

厚生労働科学研究費補助金
(がん対策推進総合研究事業(革新的がん医療実用化研究事業))
総合研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
(悪性脳腫瘍に対するウイルス療法の開発と臨床製剤製造)

研究分担者・稲生 靖
(東京大学医科学研究所 先端がん治療分野・准教授)

研究要旨

遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) を用いたウイルス療法は、平成21年から東京大学医学部附属病院において、進行性膠芽腫を対象とし臨床研究として実施されている。その実施計画に医科学研究所附属病院を追加する申請を行い、平成25年3月に厚生労働大臣から臨床研究の承認を得た。また、進行性嗅神経芽細胞腫を対象とする臨床研究も承認され、平成26年1月および平成25年9月にそれぞれ患者登録が開始された。一方、医師主導治験の実施に向け、医薬品医療機器総合機構における医薬品薬事戦略相談の準備を進め、複数回の事前面談と品質・安全性・実施計画それぞれについての対面助言を経て、平成26年7月治験計画届を提出した。対象は標準治療後に腫瘍が残存もしくは再発した膠芽腫患者である。ウイルス製剤の製造は医科学研究所治療ベクター開発室にて行った。新ロットの追加製造を行い、海外の専門機関に外部委託して品質試験を実施した。海外の外部委託機関での製剤の製造に関しては、技術移転と工程開発を行った。

A. 研究目的

がん特異的に複製するウイルスをがん細胞に感染させ、ウイルス複製による直接的な殺細胞作用を利用してがんの治癒を図るウイルス療法は、全く新しい概念に基づく治療法であり、遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)は早くから応用が試みられている。本研究で使用するG47Δは、人為的三重変異により高い安全性を保ったまま強い抗がん作用を実現した第三世代がん治療用HSV-1である。G

47Δは第二世代HSV-1 (G207) を更に改良して治療域を広め、安全性を向上させながらG207の約10倍の抗がん作用を示し、また10倍の濃度の製剤の調製を可能にした。G47Δは特異的抗腫瘍免疫を強く惹起するため、がん病変に対する局所治療が全身に転移したがんを制御する可能性がある。G47Δはまた、がん幹細胞を効率よく殺すことが最近判明している。これらは化学療法や放射線治療のいずれにも見られない新しい作用機序であり、実用化されれば、

根治的治療としてがんの治療選択を大きく変えると期待される。本研究は、脳腫瘍の中で最も悪性度が高い膠芽腫を対象とした治験の実施と、最終的な薬事承認を目的とする。

B. 研究方法

研究代表者および分担研究者らは学内のP2対応CPC（治療ベクター開発室）において臨床用G47Δ製剤をcGMPで3ロット製造し、各ロットのGLP品質試験を完了している。First-in-man臨床研究は脳腫瘍の中で最も悪性度が高い膠芽腫の再発患者を対象とし、遺伝子治療指針に則って厚労省の承認を得、平成21年11月より被験者登録を開始した。第I-IIa相の試験デザインとし、主要エンドポイントを安全性の評価としたこの試験はIIa相段階にある。本研究ではG47Δの臨床開発を第II相に発展させ、治験として実施し、GCPで臨床データを蓄積する。主体となる医科研病院は先端医療開発をミッションとし、臨床研究実施のための充実した基盤を有する。膠芽腫に加え、嗅神経芽細胞腫を対象とした臨床研究も開始されている。

（倫理面への配慮）本研究は、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日、平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正、平成26年11月25日一部改正、文部科学省・厚生労働省）、遺伝子組換え実験等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）（平成15年法律第97号）、研究開発等に係る遺伝子組換え実験等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成16年文部科学・環境省令第1号）、および遺伝子組換え生物等の第二種

使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成16年財務・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第1号、一部改正：平成18年6月6日財務・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第2号）を遵守して行われる。東京大学医科学研究所組換えDNA安全委員会よりP2レベルの承認を受けた室にておいてウイルスは取り扱われる。遺伝子組み換え実験は、使用場所の追加に伴う数回の申請と承認を経て、現在は「遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型を用いた腫瘍ウイルス療法 VII」として平成25年10月15日付にて（25受文科振第1912号）大臣確認を受けている。動物を使用する実験については、東京大学動物実験実施規則に従って作成され、審査、承認を受けた動物実験計画（A12-11, PH13-21）に基づいて実施される。また、単純ヘルペスウイルス1型と2型、およびそれに由来する遺伝子組換えウイルスについて、「レベル2微生物取扱等届出書」が平成24年3月27日付で東京大学医科学研究所長に提出されている。医科学研究所におけるウイルス療法臨床研究の実施については、膠芽腫については平成25年3月22日付（厚生労働省発科0322第2号）、嗅神経芽細胞腫については平成25年6月28日付（厚生労働省発科0628第1号）にて、厚生労働大臣の承認を得ている。第一種使用規定については、膠芽腫については平成25年5月13日付にて（厚生労働省発科0513第4号、環自野発第1305131号）、嗅神経芽細胞腫については平成25年8月22日付にて（厚生労働省発科0822第5号、環自野発第1308221号）厚生労働大臣および環境大臣の承認を得ている。臨床研究に関する倫理指針には該当せず、ヒトES細胞を用いる研究にも

該当しない。

C. 研究結果

治験に必要なウイルスを準備するため、医科学研究所治療ベクター開発室を使用してG47Δの調製を実施した。製造物については海外の専門機関に外部委託して品質試験を実施するとともに、研究室における実施項目についての試験を行い、製造記録文書の整備を行った。また、中～大規模製造のための技術開発を進め、培養担体とバイオリクターを使用した細胞培養方法およびウイルス培養についての条件検討と、中規模培養における精製および濃縮の工程の改良を行った。さらに、外部機関（海外）に委託しての製造の技術移転および製造工程の開発を行った。

治験実施のための臨床プロトコールについては、まず東京大学医学部附属病院で実施中の臨床研究に医科学研究所附属病院を追加するとの内容での変更申請を行い、平成25年3月22日付にて厚生労働大臣の承認を得た。治験実施の準備としては、確認申請に必要な資料等に関して医薬品医療機器総合機構の事前面談を受け書類整備を進めていたが、確認申請制度の廃止に伴い治験届のための書類の作成に切り替えた。平成25年5月29日（品質・安全性）と7月2日（実施計画）の事前面談の後、12月18日の再度の事前面談を経て、平成26年1月8日、対面助言申込書を提出した。医薬品医療機器総合機構からの照会事項の受領とそれに対する回答の提出、および機構意見の受領とそれに対する回答の提出を経て、平成26年2月20日（品質・安全性）と2月21日（実施計画）の2日にわたり、対面助言を受けた。その後、

