1 ではそれ以上の著明な殺細胞効果は認めなかった。これは T-01 および T-mfIL12 の殺細胞効果が高いものの、感染せずに残存した TC-1 が、その倍加速度が早いため、見かけ上、殺細胞効果に変化のないように見えているためと考えられた。以上より、感染効率の差より α 47 遺伝子の欠失により G207 と比較して強い細

胞傷害性を G47 Δ (T-01 および T-mfIL12) は獲得しているものと考えられた.

次に, マウスモデルを用いて抗腫瘍効果および免疫学的な検討を行った. 子宮頸がんでは, Blank らがヒト由来培養細胞を使用して免疫不全マウスにて G207 の効果を報告している¹¹⁾. その報告では, G207 で強い抗腫瘍効果を認めているが, 免疫不全モデルを用いているために抗腫瘍免疫の活性化については詳細な検討はなされていない. 子宮頸がん以外では, Todo らが脳腫瘍モデルで oHSV 療法により細胞障害性 T 細胞の腫瘍浸潤を報告しているが²⁴⁾, 免疫組織化学染色のみで特異的な腫瘍抗原の活性化に関する検討はされていない. そこで我々は, HPV16-E7 テトラマー抗体を使用して腫瘍抗原特異的細胞障害性 T 細胞について検討をおこなった. その結果, コントロール群に比較して oHSV 治療群 (T-01 および T-mfIL12) では, CD8 陽性細胞比率は増加する傾向を認めた. また, E7 特異的な CD8 陽性細胞比

率は T-01 について増加する傾向を認めたが、T-mfIL12 については増加を認めなかった。今回の検討は脾臓を用いており、oHSV 治療により腫瘍に細胞障害性 T 細胞が動員された可能性は否定できない。また、今回検討を行っている時期は、初回ウイルス投与から 2 週間ほど経過した時期であった。腫瘍溶解により腫瘍特異的な抗原暴露からしばらく時間が経過しており、抗腫瘍免疫がある程度おさまった時期に免疫学的解析を行ったため、このような結果と考えられた。

また、今回 oHSV 治療の効果増強を目的に IL12 遺伝子搭載 oHSV (T-mfIL12) を使用した。oHSV の効果増強を目的としたサイトカイン遺伝子 oHSV マウスモデルの検討では、遺伝子未搭載 oHSV より強い腫瘍増殖抑制効果が報告されている¹⁹⁾。しかしながら我々の結果は、コントロール群と比較すると oHSV 治療群 (T-01 および T-mfIL12) では、腫瘍体積に有意差を認め強い腫瘍増殖抑制効果を認めたが、T-01 治療群と T-mfIL12 治療群

では腫瘍体積に有意差を認めず、腫瘍増殖抑制効果は同等であった。*in vitro*の検討では、T-01 および T-mfIL12 間の IL12 産生に有意差を認めているが、*in vivo*での血清中および腫瘍中 IL12 の検討は行っていない。また、テトラマー抗体を使用して腫瘍抗原特異的細胞障害性 T 細胞について検討でも、CD8 陽性細胞比率に差は認められなかった。しかし、Ino らの検討では、我々と同じ oHSV を使用しているが、血清中および腫瘍中 IL12 の上昇と IL12 搭載 oHSV 治療群で腫瘍増殖抑制効果を報告している¹⁹⁾。今後我々は、血清中および腫瘍中 IL12 の測定を予定している。

今回我々は、培養細胞の中でも腫瘍増殖速度が著しく速い TC-1 を使用した担癌モデルを用いて、oHSV 療法で明らかな腫瘍増殖抑制効果を示した。以上より今回の *in vivo*, *in vitro*の研究において T-01 および T-mfIL12 の子宮頸がんモデルに対する oHSV 治療効果の可能性を示唆する結果が得られた。子宮頸が

んモデルでの oHSV 療法の報告は本邦では初の報告である。今後、子宮頸がんに対し臨床応用ができるように、さらなる解析を進めていく必要がある。

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂き，ご指導・ご校閲を賜りました岩手医科大学産婦人科学講座の杉山徹教授に深く感謝いたします。また本研究の遂行に際し，ご指導・ご協力を賜りました岩手医科大学産婦人科学講座の諸先生方，岩手医科大学医歯薬総合研究所動物実験センターの諸先生方，ならびに技術職員諸兄に深く感謝いたします。

本研究は文部科学省私立大学戦略的基盤形成支援事業，低侵襲医療実現のための患部ターゲティング医療開発研究プロジェクトから提供された。

本論文に関して開示すべき利益相反事項は無い。

V.文献

- 1) incidence/mortality data GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. <http://globocan.iarc.fr>
- 2) **Martuza RL, Malick A, Markert JM, et al.:** Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* **252**,854-856, 1991.
- 3) **Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, et al.:** Phase II clinical trial of a granulocyte - macrophage colony-stimulating factor - encoding, second- generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **27**, 5763-5771, 2009.
- 4) **Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, et al.:** Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent

malignant glioma. *Gene Ther* 7, 859-866, 2000.

5) **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* 7, 867-874, 2000.

6) **Markert JM, Liechty PG, Wang W, et al.:** Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre-and posttumor resection for recurrent GBM. *Mol Ther* 17, 199-207, 2009.

