

(甲種)

論 文 要 旨

学 位 論 文

表 題 頭頸部悪性腫瘍に対する G47Δ 療法

申 請 者 氏 名 井上 公介

担当指導教員氏名 森 良之

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
消化器疾患学
歯科口腔外科

使用文字数 28890 字

論文要旨

氏名 井上 公介

表題

頭頸部悪性腫瘍に対する G47Δ 療法

1 研究目的

頭頸部悪性腫瘍に対する現行治療の第一選択は外科的切除であるが、昨今腫瘍細胞のみで複製する遺伝子組換えウイルスを用いて腫瘍の治療をはかる、ウイルス療法が注目されている。本研究では、より安全性と抗腫瘍免疫の惹起が増強された、第三世代がん治療用 HSV-1 (G47Δ) の抗腫瘍効果を検討し、新たな治療の選択肢としての可能性を模索することを目的とした。

2 研究方法

各種頭頸部癌細胞株を用いて、*in vitro* にて G47Δ の殺細胞効果および複製能を調査した。*In vivo* にて同系マウス皮下腫瘍モデルおよび舌腫瘍モデルを確立し、G47Δ の抗腫瘍効果を検証した。ネオアジュバント G47Δ 療法では免疫正常マウス舌腫瘍モデル (SCCVII) に対して day 0 に mock, G47Δ を投与、day 3 に腫瘍切除を行い、生存日数・腫瘍体積・体重推移について調査した。G47Δ 投与に伴う免疫誘導について検討するため、マウス舌腫瘍モデルを用いてフローサイトメトリーによる腫瘍内浸潤リンパ球の解析、IHC による残存舌の免疫組織学的評価を行った。また RNA-seq により腫瘍微小環境における発現遺伝子の網羅的解析を行った。

3 研究成果

In vitro, in vivo において G47Δ 単独での抗腫瘍効果を確認した。ネオアジュバント G47Δ 療法では局所再発および所属リンパ節転移が抑制され、生存率が有意に向上した。腫瘍内、微小残存腫瘍に対する免疫細胞の解析により、G47Δ 投与による抗腫瘍免疫の惹起を確認した。また腫瘍微小環境における発現遺伝子の網羅的解析で、G47Δ 投与により免疫関連遺伝子の upregulation があったことが把握できた。

4 考察

免疫正常マウス舌腫瘍モデルにおいて、G47Δ を事前に投与しておくことで切除に至るまでの期間における腫瘍増大および頸部リンパ節転移の抑制を図ることでき、抗腫瘍免疫の惹起により腫瘍切除後における局所再発を抑制することで、生存率が向上することが示唆された。ネオアジュバント G47Δ 療法を施行した群では、腫瘍切除マージンが不十分だとしても局所再発が起きず、局所進行癌に対して軟組織再建が必要となるような切除（舌全摘等）が通常必要となるような症例においても部分切除術に抑えることができ、術後 QOL の向上がはかれるという点で非常に意義のある結果であったと考えられる。腫瘍内、微小残存腫瘍に対する免疫細胞の解析により、G47Δ 投与による抗腫瘍免疫の惹起を確認したが、腫瘍細胞上に発現する CD39 が responder 群において高発現しており、免疫誘導が腫瘍特異的に行われていた事も確認できた。また CD8 上に発現する PD-1 が G47Δ 投与群、特に no responder 群で upregulate されたおり、現在臨床で二次治療として使用されている抗 PD-1 抗体に G47Δ を併用する事で更なる治療効果がはかれると予想されたが、結果的

には併用による治療効果の向上は認めなかった。これは現状における臨床モデルを再現した実験系の構築が困難であったため、より正確な評価ができなかったことが要因の一つとして考えられるため、より適した実験系の構築を今後の課題とした。腫瘍微小環境における発現遺伝子の網羅的解析では、まず PC analysis により responder 群における遺伝子組成が mock, no responder 群と異なっており、G47Δ 投与のみ行った群と何も投与しなかった群における遺伝子組成が同様であったことを確認した後、responder 群および mock 群の differentially expressed genes (DEGs) を抽出したところ、responder 群において全体的な発現量は低いものの、より有意に発現していたものとして、Trav12-3、Ctsg といった免疫応答や抗原提示に関連する遺伝子等があり、これらより有意差は劣るが全体的な発現が大きかったものとして、Cxcl9 といった T cell のリクルートと活性化メディエーターとして機能するケモカイン関連遺伝子等があった。Ctsg は、腫瘍の増大や転移等と関連があるとされる MMP9 と相互に拮抗することで、口腔扁平上皮癌において腫瘍形成を阻害する能力をもち、将来的に免疫関連バイオマーカーとなり得ることが報告されている。DEGs の特徴をより包括的に把握するため、任意の条件で抽出した遺伝子群に付与された gene ontology term (GO term) の組成をゲノム全体の GO term の組成と比較した際に、特定の GO term がエンリッチされているかを統計的に検定する GO エンリッチメント解析を行ったところ、responder 群において interferon-beta および interferon-gamma に対する反応、natural killer cell による殺細胞効果、adaptive immune response、T cell の拡散および共刺激や TCR のシグナルに関連する GO terms が有意にエンリッチされていた。また、Ingenuity Pathway Analysis により、STAT3 signaling pathway が responder 群において no responder 群との比較でより高位であることが判明したが、これは腫瘍溶解性 HSV-1 の複製に関わるという報告があり、腫瘍微小環境における G47Δ の複製能が抗腫瘍効果を発揮する上で肝要であるということが裏付けられた。

経過観察や導入のしやすさという観点から、本研究ではマウス舌腫瘍モデルを中心に実験を行ったが、顎骨浸潤癌、口底部癌など他の部位における G47Δ の治療効果についても、今後必要となると考えられる。ネオアジュバント G47Δ 療法の治療効果については、死亡に瀕したマウスの舌腫瘍や頸部リンパ節、肺に対する評価をより詳細に行うことで、死因についての考察を深めることが必要であり、同様に腫瘍内・頸部リンパ節内における免疫細胞の経日的動態解析をより綿密に行っていくことが、実際に G47Δ が頭頸部癌領域において臨床応用される段階で肝要となると考えられる。また細胞株を用いた同所モデルの作成だけでなく、トランスジェニックマウスを用いた実験も今後環境次第で行っていきたく強く感じた。G47Δ の臨床試験に関しては、頭頸部癌領域ではまだ行われていないが、近い将来導入される可能性は高いと考えられるため、大学院で学んだ経験を生かせる形で携わっていきたく考える。

5 結論

本研究では、第三世代がん治療 HSV-1 の G47Δ を用いた頭頸部癌に対する新規治療法の可能性を模索した。G47Δ は、*in vitro* において頭頸部癌細胞株に対する感染性、複製能、殺細胞効果を示し、*in vivo* において舌腫瘍モデルに対して単独で良好な抗腫瘍効果を示した。また G47Δ をネオアジュバント療法として用いることで、直接的な抗腫瘍効果と宿主抗腫瘍免疫の惹起能によりステージ進行の抑制および十分な切除マージンを確保できなくとも局所再発を防げることが示された。以上より、G47Δ は単独で頭頸部癌領域の新規治療として有効であり、特に舌癌に対するネオアジュバント療法の新たな選択肢として、臨床応用される可能性が高いと考えられる。