

題目

頭頸部扁平上皮癌に対する
uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルス
による新規治療法の検討

田中 伸吾

(耳鼻咽喉科学専攻)

防衛医科大学校

平成29年度

目 次

第1章 緒言	1頁
1.1 頭頸部扁平上皮癌	1頁
1.2 Urokinase-type plasminogen activator	2頁
1.3 腫瘍溶解性ウイルス	3頁
1.4 センダイウイルス (Sendai virus, SeV)	4頁
1.5 uPA活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルス	5頁
1.6 研究の目的	7頁
第2章 実験方法	8頁
2.1 細胞株	8頁
2.2 uPA活性測定	8頁
2.3 uPA活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルス	9頁
2.4 細胞の形態的变化	9頁
2.5 殺細胞性の測定	10頁
2.6 舌扁平上皮癌マウス同所移植モデル	10頁
2.7 抗腫瘍効果の機序の検討	12頁
2.8 汎カスパーゼ阻害薬による殺細胞効果抑制	12頁
2.9 定量的reverse transcription-polymerase chain reaction 用いた安全性に関する検討	13頁
2.10 統計学的検討	14頁

第3章 結果	15頁
3.1 頭頸部扁平上皮癌のuPA活性値	15頁
3.2 腫瘍溶解性センダイウイルスによる細胞融合	15頁
3.3 頭頸部扁平上皮癌株に対する殺細胞効果	15頁
3.4 舌扁平上皮癌マウス同所移植モデルにおける治療効果	16頁
3.5 殺細胞効果の機序における検討	17頁
3.6 安全性に関する検討	18頁
第4章 考察	19頁
第5章 結論	23頁
第6章 謝辞	24頁
付記	25頁
引用文献	26頁
図表	33頁

第1章 緒言

1.1 頭頸部扁平上皮癌

頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma、HNSCC) は、全頭頸部悪性腫瘍の約 9 割を占め、舌・口腔の他、副鼻腔、咽頭・喉頭などの頭頸部粘膜上皮に由来する。HNSCC は、癌腫全体で 6 番目の頻度で高いとされており、全世界で年間約 68 万人が新規に罹患する^{1) 2)}。HNSCC の疫学的特徴として、75%以上の HNSCC でタバコとアルコールの関与が指摘されている³⁻⁵⁾。他に、EB ウイルス (Epstein-Barr virus) やヒト乳頭腫ウイルス感染などの関与があげられる^{6) 7)}。とくにヒト乳頭腫ウイルスの感染は、中咽頭癌 (扁桃癌) 数の約 50%以上にみられ、今後も患者数の増加が予想されている^{8) 9)}。HNSCC は、リンパ節腫脹を契機に医療機関を受診することが多く、初診時の段階で半数以上の症例が既に進行癌と診断されている¹⁰⁾。5 年生存率は 50%程度とする報告が多く^{11) 12)}、高い頻度で治療後の再発や重複癌を生じるため、予後不良な疾患である¹³⁾。

HNSCC の治療は、新たな癌化学療法の開発や、手術療法および放射線療法などの発展にもかかわらず、この数十年の 5 年粗生存率の改善に大きく寄与していない¹⁴⁾。頭頸部領域に特異な点として、審美面だけでなく、発声、構音、嚥下、味覚、呼吸など様々な機能が集中している器官であり、安易に治療強度を強くした場合、機能障害や患者 quality of life の低下をきたす点がある¹⁵⁾。HNSCC に対する治療を行ううえで、根治性と機能温存を両立することが重要な課題であり、新規治療法が開発が期待される領域である。

1.2 Urokinase-type plasminogen activator (uPA)

Urokinase-type plasminogen activator (uPA)はセリンタイプのプロテアーゼであり、細胞膜受容体である uPA receptor (uPAR)、plasminogen activator inhibitor (PAI) およびプラスミンと plasminogen activator (PA) system を構築している¹⁶⁾ (図 1)。PA system は、線溶系においてはプラスミノーゲンを切断、活性化させる作用を持つ。一方、悪性腫瘍においても広く発現しており、細胞外基質のリモデリングにおいて重要な役割を果たし、腫瘍細胞の遊走・浸潤・転移に対して重要な役割を果たしている¹⁷⁾。

様々な癌腫で、uPA/uPAR の発現と癌の悪性度との相関が報告されている^{18) 19)}。HNSCC においては、臨床検体を用いた検討の中で、正常組織と比較し、腫瘍組織では uPA の高発現が報告されている²⁰⁾。HNSCC においても、uPA は、腫瘍細胞膜に発現した uPAR を活性化し、プラスミノーゲンからのプラスミンの産生を増加させ、これが細胞外基質の分解をもたらす。これにより癌細胞の周囲組織への浸潤を容易にし、血液およびリンパ管へ遊走を促進し、腫瘍細胞の浸潤および転移に重要な役割を果たしている^{21) - 23)}。また、uPA と uPAR、その関連蛋白が活性化することで細胞内の成長シグナル因子を活性化し、腫瘍細胞の接着、転移、増殖と関連している^{24) 25)}。腫瘍細胞が PA system を複雑に調節することで、薬剤抵抗性や放射線抵抗性に関与しているとの報告もある^{26) 27)}。これらにより、uPA および uPAR の発現強度は、腫瘍の進行度、リンパ節転移の有無、および不良な予後と相関を認める^{23) 29)}。一方、正常組織における uPA 活性については、創傷治癒過程における組織リモデリングを除いてほとんど認めていない³⁰⁾。従って、uPA は HNSCC に対する新規治療標的となり得る。

1.3 腫瘍溶解性ウイルス

腫瘍溶解性ウイルスとは、正常組織に傷害を与えず、腫瘍細胞で選択的に増殖し、腫瘍特異的に治療効果を発揮することを目的とするウイルスの総称である³¹⁾。遺伝子治療と腫瘍溶解性ウイルスの違いは、それまでのウイルスベクターが自己増殖能を持たず、治療遺伝子を腫瘍細胞に導入する事で腫瘍の死滅を誘導することであったのに対し、腫瘍溶解性ウイルスは一部の遺伝子に変異し、腫瘍細胞内での自己増殖能を維持して腫瘍細胞の中でその数を増やし、周囲の腫瘍細胞に自己感染していく事で殺細胞効果を示す点にある。腫瘍溶解性ウイルスは、標準治療に抵抗性を示す難治性悪性腫瘍に対する全く新しい作用機序を備えた治療法として期待されている。

ウイルス感染後にしばしば腫瘍が退縮することが以前より知られていた³²⁾³³⁾。1949年に22例のホジキンリンパ腫に対して、肝炎ウイルスを使用した治療が行われている³⁴⁾。その後、1980年代にかけて肝炎ウイルスや、ウエストナイル熱、黄熱病、デング熱、アデノウイルスなどを使用した臨床試験が行われたものの、当時はウイルス毒性の制御や、ウイルスの腫瘍特異性を制御できず、これらウイルスの治療薬としての効果は不十分であった³⁵⁾。しかしながら、1991年にMartuzaらにより、遺伝子組み換え単純ヘルペスウイルス1型(herpes simplex virus type 1、HSV-1)の悪性神経膠腫に対する治療効果が報告された³⁶⁾ことを契機に、腫瘍溶解性ウイルスの開発は新たな展開を迎えた。現在では、様々な腫瘍溶解性ウイルスの臨床試験が行われている。米国食品医薬局は2015年に初めて、切除不能悪性黒色腫に対する組み換えHSV-1であるtalimogene laherparepvecを認可している³⁷⁾。頭頸部癌に対する腫瘍溶解性ウイルスとしては、中国国家食品薬品监督管理局が2005年に遺伝子組み換えアデノウイルスであるH101を認可している³⁸⁾が、これまでの治療成績は限定的である。腫瘍溶解性ウイルスの

全身投与は、抗ウイルス抗体による抗腫瘍効果の減弱³⁹⁾だけでなく、炎症反応の誘発⁴⁰⁾、宿主遺伝子への影響による癌化⁴¹⁾なども報告されており、安全性への配慮が必要である。一方、頭頸部領域については、直接穿刺や、経内視鏡的穿刺、頸部超音波ガイド下穿刺など、簡便・安全・低侵襲で正確な腫瘍内ウイルス投与が可能であり、理想的なターゲットであると考えられる。