7) **Kemeny N, Brown K, Covey A, et al.:** Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther* 17, 1214-1224, 2006.

8) **Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, et al.:** A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes

simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* **12**, 6737-6747, 2006.

9) **Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, et al.:** Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 718-730, 2010.

10) **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.

11) **Blank SV, Rubin SC, Coukos G, et al.:** Replication-selective herpes simplex virus type 1 mutant therapy of cervical cancer is enhanced by low-dose radiation.

Hum Gene Ther **13**, 627-639, 2002.

12) **Andreansky S, He B, van Cott J, et al.**: Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. Gene Ther **5**, 121-130, 1998.

13) **Hellums EK, Markert JM, Parker JN, et al.**: Increased efficacy of an interleukin-12-secreting herpes simplex virus in a syngeneic intracranial murine glioma model. Neuro Oncol **7**, 213-224, 2005.

14) **Parker JN, Gillespie GY, Love CE, et al.**: Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. Proc Natl Acad Sci USA **97**, 2208-2213, 2000.

15) **Wong RJ, Patel SG, Kim S, et al.**: Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell

carcinoma. *Hum Gene Ther* **12**, 253-265, 2001.

16) **Bennett JJ, Malhotra S, Wong RJ, et al.**: Interleukin 12 secretion enhances antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex viral therapy for colorectal cancer. *Ann Surg* **233**, 819-826, 2001.

17) **Parker JN, Meleth S, Hughes KB, et al.**: Enhanced inhibition of syngeneic murine tumors by combinatorial therapy with genetically engineered HSV-1 expressing CCL2 and IL-12. *Cancer Gene Ther* **12**, 359-368, 2005.

18) **Fukuhara H, Ino Y, Kuroda T, et al.**: Triple gene-deleted oncolytic herpes simplex virus vector double-armed with interleukin 18 and soluble B7-1 constructed by bacterial artificial chromosome-mediated system. *Cancer Res* **65**, 10663-10668, 2005.

19) **Ino Y, Saeki Y, Fukuhara H, et al.**: Triple combination of

oncolytic herpes simplex virus-1 vectors armed with interleukin-12, interleukin-18, or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy. *Clin Cancer Res* **12**, 643-652, 2006.

20) **Smahel M, Síma P, Ludvíková V, et al.:** Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules. *Vaccine* **7**,1125-1136, 2003.

21) **Yoshino N, Ami Y, Terao K, et al.:** Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) by using anti-human cross-reactive antibodies. *Exp Anim* **49**, 97-110, 2000.

22) **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.

23) 三浦 雄吉, 利部 正裕, 齊藤 達憲, 他 : 婦人科がんに対する新規腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス治療の検討. 岩手医誌 **65**, 293-305 , 2013.

24) **Todo T, Rabkin SD, Sundaresan P, et al.:** Systemic antitumor immunity in experimental brain tumor therapy using a multmutated, replication-competent herpes simplex virus. *Hum Gene Ther* **10**, 2741-2755, 1999.

後抄録

Basic study of novel oncolytic virotherapy using oncolytic herpes simplex virus-1 for cervical cancer

Tatsunori Saito¹⁾, Naoto Yoshino²⁾, Yuki Miura¹⁾, Naomi Matsukawa²⁾,
Ryosuke Takeshita¹⁾ and Masahiro Kagabu¹⁾

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

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

Abstract

Oncolytic herpes simplex virus (oHSV) is a type 1 herpes simplex

virus that has been attenuated and engineered using molecular-biological techniques so that the virus selectively proliferates in tumor cells, thereby destroying them. In this study, we evaluated the effects of third-generation oHSVs, T-01 and T-mfIL12, in *in vitro* and *in vivo* models of cervical cancer. Both T-01 and T-mfIL12 exerted potent cell-killing effects *in vitro*. Moreover, cells infected with T-mfIL12 expressed high levels of interleukin 12 (IL-12). When T-01 and T-mfIL12 were administered to *in vivo* tumors formed in mice inoculated with TC-1 cancer cells, both viruses inhibited tumor proliferation to similar extents. Moreover, no significant difference was observed between T-01 and T-mfIL12. Based on the potent antitumor effects of these viruses, we propose that oncolytic virotherapy using oHSVs might be useful as a novel therapeutic strategy for cervical cancer.

付図説明

図 1. TC-1 の細胞増殖能

TC-1 を 1×10^5 個/well からの 72 時間後, 96 時間後の細胞数を測定した. 細胞増殖能は細胞数と培養経過時間で示した. TC-1 の 48~72 時間での倍加時間は 10.6 時間, 72~96 時間での倍加時間は 25.5 時間であった. 以上より 48~72 時間での細胞増殖速度が極端に高い細胞であることがわかる.

図 2. *in vitro* における T-01 および T-mfIL12 の細胞傷害効果

T-01 および T-mfIL12 投与 24 時間後における TC-1 の光学顕微鏡写真. T-01, T-mfIL12 とともに広範に細胞変性効果 (細胞形態の円形化、集合、崩壊) が起こり, 1MOI でも中等度の細胞変性効果が観察された.

図 3.

A 感染 24 時間後の細胞生存率. B 感染 48 時間後の細胞生存率.

10MOI で T-01 および T-mfIL12 を感染させた群では非感染群と比較して約 80%の細胞傷害を認めた. 24 時間後および 48 時間後では T-01 と T-mfIL12 には細胞傷害効果に有意差は認められなかった.

