

## 論文の内容の要旨

論文題目 膀胱癌に対する IL-12 発現型がん治療用ウイルスと iPS 細胞由来樹状細胞の併用療法の開発

氏名 田口 慧

### 序論

膀胱癌(尿路上皮癌)は一般に難治であり、進行癌の場合シスプラチンを含む多剤併用化学療法を行っても、生存期間中央値は 14 ヶ月程度である。進行膀胱癌の治療はこの 20 年間大きな進歩は見られず、新規治療戦略の開発が強く求められている。一方、早期癌の場合は初回治療として内視鏡的切除(TURBT)が行われるが、術後高頻度に膀胱内再発するため、最終的に膀胱全摘が必要となる症例も珍しくなく、尿路変向に伴うストマ造設等による QOL の低下も大きな問題となる。そのため、高リスクの早期癌患者における膀胱全摘回避(膀胱温存)という観点からも、新規治療法の開発は強く求められている。

固形がんに対する全く新しい治療法としてウイルス療法が注目を集めている。これは、癌細胞で特異的に増幅し正常細胞は傷害しないように遺伝子改変したウイルス(がん治療用ウイルス)を用いて癌を治療する試みである。2015 年に、がん治療用単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)の T-VEC (talimogene laherparepvec)が、切除不能の悪性黒色腫に対して米国 FDA から初の承認を受けたのを追い風に、現在様々な親ウイルスを用いたがん治療用ウイルスが、実用化に向けて盛んに研究されている。膀胱癌に対しては、アデノウイルス(CG0070)及びワクシニアウイルス(Dryvax)を用いた、臨床試験がすでに実施されている。HSV-1 は、ウイルス療法の分野ではアデノウイルスと並んで広く研究されて来たウイルス種であり、著者らの研究室では第 3 世代がん治療用 HSV-1 の G47 $\Delta$  の研究を行ってきた。「第 $\sim$ 世代」とは変異遺伝子の個数を表しており、G47 $\Delta$  は  $\gamma 34.5 \cdot ICP6 \cdot \alpha 47$  に変異を有する 3 重変異型ウイルスである。G47 $\Delta$  は動物実験で高い抗腫瘍効果と安全性が示されたため、すでに本邦において膠芽腫や前立腺癌に対する複数の臨床試験が実施されている。

本研究は、「膀胱癌に対する G47 $\Delta$  をベースとしたウイルス療法の開発」を念頭に、より効果と臨床応用性を高める工夫を行った。複数の既報が、「ウイルス療法を樹状細胞療法と併用すると、ウイルスが破壊した癌細胞が抗原として樹状細胞に効率よく提示されるため相乗効果が得られる」と報告しているが、この戦略には「個々の患者から樹状細胞を抽出する過程に手間とコストがかかる」という欠点があった。一方、iPS 細胞から樹状細胞(iPSDC)

を作製することが近年可能となり、iPSDCは大量培養・ストック化が可能であることから、上記の欠点を克服できる可能性が出てきた。実際、国内のグループでiPSDCの前駆細胞を代表的なHLAハプロタイプごとにストック化する計画が進行中であり、ウイルス療法とiPSDCの併用が、従来の骨髄由来樹状細胞(BMDC)の併用と同等以上の効果を持つことを示せば、高い効果と臨床応用性を兼ね備えた理想的なウイルス免疫療法になり得る、と期待された。以上より本研究は、ウイルス療法とiPSDCの併用療法をマウス膀胱癌モデルを用いて検討することを主目的とした。さらに本研究では、樹状細胞の機能をより高めるため、G47Δを基にマウスIL-12を発現するように遺伝子改変した武装型ウイルス(T-mfIL12)を使用した。

## 方法および結果

G47ΔのICP6欠失領域に、マウスIL-12をCMVプロモータとともに挿入したT-mfIL12を用いた。同部位にCMVプロモータのみを挿入したT-01をコントロールウイルスとした。