平成26年6月10日の事前面談（フォローアップ面談）を経て、平成26年7月30日付にて治験計画届を提出した。30日調査における機構の照会事項受領とそれに対する回答の提出を経て、平成26年8月29日、治験計画届は受理された。GCPでの治験実施体制をとすべく諸手順書を整備確定し、また、モニタリング、データマネジメント、CRC業務、治験事務局業務補助、および監査に関して外部CROに委託した。平成26年12月報道発表を行い、被験者募集を開始した。なお、第一種使用規定については、平成25年5月13日付（厚生労働省発科0513第4号、環自野発第1305131号）を使用しつつ新たな内容での申請を行い、平成26年11月5日付（厚生労働省発薬食1105第85号、環自野発第1411051号）で承認を得た。

D. 考察

学内施設での製剤調製においては、これまでの三ロットでほぼ一様な規模および濃度のG47Δウイルスが得られており、安定した調製方法であることが示唆された。この製造実績をもとに、対面助言を経てG47Δ臨床製剤の規格を設定した。他方、中規模から大規模製造に向けての新たな製造工程の開発においては、より効率的な条件に向けた検討が必要である。医師主導治験開始のための医薬品医療機器総合機構との折衝においては、ウイルス療法という新しい治療法の実用化にむけ、検討課題の確認と解決に向けての議論が行われた。

治験計画届の提出、30日調査を経て、平成26年8月医師主導治験開始の手続きは完了した。GCPでの治験実施体制の確認および整備ののち、被験者の

募集が開始されている。今後、有害事象の確認と有効性に関する評価が行われる。

E. まとめ (結論)

医薬品医療機器総合機構の薬事戦略相談の複数回の事前面談と対面助言(品質、安全性、実施計画各1回)を経て、医師主導治験「膠芽腫患者を対象とした増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスI型の第II相臨床試験」を開始した。製剤の製造を継続するとともに、中～大規模製造のための技術開発を行ない、関連する非臨床試験について検討を重ねた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H: An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. *Int J Cancer* 132 (2): 485-494, 2013.
- ② Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T: The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32 (33): 3840-3845, 2013.
- ③ Koyama-Nasu R, Haruta R, Nasu-

Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T: The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 33(17): 2236-2244, 2014 (doi: 10.1038/onc.2013.168).

- ④ Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T. PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 444(1): 13-18, 2014 (doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.138).
- ⑤ Takai H, Masuda K, Hiraoka K, Echizen K, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Ogawa H, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, Akiyama T: 5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the methylosome. *Cell Reports* 9(1): 48-60, 2014 (doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.071).
- ⑥ Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MAE, Hayashi Y, Hamada JI, Hirao A. Strong therapeutic potential of γ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high

and CD133-low glioblastoma initiating cells. *J Neurooncol* 121(2): 239-50, 2014 (doi: 10.1007/s11060-014-1630-z).

2. 学会発表

- ① Ino Y, Fukuhara H, Takahashi M, Nakatsubo T, Todo T: Oncolytic HSV-1 virus therapy targeting glioblastoma-derived cancer stem cells. The 19th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Niagara Falls, Canada. June 21-24, 2012.
- ② Nakatsubo T, Fukuhara H, Takahashi M, Ino Y, Todo T: Oncolytic herpes simplex virus type 1 virus therapy targeting cancer stem-like cells. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会（熊本）、2012年6月28-30日。
- ③ 稲生靖、中坪拓也、高橋雅道、福原浩、藤堂具紀：脳腫瘍由来がん幹細胞を標的としたがん治療用HSV-1の開発。第71回日本癌学会学術総会；（札幌）、2012年9月19-21日。
- ④ Todo T, Tanaka M, Ito M, Fukuhara H, Ino Y: Clinical development of a third-generation recombinant oncolytic HSV-1 (G47Δ) for brain tumors and rare cancers. 第19回日本遺伝子治療学会学術集会（岡山）、2013年7月4-6日。
- ⑤ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Todo T: A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using G47Δ, A third generation oncolytic herpes simplex virus type 1. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4-6日。
- ⑥ Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma H, Ino Y, Todo T: Oncolytic virus therapy using recombinant HSV-1 for nonseminoma germ cell tumors. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4-6日。
- ⑦ 藤堂具紀、福原浩、稲生靖：ウイルス療法の臨床開発。第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月3-5日。
- ⑧ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T: Therapeutic efficacy of oncolytic virus G47Δ for oral squamous cell carcinoma in orthotopic tongue cancer models. 第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月3-5日。
- ⑨ Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma H, Ino Y, Todo T: Antitumor efficacy of oncolytic HSV-1 (G47Δ) for testicular cancer. 第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月3-5日。
- ⑩ 田中実、伊藤元一、稲生靖、藤堂具紀：G47Δを用いた嗅神経芽細胞腫の臨床試験。第31回日本脳腫瘍学会学術集会（宮崎）、2013年12月8-10日。
- ⑪ 伊藤元一、稲生靖、田中実、伊藤博崇、藤堂具紀：がん治療用ウイルス(G47Δ)とマイクロRNA阻害を併用した悪性グリオーマ治