図 4. *in vitro* における IL12 産生濃度

T-01 感染後では, すべての濃度において IL12 の産生を認めなかった. T-mfIL12 では, 0 および 0.1 MOI で IL12 の産生を認めなかったが, 1 および 10 MOI では濃度依存性に IL12 の産生を認めた.

図 5. TC-1 担癌マウスモデルのコントロール群, 治療群 (T-01, T-mfIL12) の体重推移

T-01 および T-mfIL12 接種群は、コントロール群の体重と比較して統計学的に有意な変動は認めなかった。

図 6. TC-1 担癌マウスモデルのコントロール群，治療群（T-01, T-mfIL12）の腫瘍体積推移

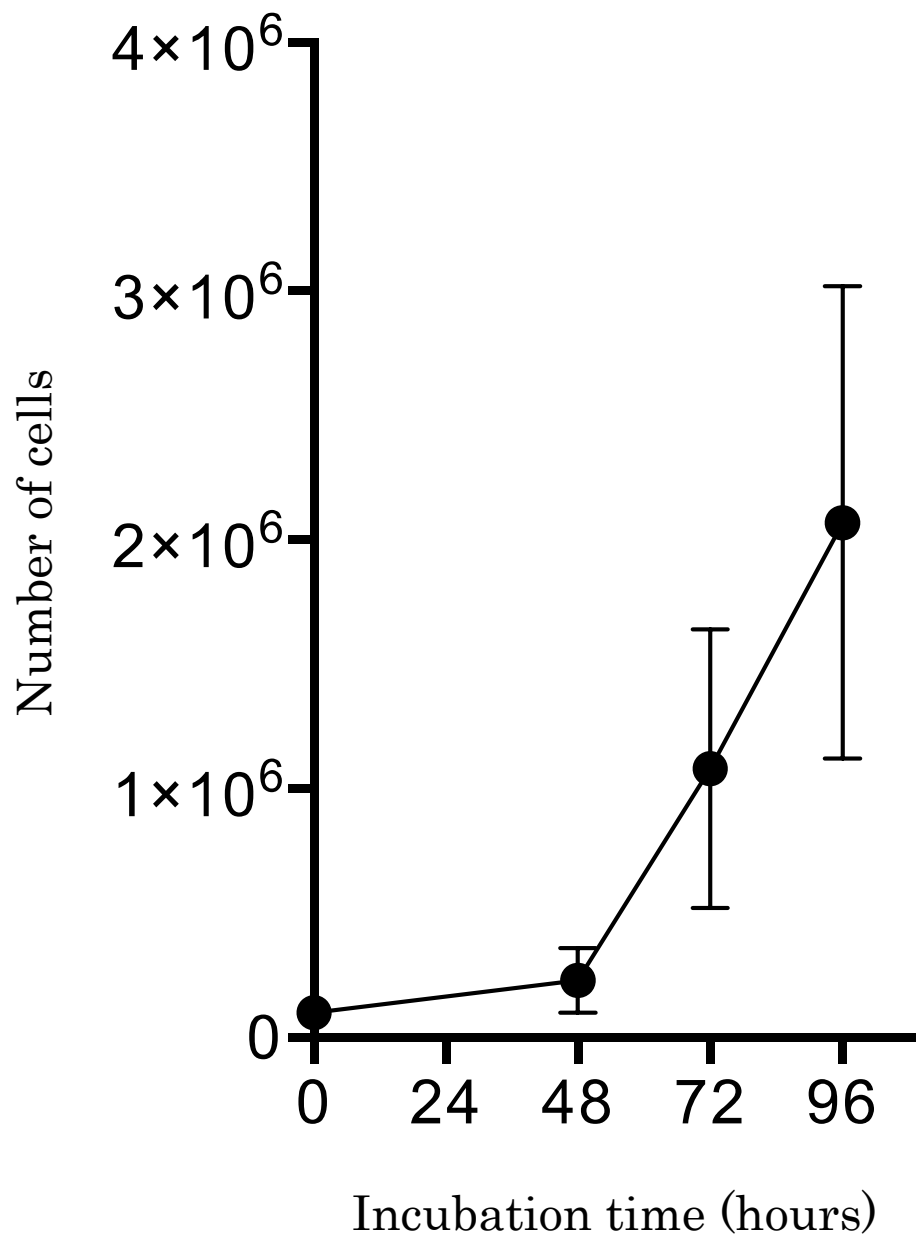
1 日目の接種から 4 日後までは T-01, T-mfIL12 接種群ではコントロール群の腫瘍体積と比較して統計学的に有意な縮小は認めなかったが、2 回目の接種から 5 回目の接種に T-01, T-mfIL12 とともに統計学的に有意な縮小を認めた。*はコントロール群と T-01, #はコントロール群と T-mfIL12 の比較を示した。その後、観察終了時まで T-01 および T-mfIL12 の腫瘍溶解効果は維持された。

図 7. 腫瘍溶解ウイルスの接種回数と腫瘍体積推移の比較

T-01 および T-mfIL12 を 3-4 回の接種することでコントロール群と比較し、統計学的に有意な腫瘍体積増大の抑制効果を認めた。T-01 投与群と T-mfIL12 投与群の間に接種回数による腫瘍体積増大の抑制効果について有意差は認められなかった。