まず、*in vitro*におけるウイルスの殺細胞効果を、マウス膀胱癌細胞株MB49で検討した。T-mfIL12・T-01いずれのウイルスとも、高い力価(MOI 1.0)で感染させると感染4日目にはほとんどの細胞が死滅した。

次に、T-mfIL12を感染した細胞(MB49及びアフリカミドリザル腎細胞株Vero)の上清中に、マウスIL-12が発現することをELISA法にて確認した。MockまたはT-01を感染した細胞の上清中には、IL-12の発現は認めなかった。

C57BL/6マウスに作製したマウス膀胱癌MB49皮下腫瘍において、T-mfIL12腫瘍内投与( $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  pfu/匹)は用量依存的に腫瘍の増大を抑制した。最小投与量の $4 \times 10^4$  pfuでもmockに比べ有意な腫瘍抑制を示したが、 $1 \times 10^6$  pfuと比べると有意に低い抑制効果であった。本研究は、ウイルスとiPSDCの併用効果を検討するのが主目的であるため、併用実験は $4 \times 10^4$  pfuで行うこととした。

MB49皮下腫瘍モデルで、ウイルスと骨髄由来樹状細胞(BMDC)の併用効果を検討した(“BMDC set”)。BMDCは、C57BL/6マウスの大腿骨・脛骨より骨髄細胞を採取し作製した。マウスを6群に分け(mock、BMDC、T-01、T-01 + BMDC、T-mfIL12、T-mfIL12 + BMDC)、ウイルス(T-mfIL12・T-01)は $4 \times 10^4$  pfuでday 0・5に、BMDCは $1 \times 10^6$ でday 2にそれぞれ腫瘍内投与した。T-mfIL12 + BMDC群で著明な腫瘍縮小を認め、それには及ばないものの、T-01 + BMDC群及びT-mfIL12群もmockに比べて有意な腫瘍縮小を示した。Day 15に採取した皮下腫瘍の免疫組織学的検査では、T-mfIL12 + BMDC群、次いでT-01 + BMDC群で、腫瘍内に浸潤するCD8陽性リンパ球数の増加を認めた。Day 15に採取した脾臓細胞による

IFN- $\gamma$  ELISpot では、T-mfIL12 + BMDC 群、次いで T-01 + BMDC 群で、IFN- $\gamma$  産生細胞数の有意な増加を認めた。“BMDC set”により、「ウイルスと BMDC の併用がウイルス単独より強い抗腫瘍効果を示す」という既報の知見を確認するとともに、IL-12 発現型ウイルス (T-mfIL12)を用いることでその併用効果がさらに増強することを、新たに見出した。また、免疫学的評価から、ウイルスと BMDC の併用群では、局所(腫瘍内)での CD8 陽性リンパ球数の増加や、全身(脾臓)での IFN- $\gamma$  産生細胞数の増加など、宿主の免疫賦活を介した機序で、抗腫瘍効果が増強していることが示唆された。

続いて、マウス胎児線維芽細胞由来 iPS 細胞株 2A-4F-100 より iPSDC を分化誘導し、様々な形態・機能的評価を行った。サイトスピン+May-Grünwald-Giemsa 染色による形態評価では、iPSDC の方が BMDC よりもやや小ぶりで円形の傾向があったものの、両者は概ね類似した形態であった。iPSDC の表面分子の発現をフローサイトメーターで解析したところ、CD11b・CD11c 二重陽性の細胞の割合は陽性対照である BMDC より有意に高く、今回作製した iPSDC の純度は十分高いことが示唆された。さらに、二重陽性細胞の中で共刺激分子 (CD40・CD80・CD86・IA/IE)の発現を評価したところ、基本的に iPSDC は BMDC と同等、もしくはより高い発現を示した。dextran-FITC 及び OVA-FITC を用いた抗原取り込み能試験では、iPSDC は BMDC と同等もしくはそれ以上の抗原取り込み能を示した。iPSDC による T 細胞の増殖能を調べるため、mixed lymphocyte reaction (MLR)試験も行った。OT-I マウス (MHC class I に提示された OVA 抗原を特異的に認識する T 細胞レセプターを強制発現したトランスジェニックマウス)の CD8 陽性 T 細胞、及び OT-II マウス (MHC class II に提示された OVA 抗原を特異的に認識する T 細胞レセプターを強制発現したトランスジェニックマウス)の CD4 陽性 T 細胞を、iPSDC 及び BMDC を OVA でパルスした後に共培養したところ、いずれの樹状細胞も効率良く T 細胞を増殖させた。MLR 試験と同様の検討を *in vivo* で行うため、popliteal lymph node assay (PLNA)試験も施行した。OT-I 及び OT-II マウスの脾臓由来 T 細胞を、C57BL/6 マウスの尾静脈より養子移入するとともに、iPSDC 及び BMDC を OVA でパルスしたものを足底より注入し、両者が出会って反応を起こすことが想定される膝窩リンパ節を採取して内部のリンパ球を解析した。MLR 試験同様、いずれの樹状細胞も効率良く T 細胞を増殖させた。以上の検討により、今回作製した iPSDC が、形態・機能の両面で「樹状細胞様」の特徴を有する細胞であることが確認された。

