

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

研 究

婦人科癌に対する
新規腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス治療の検証

三浦雄吉¹⁾, 利部正裕¹⁾, 齊藤達憲¹⁾, 竹下亮輔¹⁾,
松川直美²⁾, 阿保亜紀子³⁾, 吉野直人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: 病理病態学分野

(Received on February 15, 2013 & Accepted on March 13, 2013)

要旨

腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (腫瘍溶解性 HSV) 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. 我々は本実験で第 3 世代腫瘍溶解性 HSV (T-01) を使用し, *in vitro* にてヒト子宮頸癌由来細胞株, ヒト卵巣癌由来細胞株への殺細胞効果を判定し, どちらの細胞株に

対しても殺細胞効果が得られた. また, pre-clinical model として免疫不全マウスに形成されたヒト婦人科癌に対し腫瘍溶解性 HSV 投与を行い, 腫瘍の縮小, 消失を認めることができた. 腫瘍溶解性 HSV を用いたウイルス治療が今後の婦人科癌に対する新たな治療方法として有用である可能性を示した.

Key words : *oncolytic herpes simplex virus, ovarian cancer, uterine cervical cancer*

I. 緒 言

子宮頸癌は World Health Organization (WHO) の調査では世界の女性の癌の中で 2 番目に多い癌であり, 年間約 500,000 人の発症が報告されている. 子宮頸癌の発症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, 子宮頸癌の罹患率減少に向けて期待されている. 現在の子宮頸癌に対する治療は, 上皮内癌を含めた初期の子宮頸癌に対しては手術療法が中心であり, 進行子宮頸癌に対しては放射線療法や化学療法が標準的であるが, その効果は十分とは言えない. また, 卵巣癌は WHO の調査で, 世界中で年間約 220,000 人が発症しており, 子宮頸癌に比べ多くはない. しかし, 卵巣癌は silent killer と称されており初回診断の時点で約 60% が進行癌である.

プラチナ製剤やパクリタキセルなどの化学療法が奏功するとはいえ, 卵巣癌の臨床進行期 III/IV 期の 5 年生存率は 30% 前後であり, 婦人科癌の中では予後がもっとも不良である^{1, 2)}. このような現状より, これらの婦人科癌に対する新規治療法の開発が急務となっている. 我々は, 以前から腫瘍溶解性 HSV を用いた治療法に注目し研究を進めてきた.

単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は非必須遺伝子を選択的に 1 ~ 複数個除去あるいは不活化し腫瘍内だけで増殖し細胞を死に至らしめることができる³⁾. 第 1 世代腫瘍溶解性 HSV は TK 遺伝子を不活性化し, 人為的に癌細胞に局限させたウイルス複製を実証した Martuza らの報告から始まる⁴⁾. 第 1 世代腫瘍溶解性 HSV は病原性減弱の不徹底や, 変異が一箇所だけの野生型 HSV-1 へ自然に戻ってしまうなどの可能性があり安全面

で問題があった。第2世代腫瘍溶解性 HSV では、 γ 34.5 遺伝子と *ICP6* 遺伝子の2つを欠失している。 γ 34.5 遺伝子の欠失により正常細胞内の二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼに拮抗できなくなる。このため正常細胞内ではウイルス蛋白が合成できなくなる。また、*ICP6* 遺伝子を欠失しているため、ウイルスがチミジンキナーゼやリボヌクレオチド還元酵素を正常細胞内では活性化出来なくなる。このため正常細胞内での複製が出来ず、これらの活性が上昇している腫瘍内でのみウイルス複製が可能となる。これらの異なる2つの機序を介して安全性が顕著に改善し、第2世代腫瘍溶解性 HSV では再発悪性グリオーマを対象とした臨床試験が行われた^{3, 5, 6)}。腫瘍溶解性 HSV はこれらの機序により腫瘍内でのみ複製し腫瘍を死に至らしめる。さらには細胞障害性 T 細胞の活性化、腫瘍の増大に必要な血管新生の阻害を行うという抗腫瘍効果を示している⁷⁻¹²⁾。第3世代腫瘍溶解性 HSV では、第2世代腫瘍溶解性 HSV に加え α 47 遺伝子およびそれと重なる *US11* プロモーター領域を不活化変異させ、宿主細胞に MHC クラス I 発現を維持させ、ウイルス複製能と抗腫瘍免疫の惹起を著しく向上させたものであり、本研究で用いた T-01 は、 α 47 遺伝子およびそれと重なる *US11* プロモーター領域を不活化変異から欠失変異させ MHC クラス I 発現の維持をより安定させた最新型の第3世代腫瘍溶解性 HSV である¹³⁾。腫瘍溶解性 HSV は、すでに新たな癌治療の方法としてさまざまな充実性腫瘍に対して臨床試験が行われている¹⁴⁻¹⁸⁾。現在まで婦人科では、第2世代腫瘍溶解性 HSV (R3616, SV-1716) を用いての卵巢癌細胞株に対して研究が行われているが、最新型である第3世代腫瘍溶解性 HSV を使用した研究報告はされていない^{19, 20)}。今回我々は、最新型である3世代腫瘍溶解性 HSV の T-01 を使用して、婦人科がんの臨床

応用を目指し、ヒト婦人科癌細胞株に対する殺細胞効果とマウスモデルでの有効性について検討を行った。

II. 研究材料および方法

1. cell lines

ヒト卵巢癌由来細胞株は漿液性嚢胞腺癌由来の CAOV3, OVCAR3, SKOV3 と明細胞腺癌由来の KOC-7S を用い、ヒト子宮頸癌由来細胞株は子宮頸部腺癌由来の HeLa と扁平上皮癌由来の CaSki, SKG-IIIa を用いた。CAOV3, OVCAR3, SKOV3, KOC-7S は長谷川幸清先生 (埼玉医科大学国際医療センター婦人科腫瘍科, 埼玉) より分与を受けた。Hela, CaSki, SKG-IIIa は理研バイオリソースセンター (筑波) から購入した。CAOV3, OVCAR3, SKOV3, KOC-7S, CaSki は, RPMI 1640 に 2mM l-glutamine 添加した培養液で、HeLa は MEM 培地に、SKG-IIIa は Ham F 培地にて 37°C, 5%CO₂ 存在下で培養した。それぞれの培地は 10% 胎児牛血清 (FBS), 200U/ml ペニシリンを, 0.2mg/ml ストレプトマイシンを添加して使用した。