表 1 *in vivo* モデルでのリンパ球 subsets 解析

TC-1 接種 26 日後（4 回目のウイルス接種から 2 日後）に脾臓を採取し、HPV16 E7 テトラマーを使用してフローサイトメーターでリンパ球 subsets を計測した。



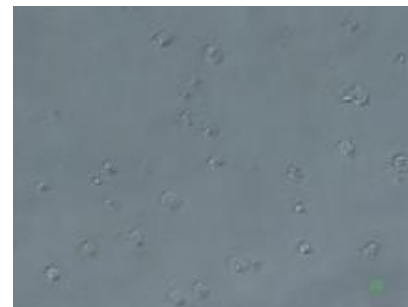
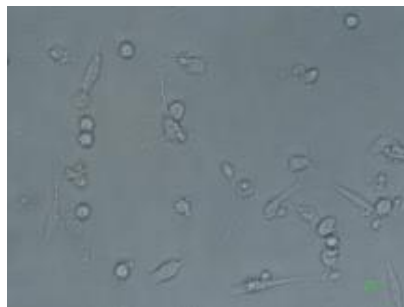
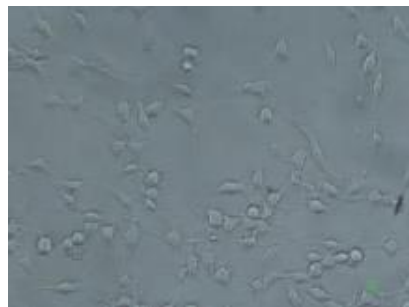
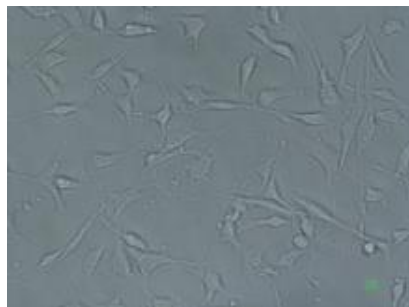
0 MOI

0.1 MOI

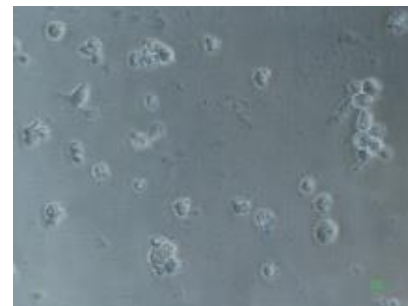
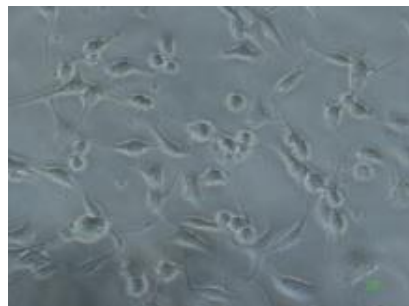
1 MOI