- 療の開発。第31回日本脳腫瘍学会学術集会（宮崎）、2013年12月8-10日。
- ⑫ 内橋俊大、中原寛和、古郷幹彦、稲生靖、藤堂具紀：第三世代がん治療用単純ヘルペスウイルス I 型G47Δを用いた口腔扁平上皮癌に対する新規治療戦略。第32回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（札幌）、2014年1月23-24日。
- ⑬ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Kogo M, Todo T: Therapeutic Efficacy of Oncolytic HSV-1 G47Δ for Lymph Node Metastases in Orthotopic Tongue Tumor Models. American Society of Gene & Cell Therapy 17th Annual Meeting, Washington DC, USA. May 21-24, 2014.
- ⑭ Todo T, Tanaka M, Ito M, Ito H, Ino Y: Clinical Trials of a third-generation recombinant oncolytic HSV-1 in recurrent glioblastoma and olfactory neuroblastoma patients. The 20th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Lake Tahoe, CA, USA. July 20-23, 2014.
- ⑮ 福原浩、竹島雄太、本間之夫、稲生靖、藤堂具紀：An ongoing clinical trial of a third-generation oncolytic HSV-1 G47Δ for patients with castration resistant prostate cancer. 第20回日本遺伝子治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
- ⑯ 伊藤博崇、岩井美和子、稲生靖、藤堂具紀：Generation of an oncolytic herpes simplex virus expressing an antibody as a therapeutic molecule. 第20回日本遺伝子治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
- ⑰ 帰山ともみ、稲生靖、福原浩、中坪拓也、岩井美和子、藤堂具紀：Arming oncolytic HSV-1 (G47Δ) with anti-VEGF factors confers additional therapeutic benefits. 第20回日本遺伝子治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
- ⑱ 内橋俊大、中原寛和、稲生靖、福原浩、岩井美和子、古郷幹彦、藤堂具紀：Intratumoral inoculation with oncolytic HSV-1 G47Δ suppresses lymph node metastases in orthotopic tongue cancer models. 第20回日本遺伝子治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
- ⑲ 阿部真也、稲生靖、福原浩、岩井美和子、渡邊聡明、藤堂具紀：Effect of virus therapy for colorectal cancer with genetically engineered herpes simplex virus type 1. 第20回日本遺伝子治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
- ⑳ 谷島翔、稲生靖、福原浩、岩井美和子、瀬戸泰之、藤堂具紀：第3世代癌治療用ヘルペスウイルス，G47Δを用いた食道癌への新しい治療法。第20回日本遺伝子治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
- ㉑ 樋口明子、稲生靖、福原浩、岩井美和子、藤堂具紀：Oncolytic virus therapy for malignant melanoma using interleukin-12 expressing herpes simplex virus type 1

- 第20回日本遺伝子治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
- 22 角谷成紀、福原浩、田口慧、竹島雄太、本間之夫、稲生靖、藤堂具紀：Oncolytic virus therapy using recombinant HSV-1 for non-seminoma germ cell tumors. 第20回日本遺伝子治療学会（東京）、2014年8月6-8日。
- 23 谷島翔、稲生靖、岩井美和子、福原浩、瀬戸泰之、藤堂具紀：第3世代癌治療用ヘルペスウイルス，G47Δを用いた食道癌への新しい治療戦略。第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。
- 24 伊藤博崇、稲生靖、田中実、藤堂具紀：Generation of a therapeutic antibody-expressing oncolytic herpes simplex virus. 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。
- 25 阿部真也、稲生靖、福原浩、岩井美和子、渡邊聡明、藤堂具紀：Therapeutic efficacy of genetically engineered oncolytic herpes simplex virus type 1 (G47Δ) in colorectal cancer. 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。
- 26 坂田義詞、稲生靖、岩井美和子、池田徳彦、藤堂具紀：Oncolytic virus therapy for lung cancers using a third generation oncolytic herpes simplex virus type 1 G47Δ. 第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。
- 27 岩井美和子、稲生靖、内橋俊大、赤津裕一、渡部徹朗、宮園浩平、藤堂具紀：がん幹細胞が豊富な腫瘍に対するTGF-β阻害分子発現型HSV-1の治療効果。第73回日本癌学会学術総会（横浜）、2014年9月25-27日。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(がん対策推進総合研究事業 (革新的がん医療実用化研究事業))
総合 研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
(前立腺癌に対するウイルス療法の開発)

研究分担者・福原 浩
(東京大学医学系研究科 泌尿器科・准教授)

研究要旨

前立腺癌は、局所に限局している場合は手術療法や放射線療法が行われ、比較的予後が良い疾患であるが、ホルモン療法に抵抗性となった場合は有効な治療法がないのが現状である。ホルモン療法抵抗性となつてからの生存期間中央値は12-15ヶ月であり、新たな機序による治療法が期待されている。そのため、今回、ホルモン療法抵抗性前立腺癌に対する臨床研究を計画しており、これは国の承認を受けて行うウイルス療法として前立腺癌に適応される、国内初の臨床研究となる。

A. 研究目的

ホルモン療法を施行したにもかかわらず再燃(再発)した前立腺癌に対して、治療手段は非常に限られており、ホルモン療法に抵抗性となつてからは、生存期間中央値(いわゆる平均余命)が12-15ヶ月とされている。抗癌剤治療が行われることがあるが、対象に高齢者が多いこともあり、そもそも選択されないことも多く。唯一効果があるとされるドセタキセルでも平均2-3ヶ月の延命効果しか認められていない。また、骨髄抑制などの副作用にて消耗して治療中止となる場合も多く見られるのが現状である。前立腺癌は多くの研究がなされている分野でありながら、再燃した際には有効な手だてがないことから、今回臨床研究を開始するウイルス療法のような、全く新しいアプローチによる治療

法開発が待ち望まれている。

G47Aをホルモン療法抵抗性前立腺癌患者に投与することが今回の臨床研究の目的である。

B. 研究方法

前立腺を摘出しておらず、ホルモン療法後に再燃した前立腺癌患者を対象疾患とする。遠隔転移がある場合も含み、抗癌剤ドセタキセル投与の既往は問わない。試験デザインは安全性確認の第I相とする。

経直腸超音波ガイド下に経会陰的(経皮的)に前立腺内に2カ所投与する方法で行い、

3例ずつ3段階で増加(2回投与→3回投与→4回投与、合計9例)する用量増加方法で行う。主目的は安全性の評価で、観察期間を6ヶ月、生

存期間追跡は2年間行うこととする。

C. 研究結果

ウイルス療法は、厳密には遺伝子治療ではないが、今回の実施計画書は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に則って審査を受けている。平成23年8月に東京大学医学部遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を受けたのち、厚生労働省に申請され、平成24年8月7日付で厚生労働大臣の承認を受けた。また、増殖型遺伝子組換えウイルスを使用するため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ法）に則って、第一種使用規程が厚生労働省に同時申請され、厚生労働大臣と環境大臣の承認を受けている。国の承認を受けて行うウイルス療法として前立腺癌に適応されるのは、今回の臨床研究が国内で初めてとなる。

D. 考察

この臨床研究は東京大学医学部附属病院泌尿器科にて平成25年5月より開始され、7症例にウイルス投与が終了している。平成27年度中に残りの2症例も投与終了する予定である。

