

概日リズムを利用した腫瘍溶解ウイルス療法の増強効果

名古屋市立大学大学院

耳鼻咽喉・頭頸部外科 講師 江崎伸一

1. 研究の背景・目的

腫瘍溶解ウイルス療法とは、腫瘍内に接種したウイルスが腫瘍細胞のみで増殖し、破壊すると同時に放出したウイルスが周囲の腫瘍細胞に感染して腫瘍を縮小させる治療法である。放射線療法、化学療法とは異なる機序により抗腫瘍効果を示す治療法であり、新たな治療法として期待されている。2000年頃より様々なウイルスが腫瘍溶解ウイルス療法の候補として臨床試験が行われてきたが、2015年には初の腫瘍溶解ウイルス Imlygic®が米国にて承認され、2022年には Delitact®が本邦にて条件付きで承認された。

腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果をさらに高めるため、様々な併用療法が模索されている。過去の研究を渉猟すると、抗癌剤の併用療法が最も多いが、従来の抗癌剤の多くはDNA合成を阻害して腫瘍細胞の増殖を抑制するため、腫瘍溶解ウイルスの増殖も抑制されて殺細胞効果も減弱される。最近では、ウイルス増殖に影響を及ぼさない分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤との併用療法が研究されている。

ところで、環境変化に対する正常細胞と癌細胞の応答が異なることを利用して、癌細胞への治療効果を高める研究が行われている。単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2) を夜に接種すると、昼に接種した場合よりもウイルスの増殖性が亢進し、病原性が強く発現された (Matsuzawa, *J Dermatol Sci*, 2018) という報告がある。この原因として、ウイルス感染に利用する受容体の一つの PVRL の発現が日内変動することが挙げられた。

そこで本研究は、「概日リズムを利用して腫瘍溶解ウイルス療法の治療効果を強化すること」を目的とする。このような概日リズムと腫瘍溶解ウイルスを組み合わせた研究は過去の報告に存在せず、独自性の高い研究である。また、腫瘍溶解ウイルス療法が一般診療で利用できるようになった際には、腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果を最大化できる方法として、容易に応用できる。

2. 研究の対象ならびに方法

1. 各細胞株における G47 Δ の殺細胞効果

腫瘍溶解ウイルスとしては、米国ハーバード大学マサチューセッツ総合病院から供与された HSV-1 由来の G47 Δ を用いた。感染細胞の分布を検討するため、赤色に蛍光を出す G47 Δ-mCherry を用いた。腫瘍細胞はマウス由来の大腸癌細胞株 Colon26-luc、膀胱癌細胞株 MB49、肉腫細胞株 S180、を用意した。まずは各細胞株を 96 well plate に接種し、翌日に G47 Δ を感染させた。48 時間後に細胞生存率を MTS assay (Promega 社) を用いて検討し、G47 Δ の殺細胞性を検討した。また、各細胞内におけるウイルス感染を可視化するため、G47 Δ-mCherry を感染させて、蛍光の分布の広がりを検討した。

2. 多発肺転移モデルの作成と G47 Δ の治療効果

Colon26-luc をマウス尾静脈に接種し (1×10^6 cells/ 0.1mL)、大腸癌多発肺転移モデルを作成した。3 日後に腫瘍溶解ウイルス G47 Δ (1×10^7 pfu/ 0.1mL) もしくは同量の PBS を尾静脈に接種した。治療後 15 日に、マウス体内における Colon26-luc の分布を検討するため、ルシフェリンを注射して、発光の分布を検討した。

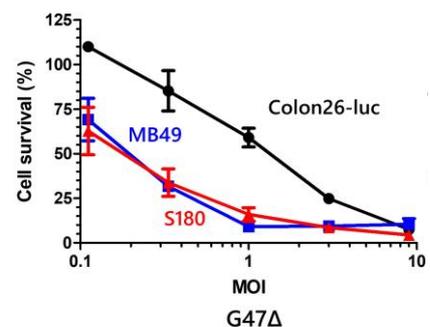
3. G47 Δ の治療効果の概日リズムによる変化

同様に大腸癌多発肺転移モデルを作成し、腫瘍溶解ウイルス G47 Δ (1×10^7 pfu/ 0.1mL) を接種した。治療群は 3 群にわけ、接種のタイミングを 2.5 日後 (昼)、3 日後 (夜)、3.5 日後 (昼) にずらした。同量の PBS を尾静脈に接種した群をコントロールとした。各群のマウスの生存率を検討した。

3. 研究結果

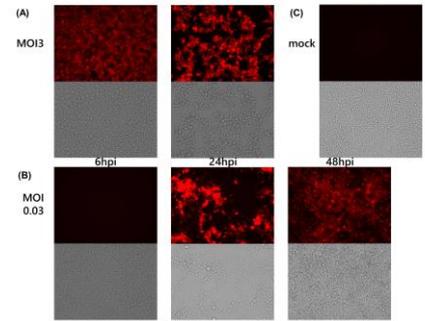
1. 各細胞株における G47 Δ の殺細胞効果

各細胞株に対して G47 Δ を異なる MOI (感染多重度、1 細胞に対するウイルスの比率) で投与し、48 時間後に生存率を評価した。生存率は細胞株毎に異なったが、各細胞株とも MOI 依存的な殺細胞効果を認めた (図 1)。



