

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

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

村上一行¹⁾, 利部正裕¹⁾, 佐々木裕²⁾,
川村花恵¹⁾, 川村英生¹⁾,
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

(Received on December 7, 2015 & Accepted on December 27, 2015)

要旨

進行子宮頸がんの治療効果の向上を目的として, 子宮頸がんモデルマウスを用いて, 腫瘍溶解性ウイルス (T-01) と免疫チェックポイント阻害剤 (抗 CD274 抗体) の同時投与による併用療法を検討した. 併用療法は T-01 単独療法に比べ顕著な腫瘍増大抑制効果を認めたが, 抗体単独療法とは有意差を認めなかった. 腫瘍組織中の腫瘍抗原特異的 CTL は併用療法と抗体単独療法共に, 未治療のマウスより増加した. しかし併用療法では, 抗体が T-01

に対する CTL も増加させ, 腫瘍組織中の T-01 量は T-01 単独療法に比べ減少していた. そのため併用療法における T-01 の効果が減弱したと考えられた. 一方 T-01 は活性化リンパ球を傷害し, 抗腫瘍免疫の低下が示唆された. それぞれの単独投与では共に有意な抑制効果があるため, T-01 と抗 CD274 抗体の作用が干渉しない投与時期を検討することでより効果的な併用療法が期待できると推察された.

Key words : cervical cancer, oncolytic herpes simplex virus, immune checkpoint inhibitor, CD274, combination therapy

I. 緒 言

子宮頸がんは世界の女性のがんの中で乳がんに次いで二番目に多く, 2012 年には 528,000 人が発症し 266,000 人が死亡したと推定されている¹⁾. また, 日本国内は年間約 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) 16 型, 18 型などの感染が関与することが明らかとなっており^{3,4)}, 子宮頸がんの予防としてワクチンが開発され患者

発生数の減少が期待されている⁵⁾. 一方, 子宮頸がんの治療法は他の癌腫と同様に, 手術療法・放射線療法・化学療法が中心である. その中でも進行子宮頸がんの治療では放射線療法と化学療法の併用で予後の改善が報告され, 現在の標準療法とされている⁶⁻¹⁰⁾. しかしながら, 手術不能例の進行子宮頸がんに対する放射線療法と化学療法の併用は一定の効果は見られるものの十分とは言えない¹¹⁾. そのため, 新規治療法の開発が必要と考えられている.

そのような中, 我々は新規治療法として腫瘍溶解性ウイルス療法に注目した. 腫瘍溶解性ウイルス療法とは, 分子生物学的な手法で作製さ

Corresponding author: Kazuyuki Murakami
Mail: tasogare_jimusho@yahoo.co.jp

れたウイルスが選択的に腫瘍細胞を殺傷することで抗腫瘍効果を得る治療法をいう¹²⁾。腫瘍溶解性ウイルス療法は現在、臨床試験が行われている新規治療法であり、腫瘍溶解性ウイルス療法として悪性神経膠腫・悪性黒色腫への単純ヘルペスウイルス (HSV)^{13,14)}、扁平上皮がんへのアデノウイルス¹⁵⁾、卵巣がんへの麻疹ウイルス¹⁶⁾、悪性神経膠腫へのレオウイルス¹⁷⁾、肝臓がんへのワクシニアウイルス¹⁸⁾などの臨床研究が報告されているが、子宮頸がんに対する臨床試験は未だ行われていない¹⁹⁾。

これまで我々は、腫瘍溶解性 HSV である T-01 を用いて子宮頸がんの新規治療法を検討してきた^{20, 21)}。T-01 は HSV の γ 34.5, infected cell proteins 6 (ICP6), α 47 の 3 個の遺伝子を欠失させたウイルスである²²⁾。 γ 34.5 を欠失させたウイルスは、腫瘍細胞に感染するとプログラム死に関連するタンパク合成を阻害し、腫瘍細胞内で増殖する²³⁾。ICP6 はウイルス DNA 合成に必須の酵素をつくる遺伝子であり²⁴⁾、これが欠失しているウイルスは DNA 合成に必要な酵素が供給される腫瘍細胞内でのみ複製が可能となりウイルスの増殖により腫瘍細胞を破壊する²⁵⁾。また、 α 47 遺伝子産物は感染細胞表面の MHC class I の発現を抑制する機能を持つが、 α 47 を欠失させることで感染細胞上に MHC の発現を持続させることが可能となり、その結果細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) が標的細胞をより効率よく認識できるようになる²⁶⁾。ヒト子宮頸がんに対する T-01 の抗腫瘍効果は、ヒト子宮頸部腺がん由来の HeLa 細胞、ヒト子宮頸部扁平上皮がん由来の Caski 細胞や SKG-IIIa 細胞を移植した種々の担がんマウスを用いた研究で確認されている²¹⁾。また、HPV E6/E7 遺伝子を導入したマウス肺がん細胞である TC-1²⁷⁾ 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大抑制効果が認められた²⁰⁾。

近年、腫瘍に対する免疫機構の研究から腫瘍免疫療法の開発が急激に進められている^{28, 29)}。免疫応答の調節メカニズムとして、自己に対する過剰な免疫反応や正常細胞への傷害を抑制するための免疫チェックポイント機構が存在する。この機構は共刺激分子により調節され、T 細胞が活性化されると CD152 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4; CTLA-4) などの免疫補助受容体に抗原提示細胞に発現する CD80 や CD86 などのリガンドが結合することで、免疫反応が抑制される^{30, 31)}。腫瘍組織ではこの免疫チェックポイント機構が増強されており、腫瘍細胞上の共刺激分子が活性化リンパ球に発現する CD152 などと結合することで腫瘍免疫が抑制され、抗腫瘍効果が減少することで免疫系からの回避が可能となっている³²⁾。これらの免疫学的知見から、免疫チェックポイントを阻害することで腫瘍免疫の活性化が維持されると考えられた。抗 CD152 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤が創薬され、悪性黒色腫や卵巣がんを対象とした臨床試験で大きな効果を挙げているが³³⁻³⁵⁾、ヒト子宮頸がんに対しては免疫チェックポイント阻害剤による臨床試験は行われていない³⁶⁾。

これまでの研究で、子宮頸がんモデルマウスにおいて T-01 に腫瘍増大抑制効果があることは明らかになっているが、腫瘍体積が約 320mm³ を超えた腫瘍では T-01 による腫瘍増大抑制効果は減弱していた²⁰⁾。本研究は、子宮頸がんモデルマウスで T-01 と免疫チェックポイント阻害剤を併用し、更なる抗腫瘍効果を持つ新規治療法を目指した。

II. 研究材料および方法

1. 研究倫理

組換えウイルス T-01 を用いた実験は、文部科学大臣確認実験として (承認番号 360)、本学組換え DNA 実験安全管理規則に従って実施した。動物実験は、動物実験委員会の承認後 (承

認番号 27-004), 本学動物実験規定を順守して実施した。マウスは, 飼育室の環境に馴化させるために, 特定病原体除去下で7日間の飼育後に実験を開始した。人道的エンドポイントとして, 腫瘍体積が $1,500\text{mm}^3$ 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。

2. 腫瘍細胞および腫瘍溶解性ウイルス

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, 10mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; 同仁科学研究所, 熊本), 20 単位/ml ペニシリン (Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京), 0.2mg/ml ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社) を添加した培養液で, 37°C , 5% CO_2 条件下で培養した。T-01 [3.5×10^9 plaque forming unit (PFU) /ml] 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附属病院脳腫瘍外科, 東京) より供与された。

3. T-01 と抗体による細胞傷害性の測定

TC-1 を 96-well 平面培養プレート (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) に 1×10^4 cells/well になるように播種し, 24 時間培養後, T-01 を 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 PFU で感染させた。この際, 抗体投与群にはラット抗マウス CD274 モノクローナル抗体 (サブクラス: IgG2b, clone: 10F.9G2, Bio Legend Inc, San Diego, CA, USA) またはアイソタイプ抗体 (サブクラス: IgG2b, clone: RTK4503, Bio Legend Inc) を同時に添加した (抗体濃度 $1 \mu\text{g/ml}$)。感染 24 時間後に細胞生存率を Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay キット (Promega Co.,

Madison, WI, USA) を用いて解析した。生存率の測定はキット試薬添加 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) で測定した。細胞生存率は以下の計算式に基づき求めた。細胞生存率 (%) = (ウイルス添加 well の OD. 490 - ウイルス添加 well の OD. 630) ÷ (ウイルス非添加 well の OD. 490 - ウイルス非添加 well の OD. 630) × 100。

4. 子宮頸がんモデルマウスの作製

実験動物として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。TC-1 をリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS) 中に 1×10^5 cells/ $100 \mu\text{l}$ に調整し, 細胞懸濁液を剃毛したマウス背部に正中を境にして, 左右に1か所ずつ (合計2カ所) 皮下移入した。皮下移入は, 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行った。体温維持のため麻酔後覚醒までの間ヒーターマット (夏目製作所, 東京) 上で管理した。