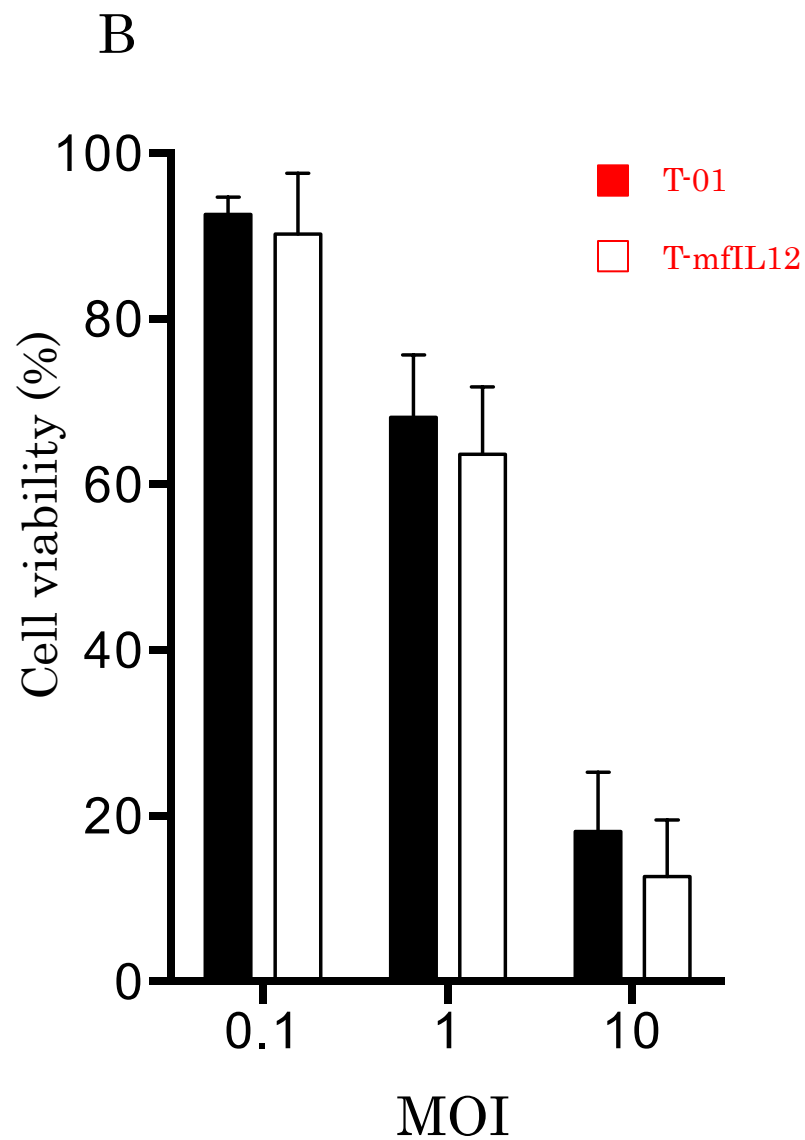
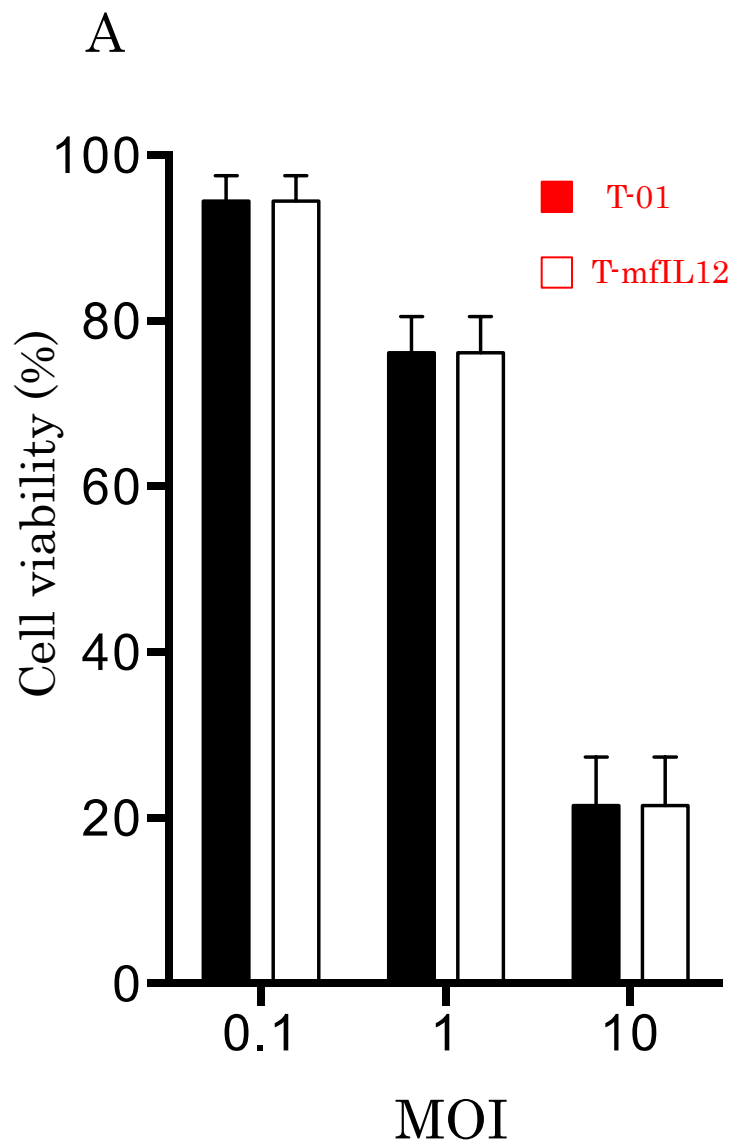
10 MOI