1.4 センダイウイルス(Sendai virus, SeV)

センダイウイルスは (Sendai virus, SeV) は、1950 年代に日本で初めて分離されたマウスやラットを自然宿主とする呼吸器病ウイルスであり、パラミクソウイルス科ウイルスのマウスパラインフルエンザウイルス 1 型に分類される⁴²⁾。SeV のゲノム RNA は、ヌクレオカプシド蛋白 (N)、RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化蛋白 (P)、RNA ポリメラーゼのラージサブユニット (L)、ウイルス粒子構造を内側から維持するマトリックス蛋白 (M)、宿主細胞への侵入にかかわる膜融合 (Fusion(F)) 蛋白、結合にかかわる赤血球凝集/neuraminidase(HN)からなる (図 2A)。SeV は、DNA 相がなく生活環はすべて細胞質内にあることが最大の特徴であり、染色体との相互作用がないことから遺伝毒性が原理的になく、安全の面できわめて優れている。センダイウイルスの特徴として、①哺乳動物細胞膜上のほとんどに存在するシアル酸と結合し、細胞内にゲノムが導入されるため、多くの細胞腫、組織に遺伝子が導入されることが期待できる。②細胞への侵入が早く、短時間のウイルス感染により十分な発現が可能である。③導入細胞内ではゲノムの自律複製がおき、転写産物量の高発現が期待できる。④センダイウイルス自体、ヒトへの病原性の報告がない、⑤自然界でのウイルス遺伝子組み換えは報告されておらず、新規ウイルス誕生の心配がない、などの点が挙げられる⁴³⁾。我が国でも線維芽細胞増殖因子 2(fibroblast growth

factor 2: FGF-2)を搭載した非伝播型組み換え SeV ベクターを用いた重症虚血肢に対する臨床治験が行われたが、これまでにヒトへの重篤な副作用は報告されていない⁴⁴⁾。また、従来から用いられてきたアデノウイルスベクターにかわり、安全性の高い SeV ベクターを用いる iPS 細胞作製用ベクターとしても応用されている。HNSCC に対しても、c-myc 転写抑制因子 FIR (Far Upstream Element Binding protein Interacting Repressor) を搭載した非伝播型 F 欠失 SeV ベクターを用い、マウス皮下移植モデルにおいて高い遺伝子導入効率と抗腫瘍効果が示されている⁴⁵⁾。

一方、当初より SeV の持つ細胞融合活性が発見され、膜融合機構の解析、プロテアーゼ活性化による感染性の発現の解析などが行われている⁴⁵⁾。SeV の細胞融合活性には、ウイルスエンベロープ上の F 蛋白が重要な作用を担っている。すなわち、F 蛋白は、産生時は非活性であるが、特定のプロテアーゼによって切断活性化された後は、ウイルスエンベロープと宿主細胞の細胞膜とを融合させ、ウイルス RNA を細胞内へ侵入させる。この膜融合活性による細胞死を導く腫瘍溶解性ウイルスは、幅広い癌腫への適応性を持つ可能性があると考えられる。

1.5 uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルス

これまでに uPA 活性依存的に細胞膜融合を生じ、悪性腫瘍に対し殺細胞効果を発揮する新たな組み換え SeV (recombinant SeV: rSeV) が作製されている (図 2B)⁴⁷⁾⁴⁸⁾。この腫瘍溶解性 rSeV は以下の点の遺伝的変更点を特徴とする。① ウイルスエンベロープを内側から維持しウイルス粒子の形成と出芽に中心的な役割を担う matrix (M) 蛋白をコードする遺伝子を欠損させる。M 蛋白欠損遺伝子欠損センダイウイルスは、感染細胞において次世代のウイルス粒子を形成できず、合成されたウイルス蛋白 (F 蛋白や hemagglutinin/neuraminidase(HN)蛋白)

は細胞膜上に発現・蓄積される。② F 遺伝子のトリプシン感受性アミノ酸配列を、uPA 感受性アミノ酸配列に変更する。③ F 遺伝子の細胞質内ドメインを切り捨て、F 蛋白による細胞膜融合能を最大化する。前述のとおり悪性腫瘍は uPA を発現しているため、この uPA 活性依存的腫瘍溶解性 rSeV (rSeV/dMFct14(uPA2)、通称 “BioKnife”) は、腫瘍細胞に感染可能となり、抗腫瘍効果を示す。細胞に感染した BioKnife は、二次的なウイルス粒子は産生せずに、細胞膜上に F 蛋白を発現させる。隣接する細胞が腫瘍細胞であれば、細胞表面に発現する uPA 活性依存的に、次々と膜融合をおこし、多核巨細胞を形成し、腫瘍細胞特異的に殺傷する。一方隣接する細胞が正常細胞であれば、正常細胞は細胞表面に uPA を発現していないため、膜融合をきたさず、正常細胞を傷害しない。すなわち BioKnife は、正常細胞に障害を残さずに抗腫瘍効果が期待でき、治療後の機能温存が期待できる新しい腫瘍溶解性ウイルスである。BioKnife はこれまでに、glioblastoma や胸膜中皮腫の同所移植マウスモデルにおいて、抗腫瘍効果が示されている⁴⁹⁾
⁵⁰⁾。

HNSCC の治療を行う上で、根治性だけでなく、機能温存を追求することが重要である。BioKnife は機能温存が期待でき、かつ頭頸部領域の特異性から投与アプローチも容易なため、HNSCC に対する極めて有効な新規治療法になり得ると考えられる。

1.6 研究の目的

本研究では、頭頸部扁平上皮癌治療に対する新規治療法の開発を目的として、uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルスによるヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株に対する治療効果を検討する。

第2章 実験方法

2.1 細胞株

対象細胞株として、HO-1-u-1 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク、大阪、日本)、OSC-19 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク)、HSC-3 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク)、HSC-3-M3、FaDu (アメリカ培養細胞系保存機関、Manassas, VA, USA) の5つのヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株を使用した。HSC-3-M3はヒト舌癌由来であるHSC-3から作成された新たな細胞株であり、同所移植したヌードマウスモデルにおいてその90%に頸部リンパ節転移を認め(HSC-3は30%に頸部リンパ節転移を引き起こす)、非常に転移をきたしやすい細胞株であることが特徴である⁵¹⁾。HO-1-u-1、OSC-19にはDulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DNEM / F12) (Life Technologies、Carlsbad、CA、USA)を、HSC-3、HSC-3-M3、FaDuにはDulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies)を培養液として用い、各培養液には10%のウシ胎児血清(Thermo Fisher Scientific、Waltham、IL、USA)、およびペニシリン・ストレプトマイシン溶液(それぞれ100 units/ml Penicilin および 100 μ g/ml Streptomycin) (Life Technologies)を添加している。細胞培養は二酸化炭素5%、37 $^{\circ}$ C湿潤環境のインキュベーター内にて実施した。

2.2 uPA 活性測定

培養中の頭頸部扁平上皮癌細胞株をそれぞれ回収後、細胞数をカウントし96 well plateに 2.0×10^4 cells/wellを、各培地160 μ l/wellとともに播種した。5% CO₂、37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションし24時間後にuPA活性値を測定した。ECM 600、uPA activity assay kit (Merck Millipore、Darmstadt、Germany)を使用書の通り使用した。活性型uPAによって切断された発色基質の検出にはプレートリーダー

ー ARVO X3 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)を用いて 405 nm 光学密度を測定した。

2.3 uPA 活性依存的腫瘍溶解性ウイルス

今回の実験には、治療ウイルスである uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルス (BioKnife) およびコントロールウイルスである M 蛋白遺伝子欠損センダイウイルス (rSeV/ Δ M) を使用した。作成方法は先行論文の通りである⁴⁷⁾⁻⁵⁰⁾。実験には、レポーター遺伝子として Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子をコードした SeV/ Δ M (SeV/ Δ M-GFP)、BioKnife (BioKnife-GFP) を用いた。本研究で使用したウイルスはすべて共同研究施設である ID ファーマ社 (旧 DNAVEC 社、つくば) から提供を受け、使用まで - 80°C で保管した。