5. 抗腫瘍効果の検討

T-01 は PBS で希釈し, 1 回の接種を 1×10^5 PFU/ $50 \mu\text{l}$ とした。免疫チェックポイント阻害剤として, 抗 CD274 抗体とコントロールとしてアイソタイプ抗体を用いた。いずれもアジ化ナトリウム不含で 0.1 エンドトキシンユニット/ μg 未満のエンドトキシン含有量の抗体を用いた。

子宮頸がんモデルマウスでの抗腫瘍効果を次の5つの群で検討した。T-01 単独群: 左側腫瘍に T-01 を接種, T-01 + 抗 CD274 抗体併用群: 左側腫瘍に T-01 を接種し, 抗 CD274 抗体を皮下投与, T-01 + アイソタイプ抗体併用群: 左側腫瘍に T-01 を接種し, アイソタイプ抗体を皮下投与, 抗 CD274 抗体単独群: 左側腫瘍に PBS を $50 \mu\text{l}$ 接種し, 抗 CD274 抗体を皮下投与, PBS 群: 左側腫瘍に PBS を $50 \mu\text{l}$ 接種。T-01 または PBS を T-01 移入後7日目

から4-5日間隔で腫瘍内接種した。抗CD274抗体またはアイソタイプ抗体は背部腫瘍間にT-01接種11日後と21日後に皮下投与した。抗体はいずれも1回の接種を100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ とした。処置はソムノペンチル麻酔下で行った。体温維持のため麻酔後覚醒までの間ヒーターマット上で管理した。TC-1移入後2-3日間隔で腫瘍径と体重を測定した。腫瘍体積はCarlssonの公式[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]で求めた³⁷⁾。

6. 組織採取および細胞単離

各投与群の子宮頸がんモデルマウスから脾臓と腫瘍組織を採取した。脾臓は70 μm -セルストレーナー(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)を通過させた後、ACKバッファー(0.826% NH_4Cl , 0.1% KHCO_3 , 0.0037% EDTA-2Na , pH7.3)で赤血球を溶血させ脾細胞を得た。Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec Inc. Bergisch Gladbach, Germany)を用いgentle MACS (Miltenyi Biotec Inc.)で腫瘍組織を破碎し、細胞を単離した。生細胞数は、TC20TM全自動セルカウンター(Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて計測した。

7. 腫瘍特異的および腫瘍溶解ウイルス特異的CTL解析

TC-1は腫瘍抗原としてHPV E7を発現しているため²⁷⁾、TC-1に対するCTLはE7特異的CTLを解析し、T-01に対するCTLはHSVのエンベロープタンパク質の1つであるglycoprotein B (gB)³⁸⁾を指標としてテトラマーアッセイ³⁹⁾で測定した。腫瘍組織から単離した細胞を染色用バッファー⁴⁰⁾に 1×10^6 cells/ $100 \mu\text{l}$ となるように浮遊させ、phycoerythrin (PE)標識HPV16 E7 tetramer (株式会社医学生物学研究所, 名古屋)またはPE標識HSV gB tetramer (株式会社医学生物学研究所)およびallophycocyanin (APC)

標識抗CD3抗体(clone: 17A2, Bio Legend Inc), fluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗CD8抗体(clone: 53-6.7, Bio Legend Inc), peridinin-chlorophyll proteins complex with cyanin-5.5 (PerCP-Cy5.5)標識抗CD45抗体(clone: I3/2.3, Bio Legend Inc)を加え30分間暗所にて静置し染色を行った。染色用バッファーで細胞を洗浄後、FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)で測定し、Cell Quest 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。

8. 共刺激分子の解析

共刺激分子の解析には以下の抗体を用いた。PerCP-Cy5.5標識CD3抗体(clone: 17A2), APC標識抗CD3抗体, APC標識抗CD4抗体(clone: RM4-5), FITC標識抗CD8抗体, APC標識抗CD11c抗体(clone: N418), FITC標識抗CD45抗体(clone: I3-2.3), PE標識抗CD80抗体(clone: 16-10A1), PE標識抗CD86抗体(clone: GL-1), PE標識抗CD262抗体(clone: MD5-1), PE標識抗CD273抗体(clone: TK25), PE標識抗CD274抗体(clone: 10F.9G2), APC標識抗CD274抗体(clone: 10F.9G2), PE標識抗CD275抗体(clone: HK5.3), PE標識抗CD279抗体(clone: RMP1-30), APC標識抗CD279抗体(clone: RMP1-30), PerCP-Cy5.5標識抗I-A^b抗体(clone: AF6-120.1) (いずれもBio Legend Inc)。培養細胞および組織から単離した細胞を染色用バッファー⁴⁰⁾に 1×10^6 cells/ $100 \mu\text{l}$ となるように浮遊させ、抗体を加え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細胞を洗浄後、FACSCaliburで測定し、Cell Quest Pro software version 6.0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。

9. 腫瘍組織中のウイルス定量

子宮頸がんモデルマウスにT-01を腫瘍内接

種し、一定期間後に腫瘍組織からウイルスを分離した。腫瘍組織を gentle MACS を用いて破碎し、 $800 \times g$, 5 分間, 4°C で遠心後, 上清をウイルス液として回収した。T-01 の定量は, アフリカミドリザル腎臓由来細胞株である Vero 細胞を用いたプラーク法で行った⁴¹⁾。Vero 細胞の培養は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies Co.) に 10% ウシ胎児血清, 20 単位/ml ペニシリン, 0.2mg/ml ストレプトマイシンを添加した培養液を用い, 37°C , 5% CO_2 条件下で行った。プラーク法に用いる Vero 細胞は, 6-well 平面培養プレート (Thermo Fisher Scientific Inc.) に 1.5×10^6 cells/well で播種し, 24 時間培養することで調整した。PBS で 1 回洗浄後, Minimum Essential Medium (MEM; Life Technologies Co.) で 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 倍に希釈したウイルス液を $250 \mu\text{l/well}$ で添加し, 37°C , 5% 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 3 回洗浄することで非吸着ウイルスを除去し, 3ml/well の寒天培地を添加した。室温で 10 分間静置することで寒天培地を固め, 37°C , 5% CO_2 条件下で 72 時間培養を行った。寒天培地は 2% Sea plaque agarose (Lonza Rockland, Inc. Rockland, ME, USA) に 2 倍の濃度の DMEM (日水製薬株式会社, 東京) を等量添加し, 最終濃度 2% でウシ胎児血清を添加することにより作製した。培養 72 時間後, さらに 2ml/well の 1% Sea plaque agarose を重層し, さらに 48 時間培養を行った。クリスタルバイオレット溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で染色し, プラークの数の測定を行った。

10. Phytohaemagglutinin (PHA) 幼若化リンパ球の T-01 による細胞傷害性の測定

ナイーブマウスより脾臓を採取し, 上述の方法でリンパ球を単離した。リンパ球を 96-well 平面培養プレートに 1×10^6 cells/well になるように播種し, 1% PHA-M (Thermo Fisher

Scientific Inc.) の存在下または非存在下で 24 時間培養した。T-01 を 1×10^6 PFU で感染させ, 感染 24 時間後の細胞生存率を測定した。生存率は上述の方法で測定した。

11. 統計

統計解析は GraphPad Prism バージョン 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。2 変数の相関分析は両側 Pearson 分析を行った。正規分布に従う独立した 2 群間の比較は両側 Student's t-検定 (対応なし) を行った。同一個体の左右の腫瘍体積の比較は両側 Student's t-検定 (対応あり) を行った。2 群間の腫瘍体積の経時的変化の比較は, 反復測定二元配置分散分析 (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。多群間の比較は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い, Tukey 比較検定を行った。p<0.05 を統計的に有意とした。

III. 結 果

1. 子宮頸がんモデルマウスでの腫瘍内浸潤リンパ球

子宮頸がんモデルマウスで腫瘍内総細胞数および腫瘍内に浸潤した CD8^+ リンパ球の比率を測定した。腫瘍組織の総細胞数は経時的に増加し, TC-1 移入後 11 日目に平均で 2.9×10^6 個だった細胞数は 25 日目には 2.7×10^8 個と約 100 倍に増加していた (図 1A)。一方, 腫瘍内浸潤 CD8^+ リンパ球の比率は TC-1 移入後 11 日目の平均で 22% であったが, 25 日目には 5 分の 1 程度の 4.3% であった (図 1B)。腫瘍内細胞数と腫瘍内浸潤 CD8^+ リンパ球の比率は, 負の相関を認めた ($r = -0.6030$, $p < 0.005$) (図 1C)。このことより, 子宮頸がんモデルマウスで腫瘍の増大に CTL による腫瘍免疫が関与していることが示唆された。

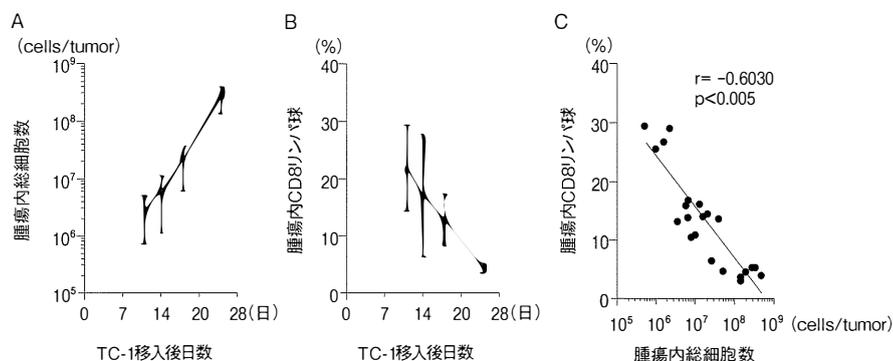


図 1. 子宮頸がんモデルマウスでの腫瘍内総細胞数と腫瘍内浸潤リンパ球

A: TC-1 移入後, 11 日, 14 日, 18 日, 25 日に腫瘍組織を採取し, 腫瘍内総細胞数を計測した.

