

氏 名	井 上 公 介
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 719 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	頭頸部悪性腫瘍に対する G47Δ 療法
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 西野 宏 (委 員) 教授 水上 浩明 准教授 仲矢 丈雄

論文内容の要旨

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（舌亜全摘等）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いと強く感じた。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いと考える。

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。

論文審査の結果の要旨

がん細胞にウイルスを感染させ悪性腫瘍を死滅させるウイルス療法は 1960 年代から行われてきた。ウイルスの病原性の減弱と抗腫瘍効果の増強を目的に様々な遺伝子改変が行われ、様々な特徴を持ったウイルスが開発されてきた。その一つが本研究に使用された第三世代がん治療用ウイルス Human Simplex Virus-1 G47Δ である。医師主導型臨床試験の結果、G47Δ は脳腫瘍神経膠芽腫に対する認可が得られ実臨床で使用されている。ウイルス療法の機序を考えると他の癌種にも抗腫瘍効果が期待できること及び担がん宿主のがん免疫を活性化させることが考えられる。本研究における G47Δ を用いたウイルス療法は、1：他のがん種のマウス舌癌に対する抗腫瘍効果を *in vitro* と *in vivo* で認めたこと、2：担がん宿主のがん免疫活性亢進の機序の一部を明らかにしたこと、3：舌癌治療における手術後の嚥下障害及び構音障害の軽減に寄与する新たな治療体系の開発に結びつく結果を示したことに学問的意義があると考えられた。

今回 *in vivo* の研究においてマウス舌癌モデルを作製し実臨床に直結する研究を行ったことは新たな知見である。今までの *in vivo* の実験モデルではマウス皮下腫瘍を用いたものであり、実臨床にどのように反映させるかを具体的に示すことが困難であった。舌癌治療は切除手術が主体であるが、手術後の嚥下障害及び構音障害が大きな課題として存在する。導入療法（術前治療）としてウイルス療法を行い腫瘍縮小後に切除範囲を縮小させても治療成績の低下を来さない可能性をマウス舌組織標本を用いて明らかにした。このことは新たな治療体系構築の布石となる。免疫不全ではないマウスを今回使用し担がん宿主免疫能の検討ができたことは今までにないことである。

In vivo の実験においてマウス舌癌に G47Δ を注入する部位が必ずしも一定ではないこと、マウス舌の切除の際にあくまでも肉眼的指標で切除するため切除部位も必ずしも一定ではないことが本研究の限界としてあげられる。この点を明示するように指導した。また論文としての体裁（文体、フォント）を整えるように指導した。その後指摘点は適切に改善され、研究内容は学問的意義、新規性、独創性を備え本学学位論文に値するものとして審査員全員の意見が一致した。

最終試験の結果の要旨

がん細胞にウイルスを感染させ、悪性腫瘍を死滅させるウイルス療法は 1960 年代から行われてきた。ウイルスの病原性の減弱と抗腫瘍効果の増強を目的に様々な遺伝子改変が行われ、様々な特徴を持ったウイルスが開発されてきた。その一つが本研究に使用された第三世代がん治療用ウイルス Human Simplex Virus-1 (HSV-1)G47Δ である。G47Δ は脳腫瘍神経膠芽腫に対する認可が得られ実臨床で使用されている。ウイルス療法の機序を考えると他の癌種にも抗腫瘍効果が期待できること及び担がん宿主のがん免疫を活性化させることが考えられる。本研究では G47Δ を用いたウイルス療法は、1：他のがん種のマウス舌癌に対する抗腫瘍効果を *in vitro* と *in vivo* で認めたこと、2：担がん宿主のがん免疫活性亢進の機序の一部を明らかにしたこと、3：舌癌治療における手術後の嚥下障害及び構音障害の軽減に寄与する新たな治療体系の開発に結びつく結果を示したことに学問的意義があるものと考えられた。特に G47Δ を用いた *in vitro* の研究においてマウス舌癌モデルを作製し、実臨床に直結する研究を行ったことは新たな知見である。以下の内容の発表がなされた。

- 1：ウイルス療法の概念と歴史
- 2：がん治療用ウイルスの課題とその改善点に基づく HSV-1 G47Δ の改良点
- 3：がん治療用ウイルスを用いた国内外の研究結果
- 4：舌癌の疫学と治療成績
- 5：本研究の目的
- 6：実験方法と結果
- 7：今後の発展性

次に主に下記の点に関して質疑応答がされた。

- 1：G47Δ の特徴（改変部位とその目的）に関すること
- 2：がん治療用ウイルスを臨床に使用する際の安全性の担保に関すること
- 3：マウス舌癌モデルにおける G47Δ の注入部位と注入方法に関すること
- 4：マウス舌癌モデルにおける舌切除範囲の決定に関すること

発表における話し方と伝え方に課題が存在した。その点を途中で指摘し改善させた。研究内容は学問的意義、新規性、独創性を備え、質疑応答にも適確に対応ができた。研究者及び医学博士としての資質も兼ね備えており、合格として審査員全員の意見が一致した。