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腫瘍溶解性 HSV である。 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¹³⁾。

3. 使用細胞増殖能の測定

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プルー色素排除試験法を用い、TC10™ 全自動セルカウンター (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) を用いて生細胞数を計測した。

4. ウイルスの殺細胞効果の検討

腫瘍溶解性 HSV を使用する実験は、DNA

表1. 婦人科がんの治療による組織学的判定基準（案）

Grade0：無効	がん組織・がん細胞に治療による変性，壊死などの障害をほとんど認めない。
Grade1：軽度の効果	がんの約 1/3 未満にがん細胞の変性，壊死などを認める場合。
a：ごく軽度の効果	
b：軽度の効果	がんの 1/3 以上で 2/3 未満に癌細胞の変性，壊死ならびに融解などを認める場合。
Grade2：かなりの効果	がんの 2/3 以上に著名な変性，壊死ならびに融解，消失などを認める。
Grade3：著効	がん全体がすべて壊死に陥っているか，または融解，消失した場合。肉芽腫瘍組織あるいは線維化巣で置き換えられている場合。

遺伝子組み換え実験委員会の承諾後行った。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する。播種 48 時間後に T-01 を 0.1, 1, 10 multiplicity of infection (MOI) で細胞に感染させ，感染後 48 時間後の生細胞率を測定し，control 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 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, 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 (%) = (ウイルス添加 well の OD₄₉₀ - ウイルス添加 well の OD₆₃₀) ÷ (ウイルス非添加 well の OD₄₉₀ - ウイルス非添加 well の OD₆₃₀)。正常細胞およびウイルス感染細胞は光学顕微鏡 (ニコン, ECLIPSE, TE300, 東京) を用いて撮影した。

5. *in vivo* での腫瘍治療

担癌マウスの動物実験は岩手医科大学動物実験委員会の承諾後 (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。T-01 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 C.B-17/lcr-scid/scidJcl (SCID) マウス (日本ク

レア, 東京) と, NOD/ShiJic-scidJcl (NOD-SCID) マウス (日本クレア, 東京) を使用した。Specific pathogen free 施設で 1 週間飼育後，実験を行った。使用した培養細胞は，予備実験にてマウスに腫瘍形成を認めたこと，また婦人科癌領域の研究において高い頻度で用いられているとより，ヒト卵巣癌モデルでは SKOV3, ヒト子宮頸癌モデルでは HeLa を選択した。SKOV3 を 1×10^5 cell/100 μ l で Phosphate Buffered Saline (PBS) に懸濁し，100 μ l/mouse で SCID マウスおよび NOD-SCID マウスの背部皮下に接種した。HeLa は 1×10^6 cell/100 μ l で PBS に懸濁し，100 μ l/mouse で NOD-SCID マウスの背部皮下に接種した。細胞接種後は 2-3 日間隔で腫瘍体積および体重を測定した。腫瘍径が 5mm に達してから 4-5 日の間隔で治療群には T-01 を 1×10^5 pfu/50 μ l/mouse に調整し腫瘍内に，Control 群には PBS を 50 μ l/mouse 皮下に投与 6 回投与した。細胞接種時およびウイルス接種時は，マウスに対しソムノペンチル (共立製薬株式会社, 東京) を 50mg/kg 腹腔投与し不動化した。腫瘍体積は，(腫瘍体積) = (腫瘍の長径) × (腫瘍の短径)² ÷ 2^{21, 22)} にて算出した。

6. 病理組織的検討

それぞれのマウスは腫瘍接種後 43 日目に頸椎脱臼法にて致死させ腫瘍組織を切除した。切除した腫瘍はホルマリン固定を行っ

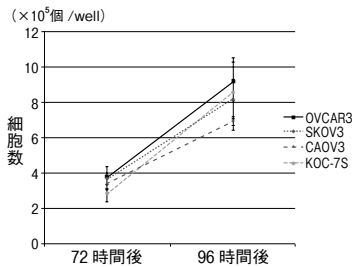


図1. ヒト卵巣癌由来細胞株の増殖能
卵巣癌由来細胞株であるCAOV3, OVCAR3, SKOV3, KOC-7Sを 1×10^5 個/wellからの72時間後, 96時間後の細胞数を測定した. 細胞増殖能は細胞数と培養経過時間で示した.

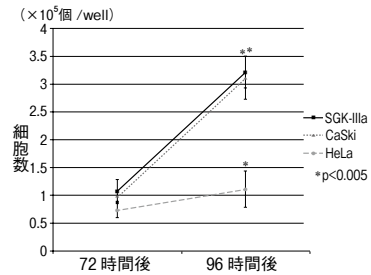


図2. ヒト子宮頸癌由来細胞株の増殖能
ヒト子宮頸癌由来細胞株であるHeLa, CaSki, SKG-IIIaを 1×10^5 個/wellからの72時間後, 96時間後の細胞数を測定した. 細胞増殖能は細胞数と培養経過時間で示した. 有意差をアスタリスク ($p < 0.005$) で示した.

た後, Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った. 腫瘍溶解性HSV投与の組織学的効果判定は婦人科癌の治療による組織学的判定基準(案)を用いて判定した(表1)²³⁾.