E. 結論

ホルモン療法抵抗性再燃前立腺癌に対して、増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型G47Δを用いたウイルス療法の臨床研究を東京大学医学部附属病院泌尿器科にて開始している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Miyazaki H, Kume H, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Enomoto Y, Nishimatsu H, Homma Y: Leukopenia as a risk factor for osteonecrosis of the jaw in metastatic prostate cancer receiving zoledronic acid and docetaxel. *BJU Int.* 110, E520-525, 2012.
- ② Nakamura M, Fujimura T, Nagata M, Hosoda C, Suzuki M, Fukuhara H, Enomoto Y, Nishimatsu H, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Association between lower urinary tract symptoms and sexual dysfunction assessed using the core lower urinary tract symptom score and International index of erectile function-5 questionnaires. *Aging Male.* 15, 111-114, 2012.
- ③ Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Nishimatsu H, Fukuhara H, Enomoto Y, Kume H, Ohe K, Matsuda S, Homma Y: Management trends, angioembolization performance and multiorgan injury indicators of renal trauma from Japanese administrative claims database. *Int J Urol.* 19, 559-563, 2012.
- ④ Fujimura T, Kume H, Nishimatsu H, Sugihara T, Nomiya A, Tsurumaki Y, Miyazaki H, Suzuki M, Fukuhara H, Enomoto Y, Homma Y: Assessment of lower

urinary tract symptoms in men by international prostate symptom score and core lower urinary tract symptom score. *BJU Int.* 109, 1512-1516, 2012.

- ⑤ Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y: Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer* 130, 1329-1337, 2012.
- ⑥ Taguchi S, Nakagawa T, Hattori M, Niimi A, Nagata M, Kawai T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Ishikawa A, Kume H, Homma Y: Prognostic Factors for Metastatic Urothelial Carcinoma Undergoing Cisplatin-based Salvage Chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 43, 923-928, 2013.
- ⑦ Nishimatsu H, Suzuki E, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Homma Y: Adrenomedullin and Angiopietin-1 Additively Restore Erectile Function in Diabetic Rats: Comparison with the Combination Therapy of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopietin-1. *J Sex Med.* 10, 1707-1709, 2013.
- ⑧ Yamada D, Nishimatsu H, Kumano S, Hirano Y, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Enomoto Y, Kume H, Homma Y: Reduction of prostate cancer incidence by naftopidil, an α_1 -adrenoceptor antagonist and transforming growth factor- β signaling inhibitor. *Int J Urol.* 20, 1220-1227, 2013.
- ⑨ Taguchi S, Fukuhara H, Kakutani S, Takeshima Y, Miyazaki H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Igawa Y, Kume H, Homma Y: Risk factors for clinical metastasis in men undergoing radical prostatectomy and immediate adjuvant androgen deprivation therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(24):10729-33.
- ⑩ Teshima T, Takahashi S, Nagamoto S, Miyazaki H, Nakagawa T, Fujimura T, Fukuhara H, Kume H, Homma Y: Intrascrotal dedifferentiated leiomyosarcoma originating from dartos muscle. *Case Rep Urol.* 2014, in press.
- ⑪ Kanatani A, Nakagawa T, Kawai T, Naito A, Sato Y, Yoshida K, Nozaki K, Nagata M, Yamada Y, Azuma T, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Adjuvant Chemotherapy Is Possibly Beneficial for Locally Advanced or Node-Positive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2014, in press.
- ⑫ Ito H, Aizawa N, Fujita Y, Suzuki M, Fukuhara H, Homma Y, Kubota Y, Ito M, Andersson KE, Igawa Y: Long-term caloric restriction in rats may prevent

age-related impairment of in vitro bladder function. *J Urol*. 2014, in press.

- ⑬ Kakutani S, Fukuhara H, Taguchi S, Nagata M, Niimi A, Hattori M, Miyazaki H, Fujimura T, Nakagawa T, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Combination of docetaxel, ifosfamide and cisplatin (DIP) as a potential salvage chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2014, in press.
- ⑭ Taguchi S, Fukuhara H, Azuma T, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Ishikawa A, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Ultra-early versus early salvage androgen deprivation therapy for post-prostatectomy biochemical recurrence in pT2-4N0M0 prostate cancer. *BMC Urol*. 14, 81-86, 2014.
- ⑮ Yamada D, Matsushita H, Azuma T, Nakagawa T, Nagata M, Yamada Y, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Kume H, Homma Y, Kakimi K: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as a predictor of the response of metastatic renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitor therapy. *Mol Clin Oncol*. 2, 1023-1027, 2014.
- ⑯ Mukaiyama Y, Suzuki M, Morikawa T, Mori Y, Takeshima Y, Fujimura T, Fukuhara H, Nakagawa T, Nishimatsu H, Kume H, Homma Y: Multiple primary malignant neoplasms of the glottis, renal pelvis, urinary bladder, oral floor, prostate, and esophagus in a Japanese male patient: a case report. *World J Surg Oncol*. 12, 294, 2014.
- ⑰ Aizawa N, Ito H, Sugiyama R, Fujimura T, Suzuki M, Fukuhara H, Homma Y, Igawa Y: Selective inhibitory effect of imidafenacin and 5-hydroxymethyl tolterodine on capsaicin-sensitive C-fibers of the primary bladder mechanosensitive afferent nerves in the rat. *J Urol*. 2014, in press.
- ⑱ Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Matsui H, Fujimura T, Nishimatsu H, Fukuhara H, Kume H, Yu C, Kattan MW, Kiyohide F, Homma Y: Robot-assisted versus other types of radical prostatectomy: population-based safety and cost comparison in Japan, 2012-2013. *Cancer Sci*. 105, 1421-1426, 2014.
- ⑲ Nishimatsu H, Kitamura Y, Yamada D, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nakagawa T, Enomoto Y, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Improvement of symptoms of aging in males by a preparation LEOPIN ROYAL containing aged garlic extract and other five of natural medicines - comparison with traditional herbal medicines (Kampo). *Aging Male*. 17, 112-116, 2014.