2.4 細胞の形態変化の経時的観察

各頭頸部扁平上皮癌細胞株について、 1×10^5 cells を 35 mm dish に播種し、24 時間後にウイルスをそれぞれ 1×10^6 cell infectious units (CIU) ずつ投与した。それぞれウイルス感染後 3 日目の細胞形態について、GFP 蛍光像を撮影した。蛍光顕微鏡写真は倒立型蛍光顕微鏡 AxioVision (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) を用いて撮影し、記録した。

またウイルス感染後の経時的細胞形態の変化を、培養細胞に対し、定点連続撮影を行った。HSC-3 細胞株 1×10^5 cells を 35 mm dish に播種し、24 時間後にウイルスを 1×10^6 CIU 投与した。以後蛍光顕微鏡 BZ8000 (キーエンス、大阪) を用い、37°C 湿潤環境下でインキュベートしつつウイルス感染後の細胞形態変化について定点観測を実施した。

2.5 殺細胞効果の測定

頭頸部扁平上皮癌細胞株 5 株を使用した。 3×10^3 cells/ 100μ l 培地/well を 96 well plate に播種した。24 時間培養後、播種細胞に対し multiplicity of infection (MOI) 0、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25 相当の BioKnife およびコントロールウイルスを投与した。ここで、MOI とは細胞 1 個に対するウイルスの数と定義する。ウイルス投与後 4 日後に Cell Counting Kit-8® (同仁堂、熊本) を使用書の通り用いた WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)] 試験を行い、相対的な生細胞数比を評価した。吸光度測定は ARVO X3 (PerkinElmer、MA、USA) を用いて 450 nm 光学密度を測定した。MOI 0 における細胞生存数を 100 % (陰性コントロール) とし、各ウイルスカ価の殺細胞効果 (%) を算出した。計算は次式を用いた。

$$\text{殺細胞効果 (\%)} = 1 - \frac{\text{(測定吸光度 - バックグラウンド吸光度)}}{\text{(陰性コントロール - バックグラウンド吸光度)}} \times 100$$

また、BioKnife における殺細胞効果が uPA 活性依存的であるかを検討するために頭頸部扁平上皮癌細胞株それぞれについて、uPA 阻害剤 PAI-1 を 25 μ g/ml で投与し投与した群と非投与群に分け、MOI 10 相当の BioKnife を感染させ 4 日後に殺細胞効果を測定した。

2.6 頭頸部扁平上皮癌マウス同所移植モデル

動物モデルの作製に当たり、5 齢週 BALB/c ノードマウス 雌 (日本 SLC、静岡) を用い、BioKnife 投与群、コントロールウイルス投与群、ハンクス平衡塩

溶液 (Hanks' Balanced Salt Solution、HBSS) (Life Technologies) 投与群の 3 群に分けて実施した。

すべての実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会 (承認番号: 14067) および遺伝子組換え DNA 実験安全委員会 (承認番号: 2014-18) の承認を得て、それぞれ防衛医科大学校動物実験規則、防衛医科大学校組換え DNA 実験安全管理規則に則り実施した。動物に対する各種処置及び飼育は、防衛医科大学校動物実験施設およびバイオセーフティーレベル 2 指定を受けた防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座第 3 研究室にて、長期飼育用餌 (CE-7) (日本クレア、東京) および水の自由摂取による通常環境下において管理された。マウスの全身麻酔にはケタミン (75 μ g/ マウス体重 g)、メドトジン (1.0 μ g/ マウス体重 g) およびリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline、PBS) の混合液の腹腔内注射法を用いた。

全身麻酔下のヌードマウスに対し、30 G 針を装着した Hamilton シリンジを用いて、左舌縁にヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3 (1×10^5 cells/10 μ l HBSS) を注入し移植した。腫瘍移植日より 7 日後に腫瘍径が 1.5 mm 以上に増大したマウスを使用し、腫瘍移植日より 7、14、21 日目の 3 回、舌腫瘍内にウイルス液 (1×10^6 CIU/dose) または HBSS 10 μ l/dose を 30 G 針を装着した Hamilton シリンジで緩徐かつ一定圧にて注入した。

BioKnife の同所移植モデルに対する抗腫瘍効果の検証を行うため、上述の同所移植モデルを作製した。ノギスにて腫瘍径の長軸 (D_1)、短軸 (D_2) を 3 日毎に測定し、腫瘍移植後 28 日目に犠牲死とするまでの腫瘍体積を測定し、各群間で比較した。腫瘍体積は、以下の公式を用いて、その近似値を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (近似値)} = D_1 D_2^2 / 2 \text{ (mm}^3\text{)}$$

BioKnife 同所移植モデルに対する生存期間の延長効果の検証を行うため、上述の同所移植モデルにおいて、体重を2日おきに測定し、体重減少が-20%を超えた時点、または腫瘍が自壊した時点で犠牲死として生存曲線を作成し、各群間で比較した。

2.7 抗腫瘍効果の機序の検討

頭頸部扁平上皮癌マウス同所移植モデルで使用したヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3 を使用して *in vitro* 実験で検討を行った。先行論文⁵⁰⁾で、BioKnife の殺細胞効果については、①uPA/uPAR system を介した細胞融合、多核巨細胞化に伴う細胞死、②カスパーゼ機構を介したアポトーシス⁵²⁾⁻⁵⁴⁾が報告されており、今回、アポトーシスの関与について検討した。

ヒト舌癌細胞株 (HSC-3) 1×10^5 cells を 35mm dish に播種し、24 時間後にウイルスを 1×10^6 CIU または PBS 10 μ l/dish を投与した (n = 3)。ウイルス感染後 3 日目に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、TMR Red (Roche Diagnostics、東京) による TUNEL 染色、DAPI (同仁堂、熊本) を用いて核染色を添付文書に従って行い、直ちに蛍光顕微鏡 BZ-X700 (キーエンス) にて観察した。定量的評価のため、各サンプル毎 2 ヶ所の関心領域を設定し、各領域毎の TUNEL 陽性細胞数を画像解析ソフト Image J version 1.51n (アメリカ国立衛生研究所、Bethesda、MD、USA) で解析し、比較検討した。

2.8 汎カスパーゼ阻害剤による殺細胞効果抑制

ヒト舌癌細胞株 HSC-3 を 3×10^3 cells/100 μ l 培地/well を 96 well plate に播種し、24 時間後に BioKnife MOI 10 および汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK

(Promega Corporation, WI, USA) 25 $\mu\text{mol/l}$ を同時に投与した。72 時間後に WST-8 assay を行い、無治療群を 100% 生存として算出した殺細胞効果について、BioKnife 群、BioKnife および Z-VAD-FMK 投与群間で比較検討した。

2.9 定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

BioKnife の腫瘍内投与に対する他臓器への移行性と安全性を確認するために、各臓器における GFP mRNA の発現量の検討を行った。左舌縁にヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3 (1×10^5 cells/ $10\mu\text{l}$ HBSS) を注入し移植した。腫瘍移植日より 7、10、13 日目の 3 回、舌腫瘍内に BioKnife-GFP (1×10^6 CIU/dose) または HBSS $10\mu\text{l}$ /dose 投与した同所移植モデルを使用し、腫瘍移植日より 16 日目（最終治療後 3 日目）に犠牲死とした。BioKnife-GFP 投与群の舌、血液、肝臓、腎臓を、HBSS 投与群の舌をそれぞれ摘出した。その後、直ちに小片として十分な量の RNA later 液 (Ambion, Austin, TX, USA) に浸透し 4°C で保存した。RNA 抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いた。使用したプライマーの配列は、GFP-F 5'-CGC ACC ATC TTC-3'、GFP-R 5'-GGT CTT TGC TCA GGG CGG ACT-3' である。プライマーはオリゴ発注システム (ファスマック、厚木) で購入した。One Step SYBR Prime Script RT-PCR (タカラバイオ、草津) と Thermal Cycler Dice Real time System II (タカラバイオ) を用いて real-time RT-PCR を行い mRNA レベルを測定した。すべての反応は同じ条件で 3 回行った。サーマルサイクラーの条件は、パターン 1 : 逆転写反応 : 42°C 5 分 95°C 10 秒、パターン 2 : PCR 反応 40 サイクル 95°C 5 秒 ; 60°C 30 秒、パターン 3 : 融解 95°C 15 秒。 60°C 30 秒、 95°C 15 秒とした。融解曲線解析により目的とする増幅産物が正しく得られているのか確認した。測定した SYBR Green I の蛍光強度を Light Cycler data analysis software TP 900 ver.4.02 20 (タカラバイオ、滋賀)