B: 図 1A で単離した細胞を染色し, 腫瘍内に浸潤した $CD8^+$ リンパ球 ($CD3^+ CD8^+ CD45^+$) の比率をフローサイトメーターで解析した.

C: 図 1A と図 1B から腫瘍内細胞数と腫瘍内 $CD8^+$ リンパ球 (%) の相関を求めた. 1 つの点は 1 匹のマウスから得られた結果を表した.

それぞれの腫瘍採取日でマウスを 3 - 6 匹用いた. 図 1A と図 1B は平均値 \pm SD で表し, 図 1C の回帰直線は両側 pearson 解析で求めた.

2. 共刺激分子の解析

腫瘍内の CTL 減少に免疫チェックポイント機構が関与する³²⁾. そこで TC-1 および子宮頸がんモデルマウスの樹状細胞とリンパ球における共刺激分子の発現レベルを解析した. 免疫調節に関与する共刺激分子は多数報告されているが, 我々はその中でも T 細胞の制御に中心的な役割を果たし, 臨床応用もなされている B7 スーパーファミリー⁴²⁾ に焦点を絞り, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD273 (B7-DC, 別名: PD-L2), CD274 (B7-H1 別名: PD-L1), CD275 (B7-H2) の解析を行った. 継代培養中の TC-1 に発現する共刺激分子をフローサイトメーターで解析したところ, CD80 および CD274 の発現が見られ, CD86, CD273, CD275 は陰性であった (図 2A). 次に, 脾臓内の樹状細胞 ($CD11c^+ CD45^+ I-A^{b+}$ 細胞) での共刺激分子の発現レベルを解析した. TC-1 移入前のマウスでは $CD80^+$, $CD86^+$, $CD274^+$ 樹状細胞の比率が高かったが, TC-1 移入後 $CD80^+$, $CD86^+$ 樹状細胞の比率は減少した. また, $CD273^+$, $CD275^+$ 樹状細胞の比率は低値のままであった (図 2B). 本モデルマウスで

は, 免疫チェックポイント阻害剤の標的分子として CD274 が候補となると考えられた.

そこで, 継代培養中に認められた TC-1 での CD274 の発現レベルが子宮頸がんモデルマウスの腫瘍内で変化するかを解析した. 腫瘍組織における TC-1 は CD262 をマーカーとして確認した⁴³⁾. 接種直前の TC-1 (0 日) と接種後 7 日, 11 日の TC-1 ($CD45^+ CD262^+$ 細胞) での CD274 発現レベルを解析したところ, 平均蛍光強度に変化はなかった (図 2C). さらに, CD274 は CD279 と結合するため⁴⁴⁾, 腫瘍内浸潤 $CD8^+$ リンパ球および脾臓中の T 細胞に発現している CD279 を確認した. 腫瘍内浸潤 $CD8^+$ リンパ球は $58.5 \pm 14.1\%$ で CD279 が陽性であり (図 2D), 脾臓中の $CD4^+$ リンパ球および $CD8^+$ リンパ球のいずれも $CD279^+$ 細胞が存在した (図 2E). 以上のことから, 本モデルマウスでの免疫チェックポイント機構に関与する分子は CD274 と考えられ, 本研究での免疫チェックポイント阻害剤を抗 CD274 抗体とした.

3. T-01 および抗 CD274 抗体の細胞傷害効果
TC-1 に対して T-01 および抗 CD274 抗体

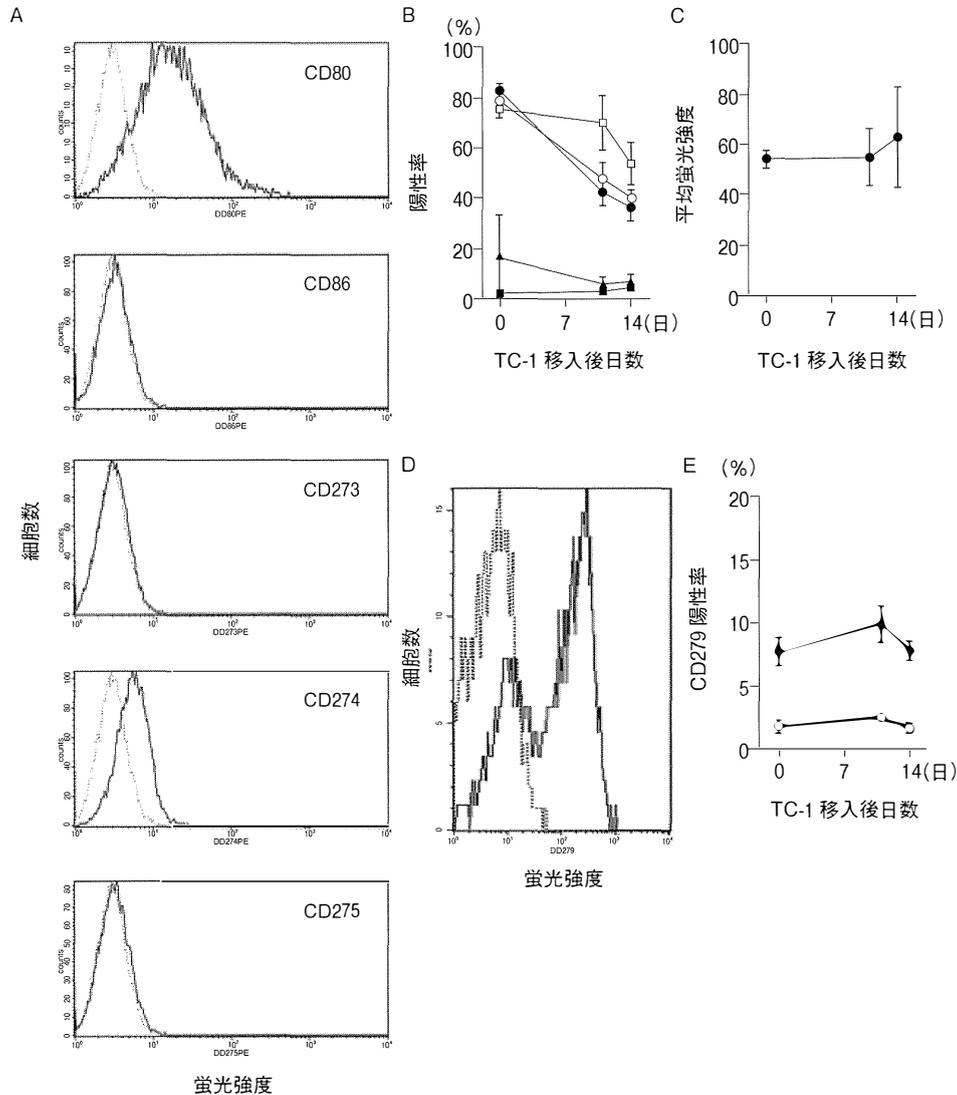


図 2. 共刺激分子の発現の解析

TC-1 細胞，樹状細胞の共刺激分子をフローサイトメーターで解析した。

A: TC-1 細胞表面に発現する共刺激分子 (CD80, CD86, CD273, CD274, CD275) をフローサイトメーターで解析した。実線はそれぞれの抗体で染色した結果を表し，破線は非染色 (ネガティブコントロール) を表した。

B: TC-1 移入直前 (0 日) および TC-1 移入後 11 日, 14 日目の脾臓における樹状細胞表面に発現する共刺激分子 [CD80 (黒丸), CD86 (白丸), CD273 (黒三角), CD274 (白四角), CD275 (黒四角)] をフローサイトメーターで解析した。

C: TC-1 移入直前 (0 日) および TC-1 移入後 11 日, 14 日目の腫瘍組織の TC-1 (CD45⁺ CD262⁺) 細胞表面に発現する CD274 をフローサイトメーターで解析し，発現を平均蛍光強度で示した。

D: TC-1 移入後 11 日目の腫瘍浸潤 CD8⁺ リンパ球 (CD3⁺ CD8⁺ CD45⁺) 細胞表面に発現する CD279 をフローサイトメーターで測定した。実線はそれぞれの抗体で染色した結果を表し，破線は非染色 (ネガティブコントロール) を表した。