- ⑳ Sato YT, Fukuhara H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Nishimatsu H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y: Long-term results of radical prostatectomy with immediate adjuvant androgen deprivation therapy for pT3N0 prostate cancer. *BMC Urol.*14, 13, 2014.
- ㉑ Kamei J, Nishimatsu H, Nakagawa T, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Igawa Y, Kume H, Homma Y: Risk factors for septic shock in acute obstructive pyelonephritis requiring emergency drainage of the upper urinary tract. *Int Urol Nephrol.* 46, 493-497; 2014.
- ㉒ Fujimura T, Yamada Y, Sugihara T, Azuma T, Suzuki M, Fukuhara H, Nakagawa T, Kume H, Igawa Y, Homma Y: Nocturia in men is a chaotic condition dominated by nocturnal polyuria. *Int J Urol.* 2015, in press.
2. 学会発表
- ① Hou J, Takeshima Y, Fukuhara H, Homma Y, Ino Y, Todo T: Oncolytic herpes simplex virus type 1 (HSV-1) armed with IL-12 for treating bladder cancer. 第6回日中泌尿器科会議 (横浜)、2012年4月23日。
- ② Sato YT, Fukuhara H, Hou J, Takeshima Y, Homma Y, Ino Y, Todo T: COMBINATION THERAPY FOR RENAL CELL CANCER USING AN ONCOLYTIC HSV-1 ARMED WITH SOLUBLE B7-1 AND ANTI-CTLA4 ANTIBODY. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会 (熊本)、2012年6月30日。
- ③ 竹島雄太、福原浩、侯劍剛、本間之夫、稲生靖、藤堂具紀: 前立腺癌の増殖速度に非依存的に高い抗腫瘍効果を発揮する新規遺伝子改変型 HSV-1。第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月20日。
- ④ Fukuhara H, Takeshima Y, Hou J, Sato YT, Homma Y, Ino Y, Todo T: Development of novel oncolytic HSV-1 using tumor/tissue specific promoters. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会 (熊本)、2012年6月30日。
- ⑤ 福原浩: ヘルペスウイルスを用いた抗癌ウイルス療法。第100回日本泌尿器科学会 (横浜)、2012年4月23日。
- ⑥ Takeshima Y, Fukuhara H, Hou J, Homma Y, Ino Y, Todo T: NOVEL ONCOLYTIC HSV-1 FOR THE TREATMENT OF PROSTATE CARCINOMA WITH IMPROVED EFFICACY INDEPENDENT OF TUMOR GROWTH RATE. ASGCT, Philadelphia. 2012.5.18.
- ⑦ Yamada D, Nishimatsu H, Teshima S, Kumano S, Hirano Y, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Enomoto Y, Kume H and Homma Y: R Reduction of prostate cancer incidence by naftopidil, an α_1 adrenoceptor antagonist and TGF- β signaling inhibitor. *American Urological*

- Association 2013 Annual Meeting, San Diego, USA. 2013.5.7.
- ⑧ Nishimatsu H, Niimi A, Suzuki E, Nomiya A, Fukuhara H, Fujimura T, Suzuki M, Nakagawa T, Enomoto Y, Kume H, Homma Y: Adrenomedullin and Angiopoietin-1 have an integrated restiration activity on Erectile Function in Diabetic Rats: Comparison with the Combination Therapy with Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin-1. American Urological Association 2013 Annual Meeting, San Diego, USA. 2013.5.7.
- ⑨ Suzuki M, Igawa Y, Fujimura T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Kume H, Koyama Y, Iguchi Y, Saito T, Homma Y: Socioeconomical effect of bladder functional assessment-based optimal prompted voiding care for institutionalized elderly with urinary incontinence in Japan. 43rd Annual Meeting of the ICS 2013, Barcelona, Spain. 2013.8.29.
- ⑩ Kume H, Taguchi S, Nagata M, Nishimatsu H, Enomoto Y, Nakagawa T, Fukuhara H, Fujimura T, Suzuki M, Homma Y. Intermittent docetaxel therapy for castration resistant prostate cancer. 33rd Congress of the Société Internationale d'Urologie, Vancouver, Canada. 2013.9.9.
- ⑪ Taguchi S, Nakagawa T, Hattori M, Niimi A, Nagata M, Kawai T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Ishikawa A, Kume H, Homma Y. Factors impacting survival in patients with metastatic urothelial carcinoma undergoing salvage chemotherapy. 33rd Congress of the Société Internationale d'Urologie, Vancouver, Canada. 2013.9.9.
- ⑫ Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma Y, Ino Y, Todo T: NOVEL ONCOLYTIC HSV-1 FOR NONSEMINOMA GERM CELL TUMOR. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会 (岡山)、2013 年 7 月 5 日。
- ⑬ Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma Y, Ino Y, Todo T. GROWTH INHIBITION OF TESTICULAR CANCER USING ONCOLYTIC HERPES SIMPLEX VIRUS. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2013 年 10 月 4 日。
- ⑭ 藤村哲也、福原浩、久米春喜、新美文彩、野宮明、川合剛人、永田政義、山田大介、鈴木基文、中川徹、西松寛明、榎本裕、本間之夫：限局性前立腺癌に対するロボット支援下根治的前立腺全摘除術。第 101 回日本泌尿器科学会総会 (札幌)、2013 年 4 月 28 日。
- ⑮ 福原浩、藤村哲也、山田幸央、新美文彩、野宮明、竹島雄太、鈴木基文、西松寛明、

久米春喜、本間之夫：限局性前立腺癌に対するロボット支援下根治的前立腺全摘除術。第102回日本泌尿器科学会総会（神戸）、2014年4月25日。

- ⑩ Fukuhara H, Takeshima Y, Homma Y, Ino Y, Todo T: AN ONGOING CLINICAL TRIAL OF A THIRD-GENERATION ONCOLYTIC HSV-1 G47Δ FOR PATIENTS WITH CASTRATION RESISTANT PROSTATE CANCER. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会（東京）、2014年8月6日。

- ⑪ 福原浩、佐藤ゆずり、鈴木基文、藤村哲也、東剛司、中川徹、西松寛明、久米春喜、森川鉄平、深山正久、本間之夫：前立腺全摘除術後即時ホルモン除去療法を施行したpT3N0前立腺癌症例の検討。第52回日本癌治療学会学術総会（横浜）、2014年8月30日。

- ⑫ 福原浩：前立腺癌に対するウイルス療法の試み。NPO法人ドクターズネットワーク研究会。2014年9月13日。

- ⑬ 福原浩：去勢抵抗性前立腺癌の病態と最新治療戦略。東京都病院薬剤師会中央支部勉強会。2014年10月10日。

- ⑭ 福原浩、藤村哲也、山田幸央、新美文彩、竹島雄太、山田雄太、東剛司、中川徹、久米春喜、本間之夫：当院におけるロボット支援腎部分切除術の初期経験。第28回日本泌尿器内視鏡学会総会（福岡）、2014年11月28日。