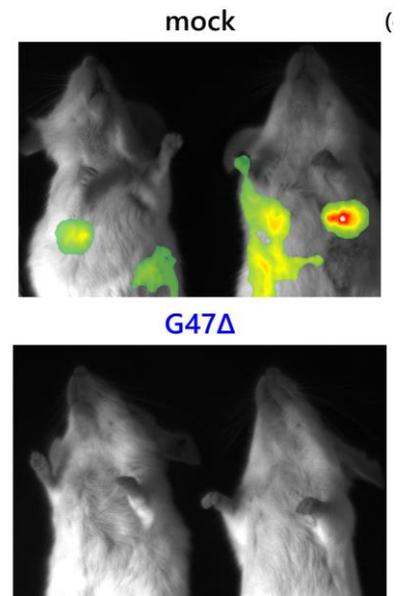
研究実績報告書

また、G47 Δ -mCherry を Colon26-luc 細胞に感染させたと
ころ、MOI 3 (1 細胞に対して 3 pfu のウイルス)では 24 時間
で全て感染した。1/100 のウイルス量 (MOI 0.03)で感染させ
たところ、24 時間では 1 視野あたり数個の細胞死か感染を認
めなかった、時間の経過と共に感染細胞の増加が増加し、ほ
ぼ全ての細胞で感染が認められた (図 2)。



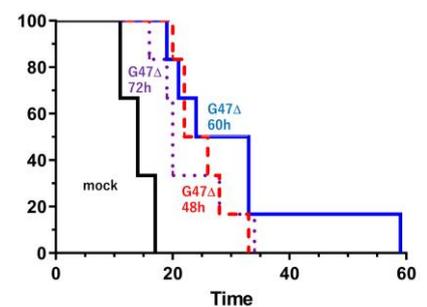
2. 多発肺転移モデルの作成と G47 Δ の治療効果

次に Colon26-luc 細胞を尾静脈に接種し、大腸癌多発肺転
移モデルを作成した。3 日目に G47 Δ で治療し、その 15 日目
に腫瘍の形成を確認するために、ルシフェリンを注入後に撮
影を行った。偽治療群ではマウスの胸部からの発光が認めら
れ、転移性肺癌が形成されたと考えられた (図 3)。G47 Δ 治
療群では発光は認められず、G47 Δ により腫瘍の形成が抑制
されたと考えられた。



3. G47 Δ の治療効果の概日リズムによる変化

次に、概日リズムによる治療への影響を検討した。
Colon26-luc 細胞を尾静脈に接種し、48 時間後 (昼)、60 時
間後 (夜)、72 時間後 (昼) に G47 Δ を接種した。各治
療とも偽治療群 (mock) と比べて生存の延長を認めた。その
中で、夜に接種した群が最も延長した (図 4)。



4. 考察

本研究では主にマウス大腸癌 Colon26-luc 細胞株を使用し、G47 Δ の抗腫瘍効果を検討し
た。培養細胞での検討では、G47 Δ の殺細胞性や、ウイルス感染細胞の広がり
が認められた。肺転移モデルを用いた検討では、G47 Δ の抗腫瘍効果が認め
られた。夜にウイルスを接種した場合はその効果が著明であった。

本研究で用いた G47 Δ は悪性脳膠芽腫で臨床治験が行われ、Delitact® として条件付き承認された。他の領域でも効果が期待できるが、現在のところ治療対象とする癌種を拡大する動きは認められない。頭頸部領域では、単純ヘルペスウイルス由来の HF10 を用いた臨床治験が行われた過去はあるが、現在進行形の臨床治験は存在しない。

腫瘍溶解ウイルスの特徴は、ウイルスが感染し得る細胞ならば癌種に関係なく治療効果が期待できるところにある。難治性である脳悪性膠芽腫や悪性黒色腫による臨床研究が研究が先行しているが、他の癌腫を対象とした臨床研究が行われている。本研究でも複数の癌細胞に対する G47Δ の殺細胞効果が認められ、癌種を問わず効果が期待できることが示された。

本研究では概日リズムを利用して腫瘍溶解ウイルスの治療効果を高める検討を行った。今後そのメカニズムを証明する必要があるとともに、他の癌種や他の部位の腫瘍、他のウイルスに応用可能か検討を行う必要がある。将来腫瘍溶解ウイルス療法が様々な癌種に適応となった時、本研究を礎として、概日リズムを利用して腫瘍溶解ウイルスの治療効果を最大限にする方法に応用できることが望ましい。