

学位論文（要旨）

○論文題目

Cyclophosphamide Enhances Antitumor Efficacy of Oncolytic Adenovirus Expressing Uracil Phosphoribosyltransferase (UPRT) in Immunocompetent Syrian Hamsters

（シクロフォスファミドは、免疫適格シリアンハムスターにおける UPRT 発現腫瘍融解アデノウイルスの抗腫瘍効果を増強する）

（所属） 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

（氏名） 長谷川 直之

目的：

腫瘍選択的に増殖し腫瘍を融解壊死させる「腫瘍融解ウイルス」は、近年、癌の新規治療法として期待され、さらに種々の遺伝子治療への応用（遺伝子武装腫瘍融解ウイルス）が注目されている。当研究室でも、特に抗癌剤 5-fluorouracil (5-FU)の効果を増強する酵素 uracil phosphoribosyltransferase (UPRT)の遺伝子を搭載した腫瘍融解アデノウイルス(OAd), AxE1CAUP の有効性を報告した(Seo, et al. Cancer Res 2005; 65: 546-52)。AxE1CAUP は、E1B-55kDa 遺伝子の欠損により p53 シグナル異常を有する癌細胞内でのみ選択的に増殖し、UPRT を発現、Ad の感染宿主ではない免疫不全マウスにおいてヒト癌細胞の 5-FU 感受性を増強した。しかし、実臨床での効果と安全性を予測するためには、近年、Ad に感染かつ免疫適格で、安全性や免疫応答の評価に適することが判明したシリアンハムスターでの検討を要することが報告された。特に、宿主の免疫応答は腫瘍融解ウイルスの効果を著しく修飾する。実際、免疫抑制剤、抗癌剤として広く使用されるシクロフォスファミド(CP)が、高容量では抗ウイルス免疫を抑制し、OAd の増殖を促進、その腫瘍融解効果を増強することが報告された。しかし、CP（特に臨床容量の CP）が UPRT 等の自殺遺伝子を搭載した腫瘍融解ウイルスの効果に与える影響は全く不明である。膀胱癌は、進行期に発見され、有効な治療に乏しく最も予後不良な癌腫の一つである。

本研究では、免疫適格で Ad が感染するシリアンハムスターの同種膀胱癌皮下腫瘍モデルを用いて、AxE1CAUP と 5-FU の併用による「遺伝子化学療法」の有効性と安全性を検討した。さらに、高容量および臨床容量の CP 併用の抗腫瘍効果と安全性についても検討した。

対象と方法：

1) ハムスター膀胱癌 HaP-T1 細胞における Ad 受容体 CAR の発現を Western blot 法で検討した。In vitro での HaP-T1 における AxE1CAUP の増殖、UPRT 発現、5-FU 感受性の増強を、リアルタイム PCR, Western blot 法, WST-1 assay によりそれぞれ検討した。2) シリアンハムスターの両側腹部に同種 HaP-T1 皮下腫瘍を作成し、片側腫瘍にのみ AxE1CAUP を腫瘍内注入した後、高容量 CP, 5-FU を腹腔内投与し、腫瘍径、体重を観察した。対側腫瘍の増大から抗腫瘍免疫を評価した。一部の動物では、血清抗 Ad 抗体価を測定、また腫瘍内の OAd の存在 (E1A 免疫染色), UPRT 発現 (リアルタイム PCR, Western blot) を検討した。3) あらかじめハムスターを AxE1CAUP で免疫 (筋肉内投与) した後 (Preimm 群), AxE1CAUP/5-FU 療法を行い、既存免疫のない群 (Nonimm 群) と比較した。また、臨床容量の中等量 CP(37 mg/kg : ヒト換算 5 mg/kg, 週 2 回)の同時投与が、Preimm 群, Nonimm 群における治療効果を増強するか否かを検討した。