- ⑮ 福原浩、藤村哲也、宮川仁平、山田幸央、新美文彩、竹島雄太、山田雄太、中川徹、久米春喜、本間之夫：ロボット支援下前立腺全摘除術における下腿接触圧力測定による体位確保の工夫。第28回日本泌尿器内視鏡学会総会（福岡）、2014年11月28日。

- ⑯ 福原浩：前立腺癌に対する私見およびウイルス療法について。第6回Uro-Oncology Meeting、2015年2月2日。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
 (がん対策推進総合研究事業 (革新的がん医療実用化研究事業))
 総合 研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
 (希少・難治がんに対するウイルス療法の開発)

研究分担者・中原 寛和
 (近畿大学医学部附属病院 歯科口腔外科・准教授)

研究要旨

口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されている。本研究では脳腫瘍のような難治性のがんに対して、安全でかつ強い抗腫瘍効果の確認できた単純ヘルペスウイルス1型治療用ウイルス (G47Δ) が、舌癌などの口腔扁平上皮癌の治療に応用し得るかの検討を行った。まず、マウスにおいて舌癌モデルを作成し、皮下または舌に腫瘍を作成し、G47Δの効果を検討した。さらに舌に腫瘍を播種させ、形成した頸部リンパ節転移に対して、G47Δの効果を検討した。結果は本研究で作成した舌腫瘍モデルにおいて、ヌードマウス、免疫コンピテントマウスにおいて、G47Δは舌局所のみならず、リンパ節転移腫瘍においても抗腫瘍効果を発揮した。G47Δはin vitro, in vivoの系においてヒト口腔扁平上皮癌細胞に有効であった。今後、口腔癌のがん治療用ウイルスとして臨床応用可能であるとの結果を得た。

A. 研究目的

近年、ウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変し、癌細胞で選択的に複製するウイルスを癌治療に応用する試みがなされ、特に単純ヘルペスウイルスI型 (HSV-1) は癌治療に適した特徴を有することがわかってきた。治療用の増殖型変異HSV-1は、癌細胞に感染すると複製し、その過程で宿主の癌細胞を死滅させる。複製したウイルスは周囲に散らばって再び癌細胞に感染し、その後複製→細胞

死→感染を繰り返して抗腫瘍効果を現す。一方、正常細胞に感染した治療用ウイルスは複製せず、正常組織には害が生じない。また腫瘍内でのウイルス増殖は、特異的抗腫瘍免疫を誘導する。従って、ウイルス複製による直接的殺細胞効果と、特異的抗腫瘍免疫の惹起により、特定の治療遺伝子の発現なしに癌を治癒させることが可能で、新しい癌治療法として高いポテンシャルを有している。第二世代の増殖型HSV-1 (G207) は二重変異を有

し、脳腫瘍に投与できるよう安全性を重視して世界で初めて臨床用に開発された。本研究代表研究者藤堂によって、治療原理、抗腫瘍効果の機序、他の治療法との併用効果、安全性などが解明された。藤堂らはその開発経験から、G207を改良し、世界で初めて三重変異を有する第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47 Δ)を作製することに成功した。このG47 Δ は、癌細胞におけるウイルス複製能と惹起される抗腫瘍免疫が増強し、安全性を維持しながら抗腫瘍効果が格段に改善した。また高いウイルス濃度が生産できることから実用性が高い。

一方、口腔癌は全癌の数%程度を占めており、手術を中心とした集学的治療が行われており治療の可能な癌の一つになってきた。しかしながら、口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されてきた。さらに、口腔癌の予後因子の一つに頸部リンパ節転移がある。局所は制御できても、リンパ節への転移を制御しなければ、完治は望めない。そこで本研究ではもう一つの目的として、ウイルス療法が転移リンパ節を制御できるかを検討することを目的としている。そのためには有効なモデルが必要である。そして、その効果の検討方法、ウイルスの有効な投与方法の検討が必要になることが予想される。それらを踏まえて本研究では治療用ウイルスを口腔癌に適用し、その実用化に向けた、基礎実験およびマウスモデルを用いた臨床に即した実験を計画した。

B. 研究方法

1) 口腔癌に対するウイルス療法の基礎実験

①培養細胞

アフリカミドリザル腎細胞株Vero、ヒト培養扁平上皮癌細胞としOSC-19、SAS、HSC-3、OSC-4 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入)、マウス扁平上皮癌細胞KLN205、 KLN205-MUC1 (American Type Culture Collection (ATCC)より購入)を用いた。すべての細胞は添付文書により推奨された培地、凍結、継代、維持を行った。

②GFP導入培養細胞

ヒト培養扁平上皮癌細胞OSC-19およびSAS細胞にRetro-XTMQベクターを用いて、GFP (Green fluorescent protein)を導入し、GFP発現ヒト培養扁平上皮癌細胞OSC-19-GFP、SAS-GFPを作製した。培養は親株と同様の培地、凍結、継代、維持を行った。

2) ウイルス複製能

6ウエルプレートにVero細胞を $4.0 \times 10^5/2m$ で1撒き、 $37^\circ C$ で16時間培養した。1%熱非働化FBS添加DPBSにて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 0.02 (8.0×10^3 PFU/0.7ml)のウイルス希釈液を作成した。1%熱非働化FBS添加DPBS 1 mlにてウエルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を0.7ml/ウエルにて1株につき3ウエルずつ感染させ、室温で5分間震盪し、 $37^\circ C$ で1時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非働化FBS添加DMEMを2 ml/ウエル加え、 $34.5^\circ C$ で72時間培養した。ウエルごとに培地と細胞を回収し、ドライアイス・エタノールにて凍結、融解を3回繰り返し、2分間超音波による細胞破碎処理を行い、タイ

ターを測定した。タイター測定は回収されたウエルごとに3枚のプレート、各2ウエルずつをカウントして行い、各株の平均を出した。

3) ウイルス感染能 (entry assay)

24ウエルプレートに細胞 5.0×10^4 /500 μ l/ウエルでまき、37°Cで16時間培養した。1%熱非働化FBS添加DPBSにて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 1.0 で感染させる。感染後6時間で感染をストップさせて、X-gal染色を行って、ウイルスの感染効率を測定した。