の $\Delta \Delta Ct$ 法で解析し、それぞれのサンプルの GAPDH の発現量で補正し、HBSS 投与群の舌腫瘍を基準に相対定量とした。

2.10 統計学的検討

実験結果の値は、平均 \pm 標準偏差または平均 \pm 標準誤差で表示した。統計学的検討には統計ソフト JMP 13.1.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。2 群間の比較には Mann-Whitney *U*-test を行った。生存曲線の作成は Kaplan-Meier 法を用い、2 群間の比較には Log-rank 検定を行った。5%以下を統計学的有意とした。

第3章 結果

3.1 頭頸部扁平上皮癌の uPA 活性値

はじめに、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株 5 株の uPA 活性値を測定することにより、HNSCC においても BioKnife の抗腫瘍効果が期待できるかを検討した (図 3)。全 5 株ともに uPA 活性を認めたが、各細胞株間で uPA 活性値に差がみられた (HO-1-u-1 4.36 ± 0.04 U/ml、OSC-19 3.31 ± 0.05 U/ml、HSC-3 4.35 ± 0.04 U/ml、HSC-3-M3 7.97 ± 0.02 U/ml、FaDu 1.80 ± 0.02 U/ml)。HSC-3-M3 は前述のとおり、HSC-3 の高転移株であるが、今回検討した HNSCC 5 株の中では最も活性値が高かった。一方、FaDu は最も低い活性値であった。

3.2 腫瘍溶解性センダイウイルスによる細胞融合

HNSCC 5 株それぞれについてウイルス投与 72 時間後の培養細胞の形態変化を GFP 蛍光顕微鏡にて観察した (図 4A)。コントロールウイルス投与群では、融合細胞は認めず細胞形態に変化は認めなかったが、BioKnife 投与群では巨大な細胞融合を認め、一部多核巨細胞も認めた。HNSCC 全 5 株で細胞融合を認めたものの、uPA 活性値の最も低い FaDu では巨細胞化はあまり認めなかった。

腫瘍細胞に対する BioKnife の治療効果の経時的変化を観察するために、定点観測による連続撮影を行った (図 4B)。当初 HSC-3 は勢いよく増殖するが、ウイルス感染 20 時間後ごろから細胞融合を認め、GFP 発現陽性の巨細胞形成が出現し周辺の細胞と融合を認めた。その後、多核巨細胞は、はじけるように急速に縮小、死滅し、細胞密度の低下を認めた。

3.3 頭頸部扁平上皮癌株に対する殺細胞効果

HNSCC 細胞株 5 株に対する BioKnife の殺細胞効果を *in vitro* で検討した (図

5A)。MOI 2.5 および MOI 25 における、Bioknife 殺細胞効果の平均はそれぞれ HO-1-u-1 48.8/76.6 %、OSC-19 42.5/60.0 %、HSC-3 63.1/86.1 %、HSC-3-M3 79.2/88.0 %、FaDu 42.8/66.0 %であり、いずれもコントロールウイルスと比べ有意に高い殺細胞効果を示した (いずれも $P < 0.05$)。また殺細胞効果は力価依存的であった。uPA 活性値の最も低い FaDu に対する殺細胞効果は、他の HNSCC 細胞株に比べ低い傾向にあった。またコントロールウイルスにおいても殺細胞効果があることが示された。

BioKnife の治療効果が uPA 活性依存的であることを確認するため、uPA 阻害薬である PAI-1 を投与し BioKnife の殺細胞性効果を検討した (図 5B)。PAI-1 の濃度は、先行論文と同濃度で検討を行った⁴⁹⁾。細胞株 HO-1-u-1、OSC-19、HSC-3、HSC-3-M3、FaDu のそれぞれにおいて、MOI 10 における PAI-1 (25 μ g/ml) 投与による Bioknife の殺細胞効果抑制はそれぞれ、11.1 %、18.9 %、24.9 %、15.7 %、7.7 %であり、uPA 活性値が最も低い FaDu 以外の HNSCC 細胞株で、PAI-1 により BioKnife の殺細胞性効果は有意に抑制された (いずれも $P < 0.05$)。これらの結果より、BioKnife の抗腫瘍効果は uPA 活性依存的であることが示された。

3.4 舌扁平上皮癌マウス同所移植モデルにおける抗腫瘍効果の検討

ヌードマウス同所移植モデルを作製し、HNSCC に対する BioKnife の治療効果を *in vivo* で検討した。細胞株は HSC-3 を使用した。より臨床的モデルに近づけるために舌腫瘍形成後の腫瘍移植 7 日目から、1 週間ごとの間隔でウイルス投与を行った。腫瘍移植 28 日目のマウスの舌腫瘍外観と腫瘍体積の経過を示す (図 6)。腫瘍は、HBSS 投与群では舌全体に浸潤していた。コントロールウイルス投与群では舌正中を超えて浸潤し、腫瘍辺縁に自壊する像を認めた。

BioKnife 投与群では、両群に比較し舌腫瘍の体積は有意に抑制され（いずれも $P < 0.05$ ）、抗腫瘍効果を認めた（HBSS 投与群 $36.1 \pm 14.4 \text{ mm}^3$ 、コントロールウイルス投与群 $36.6 \pm 4.0 \text{ mm}^3$ 、BioKnife 投与群 $18.4 \pm 6.6 \text{ mm}^3$ ）。BioKnife 投与群における舌腫瘍の体積は、HBSS 投与群、コントロールウイルス投与群の舌腫瘍の体積に比べ、投与開始 25 日後の状態ですべてそれぞれ 51.7%、56.3%に縮小し、また投与開始後 28 日後の状態ですべてそれぞれ 50.9%、50.2%にまで縮小していた。

上記と同様の同所移植モデルで、生存期間の延長に対する検討を行った。体重が 20%減少した時点を犠牲死の条件とした。腫瘍移植後からのマウスの体重変化、生存曲線を図に示す（図 7A、7B）。BioKnife 投与群は、HBSS 投与群およびコントロールウイルス投与群に対して生存期間を有意に延長した（HBSS 投与群 28.3 ± 2.7 日、コントロールウイルス投与群 35.0 ± 3.7 日、BioKnife 投与群 45.0 ± 6.2 日）（いずれも $P < 0.005$ ）。一方、コントロールウイルス投与群は、HBSS 投与群に対して、生存期間を有意に延長した（ $P < 0.05$ ）。HSC-3 は約 30%でリンパ節転移をきたすが、犠牲死とした時点で明らかな頸部の巨大転移や、肺、肝臓に腫瘤を形成した個体は認めず、今回の検討では、BioKnife の局所に対する治療効果を反映していた。

3.5 殺細胞効果の機序における検討

HNSCC に対する殺細胞効果をもたらす機序を明らかにするために、HSC-3 細胞株を用い、*in vitro* 実験で検討を行った。蛍光顕微鏡像では、巨細胞のみならず、巨細胞化をきたしていない感染細胞も TUNEL 染色が陽性となり、アポトーシスが誘導されていた（図 8A）。BioKnife 投与群では、TUNEL 染色陽性の細胞数が、ほかの 2 群と比較して有意に増加を認めた（図 8B）。TUNEL 陽性細胞数の平均値は PBS 群、コントロールウイルス投与群ではそれぞれ 17.3 個、22 個で

あったが、BioKnife 投与群では 140.2 個とそれぞれ 8.1 倍、6.4 倍に増加していた（いずれも $P < 0.005$ ）。次に、汎カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK を用い、アポトーシスを阻害したところ、BioKnife の抗腫瘍効果は、Z-VAD-FMK 投与により 36.2 % 低下した（ $P < 0.005$ ）（図 8C）。HNSCC に対する BioKnife の抗腫瘍効果には、アポトーシスの誘導が関与していることが示唆された。

3.6 安全性に関する検討

BioKnife の体内動態を検討するため、各種臓器における GFP mRNA の発現を qRT-PCR を用いて検討した。その結果、血液、肝臓、腎への移行は、局所投与された舌腫瘍の数百分の一の発現にとどまった（図 9）。すなわち、同所移植モデルにおいては、血液や肝臓、腎臓への移行性は極く微量であり、安全であると考えられた。