7. 統計処理

2群間の比較はStudentの t 検定を用い有意差を確認した. 3, 4群間の比較はone-way ANOVA(一元配置分散分析)を行い, 有意である場合は, 群間の差をTukey's multiple comparison testで確認した. 経時的現象変化に関してはKaplan-Meier法で解析し確認した. ノンパラメトリックな2群間については, Mann-Whitneyの U 検定にて有意差を測定した. p 値が0.05未満であるとき有意であるとみなした.

III. 結 果

1. ヒト卵巣癌由来細胞株, ヒト子宮頸癌由来細胞株の増殖能の検討

CAOV3は72時間後 3.4×10^5 個/wellから96時間後には 7.0×10^5 個/wellに増殖し, OVCAR3は 3.7×10^5 個/wellから 9.2×10^5 個/well, SKOV3は 3.7×10^5 個/wellから 8.2×10^5 個/well, KOC-7Sは 2.9×10^5 個/wellから 8.6×10^5 個/wellにそれぞれ増殖した(図1). ヒト卵巣癌由来細胞株4群間の有意差なく増殖能を示した.

それに対し, ヒト子宮頸癌由来細胞株では, HeLaは 1.0×10^5 個/wellから 3.1×10^5 個/well, CaSkiは 1.1×10^5 個/wellから 3.2×10^5 個/wellと有意差なく増殖したのに対しSKG-IIIaは 0.7×10^5 個/wellから 1.1×10^5 個/wellと, SKG-IIIaのみ96時間後で細胞増殖が低い(図2). ヒト卵巣癌由来細胞株とヒト子宮頸癌由来細胞株では細胞増殖能に有意に差を認めた($p < 0.000001$).

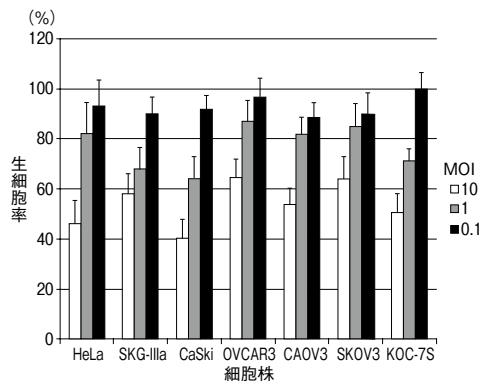


図3. *in vitro*でのT-01感染48時間後の生存細胞率
ヒト子宮頸癌由来細胞株とヒト卵巣癌由来細胞株を 1×10^4 個/wellとし, T-01を0.1, 1, 10MOIでそれぞれに感染させ, control群と比較した. 感染後, 細胞は37°Cで48時間培養した. 生存細胞率はcontrolと比較した生存細胞率をそれぞれの細胞株で示した. 生存細胞率において有意差は認めなかった.