E: TC-1 移入直前 (0 日) および TC-1 移入後 11 日, 14 日目の脾臓における CD4⁺ リンパ球 (白丸) および CD8⁺ リンパ球 (黒丸) 細胞表面に発現した CD279 をフローサイトメーターで解析した。

それぞれの日数でマウスを 3 - 5 匹用いた。図 2B, 2C, 2E はそれぞれ平均値 ± SD で表した。

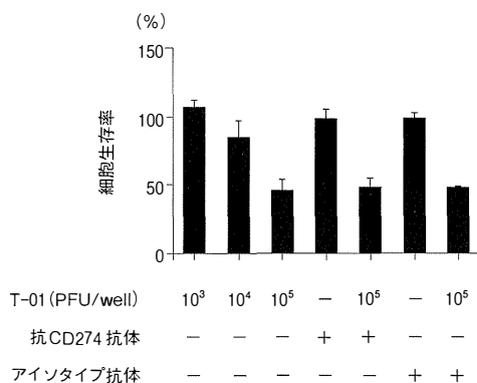


図3. T-01 および抗 CD274 抗体による細胞傷害性継代培養中の TC-1 細胞に T-01 (1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 PFU) を感染させ, 同時に抗 CD274 抗体およびアイソタイプ抗体をそれぞれ $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ で添加し, 生存細胞率を計測した. T-01 および抗体を添加していない条件での細胞生存率を 100% とした. 各群の生存率を平均値 \pm SD で表した. 各群における同一の計測を 3 回行った. 多群間の比較は one-way ANOVA で解析した.

の細胞傷害作用を *in vitro* で確認した. TC-1 に T-01 を感染させたところ, ウイルス量依存的に細胞傷害が認められ, 1×10^5 PFU で感染させた TC-1 には広範に細胞変性効果を認めた (data not shown). 抗 CD274 抗体またはアイソタイプ抗体のみを添加した条件では細胞生存率はほぼ 100% であった. 1×10^5 PFU の T-01 とともに抗 CD274 抗体またはアイソタイプ抗体を添加した場合, 細胞生存率は T-01 のみを添加した条件と比較して有意な差は認めなかった (図 3). 以上のことより, 抗 CD274 抗体には細胞傷害作用はなく, T-01 の細胞傷害性にも影響を及ぼさないことが明らかになった.

4. 子宮頸がんモデルマウスでの腫瘍体積の経時的変化

子宮頸がんモデルマウスで抗腫瘍効果を検討した. 5 つの実験群でそれぞれの個体における

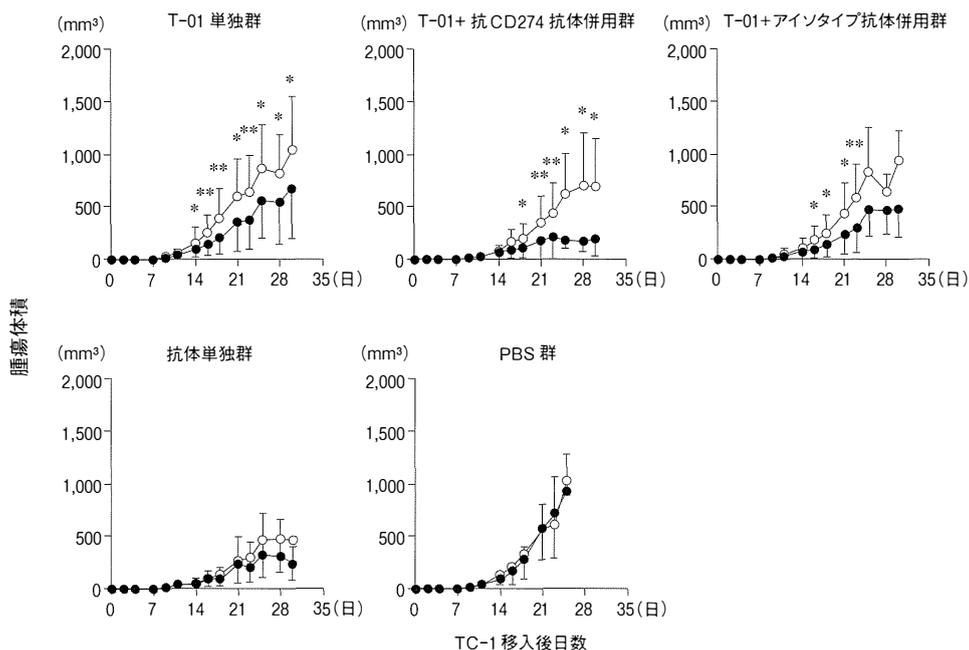
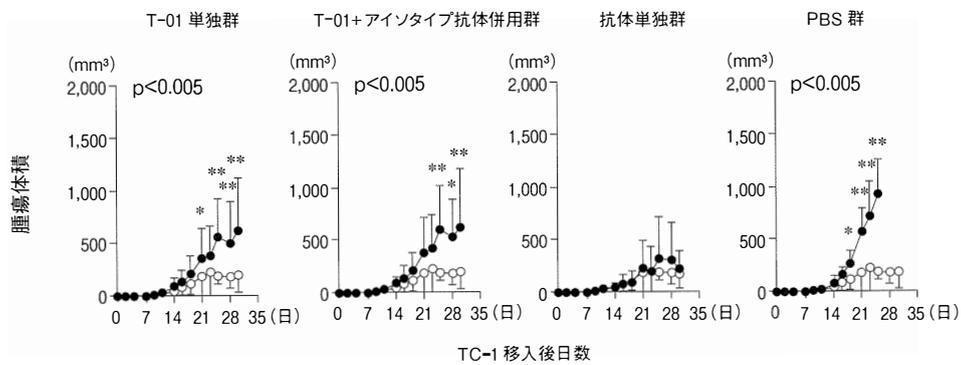


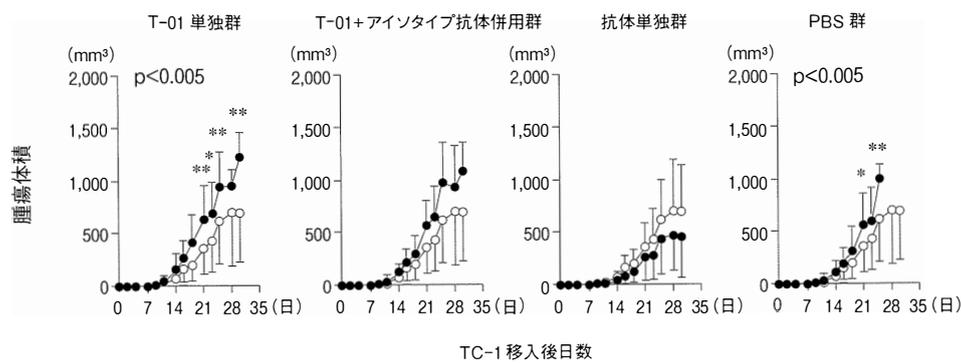
図4. モデルマウスの腫瘍体積の経時変化

T-01 単独群 (19 匹), T-01+ 抗 CD274 抗体併用群 (10 匹), T-01 + アイソタイプ抗体群 (8 匹), 抗 CD274 抗体単独群 (9 匹), PBS 群 (11 匹) の腫瘍体積の推移を表した. 左側腫瘍に TC-1 移入後 7 日目, 11 日目, 16 日目, 21 日目, 25 日目に T-01 または PBS を腫瘍内接種し, 両腫瘍間に, 11 日目と 21 日目に抗 CD274 抗体またはアイソタイプ抗体を皮下投与した. 各群における, 左側腫瘍 (黒色) と右側腫瘍 (白色) の腫瘍体積を平均値 \pm SD を用いて表した. 左右の腫瘍体積の有意差は両側 Student's t-検定 (対照あり) 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.