第4章 考察

本研究では、uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルス (BioKnife) による頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) に対する抗腫瘍効果を、*in vitro* および *in vivo* 実験において検証した。

本研究において、BioKnife の抗腫瘍効果は、uPA 活性依存的、力価依存的であった。すなわち、uPA 活性が最も高い値を示した HSC-3-M3 は、低力価から高い抗腫瘍効果を示し、一方、uPA 活性の最も低い値を示した FaDu は、感染 3 日後の蛍光顕微鏡像において細胞融合をほぼ認めず、他の HNSCC 細胞株と比較し、抗腫瘍効果は低かった。また、FaDu に対する BioKnife の殺細胞効果は、PAI-1 により抑制されなかった。この理由として、BioKnife は、感染細胞に隣接する細胞に uPA を発現してはじめて細胞融合を生じるように設計されているため、uPA 活性の低い FaDu においては、巨細胞化をきたしにくく細胞死に導く効率が低いためと考えられた。一方、BioKnife に感染した腫瘍細胞は、retinoic acid-inducible gene-1(RIG-1)や NF- κ B の活性化によって uPA を発現することが報告されている⁵⁰⁾ことから、BioKnife を複数回投与することで、FaDu のような uPA が低値の腫瘍細胞でも、より大きな抗腫瘍効果が得られることができると予想される。

第1章の1.2で述べたとおり、HNSCCにおいてuPAは、細胞膜受容体であるuPAR、PAIおよびプラスミンとともにPA systemを構築しており、高発現している¹⁶⁾。これらは相互に作用して腫瘍の増殖、遊走、浸潤、転移に関係しており、uPAが高発現をしているHNSCCは、一般に、T分類が大きい、分化度が低い、リンパ節転移をきたしているなど、予後が悪いとされている²²⁾²⁷⁾。また口腔癌においては、喫煙による前癌病変および悪性腫瘍においてuPA発現が誘導されることも報告されている⁵⁵⁾。放射線や活性酸素への暴露によっても、HNSCCにおいてuPAの発現が誘導される⁵⁶⁾など、PA systemは薬剤抵抗性や放射線治療

抵抗性に關与する。これらのことより uPA は HNSCC に対する予後因子としての Biomarker となるだけでなく、新規治療標的となり得ると考えられる。すなわち、uPA 活性依存的な腫瘍溶解性ウイルスである BioKnife は、放射線治療との相乗効果が期待できることに加え、放射線治療後の再発や残存癌など現在の標準治療では根治できなかった病変に対しても、有効な治療効果をもたらすことが予想される。

本研究における舌癌同所移植モデルに対する治療は、マウスの生存期間を有意に延長した。これまでの BioKnife における先行論文では、3 日毎にウイルスの投与を行っていた^{49) 50)}が、今回の我々の検討では、7 日毎にウイルスを投与したところ、腫瘍体積の縮小や生存期間の延長など高い抗腫瘍効果が得られた。7 日毎の投与間隔は、より実臨床に近く、投与間隔からの面からも極めて低侵襲であると考えられる。しかしながら、腫瘍の uPA 活性が低い場合は、7 日毎の投与では腫瘍制御が得られない可能性もある。BioKnife を胸膜中皮腫同所移植モデルに投与した場合、単回投与より 3 日毎に 3 回投与が、さらには 3 日毎に 6 回まで投与を行い治療効果の向上を得たことを報告している⁵⁰⁾。すなわち、腫瘍毎の uPA 活性によって、よりよい投与間隔や投与回数を選定する必要がある。頭頸部領域は、体表から近く腫瘍へのアプローチが極めて容易な領域である。頭頸部腫瘍に対するウイルスの投与は、直接穿刺または内視鏡下穿刺、エコーガイド下穿刺による投与など比較的 low-injury で正確な投与が可能であり、本ウイルスは HNSCC に対する新規治療として期待される。

本研究では、HNSCC に対する BioKnife の抗腫瘍効果の機序について、アポトーシスの関与を検討した。これまで、SeV は感染細胞に対してカスパーゼ機構を介したアポトーシスを誘導することが報告されている⁵²⁾⁻⁵⁴⁾。本研究においても *In vitro* 実験において、BioKnife 投与群では TUNEL 陽性細胞が有意に増加した。ま

た、汎カスパーゼ阻害剤によって殺細胞効果が抑制されたことから、HNSCCにおいても、アポトーシスの誘導が BioKnife の殺細胞機序として関与していることが示唆された。

BioKnife 投与群では、多核巨細胞だけでなく、細胞融合をきたしていない腫瘍細胞においても TUNEL 陽性細胞を認めたものの、コントロールウイルス投与群においては、PBS 投与群と比較して TUNEL 陽性細胞数に有意な差を認めなかった。これらについては、BioKnife が何らかの機序を介してアポトーシスを効果的に誘導していることが示唆された。今後、BioKnife による殺細胞機序には更なる検討が必要である。

HNSCC に対する腫瘍溶解性ウイルスによる治療は、これまで、ヘルペスウイルス、レオウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、ワクシニアウイルスなどを使用したものが報告されている⁵⁷⁾。一般に DNA ウイルスは遺伝子操作を行いやすく頻繁に利用されているものの、遺伝毒性を引き起こす可能性を秘めている。今回我々が注目した SeV は、ウイルス RNA が細胞質にとどまり宿主染色体との相互作用がないことから遺伝毒性が原理的にない極めて安全性の高いことが大きな特徴である。我が国では、下肢虚血性疾患に対する SeV ベクターを用いた遺伝子治療が臨床試験でおこなわれているが、感染や炎症なども含めて重大な副作用は報告されていない⁴⁴⁾。本研究では、BioKnife の特性上、腫瘍内への局所注入を行ったが、各臓器において GFP mRNA の発現は極く少量であり、また投与による副反応も認めなかったことから、腫瘍溶解性ウイルスとしての SeV も安全で有効な治療法として期待できる。

本研究での *in vitro* および *in vivo* 実験において、BioKnife は HNSCC に対して高い抗腫瘍効果を示し、*in vivo* 実験では、生存期間を有意に延長した。しかしながら、BioKnife 単独投与によって完全寛解は得られておらず、より高い治療効果

を得るために他の治療法との併用療法を検討する必要がある。前述のとおり、BioKnife の治療標的が腫瘍細胞の uPA 活性であるという面から考察すると、HNSCC の標準療法である放射線治療との併用療法は、より高い治療効果を生む可能性がある。また、断端が近接した根治切除後に BioKnife を投与することで、断端再発を抑制する効果も期待し得る。腫瘍溶解性ウイルス療法としての面から考察すると、腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍効果はこれまでの治療法とは異なる機序で抗腫瘍効果を示すため、既存の治療法と併用することで高い治療効果が期待できる。併用療法についてはいくつかの臨床試験もすでに行われている。再発または転移 HNSCC に対する化学療法 (paclitaxel、carboplatin) への活性化 Ras 依存的腫瘍溶解性レオウイルス (Reolysin®) の上乗せ効果の検討では、化学療法単独群と比較して、Reolysin 併用療法群が粗生存率を有意に延長させた⁵⁸⁾。

また、腫瘍溶解性ウイルスは、直接的な抗腫瘍効果だけでなく、その腫瘍破壊過程において宿主の抗腫瘍免疫が誘導され、賦活化することにより、遠隔転移病変に対しても抗腫瘍効果を引き起こすとされている⁵⁹⁾⁻⁶¹⁾。悪性黒色腫において、免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体との併用で有意に治療効果を増強したことが報告されている⁶²⁾。BioKnife においても他の腫瘍溶解性ウイルスと同様に、局所に腫瘍内投与を行うことにより宿主の抗腫瘍免疫が賦活化し、遠隔転移や潜在的な転移に対する抗腫瘍効果を持つ可能性がある。BioKnife については、従来の治療法と併用することで抗腫瘍効果が増強する可能性があるが、まだまだ未知数な点も多く、さらなる検討が必要である。

最後に、本研究結果が今後の頭頸部癌治療における新たな礎となり、BioKnife が HNSCC 治療の選択肢の一つとして近い将来に臨床応用される事を願ってやまない。

