

論 文 要 旨

Triple combination oncolytic adenovirus immunotherapy for potent treatment of primary and metastatic cancer

原発性および転移性がんに対する強力な治療を目的とした
腫瘍溶解性アデノウイルス免疫療法の 3 剤併用療法

渡邊 真季

【序論及び目的】

制限増殖型アデノウイルス (CRA) を始めとする、がん特異的増殖・殺傷するように遺伝子改変した腫瘍溶解性ウイルス (OV) は、増幅したウイルス蛋白によるがん細胞の殺細胞作用に加え、同時に腫瘍関連抗原の局所創出による細胞性免疫が誘導できるため、画期的ながん治療薬として期待されている。我々は多種多様の次世代 CRA を迅速効率に作製可能な多因子増殖制御型アデノウイルス (m-CRA) プラットフォーム技術を独自開発し、多種多様の m-CRA 作製・解析からサバイビン反応性 m-CRA (Surv.m-CRA) が最高性能を示すことを見出し、本学で治療遺伝子未搭載 Surv.m-CRA の第 II 相医師主導治験が進行中である。さらに免疫誘導を最大化するため免疫刺激遺伝子を搭載する OV の開発が現在注目されており、GM-CSF (顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子) 搭載 OV は欧米で初承認されている。しかし GM-CSF、IL-2 (インターロイキン 2) などのサイトカイン遺伝子搭載 OV と比べ、ケモカイン遺伝子搭載 OV の研究は限られ、さらにエフェクター T 細胞の腫瘍浸潤作用を持つケモカイン CXCL10 (CXC ケモカインリガンド 10) 搭載 OV が単剤で治療効果を示した報告はない。我々は最近、至適プロモーター制御型の GM-CSF 搭載遺伝子 Surv.m-CRA-2 の開発に成功し (論文投稿中)、本研究では、様々な CXCL10 搭載 Surv.m-CRA を作製し、その治療効果を検証する。さらに CXCL10 搭載 Surv.m-CRA の単剤だけでなく、GM-CSF、IL-2 を搭載した Surv.m-CRA との、2 種ならびに 3 種の併用療法の、原発巣ならびに転移巣の抑制の *in vivo* 治療効果を検証する。

【材料及び方法】

In vitro での CXCL10 タンパク質の発現量を検証するため、E2F、RSV、CMV、CA プロモーターで制御した CXCL10 遺伝子を搭載した各種 P2 プラスミド (治療遺伝子とプロモーターを含むプラスミド) を HEK293 細胞にトランスフェクションした上清および CXCL10 搭載 Surv.m-CRA のがんまたは正常細胞への感染上清を用いて、ELISA アッセイにて測定した。CXCL10 遺伝子の発現を制御する個々のプロモーターが *in vitro* での細胞傷害効果に及ぼす影響を調べるため、がんまたは正常細胞に各ウイルスを感染させた 3 日または 5 日後に細胞の生存率を WST-8 アッセイにて検証した。複製ウイルス依存性殺細胞作用に加え、サイトカインおよびケモカインが誘導する免疫学的作用を含む *in vivo* 治療効果を十分に明らかにするために、ヒトアデノウイルスが増殖可能なハムスターに、ハムスター由来がん細胞を移植し、シンジェニックハムスターがんモデルを確立した。まず、CXCL10 タンパク質が免疫機能を有するハムスターで適切に機能し Surv.m-CRA の *in vivo* 治療効果が増強するか

どうかを単剤治療にて検討した。次に、治療効果を高めるため、CXCL10 発現に最も活性の高い CA プロモーターを使用し GM-CSF、IL-2 を搭載した Surv.m-CRA との 2 種併用療法を行った。併用療法では、単剤治療と比較して劇的な治療効果の増強を示したため、各ウイルスの投与量を半減し、2 種および 3 種の併用療法を行った。このとき、腫瘍内への単回投与による原発巣への治療効果検証に加え、ウイルス治療の 2 週間後に親がん細胞と異種がん細胞を移植して、全身性抗腫瘍免疫の誘導効果を検証する、チャレンジテストも行った。

【結果】

CXCL10 タンパク質の発現レベルは低いものから高いものまで、E2F、RSV、CMV、CA プロモーターの順であり、我々が以前に行ったプロモーター活性の研究と同じ傾向であった。In vitro での細胞傷害効果の検証では、Surv.m-CRA はがん細胞で顕著な細胞死を誘導し、正常細胞では全く誘導しなかったことから、ヒト細胞で我々が以前に示したように Surv.m-CRA がハムスターのがん細胞で厳密に複製されることを確認できた。シンジュニックハムスターモデルにおける CXCL10 搭載 Surv.m-CRA の単剤治療では、穏やかではあるものの治療遺伝子未搭載 Surv.m-CRA と比較して腫瘍増殖抑制効果を増強した。治療効果をさらに増強するため GM-CSF、IL-2 を搭載した Surv.m-CRA との 2 種併用療法を行ったところ、単剤治療よりも劇的に腫瘍体積を縮小させるという相乗効果を示した。2 種併用療法では特に、IL-2 搭載 Surv.m-CRA と CXCL10 搭載 Surv.m-CRA の組み合わせの治療効果が高かったため、次に、IL-2 搭載 Surv.m-CRA をコアとした 2 種または 3 種併用療法を実施したところ、3 種併用療法は最も強力に安定した腫瘍増殖抑制効果を示した。さらにチャレンジテストでは、ウイルス治療後に移植した親がん細胞の腫瘍増殖を抑制し、親がん細胞特異的な全身性抗腫瘍免疫の誘導効果も示した。また、ウイルス投与から 88 日後に実験を終了するまで、どの群でも有意な体重減少は起こらなかったことから、重篤で致死的な有害事象は 3 種併用療法も含めいずれの治療によっても誘発されなかったことが示唆された。

【結論及び考察】

本研究は、ケモカイン CXCL10、サイトカイン IL-2 または GM-CSF 遺伝子を搭載した OV の単剤療法および 2 種または 3 種の併用療法の原発性および転移性がんに対する治療可能性を検討した初めての研究である。

本研究により、CXCL10 遺伝子搭載 OV の単剤投与が、in vivo での抗腫瘍効果を有意に増大させることが初めて示された。しかし、CXCL10 遺伝子による付加的な部分は、実験条件を変えると不明瞭になるため、CXCL10 遺伝子搭載による治療効果の増強は穏やかで不安定であった。対照的に、CXCL10 遺伝子と GM-CSF または IL-2 遺伝子搭載 Surv.m-CRA の 2 種併用療法は、腫瘍増殖抑制効果を相乗的に、劇的に、安定的に増加させた。注目すべきは、これらの治療効果は、3 種併用療法によってさらに増強され、最大化されたことである。

結論として、本研究は、CXCL10、IL-2、および GM-CSF 遺伝子を搭載した Surv.m-CRA の 3 剤併用療法が、原発腫瘍および遠隔転移巣に対して相乗的かつ劇的な治療効果を発揮することを実証した。3 種類の Surv.m-CRA を腫瘍局所に単回投与するだけで、原発腫瘍を劇的に消滅させるだけでなく、全身性および親がん細胞特異的な抗腫瘍免疫も誘導し、遠隔部位への腫瘍形成を強力に抑制した。この併用療法は、アンメット・メディカル・ニーズのある難治性がん、特に多発性転移がんに対する新規の有効な治療法への道を開く可能性がある。