ここまでの検討を踏まえて、本実験である「ウイルスと iPSDC の併用実験」を、MB49 皮下腫瘍を用いて行った(“iPSDC set”)。マウスを 6 群に分け(mock、BMDC、iPSDC、T-mfIL12、T-mfIL12 + BMDC、T-mfIL12 + iPSDC)、T-mfIL12 は  $4 \times 10^4$  pfu で day 0・5 に、iPSDC・BMDC は  $1 \times 10^6$  で day 2 にそれぞれ腫瘍内投与した。T-mfIL12 + iPSDC 群は T-mfIL12 + BMDC 群と同等の著明な腫瘍抑制を認め、両群とも mock 群及び T-mfIL12 群に対して有意となった。Day 15 に採取した皮下腫瘍の免疫組織学的検査では、両群にて腫瘍内に浸潤する CD8 陽性

リンパ球数の増加を認めた。Day 15 に採取した脾臓細胞による IFN- $\gamma$  ELISpot では、両群で他群に対して有意な IFN- $\gamma$  産生脾臓細胞数の増加を認めた。さらに樹状細胞の成熟マーカー (CD40, CD80, CD86, IA/IE) の免疫組織学的検査も行ったところ、BMDC 単独群及び iPSDC 単独群では樹状細胞は存在するものの成熟マーカーの発現は見られなかった一方で、T-mfIL12 + iPSDC 群及び T-mfIL12 + BMDC 群では樹状細胞の存在と同時に成熟マーカーも発現しており、ウイルスと樹状細胞の共存により樹状細胞の「成熟促進」が起こることが示唆された。“iPSDC set”により、ウイルスと iPSDC の併用が、骨髄由来樹状細胞(BMDC)の併用と同等の高い抗腫瘍効果を示すことを、新たに見出した。 また、免疫学的評価から、ウイルスと iPSDC の併用群では、ウイルスと BMDC の併用と同様に、局所(腫瘍内)での CD8 陽性リンパ球数の増加や、全身(脾臓)での IFN- $\gamma$  産生細胞数の増加など、宿主の免疫賦活を介した機序で、抗腫瘍効果が増強していることが示唆された。

## 結語

マウス膀胱癌 MB49 皮下腫瘍において、IL-12 発現型がん治療用 HSV-1 の T-mfIL12 と、iPS 細胞から分化誘導した iPSDC の併用は、骨髄由来樹状細胞(BMDC)の併用と同等の高い抗腫瘍効果を示した。今回作製した iPSDC は様々な形態・機能的評価から、「樹状細胞様」の特徴を十分有することを確認しており、また理論的に iPSDC は大量培養・ストック化が可能なことから、本戦略は高い効果と臨床応用性を兼ね備えた理想的なウイルス免疫療法になり得ると考えられた。今後本格的な実用化を目指すに当たり、同所モデルでの検討、安全性試験、内視鏡デバイスの開発、投与経路の選択、等が課題である。

(全角換算 4000 字)