第5章 結論

今回我々は、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）に対する uPA 活性依存的腫瘍溶解性ウイルス（BioKnife）の治療効果を、*in vitro* および *in vivo* 実験において検証した。ヒト HNSCC 細胞株は uPA 活性を示し、BioKnife によって、細胞融合、多核巨細胞化が引き起こされ、細胞死が誘導された。また、BioKnife による抗腫瘍効果は、uPA 活性依存的、濃度依存的であることが *in vitro* 実験で示された。ヒト舌癌ヌードマウス同所移植モデルにおいて、BioKnife による抗腫瘍効果は対照群と比較して有意に高く、生存期間を有意に延長した。HNSCC に対する BioKnife の抗腫瘍効果の機序として、アポトーシス誘導が関与していることが示唆された。今後は、抗癌剤や放射線治療など他の因子と BioKnife による HNSCC への相乗効果を検証していく必要があるものの、uPA を標的とした BioKnife による腫瘍溶解性ウイルス療法は、HNSCC に対する有効な新規治療法となり得る。

第6章 謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座塩谷彰浩教授および細部にわたり直接研究のご指導を頂きました北里大学耳鼻咽喉科学教室 山下拓教授（前 防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座准教授）、防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座荒木幸仁准教授に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました東邦大学大学院外科学講座一般・消化器外科学分野および臨床腫瘍学講座島田英昭教授、株式会社 ID ファーマ 井上誠先生、上田泰次先生、そして防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座教室員の皆様に深く感謝の意を表します。

付記

本研究の一部は防衛医科大学校特別研究費、文部科学省研究費基盤 (C) (No. 17K11415、26462626 および 26462627)、および挑戦的萌芽研究費 (No. 16K15726) により実施した。

本研究の一部は下記の学会において発表した。

- ・ 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology U40 Symposium (2015年6月、神戸)
- ・ The American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation The 2017 Annual Meeting & OTO Experience (2017年9月、シカゴ、イリノイ州、米国)

引用文献

1. Maruthappu M, Head MG, Zhou CD, Gilbert BJ, El-Harasis MA, Raine R, Fitchett JR, Atun R. Investments in cancer research awarded to UK institutions and the global burden of cancer 2000-2013: a systematic analysis. *BMJ Open*. 2017; 20;7:e013936.
2. World Health Organization. International Agency for Research in Cancer. Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012. 2013. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
3. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Boyle P. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J of Cancer*. 2008;122:155–164.
4. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, et al. Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev*. 2006;15:696–703.
5. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988;48:3282–3287.
6. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011; 29:4294–4301.
7. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D'Souza G, Gravitt PE, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9–10, 2008, Washington, D.C. *Head and Neck* 2009;31:1393–1422.
8. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factors profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type-16 negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:407–420
9. Chien YC, Chen JY, Liu MY, Yang HI, Hsu MM, Chen CJ, et al. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Eng J Med*. 2001; 345:1877–1882.

10. Licitra L, Mesia R, Keilholz U. Individualised quality of life as a measure to guide treatment choices in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2016;52:18-23
11. Chaikhoutdinov I, Goldenberg D. Impact of genetic targets on therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Exp Med Biol.* 2013;779:165-177
12. Leon X, Martinez V, Lopez M, Garcia J, Venegas Mdel P, Esteller E, Quer M. Second, third, and fourth head and neck tumors. A progressive decrease in survival. *Head Neck.* 2012;34:1716–1719.
13. Gourin CG, Podolsky RH. Racial disparities in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2006;116:1093-1106.
14. Li D, Guang W, Abuzeid WM, Roy S, Gao GP, Sauk JJ, et al. Novel adenoviral gene delivery system targeted against head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2008;118:650-658.
15. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF, et al. Long-term results of RTOG 91-11 : a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31:845-852.
16. Pavón MA, Arroyo-Solera I, Céspedes MV, Casanova I, León X, Mangues R. uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Oncotarget.* 2016;7:57351-57366
17. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer.* 1997;72:1–22.
18. McMahon BJ, Kwaan HC. Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2015;867:145–156.
19. Strojjan P, Budihna M, Smid L, Vrhovec I, Skrk J. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in tissue and serum of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Eur J Cancer.* 1998;34:1193-1197
20. Shi Z, Stack MS. Urinary-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in

squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Biochem J.* 2007;407:153–159.

21. Petruzzelli GJ, Snyderman CH, Johnson JT. In vitro urokinase type plasminogen activator levels and total plasminogen activator activity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;120:989–992.
22. Nozaki S, Endo Y, Kawashiri S, Nakagawa K, Yamamoto E, Yonemura Y, Sasaki T. Immunohistochemical localization of a urokinase-type plasminogen activator system in squamous cell carcinoma of the oral cavity: association with mode of invasion and lymph node metastasis. *Oral Oncol.* 1998;34:58–62.
23. Aguirre Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol.* 1999;147:89–104.
24. Aguirre Ghiso JA. Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene.* 2002;21:2513–2524
25. Gonias SL, Hu J. Urokinase receptor and resistance to targeted anticancer agents. *Front Pharmacol.* 2015;6:154.
26. Lee YC, Yu CC, Lan C, Lee CH, Lee HT, Kuo YL, Wang PH, Chang WW. Plasminogen activator inhibitor-1 as regulator of tumor-initiating cell properties in head and neck cancers. *Head Neck.* 2016 ;38 Suppl 1:E895-904.
27. Pasini FS, Brentani MM, Kowalski LP, Federico MH. Transforming growth factor beta1, urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in head and neck squamous carcinoma and normal adjacent mucosa. *Head Neck.* 2001;23:725–732.
28. Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, Campbell CM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2005;113:789–797.
29. Schmidt M, Schler G, Gruensfelder P, Müller J, Hoppe F. Urokinase receptor up-regulation

- in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2000;22:498-504.
30. Liu S, Aaronson H, Mitola DJ, Leppla SH, Bugge TH. Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:657-662.
 31. Russell SJ, Peng KW. Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28:326-333.
 32. Larson C, Oronsky B, Scicinski J, Fanger GR, Stirn M, Oronsky A, et al. Going viral: a review of replication-selective oncolytic adenoviruses. *Oncotarget*. 2015;6:19976-19989.
 33. Huebner RJ, Rowe WP, Schatten WE, Smith RR, Thomas LB. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer*. 1956;9:1211-1218.
 34. Hoster HA, Zanes RP Jr, Von Haam E. Studies in Hodgkin's syndrome; the association of viral hepatitis and Hodgkin's disease; a preliminary report. *Cancer Res*. 1949;9:473-480.
 35. Kelly E, Russell SJ. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther*. 2007;15:651-659.
 36. Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*. 1991;252:854-856.
 37. Johnson DB, Puzanov I, Kelley MC. Talimogene laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma. *Immunotherapy*. 2015;7:611-619.
 38. Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:298-300.
 39. Gong J, Sachdev E, Mita AC, Mita MM. Clinical development of reovirus for cancer therapy: An oncolytic virus with immune-mediated antitumor activity. *World J Methodol*. 2016;6:25-42.
 40. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80:148-158.

41. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008;118:3132-3142.
42. Nagai Y, Kato A. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbiol. Immunol. Microbiol Immunol.* 1999;43:613-624.
43. 飯田 章博. センダイウイルスベクター：ベクター開発と医療・バイオ分野への応用. *ウイルス* 2007;57:29-36
44. Yonemitsu Y, Matsumoto T, Itoh H, Okazaki J, Uchiyama M, Yoshida K, et al. DVC1-0101 to treat peripheral arterial disease: a Phase I/IIa open-label dose-escalation clinical trial. *Mol Ther.* 2013;21:707-714.
45. Tanaka N, Araki K, Mizokami D, Miyagawa Y, Yamashita T, Tomifuji M, et al. Sendai virus-mediated gene transfer of the c-myc suppressor far-upstream element-binding protein-interacting repressor suppresses head and neck cancer. *Gene Ther.* 2015 Apr;22:297-304.
46. Ishida N, Homma M. Sendai virus. *Adv.Virus Res.*1990;23:131-140.
47. Kinoh H, Inoue M, Komaru A, Ueda Y, Hasegawa M, Yonemitsu Y. Generation of optimized and urokinase-targeted oncolytic Sendai virus vectors applicable for various human malignancies. *Gene Ther.* 2009;16:392-403.
48. Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Kanaya T, Shirakura M, Tokusumi T, et al. A new Sendai virus vector deficient in the matrix gene does not form virus particles and shows extensive cell-to-cell spreading. *J Virol.* 2003;77:6419-6429.
49. Hasegawa Y, Kinoh H, Iwadate Y, Onimaru M, Ueda Y, Harada Y, et al. Urokinase-targeted fusion by oncolytic Sendai virus eradicates orthotopic glioblastomas by pronounced synergy with interferon- β gene. *Mol Ther.* 2010;18:1778-1786.
50. Morodomi Y, Yano T, Kinoh H, Harada Y, Saito S, Kyuragi R, et al. BioKnife, a uPA activity-dependent oncolytic Sendai virus, eliminates pleural spread of malignant mesothelioma via simultaneous stimulation of uPA expression. *Mol Ther.* 2012;20:769-777.