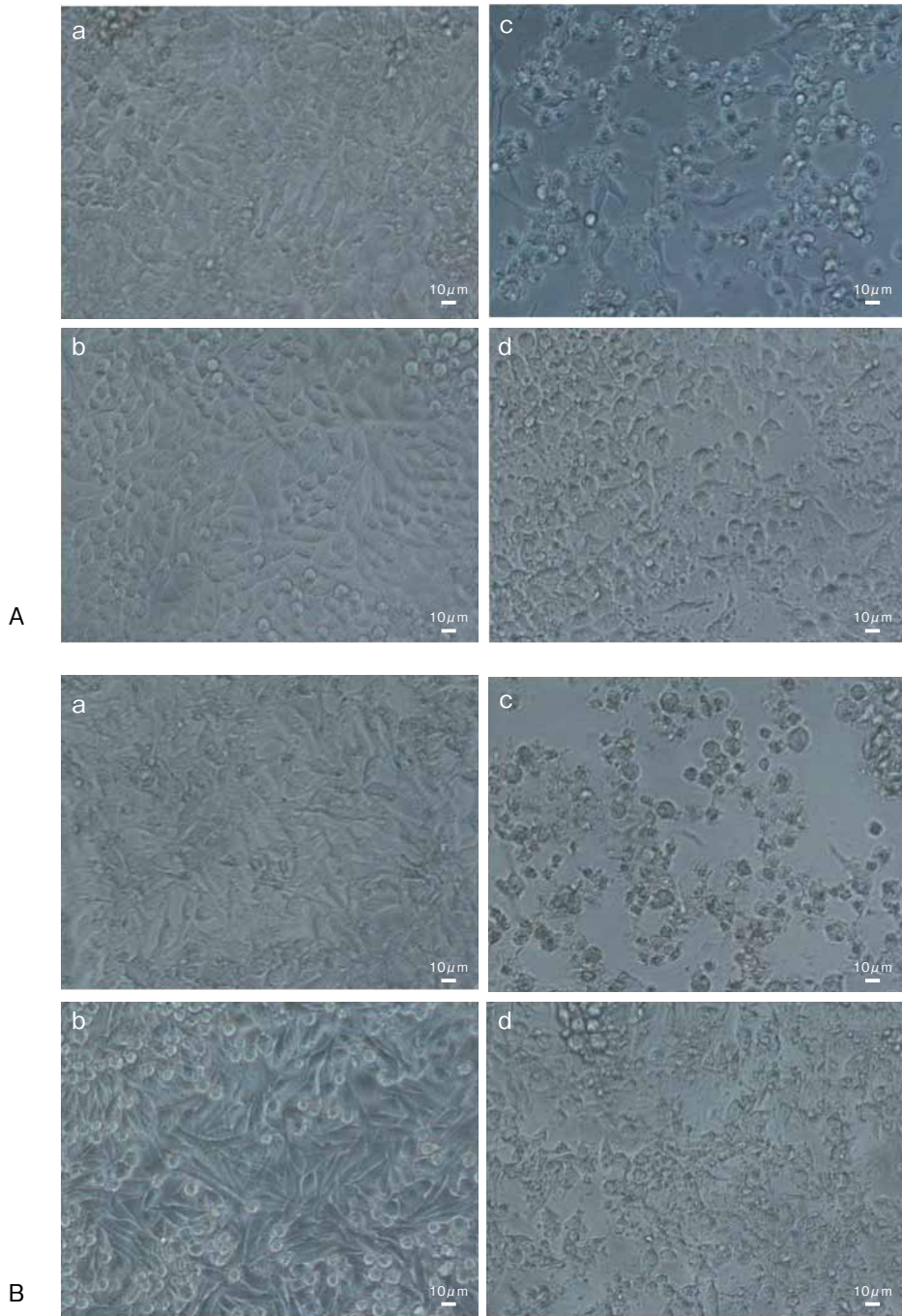


図4. HeLa と SKOV3 の control と T-01 投与群 (MOI 10) の写真
 A a) 24 時間後の HeLa の control, b) 24 時間後の SKOV3 の control, c) 24 時間後の HeLa の T-01 投与, d) 24 時間後の SKOV3 の T-01 投与の写真. スケールは写真に示す.
 B. a) 48 時間後の HeLa の Control, b) 48 時間後の SKOV3 の control, c) 48 時間後の HeLa の T-01 投与, d) 48 時間後の SKOV3 の T-01 投与の写真. スケールは写真上に記載する.

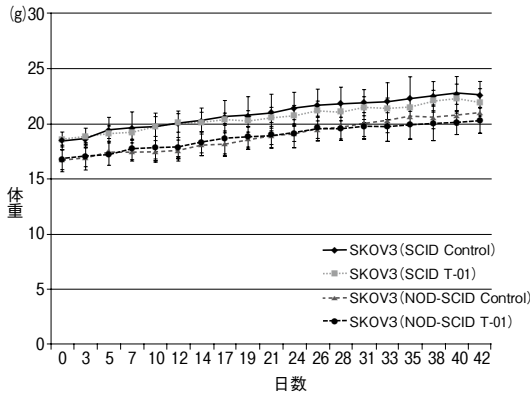


図5. 卵巣癌モデルの control 群, 治療群の体重推移
SCID マウスおよび NOD-SCID マウスのそれぞれの群の体重を経日的に測定し平均体重を示した. 経日的な上昇を認め, 急激な体重減少は認めなかった. 体重は平均体重と日数で示した.

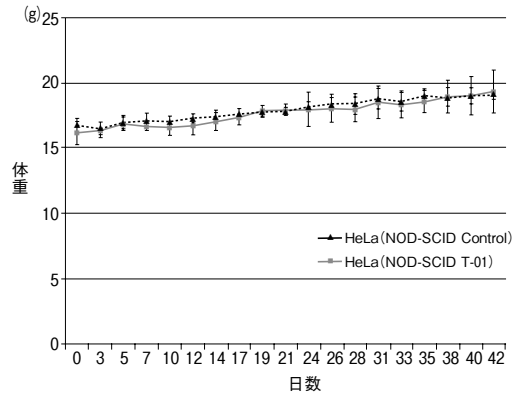


図6. 子宮頸癌モデルの control 群, 治療群の体重推移

NOD-SCID マウスのそれぞれの群の体重を経日的に測定し平均体重を示した. 経日的な上昇を認め, 急激な体重減少は認めなかった. 体重は平均体重と日数で示した.

2. *in vitro* でのヒト卵巣癌由来細胞株, ヒト子宮頸癌由来細胞株に対する T-01 の殺細胞効果の検討

T-01 を MOI 10 で感染させ 48 時間後の生存細胞率は CAOV3 では 53%, OVCAR3 では 64%, SKOV3 では 64%, KOC-7S では 50%, HeLa では 46%, CaSki では 40%, SKG-IIIa では 58% であった. このことによりウイルスが有意に直接細胞傷害を引き起こしていることが確認できる (図 3). また, MOI 10, 1, 0.1 を比較すると T-01 は添加量を増加させると殺細胞効果が強くなることを認めた. 一方, ヒト卵巣癌由来細胞株の 4 群間, ヒト子宮頸癌由来細胞株の 3 群間で細胞障害効率にばらつきを認めたが生存細胞率に有意差は認めなかった. また, SKOV3 と HeLa の 24 時間後および 48 時間後の細胞状態の写真では, 24 時間後において細胞融解が既に出始めており, 48 時間後には 24 時間後よりも生存細胞が減少し, 細胞溶解進行していることが認められた (図 4-a, b).

3. *in vivo* での腫瘍に対する T-01 の抗腫瘍効果の検討

卵巣癌モデル SCID マウスの control 群,

治療群では体重は経日的に増加し, 急激な体重減少は認めなかった. 卵巣癌モデル NOD-SCID マウス Control 群, 治療群でも同様に経日的な体重増加を認めた. 子宮頸癌モデルの NOD-SCID マウスでも control 群と治療群, 両群とも経日的な体重増加を認めた (図 5, 6).

次いで, 腫瘍体積について比較検討を行った. 卵巣癌モデルで SCID マウスへの SKOV3 接種群では Control 群, 治療群とも接種 14 日目に腫瘍形成を認め, control 群では接種 19 日目以降から腫瘍増大を認めるようになった. 治療群においては, T-01 投与 2 回目以降で腫瘍体積の変化がなくなり, 接種 35 日目 (T-01 投与開始 17 日目) 以降は control 群と治療群の間に腫瘍体積において有意差を認めた (図 7). NOD-SCID マウスへの SKOV3 接種群では, control 群, 治療群とも接種後 10 日目以降から腫瘍の増大を認めた. 治療群においては, T-01 投与 3 回目以降で腫瘍体積の変化がなくなった. NOD-SCID マウスでは, 接種 26 日目 (T-01 投与開始後 7 日目) から control 群と治療群において腫瘍体積に有意差を認めた (図 8).