A 接種側腫瘍(左側腫瘍)



B 非接種側腫瘍(右側腫瘍)



C

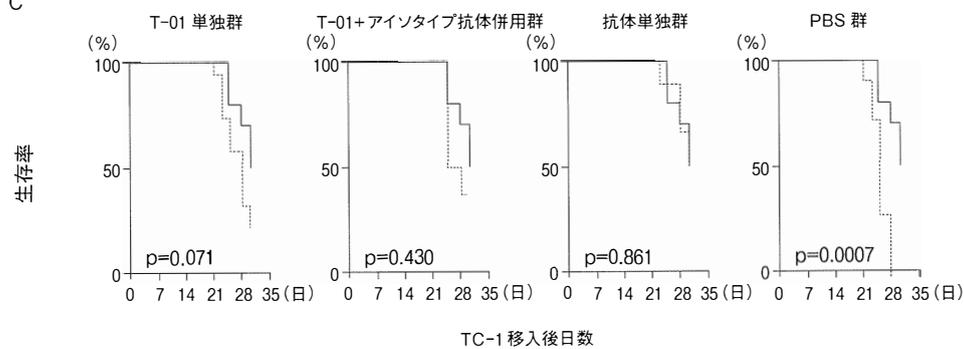


図5. T-01 + 抗 CD274 抗体併用群と各群の比較

A: T-01 または PBS 接種側腫瘍 (左側) の腫瘍体積を平均値 \pm SD で表した。

B: 非接種側腫瘍 (右側) の腫瘍体積を平均値 \pm SD で表した。

図5A, 5Bともに T-01 + 抗 CD274 抗体併用群 (白丸) とそれぞれの群 (黒丸) 間での経時的变化の比較を反復測定 two-way ANOVA で行い, 有意水準である場合, p 値をグラフ左上に記した。経時的变化に有意差がある場合は Bonferroni 比較検定を行い, 各測定日でのアスタリスク (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$) で示した。

C: 生存解析は Kaplan-Meier 生存分析を行った。T-01 + 抗 CD274 抗体併用群を実線で表し, それぞれの群を破線で表した。生存率の比較は log-rank 検定を行った。p 値をグラフ左下に記した。

左右の腫瘍体積を比較したところ, PBS 群では左右の腫瘍体積に差はなく, 腫瘍の増大に移入部位の左右差はないことが示された. T-01 単独群では, T-01 接種側腫瘍 (左側腫瘍) は非接種側腫瘍 (右側腫瘍) と比較して, TC-1 移入後 14 日目から有意に腫瘍体積の増大が抑制された. T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群および T-01 + アイソタイプ抗体併用群でも左右の腫瘍体積の増大傾向が異なった. 一方, 抗 CD 274 抗体単独群では左右の腫瘍体積に有意な差はなく, 本研究の子宮頸がんモデルマウスにおいて抗 CD 274 抗体には両側の腫瘍に対し腫瘍増大抑制効果があることが示された. また, 28 日目までに PBS 群と比較して約 50% の腫瘍体積となっており, 高い腫瘍体積増大抑制効果を認めた (図 4).

5. T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群と各群の比較

T-01 単独群と T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群で左右それぞれの腫瘍に対し腫瘍増大抑制効果が大きく異なった (図 4). そこで, 治療効果をより詳細に検討するために, 腫瘍体積の経時的变化を左側腫瘍と右側腫瘍の双方で, T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群と他の 4 群と比較した (図 5).

T-01 または PBS 接種側腫瘍 (左側腫瘍) では, T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群は T-01 単独群に比べ, 有意に腫瘍体積の増大が抑制されていた (図 5A 左). T-01 + アイソタイプ抗体併用群および PBS 群との比較でも同様に有意な腫瘍抑制効果が認められた (図 5A 中左および右). 非接種側腫瘍 (右側腫瘍) では, T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群は T-01 単独群に比し有意差を認め, 併用効果が見られた (図 5B 左). しかし接種側腫瘍 (図 5A 中右) と同様に, T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群には抗 CD 274 抗体単独群を上回る効果は認められなかった (図 5B 中右). 逆に, TC-1 移入後 30 日目の非接種側腫瘍の平均腫瘍体積は T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群と抗 CD 274 抗体単独群でそれぞれ 692mm^3 と 459mm^3 で, 有意差はないものの

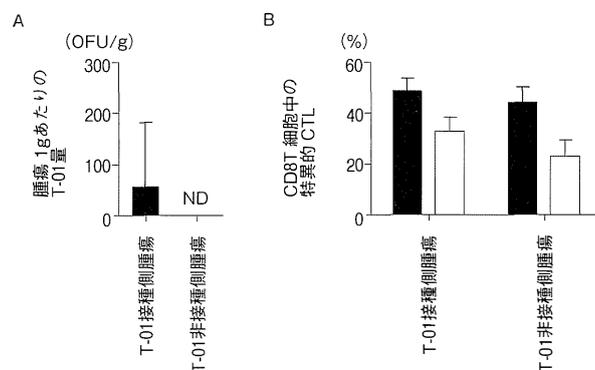


図 6. 接種側腫瘍と非接種側腫瘍の比較

TC-1 移入後 7 日目に T-01 を接種し, その 4 日後 (TC-1 移入後 11 日目) に T-01 接種側 (左側) と非接種側 (右側) の腫瘍組織を採取した. マウスは 4 匹用いた.

A: 腫瘍組織内の T-01 を定量した. それぞれの腫瘍組織での腫瘍 1g あたりのウイルス量を平均値 \pm SD で表した. ND: not detected

B: 腫瘍浸潤 CD8⁺ リンパ球 (CD3⁺ CD8⁺ CD45⁺) 中の E7 特異的 CTL (黒色) および gB 特異的 CTL (白色) の比率をテトラマーアッセイで解析した. それぞれの腫瘍組織での CTL の比率を平均値 \pm SD で表した. 左右の腫瘍組織での各 CTL の比率の有意差は両側 Student's t-検定 (対応あり) で解析した.

($p=0.744$) 抗 CD 274 抗体単独群は T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群の 3 分の 2 程度の腫瘍体積であった.

TC-1 移入後 30 日目での生存率は, T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群で 50% (10 匹中 5 匹生存) であったのに対し, T-01 単独群, T-01 + アイソタイプ抗体併用群, 抗 CD 274 抗体単独群ではそれぞれ 21.1% (19 匹中 4 匹生存), 37.5% (8 匹中 3 匹生存), 55.6% (9 匹中 5 匹生存) であった (図 5C). また, PBS 群は 28 日目までに 11 匹全例で人道的エンドポイントの設定に達した. 生存率は T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群と PBS 群とで有意差があった (図 5C 右). T-01 + 抗 CD 274 抗体併用群と T-01 単独群を比べると, 生存曲線に有意差は認めなかったが TC-1 移入後 30 日目での生存率は T-01 単独群よりも改善していた (図 5C 左).

6. 接種側腫瘍と非接種側腫瘍の比較

T-01 単独群において、T-01 接種側腫瘍（左側腫瘍）と非接種側腫瘍（右側腫瘍）の腫瘍体積の増加に差が認められた（図4左上）。この左右差の理由を明らかにするために、まず両腫瘍組織に存在する T-01 を定量した（図6A）。T-01 接種側腫瘍では接種後4日目の腫瘍で予想通り T-01 の存在が確認されたが、非接種側腫瘍では T-01 は検出限界未満であった。このことから T-01 接種側腫瘍では T-01 の感染が認められたが、非接種側腫瘍へ T-01 が移行していないことが明らかになった。

次に腫瘍体積の左右差に CTL が関与しているかどうかを解析した。腫瘍組織中の CD8⁺ リンパ球に占める E7 特異的 CTL と gB 特異的 CTL の比率をテトラマーアッセイで解析した。T-01 接種側腫瘍で E7 特異的 CTL および gB 特異的 CTL はそれぞれ 48.5%、32.7% であった。一方、T-01 非接種側腫瘍でも gB 特異的 CTL が検出され、E7 特異的 CTL と gB 特異的 CTL のそれぞれの存在比は左右の腫瘍で有意差はなかった。

7. 腫瘍組織中の CTL の解析と T-01 の定量

腫瘍体積増大抑制効果には T-01 + 抗 CD274 抗体併用群と T-01 単独群に有意差はあるが（図5A左, 5B左）、抗 CD274 抗体単独群と併用群の間で有意差は認められなかった（図5A中右, 5B中右）。その原因を考えるために、各群における CTL の解析と T-01 の定量を行った。

解析を行うのに適切な時期を推定する目的で、PBS 群で E7 特異的 CTL の推移を測定したところ、TC-1 移入後11日目には14%存在した E7 特異的 CTL はその後減少し、18日目以降は3%未満となった（図7）。さらに、各群間で腫瘍体積に有意差が出始めるのが TC-1 移入後18～21日目（図5A, 図5B）であったため、各群間の比較を行うのに18日目が適切であると判断した。

まず、5つの群における腫瘍組織中の E7 特異的 CTL を測定した。抗 CD274 抗体単独群で

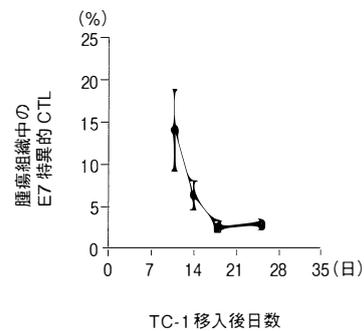


図7. 腫瘍内に浸潤した E7 特異的 CTL の経時的変化

TC-1 移入後11日目、14日目、18日目、25日目に腫瘍組織を採取し、腫瘍組織内の総細胞数に対する E7 特異的 CTL の比率をテトラマーアッセイで測定した。それぞれの日数でマウスを3-6匹用いた。各日の CTL の比率を平均値 ± SD で表した。