結果：

1)HaP-T1 細胞は、Ad 受容体 CAR を良好に発現した。AxE1CAUP は、*in vitro* で HaP-T1 細胞内に良好に感染、増殖、UPRT を発現し 5-FU 感受性を増強した。2)ハムスター-HaP-T1 皮下移植腫瘍において、AxE1CAUP/5-FU 併用療法は、PBS 群、AxE1CAUP 群に比し有意($P<0.01$)に強く腫瘍増殖を抑制した。さらに高容量 CP を追加すると、CP 非追加群に比し有意($P<0.01$)にさらに強く腫瘍増殖を抑制した。体重減少や肝、肺の組織障害はみられなかった。AxE1CAUP/CP 群では、血清抗 Ad 中和抗体が抑制され、腫瘍内の Ad 増殖・UPRT 発現が増強した。AxE1CAUP 群の対側腫瘍も、PBS 群の対側腫瘍に比し有意($P<0.01$)に増殖抑制されたが、この全身的抗腫瘍効果は AxE1CAUP/CP 併用群ではみられなかった。3)臨床容量の中等量 CP の併用でも AxE1CAUP/5-FU の抗腫瘍効果は有意($P<0.05$)に増強した。AxE1CAUP/5-FU の抗腫瘍効果は、Preimm 群では Nonimm 群に比し有意($P<0.05$)に減弱したが、臨床容量の CP を併用したところ、Preimm 群でも抗 Ad 抗体産生が抑制され、抗腫瘍効果も CP 非投与群に比し有意($P<0.01$)に増強した。

考察：

本研究では、免疫適格な Ad 感染動物であるシリアンハムスターの同種腭癌皮下腫瘍モデルにおいて、UPRT 発現 OAd (AxE1CAUP) と 5-FU の遺伝子化学療法の有効性と安全性を示した。また、高容量 CP 併用により、抗 Ad 抗体が抑制され、腫瘍内の Ad 増殖・UPRT 発現が亢進し 5-FU 投与時の抗腫瘍効果がさらに増強した。さらに臨床容量の中等量 CP の併用でも治療前の既存免疫の有無にかかわらず抗腫瘍効果が増強した。CP が種々のウイルスの腫瘍融解効果を増強することは報告されてきたが、今回、初めて CP が自殺遺伝子の一つである UPRT を搭載した腫瘍融解ウイルスの抗腫瘍効果を増強することを示し得た。

AxE1CAUP 非注入側の腫瘍も軽度な増殖抑制を示したが、この効果は高容量 CP 併用により消失した。AxE1CAUP による抗腫瘍免疫の賦活と高容量 CP によるその消失が示唆された。このことは、抗ウイルス免疫と抗腫瘍免疫のジレンマを示唆する。

これらの結果から、いくつか臨床的に重要な点が示唆される。第一に、AxE1CAUP/5-FU では、5-FU 投与により癌細胞のみならずベクターも排除されるため、効果増強のため反復治療が望ましいが、CP 併用は中和抗体抑制により反復治療を可能にする。第二に、抗ウイルス免疫と抗腫瘍免疫のジレンマの解消法として、CP による免疫抑制期に AxE1CAUP/CP/5-FU 療法を反復し、腫瘍を大いに縮小させた後、CP を減量ないし中止し、サイトカイン遺伝子で武装した OAd を用いて抗腫瘍免疫賦活を狙う「腫瘍融解ウイルスの連続的併用治療」などは、今後、検討に値すると考えられる。

結論：

免疫適格な Ad 感染動物であるシリアンハムスターの同種膵臓癌皮下腫瘍モデルにおいて、UPRT 発現腫瘍融解アデノウイルスと 5-FU による遺伝子化学療法の有効性と安全性、さらに高容量または臨床容量のシクロフォスファミドの併用による効果増強が示された。本併用療法が 5-FU 耐性難治性膵臓癌に対する有効な治療になり得ること、またシクロフォスファミドが宿主の抗ウイルス免疫を克服し遺伝子武装腫瘍融解ウイルス療法の効果を高めることが示された。