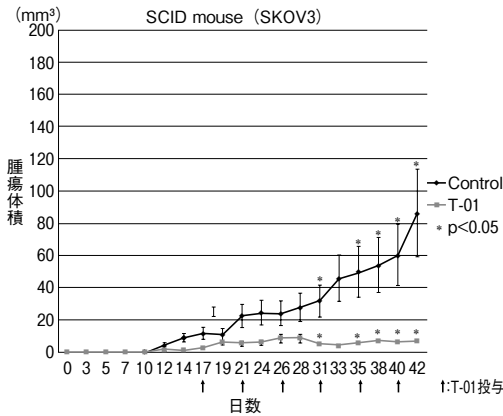


図7. 卵巣癌モデル SCID マウスの腫瘍体積推移
SCID マウスの卵巣癌モデルに対し、矢印で示した日 (17, 21, 26, 31, 35, 40 日目) に計6回 control 群には PBS を、治療群には T-01 をそれぞれ $50 \mu\text{l}/\text{mouse}$ 皮下または腫瘍内に投与した。マウスは各群 $n=8$ 。各群の腫瘍体積は平均腫瘍体積と日数で示した。有意差をアスタリスク ($p < 0.05$) で示した。

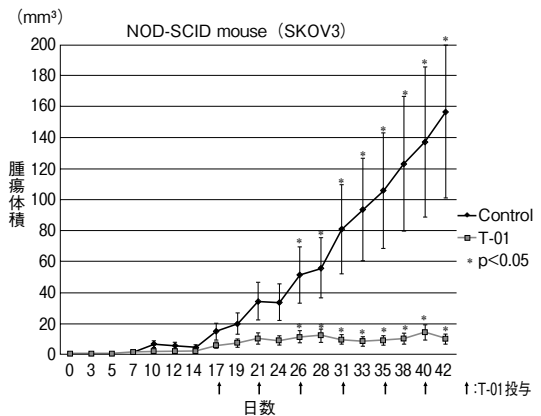


図8. 卵巣癌モデル NOD-SCID マウスの腫瘍体積推移
NOD-SCID マウスの卵巣癌モデルに対し、矢印で示した日 (17, 21, 26, 31, 35, 40 日目) に計6回、治療群には T-01 を、control 群には PBS をそれぞれ $50 \mu\text{l}/\text{mouse}$ 腫瘍内または皮下に投与した。マウスは各群 $n=8$ 。各群の腫瘍体積は平均腫瘍体積と日数で示した。有意差をアスタリスク ($p < 0.05$) で示した。

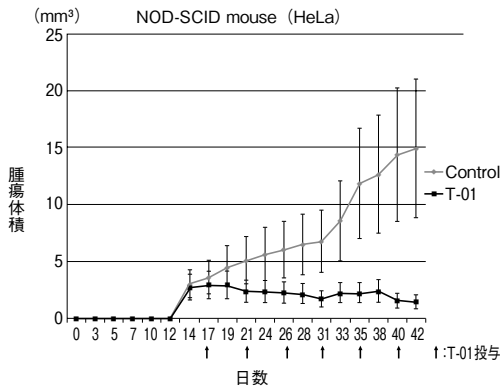


図9. 子宮頸癌モデル NOD-SCID マウスの腫瘍体積推移
矢印で示した日 (17, 21, 26, 31, 35, 40 日目) に計6回、治療群には T-01 を、control 群には PBS をそれぞれ $50 \mu\text{l}/\text{mouse}$ 腫瘍内または皮下に投与した。HeLa は NOD-SCID マウスで各群 $n=6$ で行った。各群の腫瘍体積は平均腫瘍体積と日数で示した。有意差をアスタリスク ($p < 0.05$) で示した。

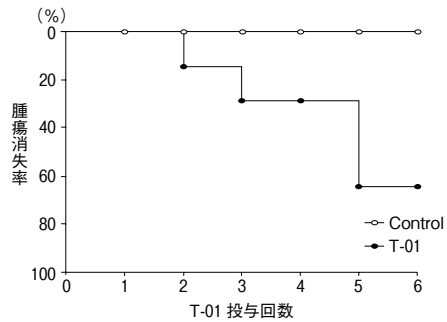


図10. 子宮頸癌モデルの治療群における T-01 投与回数と腫瘍消失率
子宮頸癌モデル HeLa 担癌マウスにおいて腫瘍消失が6匹中4匹認められたため、T-01 投与回数と腫瘍消失率を Kaplan-Meier 法で解析した。

子宮頸癌モデルの HeLa 接種群は、卵巣癌モデルで SCID マウスと NOD-SCID マウスの治療群間で腫瘍体積に有意差を得られなかったことから NOD-SCID マウスのみでの検討

を行った。NOD-SCID マウスへ HeLa 接種し14日目に腫瘍形成を認め、control 群では腫瘍は増大傾向となっていくのに対し、治療群においては T-01 投与1回目以降から腫瘍体積の変化を認めなくなった。control 群と比較し治療群の腫瘍体積は増大なく推移したが2群間に有意差は認めなかった(図9)。