の E7 特異的 CTL は 5.7% 存在していたのに対し、T-01 単独群、T-01 + アイソタイプ抗体併用群、PBS 群では有意に少なかった（図8A）。T-01 単独群と PBS 群に有意差がなかったことから、T-01 は E7 特異的 CTL の誘導に関与していないと考えられた。TC-1 移入後14日目における PBS 群の E7 特異的 CTL が 6.3% であったことから（図7）、抗 CD274 抗体が腫瘍組織中の CTL の減少を抑制していることが示唆された。T-01 接種により HSV に gB 特異的 CTL が誘導されることが判明したため（図6B）、移入後18日目の gB 特異的 CTL についても解析を行った。E7 特異的 CTL と同様に、T-01 + 抗 CD274 抗体併用群では T-01 単独群よりも腫瘍組織中の gB 特異的 CTL は高値であった（図8B）。一方、腫瘍組織中の T-01 の定量を試みたところ、T-01 + 抗 CD274 抗体併用群での T-01 量は T-01 単独群に比べて3分の1程度に減少していた（図8C）。

8. T-01 のリンパ球傷害効果

HSV-1 の臨床分離株である KOS 株⁴⁵⁾ はヒト末梢血リンパ球や臍帯血リンパ球にアポトーシスを誘導することが報告されている^{38,46)}。T-01 は遺伝子欠失により増殖停止している細

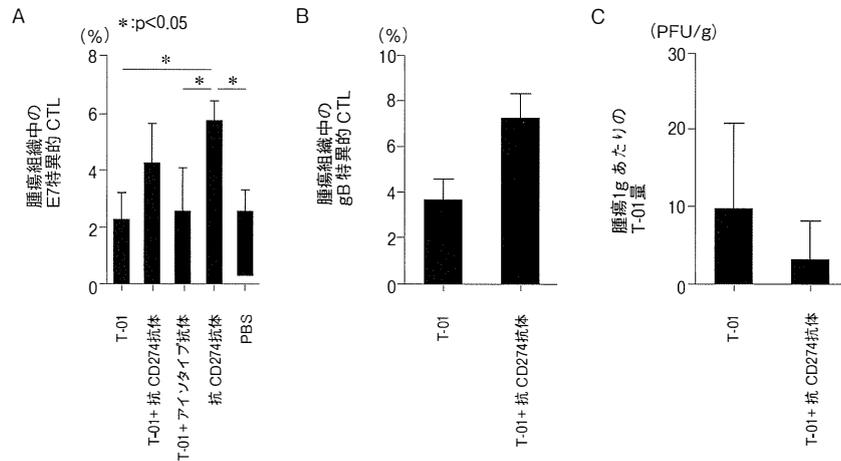


図 8. TC-1 移入後 18 日目の腫瘍内浸潤 CTL とウイルス量

各群において TC-1 移入後スケジュール通りに T-01 または PBS の接種および抗 CD274 抗体の投与を行い、18 日目に接種側（左側）腫瘍組織を採取した。各群でマウスを 3-6 匹用いた。

A: 腫瘍組織内の E7 特異的 CTL の比率をテトラマーアッセイで解析した。各群の CTL の比率を平均値 \pm SD で表した。他群間の比較は one-way ANOVA を行い、Tukey 比較検定を行った。有意差はアスタリスク (* $p < 0.05$) で示した。

B: T-01 単独群と T-01 + 抗 CD274 抗体併用群の腫瘍組織内の gB 特異的 CTL の比率をテトラマーアッセイで解析した。各群の CTL の比率を平均値 \pm SD で表した。2 群間の比較は両側 Student's t-検定 (対応なし) を行った。

C: T-01 単独群と T-01 + 抗 CD274 抗体併用群の T-01 を定量した。それぞれの腫瘍組織での腫瘍 1g あたりのウイルス量を平均値 \pm SD で表した。2 群間の比較は両側 Student's t-検定 (対応なし) を行った。

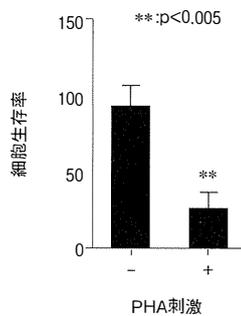


図 9. T-01 の活性化リンパ球への細胞傷害性の確認
 ナイーブマウスの脾臓からリンパ球を単離し、PHA 存在下、または非存在下で培養後、T-01 (1×10^6 PFU) を感染させた。感染 24 時間後に細胞生存率を測定した。T-01 を感染させていない条件での細胞生存率を 100% とした。細胞生存率は、平均値 \pm SD で表した。同一の計測を 4 回行った。2 群間の有意差は両側 Student's t-検定 (対応なし) を用いて解析し、有意差はアスタリスク (** $p < 0.005$) で示した。

胞に対する細胞傷害性はないが、活性化リンパ球に対する殺細胞効果は検証されていない。また抗 CD274 抗体単独群と比較し、T-01 + 抗 CD274 抗体併用群で E7 特異的 CTL が低い値を示したことは (図 7A)、T-01 による腫瘍浸潤 CTL を殺傷している可能性が考えられた。そこで、ナイーブマウスの脾臓から分取したリンパ球を用い PHA 刺激の有無での T-01 の細胞傷害性を検討した。PHA 非刺激のリンパ球に対し T-01 は細胞傷害作用を有しないが、PHA 刺激を行ったリンパ球では PHA 非刺激のリンパ球と比較して有意に細胞生存率が減少していた (図 9)。

IV. 考 察

我々は進行子宮頸がんの新たな治療法を開発するため、実験動物を用い検討した。マウスでの抗腫瘍効果は、一般に背部または側腹部の

1カ所に腫瘍細胞を移入し、担がんマウスを作製し解析する^{20-22, 47, 48)}。本研究では2カ所に腫瘍細胞を移入したモデルを作製し、そのうちの1カ所にT-01を接種し、他方への抗腫瘍効果を確認した。TC-1を背部に1カ所のみ移入した子宮頸がんモデルマウスでは、移入後28日目の腫瘍体積は $582.7 \pm 396.8\text{mm}^3$ で生存率は78.6%であったのに対し²⁰⁾、本研究で用いた背部2カ所にT-01を移入した子宮頸がんモデルマウスでは、移入後28日までに全マウスが死亡し、25日目で生存していたマウスの平均腫瘍体積は $966.1 \pm 237.2\text{mm}^3$ (図4)であった。即ち、本研究で用いた子宮頸がんモデルマウスは、これまでのモデルマウスと比して腫瘍増大の進行が早いモデルマウスであり、1カ所にTC-1を移入したこれまでのモデルマウスでの治療効果と一概に比較できないと考えられた。

ヒト子宮頸部上皮内腫瘍(子宮頸部異形成)に浸潤したCTLは病態の進行を抑制し⁴⁹⁾、また、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あることが報告されている^{50, 51)}。これらのことからヒト子宮頸がんでの腫瘍免疫の関与が示唆されている。本研究で作製した子宮頸がんモデルマウスでも腫瘍内に浸潤した $\text{CD}8^+$ リンパ球の存在がフローサイトメトリーにより確認されたが、腫瘍の増大とともに腫瘍浸潤 $\text{CD}8^+$ リンパ球の存在比は減少し(図1B)、腫瘍内総細胞数と腫瘍浸潤 $\text{CD}8^+$ リンパ球には有意な負の相関が認められた(図1C)。これらの結果は、腫瘍の増大にCTLが関与することが示唆された。また、腫瘍組織におけるCTLの減少は免疫チェックポイント機構が関与していることが明らかになっており、腫瘍細胞-T細胞間および抗原提示細胞-T細胞間で共刺激分子の相互作用によりT細胞機能の減弱が起こる³²⁾。そこで、本モデルでも免疫チェックポイント機構を解明するために共刺激分子の探索を行った。

