

## 論文内容の要旨

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, 吉野直人, 三浦雄吉, 松川直美, 竹下良輔, 利部正裕)  
(岩手医学雑誌～平成 26 年 10 月掲載 (予定))

### I. 研究目的

子宮頸がんは全世界の女性では年間の罹患率が第三位, 死亡率も第七位を占めている. また 2008 年には約 530000 人が発症し 275000 人が死亡している. 現在, 子宮頸がんに対する治療方法は手術療法, 科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. しかしながら進行もしくは再発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. そのためこれらの治療方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. そこで新規治療方法として腫瘍溶解性ヘルペスウイルスに着目し婦人科腫瘍モデルに対する基礎的検討を行うこととした.

### II. 研究対象ならび方法

HPV16-E6/7 遺伝子を導入したマウス肺がん細胞 TC-1 をがん細胞モデルとして用いた. また腫瘍溶解性ヘルペスウイルスは T-01 および T-mfIL12 を用いて実験した. T-01 は HSV-1 を遺伝子組み替えした ( $\gamma$ 34.5 遺伝子,  $\alpha$ 47 遺伝子, ICP 遺伝子を欠失させた) 腫瘍溶解ヘルペスウイルスであり, T-mfIL12 は T-01 の ICP 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ものである. これらを用い【TC-1 における細胞増殖能の測定】, 【TC-1 に対する T-01 および T-mfIL12 の殺細胞効果の検討】, 【IL-12 発現の検討】, 【TC-1 接種担癌マウスに対する T-01 および T-mfIL12 の抗腫瘍効果】, 【マウス脾臓を用い FACS による免疫学的解析】の 5 点において検討し統計処理として 3 群間 (control, T-01, T-mfIL12) の比較は 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 Tukeys 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. 研究結果

【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】T-01 および T-mfIL12 を感染させた群では非感染群に比較して明らかな細胞傷害が確認された。24, 48 時間後において T-01、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られなかった。また細胞生存率から 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】ELISA による検討において T-01 および T-mfIL12 感染後の IL-12 産生は 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。T-mfIL12 では 1 および 10MOI では濃度依存性に IL-12 の産生を認めた。

【4】TC-1 を接種後に腫瘍形成は最短で接種 5 日後で、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 1.904mm<sup>3</sup>(平均 1.532mm<sup>3</sup>)に増殖した腫瘍を認めた。UKCCCR ガイドラインより 35 日目を人道的エンドポイントとした。T-01 または T-mfIL12 接種群において非接種群の体重と比較して有意な変動は無かった。2 回目の接種から 5 回目の接種において両者ともに有意に縮小した。その後、観察終了まで両者ともに腫瘍溶解効果は維持された。両者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検討したが 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。T-01 投与群と T-mfIL12 投与群の間には明らかな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。

【5】ウイルス接種後 26 日後に脾臓を摘出し、HPV16E7 テトラマーを使用しフローサイトメーターで E7 特異的な細胞傷害性 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。

### Ⅳ. 結 語

今回われわれ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。異常より今回の *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 療法は本邦初の報告である。今後、子宮頸がんに対し臨床応用が出来るよう、さらなる解析を進めていく必要がある。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 石田 陽治 (内科学講座：血液・腫瘍内科分野)  
副査 准教授 吉野 直人 (微生物学講座：感染症学・免疫学分野)  
副査 講師 庄子 忠宏 (産婦人科学講座)

進行性婦人科がんに対する従来の治療効果は十分とは言えない現状であり、新規治療法の開発が急務となっている。本研究論文は、新規腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (HSV) による抗腫瘍効果を *in vitro*, *in vivo* 双方から検証した論文である。特筆すべきは、従来の研究と異なりウイルスによる腫瘍溶解効果のみならず抗腫瘍免疫誘導にも焦点を当て解析している点である。マウスを使用した担がんモデルでは、マウス子宮頸がんモデル細胞株への腫瘍溶解性 HSV の腫瘍縮小効果を証明した。さらに三分の二以上の個体で腫瘍体積が半分以下になり非常に有効な治療効果を示した。腫瘍溶解性ウイルスと IL-12 を組み込んだウイルスとで有意差は認められないものの、今後の腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス療法の可能性を示した。本研究は、一般に用いられている免疫不全マウスでのヒト腫瘍細胞移植マウスモデルと異なり、正常マウスで腫瘍消失個体例などの腫瘍溶解性 HSV による抗腫瘍効果の新規知見を初めて示した論文である。

本論文は、腫瘍溶解性 HSV の有効性と将来の新規婦人科がん療法の開発に役立つ有益な知見を示したといえる。学位に値する論文である。

## 試験・試問の結果の要旨

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証について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。

## 参考論文

- 1) Neoadjuvant chemotherapy using platinum- and taxane-based regimens for bulky stage Ib2 to IIb non-squamous cell carcinoma of the uterine cervix (庄子忠宏 他 7 名と共著)  
Cancer chemotherapy and pharmacology, 71 巻, 3 号 (2013) : p657-662.
- 2) 卵巣明細胞腺癌の臨床像 (杉山徹 他 2 名と共著)  
産科と婦人科, 79 巻, 10 号 (2012) : p1205-1210.