子宮頸癌モデルの HeLa 接種群の治療群で

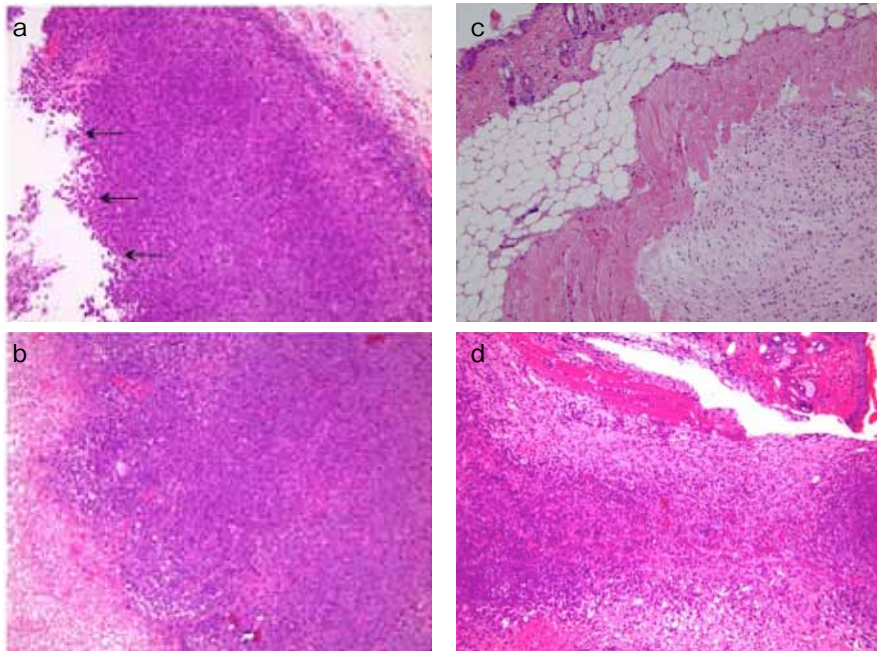


図 11. 卵巣癌モデルの HE 染色標本 (100 倍率)

- SCID マウスの control 群の HE 標本. 病理組織の中心部に軽度の中心性壊死, 空洞形成 (←) を認めるが, 周囲に線維化は認めない.
- NOD-SCID マウスの control 群の HE 標本. a. 同様に中心性壊死を認めるが線維化は認めない.
- SCID マウスの治療群の HE 標本. 腫瘍はほぼ 100% 消失し, 線維化巣となっている.
- NOD-SCID マウスの治療群の HE 標本. 腫瘍組織の 1/3 程度に変性壊死および線維化を認める.

は, T-01 投与に伴い腫瘍体積が測定できないほどの縮小を認めた. 解剖を行っても腫瘍を認めず, 腫瘍があったと思われる線維化組織も目視上ははっきりしなかったため, 組織標本の作成は行わず腫瘍体積が測定できなくなった時点で腫瘍消失と判断した. HeLa の腫瘍消失率と T-01 接種回数を Kaplan-Meier 法で示し, 早いものでは 1 度の T-01 投与で腫瘍の消失を認めたものもあり, 最終的には腫瘍消失率は約 66% となった (図 10).

4. 病理学的検討

婦人科癌の治療による組織学的判定基準 (案) を用いて卵巣癌モデルで SCID マウスと NOD-SCID マウスの治療群について効果判定を行った. control 群では, SCID マウスと NOD-SCID マウスともに皮下に腫瘍結節を認め, 腫瘍の中心部は中心性壊死を認める

が, 線維化巣は認められなかった. いずれの control 群においても効果判定では grade 0 とした (図 11-a, b). SCID マウス治療群は, 50% (8 匹中 4 匹) において皮下に腫瘍結節は認めず, 線維化巣が認められた. 癌は消失したと考え, 化学療法効果判定で grade 3 とした (図 11-c). また NOD-SCID マウス治療群では, 50% (8 匹中 4 匹) において 1/3 以上の領域に組織の変性と壊死, 線維化を認めたことから癌化学療法効果判定は grade 1a ~ 1b であった (図 11-d). SCID マウスと NOD-SCID マウスの治療群をそれぞれ grade 分類したものを Mann-Whitney の *U* 検定にて有意差を測定したが, 治療群間では明らかな有意差は認めなかった (図 12).

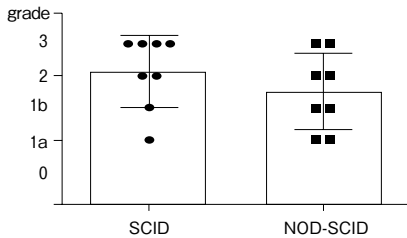


図 12. 卵巣癌モデル治療群の病理組織学的 grade 判定

卵巣癌モデルの SCID マウスおよび NOD-SCID マウスの婦人科癌の治療による組織学的基準(案)の効果判定に従って SCID マウス (n=8) と NOD-SCID マウス (n=8) の治療群について組織学的判定を行った。Grade 分類とそれぞれの治療群と比較した。治療群間では明らかな有意差は認められなかった。

IV. 考 察

現在、卵巣癌においてさらなる予後改善に向けて種々の取り組みが行われている。その一つが組織型別に行われている臨床試験である。我々は、腫瘍溶解性 HSV の臨床応用に向け、ヒト卵巣癌由来細胞株 4 種については漿液性嚢胞腺癌由来 (CAOC3, OVCAR3, SKOV3) と明細胞腺癌 (KOC-7S) の組織型を用い、ヒト子宮頸癌由来細胞株 3 種については腺癌由来 (HeLa) と扁平上皮癌由来 (CaSki, SKG-IIIa) の組織型を用いて検討した。

はじめに *in vitro* にて腫瘍溶解性 HSV の抗腫瘍効果を検討した。その結果、T-01 を 10MOI で感染させた場合、48 時間後の生存細胞率が 40 ~ 60% 程度と有意な差を認めなかったが、細胞間で反応にばらつきがあった。これは *in vitro* で扱った細胞の組織型の違いやまた細胞の増殖能の違い、ウイルスの感染効率、細胞内でのウイルス複製の効率などが関係していると考えられる。臨床で用いた場合に腫瘍組織型によって治療効果が変わってくる可能性が示唆された。さらに、感染後 48 時間では感染後 24 時間と比較して細胞の溶解が進んで生存細胞が減少していた。また、

本実験では T-01 を 0.1, 1, 10MOI でそれぞれの細胞株に感染させたが、0.1MOI では生存細胞率が約 85 ~ 99%, 1MOI では約 65 ~ 85% と T-01 の添加量を増やすと生存細胞率が低下している。これらのことから、腫瘍溶解性 HSV 治療には時間依存性と容量依存性があることが認められた。