TC-1は $\text{CD}80$ 、 $\text{CD}274$ が陽性であり、樹状

細胞では、TC-1移入後 $\text{CD}80$ が急激に減少した一方で、 $\text{CD}274$ の発現比率は保たれた。そのため $\text{CD}274$ が標的分子候補と考えられた。 $\text{CD}274$ は活性化T細胞に発現する $\text{CD}279$ のリガンドであり、T細胞表面における $\text{CD}279$ の発現も併せて解析したところ、腫瘍内および脾臓内のT細胞で $\text{CD}279$ 陽性T細胞が確認された。これらのことから、 $\text{CD}274$ と $\text{CD}279$ の相互作用により腫瘍組織におけるCTLの減弱が示唆され、この相互作用を遮断するには抗 $\text{CD}274$ 抗体または抗 $\text{CD}279$ 抗体の投与が考えられた。活性化T細胞上の $\text{CD}279$ は $\text{CD}273$ および $\text{CD}274$ と結合し、いずれの分子と結合してもT細胞に抑制性シグナルが伝達される⁴⁴⁾。一方、 $\text{CD}274$ は $\text{CD}279$ および $\text{CD}80$ と結合する。 $\text{CD}80$ は抗原提示細胞に発現し、T細胞に発現する $\text{CD}28$ および $\text{CD}152$ と結合するが⁵³⁻⁵⁶⁾、活性化T細胞にも発現する⁵⁷⁻⁵⁹⁾。活性化T細胞に発現する $\text{CD}80$ は $\text{CD}274$ と結合しT細胞機能の抑制に関与することが知られている^{60, 61)}。即ち、抗 $\text{CD}274$ 抗体と抗 $\text{CD}279$ 抗体では遮断できるシグナルは完全には一致しない。ヒトにおいて正常子宮頸部上皮細胞では $\text{CD}274$ は発現されないが子宮頸がん患者の23~51%の症例で腫瘍細胞に $\text{CD}274$ が発現している^{62, 63)}。リンパ節転移を認めた子宮頸がん患者の症例では、リンパ節中のT細胞での $\text{CD}279$ の発現が有意に増加する⁶⁴⁾。また、抗 $\text{CD}274$ 抗体と抗 $\text{CD}279$ 抗体は肺がんの免疫チェックポイント阻害薬として臨床試験が既に行われており、抗 $\text{CD}279$ 抗体では副作用として間質性肺炎の発生が報告されているが⁶⁵⁾、抗 $\text{CD}274$ 抗体では間質性肺炎の報告は極めて少ない⁶⁶⁾。本モデルマウスでTC-1に $\text{CD}273$ の発現が認められないこと(図2A)と、肺がんに対する臨床試験における副作用発生頻度から、本研究において $\text{CD}274$ を免疫チェックポイント阻害の標的分子とし、T-01と抗 $\text{CD}274$ 抗体の併用療法の可能性を検討し

た。抗 CD274 抗体は TC-1 細胞に直接細胞傷害性を示さず (図 3), またモデルマウスへの投与によって腫瘍増大抑制効果を示しており (図 4), 抗 CD274 抗体の有効性は確認された。

これまでの TC-1 を背部に 1ヶ所移入した子宮頸がんモデルマウス²⁰⁾では明らかになっていなかった知見として, T-01 非接種側腫瘍 (右側腫瘍) の腫瘍体積の増大が T-01 で抑制できなかったことがある。T-01 単独群の T-01 接種側腫瘍 (左側腫瘍) はこれまでの研究²⁰⁾と同様, PBS 群と比較して有意に腫瘍体積増大が抑制されていたが ($p < 0.0001$), T-01 非接種側腫瘍では T-01 単独群と PBS 群で腫瘍体積に有意差は認められなかった ($p = 0.9867$)。即ち, 本モデルマウスにおいて T-01 は接種を行った腫瘍には腫瘍体積増大抑制効果があるが, 遠隔の腫瘍に対してはほとんど有効ではないということになる。その理由の 1つとして, T-01 非接種側腫瘍では T-01 は分離されなかったことが挙げられ (図 6A), T-01 は接種した腫瘍から遠隔の腫瘍へ移行せず, 移行先の腫瘍で腫瘍溶解を起こすことはないと考えられた。さらに 2つ目の理由として, T-01 の接種により gB 特異的 CTL が誘導されることが挙げられる (図 6B)。T-01 単独群の T-01 非接種側腫瘍では, gB 特異的 CTL が 22.8% 存在していた。CTL の腫瘍組織への浸潤の可否は, 一般的に CTL に発現する接着分子やケモカインレセプターと腫瘍組織内の血管内皮細胞に発現する接着分子及び血管内皮細胞または腫瘍細胞から産生されるケモカインの組み合わせで決まる⁶⁷⁾。つまり, T-01 が接着分子やケモカインの発現に関与していなければ, 腫瘍組織内に T-01 が存在するかどうかには関わりなく CTL は腫瘍組織に浸潤する。T-01 に対する gB 特異的 CTL は T-01 接種側の腫瘍だけでなく標的細胞のない遠隔の腫瘍にも浸潤してしまい, 腫瘍細胞に対する CTL の腫瘍組織内比率を減少させ, 抗腫瘍効果が減弱すると考えられた。

実際に, TC-1 移入後 11 日目の腫瘍組織中の CTL で計算を行った。接種側腫瘍において E7 特異的 CTL の標的細胞は TC-1 であり, gB 特異的 CTL の標的細胞は T-01 感染細胞である。両 CTL の存在比を各個体で合計すると, 平均で 81.2% となる。非接種側腫瘍は T-01 が検出されず (図 6A), gB 特異的 CTL の標的細胞は存在しないと考えられた。非接種側腫瘍では標的細胞を有する CTL は E7 特異的 CTL のみで, その存在比は 43.8% であった。両腫瘍で標的細胞の存在する CTL を比較すると, 非接種側腫瘍で有意に ($p < 0.005$) CTL の存在比は低かった。しかし, 2ヶ所に腫瘍細胞を移入し片側に腫瘍溶解性ウイルスを接種したモデルで, 両側の腫瘍に抗腫瘍効果が得られた報告もあり⁶⁸⁾, 遠隔の腫瘍に対しては更なる研究が必要である。

さらに検討を行った 5つの群での腫瘍体積および生存率から, まず T-01 単独群と T-01 + 抗 CD274 抗体併用群について比較すると, T-01 単独群よりも T-01 + 抗 CD274 抗体併用群で有意な腫瘍増大抑制効果が認められた (図 5A 左, 図 5B 左)。E7 特異的 CTL の解析では, T-01 単独群と比較して約 2 倍の比率の CTL が T-01 + 抗 CD274 抗体併用群の腫瘍組織内に存在しており (図 8A), 抗 CD274 抗体による効果が現れた結果と考えられた。一方, T-01 + 抗 CD274 抗体併用群と抗 CD274 抗体単独群では有意差は認められなかった (図 5A 中右, 図 5B 中右)。T-01 + 抗 CD274 抗体併用群と抗 CD274 抗体単独群の腫瘍体積をさらに詳細に解析すると, T-01 接種側腫瘍の腫瘍体積に 2 群間で殆ど差がないのに対し ($p = 0.887$), TC-1 移入後 30 日目の非接種側腫瘍の平均腫瘍体積は, 抗 CD274 抗体単独群で T-01 + 抗 CD274 抗体併用群の 3分の2程度であり, 遠隔の腫瘍に対する効果の違いが大きかった。これまでの結果から, 抗 CD274 抗体は E7 特異的 CTL の免疫チェックポイントを阻害するの

みならず, gB 特異的 CTL に対する免疫チェックポイントも阻害し, gB 特異的 CTL が維持されたと考えられた. T-01 + 抗 CD274 抗体併用群では gB 特異的 CTL が腫瘍組織内に高頻度で存在し, T-01 が感染しても T-01 感染細胞が gB 特異的 CTL により排除される. 免疫チェックポイント阻害剤が HSV 感染細胞に対する CTL を増加させる報告⁶⁹⁾はこれまでもあり, また免疫抑制剤であるシクロスポリンは腫瘍溶解性 HSV の免疫による排除を抑制し, HSV による抗腫瘍効果を高めることも報告⁷⁰⁾されている. 即ち, T-01 + 抗 CD274 抗体併用群では抗 CD274 抗体が T-01 の抗腫瘍効果を減弱していると考えられた. さらに, T-01 + 抗 CD274 抗体併用群と抗 CD274 抗体単独群の腫瘍組織中の E7 特異的 CTL の比率は併用群の方が低かった. T-01 は PHA で幼弱化したリンパ球に対しても細胞傷害性があることが明らかになったことにより, 腫瘍内に存在する CTL のような活性化リンパ球が T-01 により直接破壊されていることが原因である可能性が示唆された. この点に関しては, 実際に腫瘍組織に浸潤した CTL に対する T-01 の細胞傷害性を今後解析する必要があるが, T-01 により E7 特異的 CTL が傷害され, T-01 + 抗 CD274 抗体併用群では T-01 が抗 CD274 抗体により維持された E7 特異的 CTL の抗腫瘍効果を減弱していると考えられた. このように T-01 + 抗 CD274 抗体併用群においては, T-01 と抗 CD274 抗体の作用が拮抗している可能性が推察された.

腫瘍溶解性ウイルスと免疫チェックポイント阻害剤の併用の報告はまだ少ないが, 腫瘍溶

解性ウイルスとしてリコンビナントワクシニアウイルスと免疫チェックポイント阻害剤として抗 CD152 抗体を同時接種した場合にそれぞれの抗腫瘍効果が拮抗するという報告がある⁷¹⁾. この研究では, 抗 CD152 抗体によりウイルスに対する免疫が過剰になり, ウイルスを排除する結果となった. しかしながら, 腫瘍組織内のウイルス量が減少してから抗 CD152 抗体を投与することで腫瘍体積増大と生存率ともに改善し, それぞれの投与時期が非常に重要であると結論づけている. 本研究では, T-01 と抗 CD274 抗体の効果が拮抗する結果となったが, 腫瘍溶解ウイルスと免疫チェックポイント阻害剤併用療法は, プロトコルの改良により更なる改善の余地があると考えられ, 今後の詳細な研究により新規治療法となり得る可能性があると思われた.

稿を終えるにあたり 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. 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.