51. Matsui T, Ota T, Ueda Y, Tanino M, Odashima S. Isolation of a highly metastatic cell line to lymph node in human oral squamous cell carcinoma by orthotopic implantation in nude mice. *Oral Oncol.* 1998;34:253-256.
52. Zhang Q, Zhu H, Xu X, Li L, Tan H, Cai X. Inactivated Sendai virus induces apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465:64-70.
53. Bitzer M, Prinz F, Bauer M, Spiegel M, Neubert WJ, Gregor M, et al. Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32). *J Virol.* 1999;73:702-708.
54. Shi LY, Han Z, Li XX, Li M, Han H, Chen J, Zang S, et al. Inactivated Sendai virus strain Tianjin induces apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by promoting caspase activation and Fas/FasL expression. *Cancer Biother Radiopharm.* 2015;30:33-40.
55. Du B, Leung H, Khan KM, Miller CG, Subbaramaiah K, Falcone DJ, et al. Tobacco smoke induces urokinase-type plasminogen activator and cell invasiveness: evidence for an epidermal growth factor receptor dependent mechanism. *Cancer Res.* 2007;67:8966-8972.
56. Schilling D, Bayer C, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Pruschy M, Mengers K, et al. Induction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) by hypoxia and irradiation in human head and neck carcinoma cell lines. *BMC Cancer.* 2007;7:143.
57. Shilpa P, Kaul R, Bhat S, Sultana N, Pandeshwar P. Oncolytic viruses in head and neck cancer: a new ray of hope in the management protocol. *Ann Med Health Sci Res.* 2014;4:S178-84.
58. Gong J, Sachdev E, Mita AC, Mita MM. Clinical development of reovirus for cancer therapy: An oncolytic virus with immune-mediated antitumor activity. *World J Methodol.* 2016;6:25-42
59. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016;107:1373-1379
60. Todo T, Rabkin SD, Sundaresan P, Wu A, Meehan KR, Herscowitz HB, et al. Systemic

antitumor immunity in experimental brain tumor therapy using a multimutated, replication-competent herpes simplex virus. *Hum Gene Ther.* 1999;10:2741-2755.

61. Todo T, Rabkin SD, Chahlavi A, Martuza RL. Corticosteroid administration does not affect viral oncolytic activity, but inhibits antitumor immunity in replication-competent herpes simplex virus tumor therapy. *Hum Gene Ther.* 1999;10:2869-2878.
62. Rajani K, Parrish C, Kottke T, Thompson J, Zaidi S, Ilett L, et al. Combination therapy with reovirus and anti-PD-1 blockade controls tumor growth through innate and adaptive immune responses. *Mol Ther.* 2016;24:166-174.

図 1

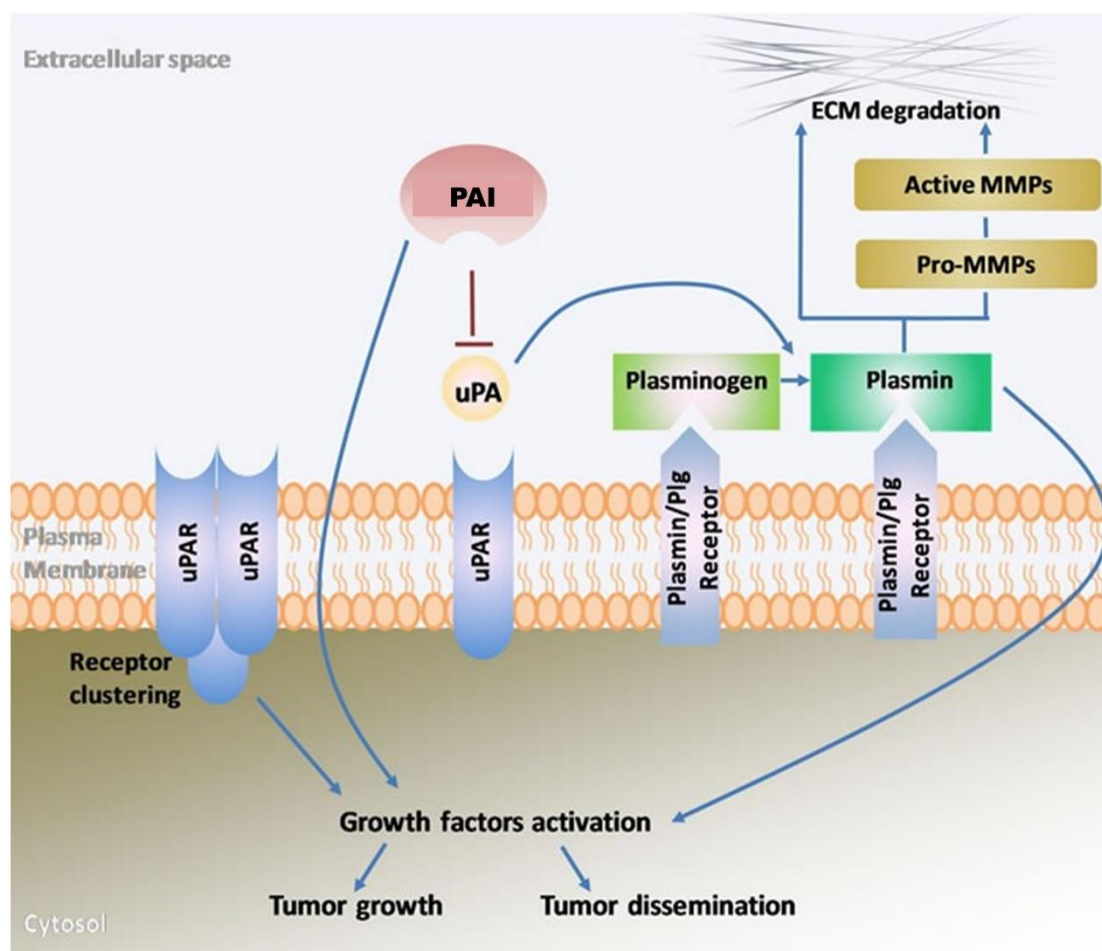
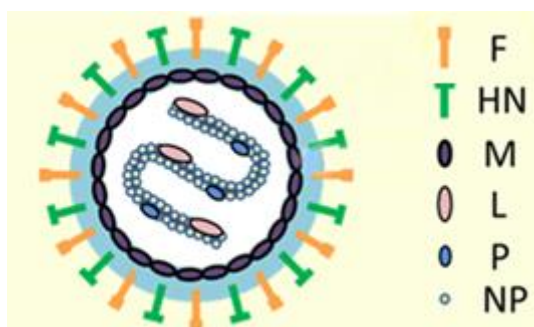


図 1 悪性腫瘍における plasminogen activator system (PA system) の模式図
uPA、細胞膜受容体である uPAR、plasminogen activator inhibitor (PAI)、
およびプラスミンと PA system を構築している。これらは相互作用をきたしつ
つ、細胞外基質の分解や、細胞内シグナル伝達による細胞増殖に関与する。
*引用文献 16 より改変

図 2

A



- NP: 核外被 (ヌクレオカプシド) 蛋白質
- P: RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化蛋白質
- M: 粒子構造を裏打ちするマトリックス蛋白質
- F: 宿主細胞への侵入にかかわる膜融合蛋白質
- HN: シアル酸への結合にかかわる赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ
- L: RNA ポリメラーゼの大サブユニットであるラージ蛋白質