次いで、*in vivo* での抗腫瘍効果の検討を行った。腫瘍溶解性 HSV は、ウイルス自体の腫瘍溶解効果だけでなく、抗腫瘍免疫も活性化するといわれている¹³⁾。今までの文献的報告では、細胞障害性 T 細胞による抗腫瘍免疫の検討を行ったものであり、NK 細胞について検討を行っている報告はない。今回我々は、免疫不全モデルマウスを用いることにより、腫瘍溶解性 HSV の抗腫瘍免疫について NK 細胞の視点で検討した。

卵巣癌モデルの SKOV3 接種群では、SCID マウスと NOD-SCID マウスにおいてそれぞれの Control 群間、治療群間の腫瘍体積を比較した。腫瘍接種後 42 日目時点での SCID マウスの平均腫瘍体積は Control 群では 86.3mm³、治療群では 6.5mm³ となり、NOD-SCID マウスでは Control 群は 156.7mm³、治療群は 10.0mm³ となった。SCID マウス、NOD-SCID マウスの Control 群間、治療群間の腫瘍体積は有意差を認めないが、SCID マウスの方が NOD-SCID マウスに比べ腫瘍体積が小さいことが示された。SCID マウスでは T・B 細胞が欠損しているのが、NOD-SCID マウスでは T・B 細胞の欠損に加え natural killer 細胞 (NK 細胞) やマクロファージ、補体の活性が低下している。このことから、Control 群間の腫瘍体積差は NOD-SCID マウスで低下している NK 細胞などの免疫細胞の働きが起因している可能性がある。NK 細胞は、正常細胞と炎症細胞や腫瘍細胞などの細胞を MHC クラス I 発現で見分けることができる²⁴⁻²⁶⁾。MHC クラス I は NK 細胞の抑制受容体に認識される。

NK細胞はMHCクラスI発現が低下しているウイルス感染細胞や腫瘍細胞に対して細胞傷害性を活性化する。また、MHCクラスI発現が低下を認めなくても、NK細胞の活性受容体がMHCクラスIといった抑制受容体より強く認識することによってNK細胞の細胞傷害性は活性化させる²⁷⁾。本実験で用いたT-01は α 47遺伝子を欠失させ感染腫瘍細胞表面のMHCクラスI発現を維持させている。SCIDマウスの治療群がNOD-SCIDマウス治療群に比べ腫瘍体積が小さいことから、感染腫瘍細胞表面のMHCクラスI発現が維持された状態でも、NK細胞は活性受容体の認識によって細胞傷害活性があった可能性が考えられる。病理組織学的所見においては、SCIDマウス治療群の50%で癌細胞が融解消失し線維化など効果を認めた。NOD-SCIDマウス治療群の50%でも癌細胞の融解や線維化が認められたが、一部に癌細胞の残存が認められた。癌細胞の融解や線維化は、T-01が腫瘍細胞内でのみ増殖し、腫瘍細胞をアポトーシスへと導き増殖したウイルスは隣接した腫瘍細胞へと感染を繰り返すと同時に、腫瘍形成に必要な血管新生阻害をもたらした結果だと考えられる¹⁰⁻¹²⁾。SCIDマウスとNOD-SCIDマウスの病理組織学的所見の差からNK細胞が働いた可能性も考えられるが、病理学所見からはNK細胞の存在は確認出来なかった。

卵巣癌モデルでは組織学的効果判定にSCIDマウスとNOD-SCIDマウスの治療群間で腫瘍体積に有意差がみられなかったことから、子宮頸癌モデルのHeLa接種群は、NOD-SCIDマウスのみで検証を行った。腫瘍接種後42日目の平均腫瘍体積はcontrol群で 15.0mm^3 、治療群は 1.4mm^3 となり、腫瘍体積に差は認めるが有意差は認められなかった。しかし、治療群では約66% (6匹中4匹)の腫瘍消失を認め、またT-01投与は計6回行っているが腫瘍消失は4回投

与までに生じた。この結果より、子宮頸癌における臨床応用では腫瘍溶解性HSV治療による癌細胞の消失が期待できるものと考えられる。NOD-SCIDマウスにおいて、SKOV3とHeLaのそれぞれの腫瘍体積は、SKOV3ではControl群は 156.7mm^3 、治療群は 10.0mm^3 、HeLaではControl群は 15.0mm^3 、治療群は 1.4mm^3 となり腫瘍体積の違いを認めた。腫瘍体積の違いは、*in vitro*におけるヒト子宮頸癌細胞株とヒト卵巣癌細胞株の増殖能に有意 ($p < 0.000001$) に差があり、ヒト卵巣癌細胞株の増殖能が上回っていることが要因にあると考えられる。細胞増殖能が早いSKOV3と、細胞増殖能が遅いHeLaとの間に、腫瘍縮小効果に差を認めた理由として、T-01の細胞内増殖スピードによるものと細胞への感染効率に差がある可能性が考えられる。

現在、腫瘍溶解性HSVは第3世代までであり、第2世代腫瘍溶解性HSV (G207)と第3世代腫瘍溶解性HSV (G47 Δ)を比較すると第3世代腫瘍溶解性HSVの方がより強い抗腫瘍効果を出現させることが証明されている¹³⁾。また、第3世代腫瘍溶解性HSVと化学療法との比較では有意差は認めないものの化学療法よりも腫瘍は縮小し、併用することでさらなる縮小が認められることが示されている^{28, 29)}。婦人科領域では、第2世代腫瘍溶解性HSVを用いた検討しか行われておらず¹⁹⁾、今回の実験系では第2世代腫瘍溶解性HSVとの比較検討は行えてはいないが、第3世代腫瘍溶解性HSVを用いたことで強い抗腫瘍効果を確認できた。