T-01

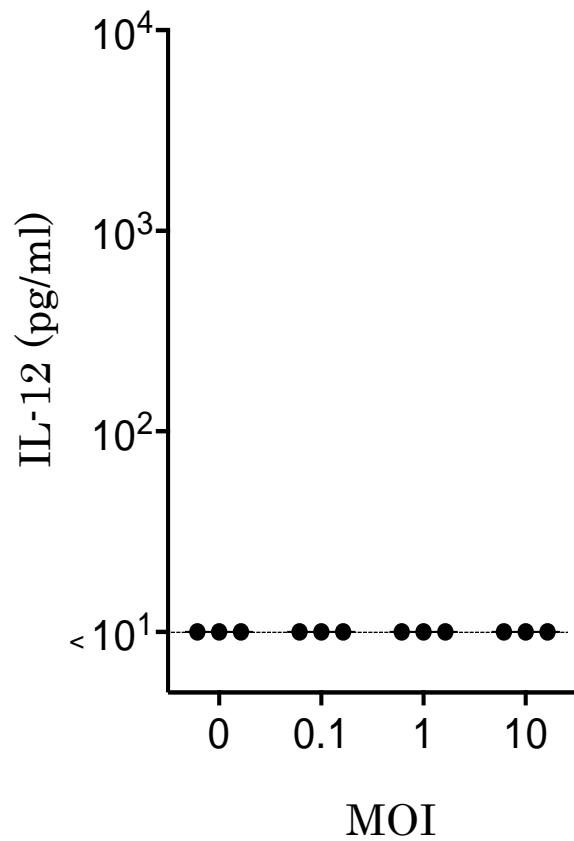


T-mfIL12

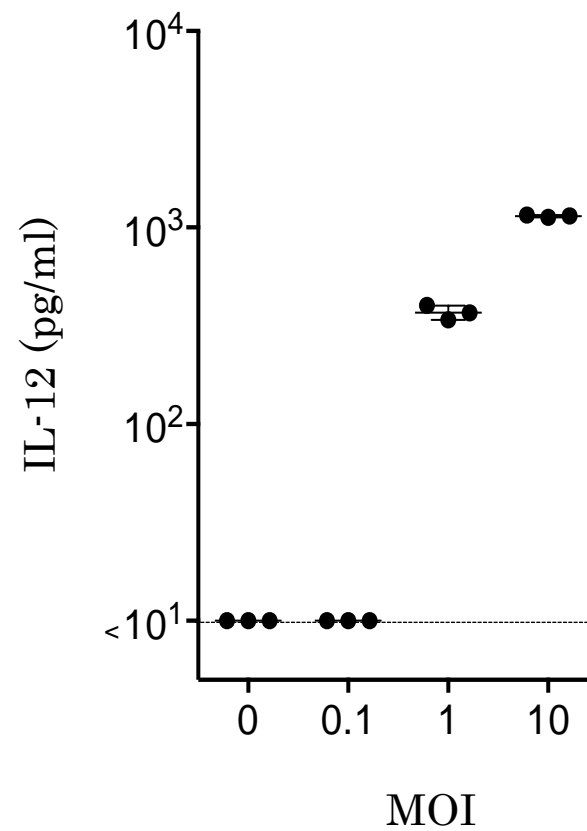


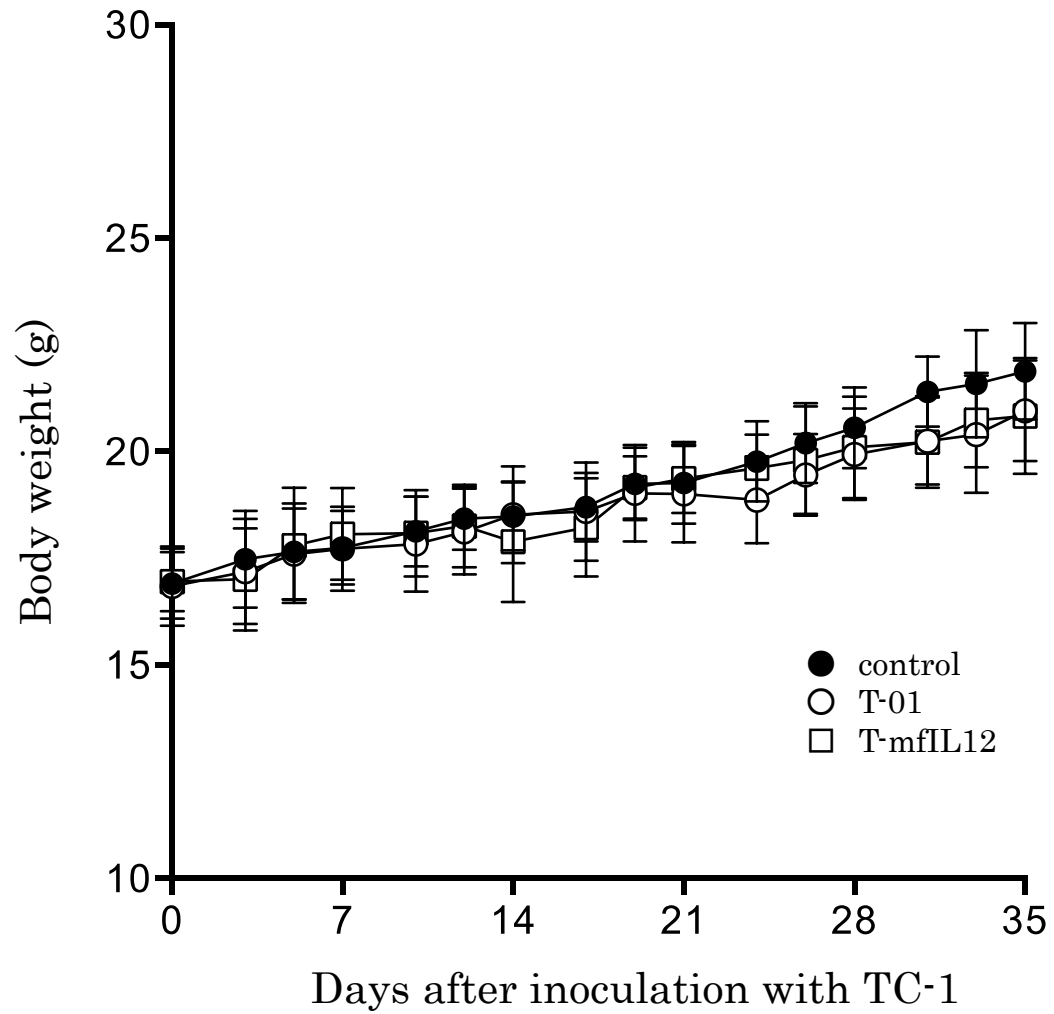


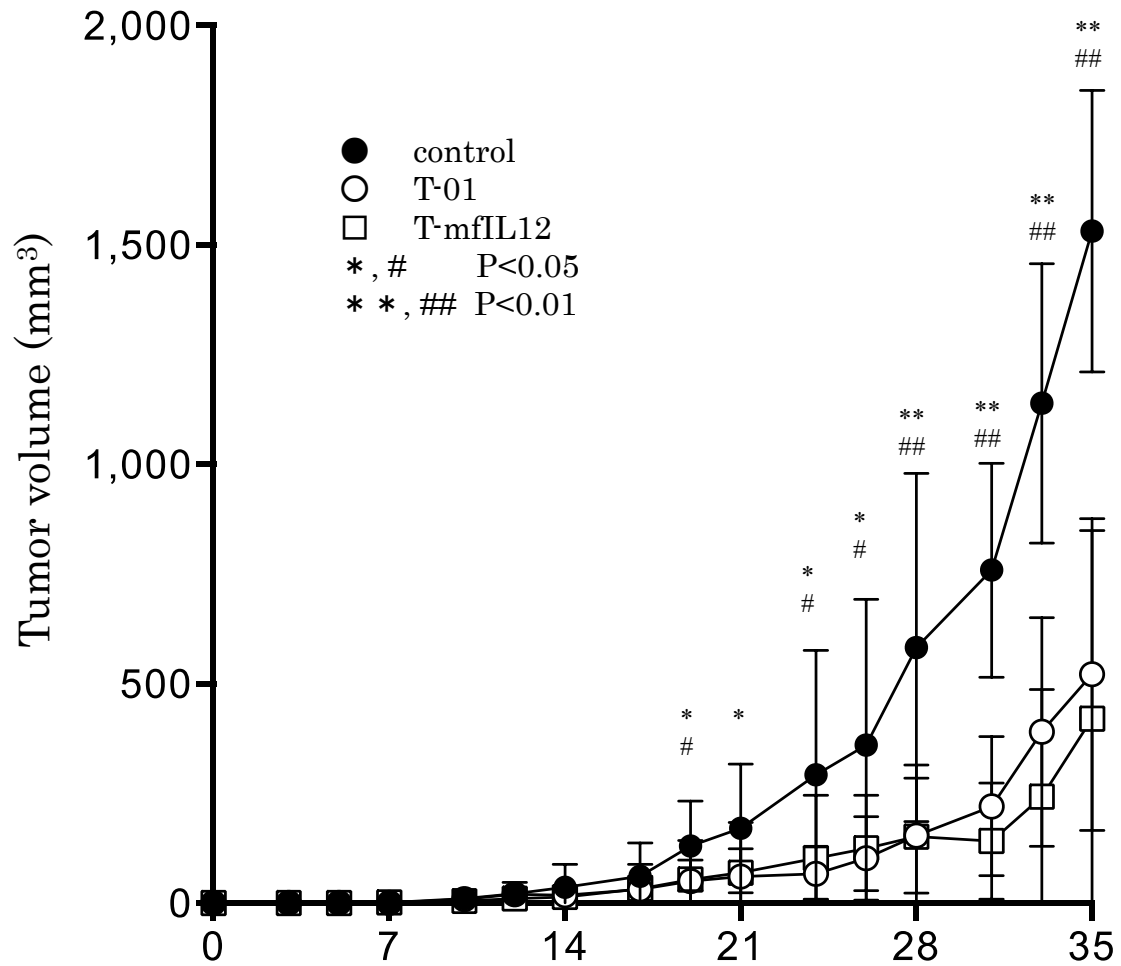
T-01



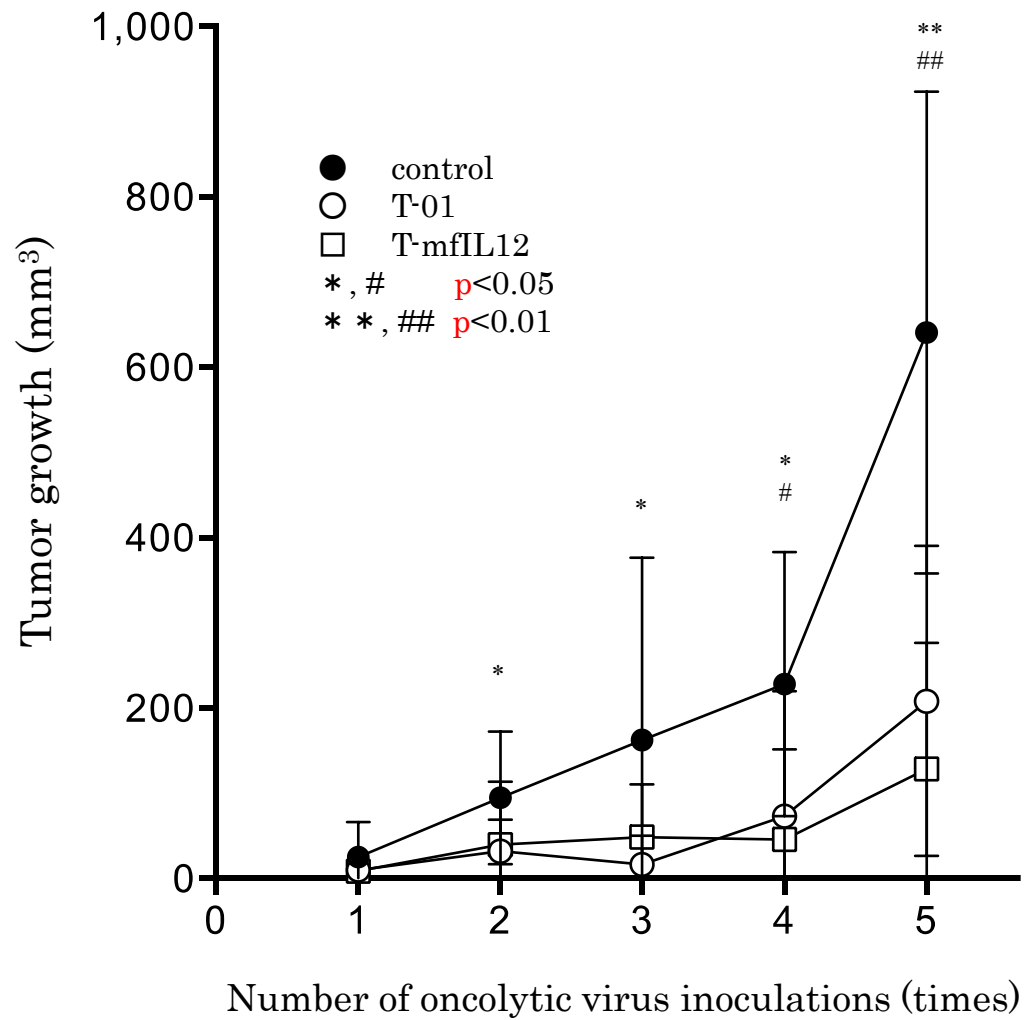