4) In vitro におけるウイルスペクターの殺細胞効果

各ウイルスの殺細胞効果について、in vitroにおいては以下のように評価した。細胞間、ウイルス間で比較することができるよう、ウイルス量、感染時間、培養時間などは全て同一条件で行った。6ウエルプレートに細胞を 2.0×10^5 /2mlまき、37°Cで16時間培養した。16時間後に作製したプレートのうち1枚を使用してトリプシン処理にて細胞をはがし、細胞数を測定した。6ウエルの平均細胞数をもとに、1%熱非稼働FBS添加DPBSもてMOI1.0、0.1または0.01の2段階のウイルス希釈系列を作製した。1%熱非稼働FBS添加DPBS 1 mlにて各ウエルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を0.7ml/ウエルにて各濃度3ウエルずつ感染し、室温で5分間震盪し、37°Cで1時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非稼働FBS添加DMEMを2ml/ウエル加え、34.5°Cで培養した。24時間ごと4日間にわたり生存する細胞数を測定し、mock感染群における生存細胞数対する、パーセント表示で評価した。細胞数の測定はCoulter counter (Beckman Coult

er, CA, USA) にて行った。なお、ヒト由来細胞株にはMOI 1.0および0.1を感染して行った。

5) 動物実験

5-6週のBALB/c nu/nu 雌マウス (ヌードマウス) を使用した。マウスは三協ラボサービスから購入し、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。動物実験は「動物愛護および管理に関する法律」を遵守し、東京大学バイオサイエンス委員会による東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った。なお、動物実験使用するウイルスの希釈には全て10%グリセロール添加PBSを使用した。

6) 皮下腫瘍モデルの作製

マウスの左側腹部に、25G針を使用して、DME M溶液50 μ l/マウスにて希釈した細胞を皮下注射し、皮下腫瘍を作製した。ヒト扁平上皮癌細胞を使用した実験ではヌードマウスに細胞数 1.0×10^7 個/50 μ l/匹を、それぞれ皮下注射して皮下腫瘍を作製した。最大腫瘍径が5mm大になったときをday0として実験を行った。週に3回腫瘍を測定し、最大径 \times 短径 \times 厚み (mm^3) で腫瘍体積を算出して評価した。または生存期間を観察して評価した。片側の皮下腫瘍モデルにおいては腫瘍の最大径が24mmに達したとき安楽死させた。

7) 皮下腫瘍モデルにおけるウイルスの腫瘍内投与実験

最大腫瘍径が5mmになったときをday0として、10%グリセロール添加PBS溶液20 μ l/マウスでウイルスを希釈して、30G針を用いてday0およびday3に腫瘍内投与した。

8) 舌がんモデルにおけるG47 Δ 投与実験

SAS-GFP または HSC-3 細胞 1×10^6 個を、

それぞれ 50 μ l の DMEM / F12、MEM に希釈し、ヌードマウス左舌縁部より 26 G 針を用いて舌内へ接種し、舌腫瘍を作成した。同様に、KLN205-MUC1 細胞は 2×10^5 個を 50 μ l の MEM に希釈し、DBA/2 マウスの舌内へ接種した。舌腫瘍内への G47 Δ および mock 投与は、ハミルトンシリンジと 30 G 針を用いて、20 μ l を緩徐に注入した。腫瘍細胞接種時を day 0 とし、以下随時ウイルス投与、処置を行った。

9) 頸部リンパ節へのG47 Δ 投与実験

KLN205-MUC1 舌がんモデルを作成し、day 3 に舌腫瘍を組織鋏で切除した。Day 16および day 21 に、頸部にメスで小切開を加え、両側の頸部リンパ節を明示し、鑷子でリンパ節を把持しながらハミルトンシリンジおよび 30 G 針を用いて、G47 Δ を 2.5×10^6 pfu / 5 μ l ずつ、両側の頸部リンパ節に緩徐にウイルス液を注入した。Mock も同様に両側に 5 μ l ずつ注入した。切開部は、3-0 バイクリルで縫合した。

10) 統計学的解析

統計学的解析はスチューデントt検定および生存期間の解析についてはKaplan-Meier法にて生存曲線を描き、Log-rank検定を行った。統計解析ソフトはエクセル統計2012 (SSRI) を用いた。

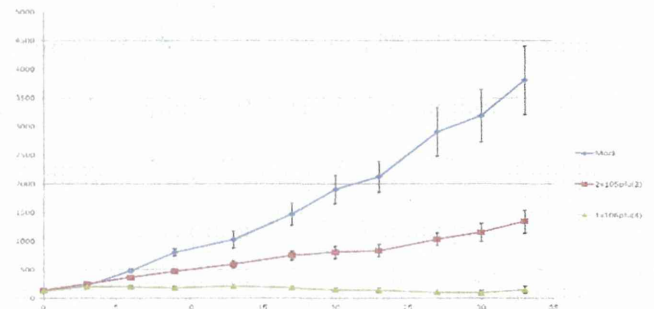
C. 研究結果

ヒト培養扁平上皮癌細胞とし、OSC-19、SAS、HSC-3、OSC-4のG47 Δ ウイルスの殺細胞効果、ウイルス複製能、ウイルス感染効果を検討した結果、殺細胞効果があり、複製能が高く、感染効率 (entry assay) の良好なOSC-19、SAS、HSC-3

を以下の実験に使用した。

G47 Δ の扁平上皮癌細胞のヌードマウス皮下モデルでの結果はin vivoにおいてもG47 Δ は十分な殺細胞効果が認められた (図1)。

(図1) G47 Δ のSAS皮下腫瘍への殺細胞効果



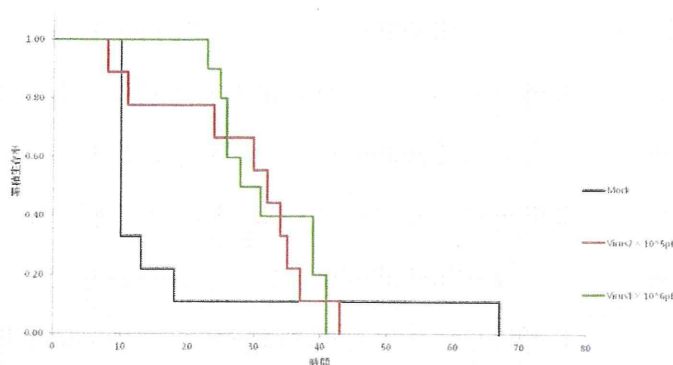
青：コントロール、赤：G47 Δ 2.0 \times 10⁵pfu、
緑：G47 Δ 1.0 \times 10⁶pfu投与。