我々は本研究から腫瘍溶解性HSVが婦人科癌に対して有効であり、T細胞以外にNK細胞などの免疫細胞も腫瘍溶解性HSVによって活性化されている可能性も考えられた。今後、腫瘍溶解性HSV投与下でのNK細胞活性なども詳細に検討し、臨床治療に向けてさらなる研究を進めていく必要がある。

稿を終えるにあたり、本研究において腫瘍組織をHE染色してくださった岩手医科大学医学部：病理学講座、病理病態学分野後川昭彦技師に心からご礼申し上げます。

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ない。

文 献

- 1) **Lawrenson K and Gayther SA:** Ovarian cancer: a clinical challenge that needs some basic answers. *PLoS Med* **6**, 126-129, 2009.
- 2) **Harries M and Gore M:** Part II: chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment of recurrent disease. *Lancet Oncol* **3**, 537-545, 2002.
- 3) **Martuza RL:** Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. *J ClinInvest* **105**, 841-846, 2000.
- 4) **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.
- 5) **Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, et al.:** Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* **1**, 938-943, 1995.
- 6) **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.
- 7) **Cassady KA, Gross M and Roizman B:** The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the gamma 134.5 genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2alpha. *J Virol* **72**, 7005-7011, 1998.
- 8) **Chou J, Chen JJ, Gross M, et al.:** Association of a M (r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5-mutants of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 10516-10520, 1995.
- 9) **Benencia F, Courreges MC, Conejo-Garcia JR, et al.:** Oncolytic HSV exerts antiangiogenic activity in ovarian carcinoma. *Hum Gene Ther* **16**, 765-778, 2005.
- 10) **Mullen JT, Donahue JM, Chandrasekhar S, et al.:** Oncolysis by viral replication and inhibition of angiogenesis by a replication-conditional herpes simplex virus that expresses mouse endostatin. *Cancer* **101**, 869-877, 2004.
- 11) **Wong RJ, Chan M, Yu Z, et al.:** Angiogenesis inhibition by an oncolytic herpes virus expressing interleukin 12. *Clin Cancer Res* **10**, 4509-4516, 2004.
- 12) **Folkman J:** Fundametal concept of the abgiognicprocess. *CurrMol Med* **3**, 643-651, 2003.
- 13) **Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, et al.:** Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHCclass I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 6396-63401, 2001.
- 14) **Ramplng 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.
- 15) **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.
- 16) **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.
- 17) **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.
- 18) **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.
- 19) **George C, Antonis M, Eugene HK, et al.:** Oncolytic herpes simplex virus-1 lacking IP34.5 induces p53-independent death and is efficacious against chemotherapy-resistant ovarian cancer. *Clin cancer res* **6**, 3342-3353, 2000.
 - 20) **Fabian B, Maria CC, Jose RC, et al.:** HSV oncolytic therapy upregulates interferon-inducible chemokines and recruits immune effector cells in ovarian cancer. *Mol Ther* **12**, 789-802, 2005.
 - 21) **Fu X, Tao L, Jin A, et al.:** Expression of a fusogenic membrane glycoprotein by an oncolytic herpes simplex virus potentiates the viral antitumor effect. *Mol Ther* **7**, 748-754, 2003.
 - 22) **Fu X, Tao L, Rivera A, et al.:** Virotherapy induces massive infiltration of neutrophils in a subset of tumors defined by a strong endogenous interferon response activity. *Cancer Gene Ther* **18**, 785-794, 2011.
 - 23) 日本産婦人科学会: 卵巣腫瘍取扱い規約, 第2版, pp. 69-71, 金原出版, 東京, 1997.
 - 24) **Herberman RB, Nunn ME and Lavrin DH:** Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cell against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* **16**, 216-229, 1975.
 - 25) **Yokoyama WM and Seaman WE:** The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cell: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* **11**, 613-635, 1993.
 - 26) **反町典子, 子安重夫, 鳥山 一:** NK細胞の標的識別とウイルスのエスケープ機構. *実験医学* **19**, 614-620, 2001.
 - 27) **Vivier E, Ugolini S, Blaise D, et al.:** Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* **12**, 239-252, 2012.
 - 28) **Liu TC, Castelo-Branco P, Rabkin SD, et al.:** Trichostatin A and oncolytic HSV combination therapy shows enhanced antitumoral and antiangiogenic effects. *Mol Ther* **16**, 1041-1047, 2008.
 - 29) **Passer BJ, Castelo-Branco P, Buhrman JS, et al.:** Oncolytic herpes simplex virus vectors and taxanes synergize to promote killing of prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther* **16**, 551-560, 2009.

New oncolytic herpes simplex virus (HSV) therapy for gynecologic cancer

Yuki MIURA¹⁾, Masahiro KAGABU¹⁾, Tatsunori SAITO¹⁾,
Ryosuke TAKESHITA¹⁾, Naomi MATUKAWA²⁾, Akiko ABO³⁾,
Naoto YOSHINO²⁾ and Toru SUGIYAMA¹⁾

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

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

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

(Received on February 15, 2013 & Accepted on March 13, 2013)

Abstract

Ovarian cancer is called a silent killer, as 60-70% of patients at first diagnosis are already in the advanced stage of cancer. And about cervical cancer, 500,000 new cases are reported annually, and 270,000 patients die worldwide each year. New treatments are necessary to improve outcomes. Accumulating evidence indicates that, aside from the extent of replication capability within the tumor, the efficacy of an oncolytic herpes simplex virus (HSV) depends on the extent of

induction of host antitumor immune responses. We analyzed a preclinical mouse model of human ovarian and cervical cancer to a third-generation of oncolytic HSV termed T-01. We believe that both cell lines are sensitive to oncolytic HSV, and our *in vivo* experiments showed that treatment with T-01 significantly inhibited tumor growth. The use of oncolytic HSV is a promising strategy for cancer treatment.