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) 人口動態統計 2014 年 (厚生労働省大臣官房統計情報部編)
- 3) Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, et al.: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci USA **80**, 3812-3815, 1983.
- 4) Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, et al.:

- Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 560-563, 1983.
- 5) **Asiaf A, Ahmad ST, Mohammad SO, et al.**: Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *Eur J Cancer Prev* **23**, 206-224, 2014.
 - 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) **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.
 - 8) **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.
 - 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) **Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, et al.**: Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* **340**, 1144-1153, 1999.
 - 11) **Ann HK and Patricia JE**: Chemoradiotherapy for Cervical Cancer in 2010. *Curr Oncol Rep* **13**, 77-85, 2011.
 - 12) **Nemunaitis J**: Oncolytic viruses. *Invest New Drugs* **17**, 375-386, 1999.
 - 13) **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, 1996.
 - 14) **Hiroshi F and Todo T**: Oncolytic herpes simplex virus type 1 and host immune responses. *Curr Cancer Drug Targets* **7**, 149-155, 2007.
 - 15) **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.
 - 16) **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.
 - 17) **Forsyth P, Gloria R, David G, et al.**: A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Molecular Therapy* **16**, 627-632, 2007.
 - 18) **Heo J, Reid T, Ruo L, et al.**: Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nature Med* **19**, 329-336, 2013.
 - 19) **Pol J, Bloy N, Obrist F, et al.**: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* **3**, e28694, 2014.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) **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.
 - 23) **Chou J and Roizman B**: The γ_1 34.5 gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3266-3270, 1992.
 - 24) **Goldstein DJ and Weller SK**: Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *J Virol* **62**, 196-205, 1988.
 - 25) **Martuza RL**: Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. *J Clin Invest* **105**, 841-846, 2000.
 - 26) **Mavromara-Nazos P, Ackermann M and Roizman B**: Construction and properties of

- a viable herpes simplex virus 1 recombinant lacking coding sequences of the α 47 gene. *J Virol* **60**, 807-812, 1986.
- 27) **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.
- 28) **Couzin FJ**: Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* **342**, 1432-1433, 2013.
- 29) **Hanahan D and Weinberg RA**: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, 2011.
- 30) **Krummel MF and Allison JP**: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* **182**, 459-465, 1995.
- 31) **Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al.**: CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**, 405-413, 1994.
- 32) **Hodi FS**: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4. *Clin Cancer Res* **13**, 5238-5242, 2007.
- 33) **Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, et al.**: Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4712-4717, 2003.
- 34) **Maker AV, Phan GQ, Attia P, et al.**: Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* **12**, 1005-1016, 2005.
- 35) **McDermott D, Haanen J, Chen TT, et al.**: MDX010-20 Investigators. Efficacy and safety of ipilimumab in metastatic melanoma patients surviving more than 2 years following treatment in a phase III trial (MDX010-20). *Ann Oncol* **24**, 2694-2698, 2013.
- 36) **Buqué A, Bloy N, Aranda F, et al.**: Trial Watch: Immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications. *Oncoimmunology* **4**, e1008814, 2015.
- 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) **Eberle R and Courtney RJ**: gA and gB glycoproteins of herpes simplex virus type 1: two forms of a single polypeptide. *J Virol* **36**, 665-675, 1980.
- 39) **Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al.**: Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-96, 1996.
- 40) **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.
- 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) **Sharpe AH and Freeman GJ**: The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**, 116-126, 2002.
- 43) **Tseng CW, Monie A, Trimble C, et al.**: Combination of treatment with death receptor 5-specific antibody with therapeutic HPV DNA vaccination generates enhanced therapeutic anti-tumor effects. *Vaccine* **26**, 4314-4319, 2008.
- 44) **Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al.**: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* **2**, 261-268, 2001.
- 45) **Wagner MJ and Summers WC**: Structure of the joint region and the termini of the DNA of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **27**, 374-387, 1978.
- 46) **Ito M, Koide W, Watanabe M, et al.**: Apoptosis of cord blood T lymphocytes by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78**, 1971-1975, 1997.
- 47) **Ito M, Watanabe M, Kamiya H, et al.**: Herpes simplex virus type 1 induces apoptosis in peripheral blood T lymphocytes. *J Infect Dis* **175**, 1220-1224, 1997.
- 48) **Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, et al.**: An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. *Int J Cancer* **132**, 485-494, 2013.
- 49) **Liu TC, Zhang T, Fukuhara H, et al.**: Dominant-negative fibroblast growth factor receptor expression enhances antitumoral potency of oncolytic herpes simplex virus in neural tumors. *Clin Cancer Res* **12**, 6791-6799, 2006.
- 50) **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.
- 51) **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.
- 52) **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.
 - 53) **Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, et al.:** Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* **262**, 905-907, 1993.
 - 54) **Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, et al.:** Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11054-11058, 1993.
 - 55) **Damle NK, Klussman K, Linsley PS, et al.:** Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* **148**, 1985-1992, 1992.
 - 56) **Norton SD, Zuckerman L, Urdahl KB, et al.:** The CD28 ligand, B7, enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. *J Immunol* **149**, 1556-1561, 1992.
 - 57) **Podojil JR, Kohm AP and Miller SD:** CD4+ T cell expressed CD80 regulates central nervous system effector function and survival during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**, 2948-2958, 2006.
 - 58) **Nikoloff BJ, Nestle FO, Zheng XG, et al.:** T lymphocytes in skin lesions of psoriasis and mycosis fungoides express B7-1: a ligand for CD28. *Blood* **83**, 2580-2586, 1994.
 - 59) **Taylor PA, Lees CJ, Fournier S, et al.:** B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions. *J Immunol* **172**, 34-39, 2004.
 - 60) **Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al.:** Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**, 111-122, 2007.
 - 61) **Paterson AM, Brown KE, Keir ME, et al.:** The programmed death-1 ligand 1:B7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells *in vivo*. *J Immunol* **187**, 1097-1105, 2011.
 - 62) **Mezache L, Paniccia B, Nyinawabera A, et al.:** Enhanced expression of PD L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers. *Mod Pathol* **1**, 1594-1602, 2015.
 - 63) **Karim R, Jordanova ES, Piersma SJ, et al.:** Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res* **15**, 6341-6347, 2009.
 - 64) **Heeren AM, Koster BD, Samuels S, et al.:** High and interrelated rates of PD-L1+CD14+ antigen-presenting cells and regulatory T cells mark the microenvironment of metastatic lymph nodes from patients with cervical cancer. *Cancer Immunol Res* **3**, 48-58, 2015.
 - 65) **Suzanne LT, Hodi FT, Brahmer JR, et al.:** Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**, 2443-2454, 2012.
 - 66) **Julie RB, Tykodi SS, Chow LQM, et al.:** Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* **366**, 2455-2465, 2012.
 - 67) **Alexandroff AB, McIntyre CA, Porter JC, et al.:** Sticky and smelly issues: lessons on tumour cell and leucocyte trafficking, gene and immunotherapy of cancer. *Br J Cancer* **77**, 1806-1811, 1998.
 - 68) **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.
 - 69) **Channappanavar R, Twardy BS and Suvas S:** Blocking of PDL-1 interaction enhances primary and secondary CD8 T cell response to herpes simplex virus-1 infection. *PLoS One* **7**, e39757, 2012.
 - 70) **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.
 - 71) **Juan JR, Padma S and Weizhou H:** Defining effective combinations of immune checkpoint blockade and oncolytic virotherapy. *Clin Cancer Res* **10**, 1078-2013, 2015.

A study of combination therapy that
oncolytic virus and immune checkpoint inhibitor for
cervical cancer model mice

Kazuyuki MURAKAMI¹⁾, Masahiro KAGABU¹⁾, Yutaka SASAKI²⁾,
Hanae KAWAMURA¹⁾, Hideki KAWAMURA¹⁾,
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

(Received on December 7, 2015 & Accepted on December 27, 2015)

Abstract

Since the advanced stage of cervical cancer is very difficult to treat, a novel therapy is required. We attempted to develop a combination therapy with oncolytic virus and immune checkpoint (ICP) inhibitor. We employed well-defined cervical cancer model mice bearing human papillomavirus E6/E7-expressing TC-1 tumor cells. We assessed the antitumor effects of T-01 as an oncolytic virus and anti-CD274 antibody as an ICP inhibitor. Comparing T-01 monotherapy with the combination regimen, the increase in tumor size in mice treated with the combination regimen was significantly suppressed. However, antitumor effects of anti-CD274 antibody monotherapy were slightly greater than those of the combination

regimen. To evaluate the antitumor effects in each regimen, we analyzed anti-tumor immunity in the mice. The highest frequency of E7-specific cytotoxic lymphocytes (CTL) in the tumor was observed in mice given the anti-CD274 antibody monotherapy, indicating that anti-CD274 antibody performed as an ICP inhibitor in the mice. We considered that the combination of oncolytic virus and ICP inhibitor might have antagonistic effects. However, each therapy showed potent antitumor activity in our study. We proposed herein that a sequential regimen of oncolytic virus and ICP inhibitor would be a novel combination therapy for cervical cancer.