同様の効果はOSC-19細胞でも得られた(結果省略)。さらにGFPを導入したOSC-19-GFP、SAS-GFPにおいて舌に投与し、顎下リンパ節に転移するかを検討したところ、両細胞とも、有意に顎下リンパ節への転移をGFP発現によって確認できた (図2)。G47 Δ の扁平上皮癌細胞OSC-19のヌードマウス舌腫瘍モデルでの結果はin vivoにおいてもG47 Δ は十分な殺細胞効果が認められた (図3)。

(図2) 顎下線にGFPの発現を認め、顎下リンパ節への転移を確認



(図3) G47ΔのOSC-19-GFP舌投与への殺細胞効果



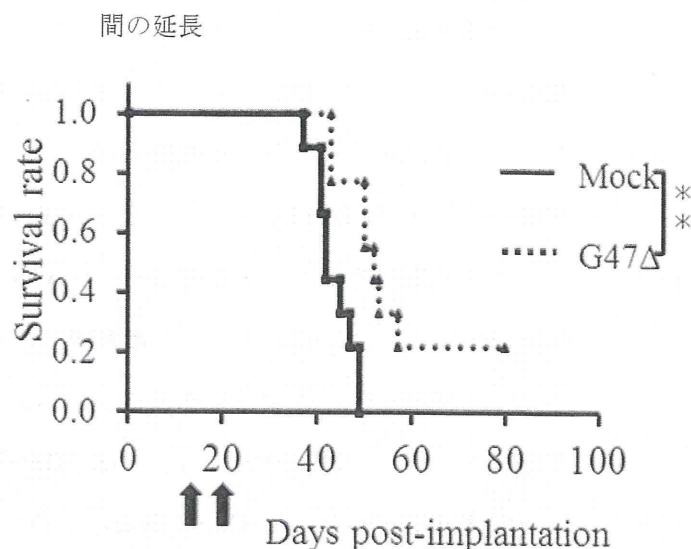
黒：コントロール、赤：G47Δ 2.0×10^5 pfu、
 緑：G47Δ 1.0×10^6 pfu投与。

(図4) G47Δを転移リンパ節にて検出



図2で示した頸部リンパ節に転移した段階で舌にG47Δ 1.0×10^6 pfu投与を投与したところ、転移したリンパ節転移の縮小とマウスの延命効果が認められた(結果省略)。そこでリンパ節での腫瘍縮小効果はG47Δによるものかを検討するため、転移リンパ節でのHSV-1、GFP、βgalactosidaseの免疫染色を施行した(図4)。免疫染色の結果、転移リンパ節において、ウイルス(G47Δ)が検出された。すなわち舌へ投与したG47Δがリンパ節へ移行し、抗腫瘍効果を発揮していることが判明した。

(図5) G47Δの頸部リンパ節への投与にて生存期間の延長



KLN205-MUC1 舌がんモデルにおいては、mock 投与群は、day 12 に原発巣の腫大により死亡し始めた。本モデルにおいて、day 15 の MUC1 に対する免疫染色の結果から、少なくとも片側の頸部リンパ節はこの時期にほぼ転移腫瘍に置換されることが示されたことから、day 16、およびday 21 に 2.5×10^6 pfu / 5 μ l ずつ両側の頸部リンパ節に G47Δ を投与し、マウスの生存期間を同量の mock を投与した場合と比較した。2 回の頸部への処置による侵襲に耐えるため、day 16 の時点で体重が 13.0 g 以上のマウスのみ実験に用いた。G47Δ を投与したマウスは mock 投与群と比較し、有意に生存延長効果を認めたことから(図5)、頸部リンパ節転移が明らかとなった進行頸部リンパ節転移に対して G47Δ を直接投与することは、リンパ節転移の進行抑制に有効であることが示唆された。

D. 考察

口腔扁平上皮癌細胞に対するウイルス療法の確立を目指し、まずすでに、治療効果安全性の確立されている、第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47Δ)すなわち増殖型HSV-1ウイルスベクターを用いた治療法が応用できるのかを検討した。In vitro in vivoの実験においては、ウイルス複製能、ウイルス感染能、ウイルス殺細胞効果をスクリーニングとすることにより、OSC-19、SAS、HSC-3を用いて以下の実験を進めた。OSC-19、SAS、HSC-3はウイルス複製能、ウイルス感染能が得られる細胞種であれば、G47Δが有効な殺細胞効果を発揮することが明らかとなった。さらに、同様の細胞を用い、舌に投与するモデルでも有効な結果を得られた。

この結果は少なくとも、局所投与に当たっては、G47Δが口腔扁平上皮癌の臨床応用に当たり、十分有効性を発揮することを示唆する結果であった。またGFP導入は腫瘍の動態を見るうえで有効な方法であると考えられる。本実験においても転移腫瘍の有効な検出手段となっており、マウス転移作成モデルとして有効に機能すると考えられる。

そして、効率に頸部リンパ節転移をきたす細胞を用いた実験において、G47Δは局所における抗腫瘍効果のみならず、転移リンパ節においても抗腫瘍効果を発揮した。そしてそのリンパ節での抗腫瘍効果は単にウイルスが惹起する免疫応答反応による副次的効果ではなく、G47Δが直接リンパ節に移行し働いている可能性を強く示唆する結果が得られた。

次年度の実験計画としては、リンパ節転移腫瘍における抗腫瘍効果に対し、いかなる免疫担当細

胞が関与しているかの詳細な検討を行いたい。

一方、感染効率の悪い細胞に対する対策として、細胞への感染のメカニズムを詳細に検討することをさらなる検討課題としている。プレリミナリーなデータとしてウイルスに関与する膜タンパクとしてNectin-1が重要な働きをしていることを見出している。その発現によって、感染効率に影響が出ていることが示唆されている。今後その詳細なメカニズムを解明することにより、現時点では感染効率が悪く、G47Δによるウイルス治療が期待できないと思われる細胞にも効果を発揮する、扁平上皮癌細胞特異的な武装ウイルスの作製を目指す予定である。

E. 結論

本実験の目的とする口腔扁平上皮癌細胞に対して、第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47Δ)は細胞種を選別することにより、in vitro、in vivoの実験において十分な抗腫瘍効果を発揮した。さらに局所投与において転移リンパ節へも抗腫瘍効果が期待できることが分かった。今後、臨床応用へ向けた研究を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Itoh Y, Nakahara H, et al. : a case report and literature review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 113(5): 23-28, 2012.
- ② Enomoto A, Uchihashi T, Izumoto T, Nakahara H, et al. : Suppurative arthritis of the temporomandibular joint associated with