T-mfIL12







Days after inoculation with TC-1 and T-mfIL12



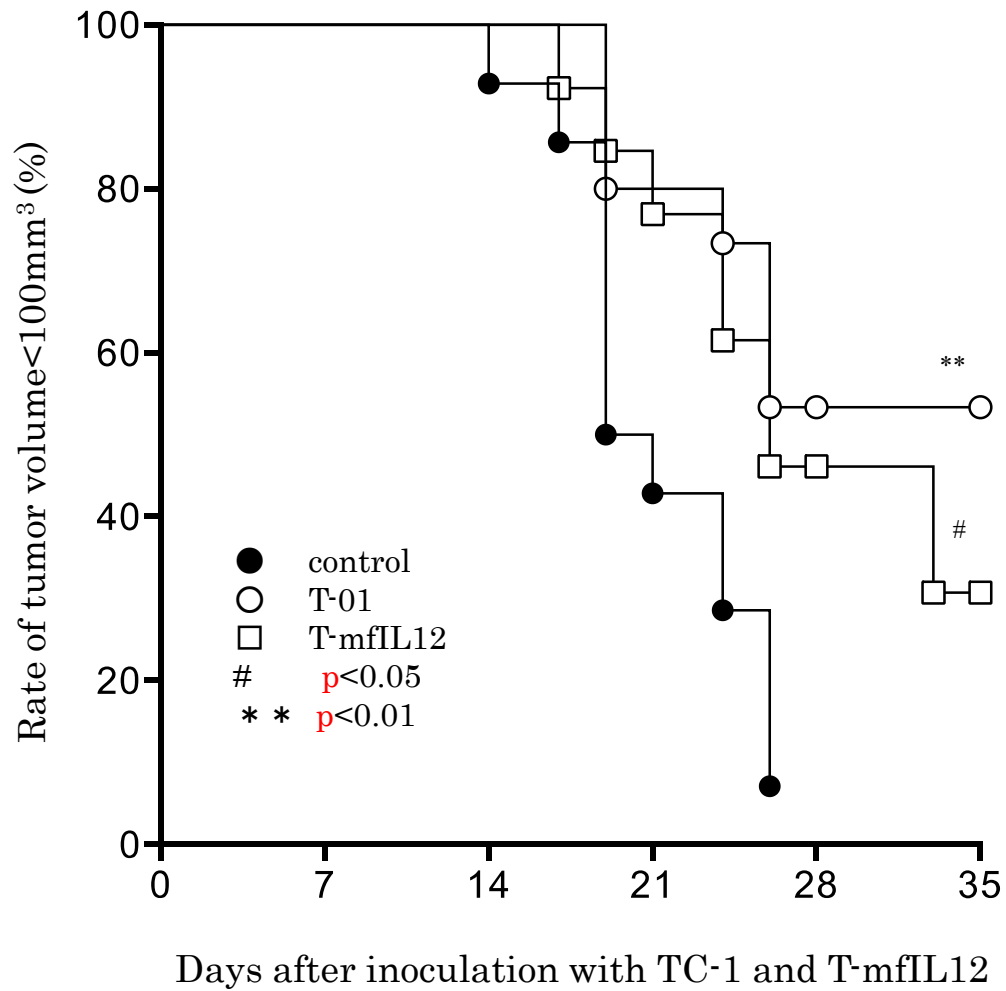


Table 1. Analysis of lymphocyte subsets in *in vivo* mouse models

	Percentages in T cells (%)		Percentage in CD8- positive T cells (%)
	CD4-positive cells	CD8-positive cells	Tetramer-positive cells
control	28.6 ± 5.5	60.1 ± 4.1	0.16 ± 0.10
T-01	22.9 ± 3.8	65.5 ± 2.4	0.27 ± 0.19
T-mfIL12	25.9 ± 4.0	63.0 ± 4.3	0.10 ± 0.14