B

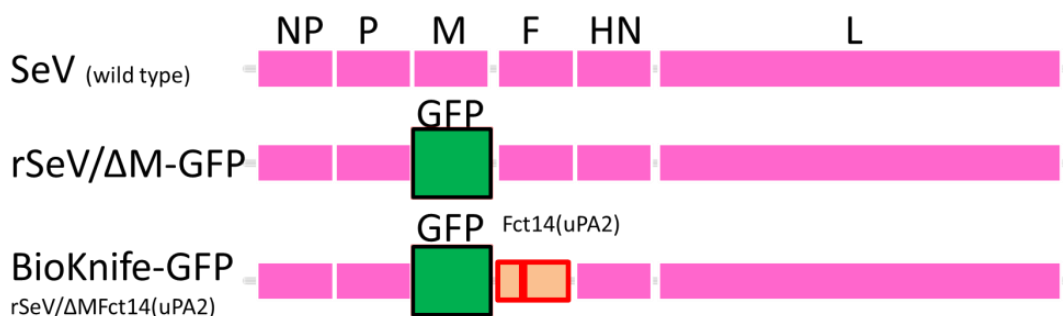


図 2 センダイウイルス (SeV) 粒子と組み換えセンダイウイルスのゲノム構造
(A) SeV 粒子構造。*引用文献 43 より改変。

(B) 野生型 SeV、コントロールウイルス (rSeV/dM)、uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルス ((rSeV/dMFct14(uPA2)、通称 “BioKnife”)) のゲノム構造。野生型に対してそれぞれ下記の改変が加えられている。

コントロールウイルス: M 蛋白を欠損させ、GFP 遺伝子を挿入。

BioKnife: ①M 蛋白を欠損させ、GFP 遺伝子を挿入。②F 遺伝子のトリプシン感受性アミノ酸配列を、uPA 感受性アミノ酸配列に変更する。③F 遺伝子の細胞質内ドメインを切り捨て、F 蛋白による細胞膜融合能を最大化する。

図 3

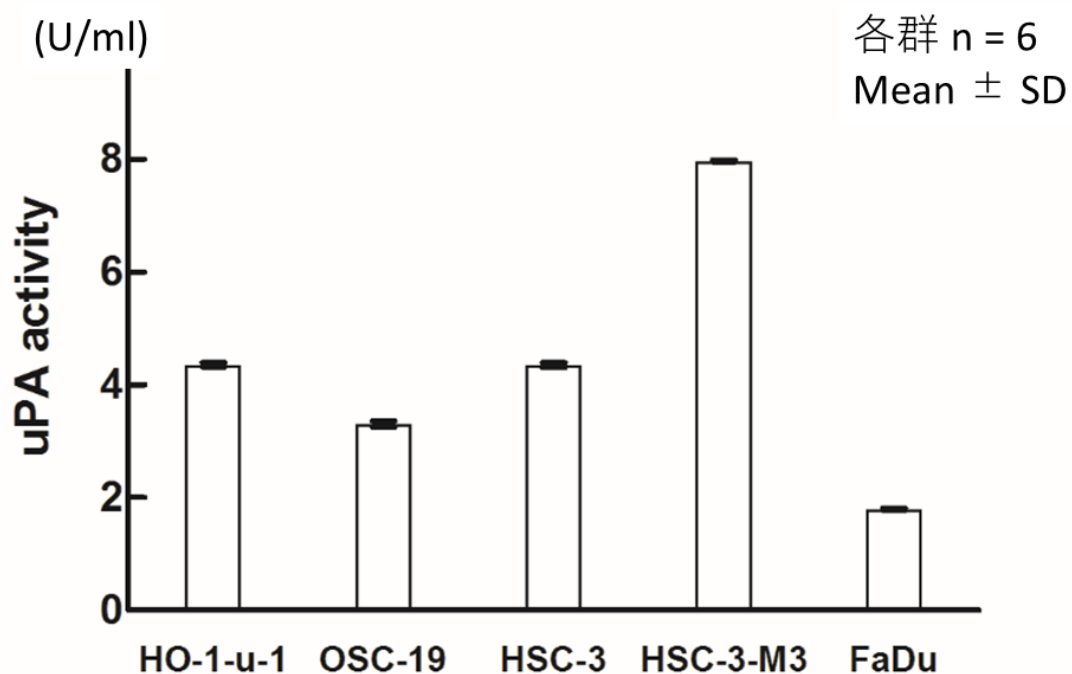
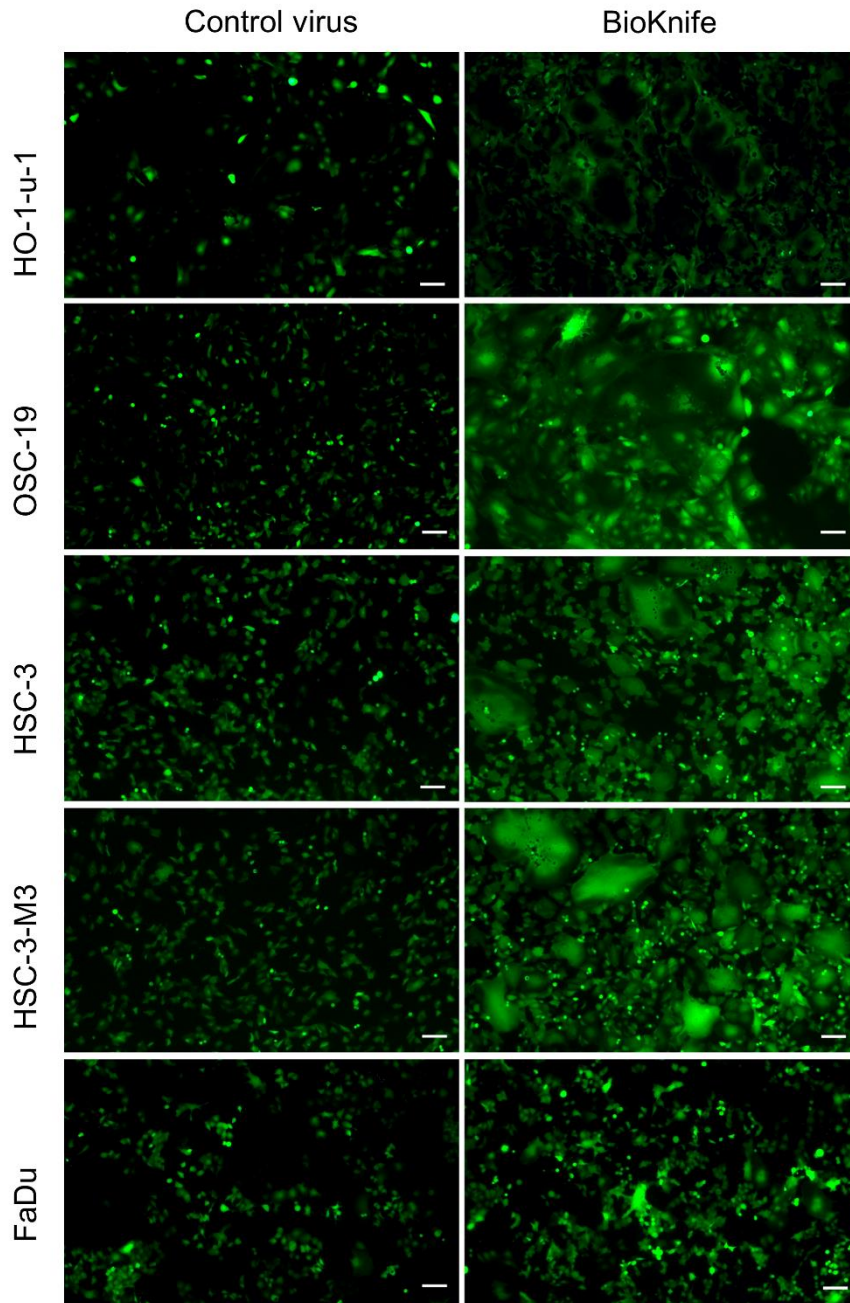


図 3 頭頸部扁平上皮癌細胞株における uPA 活性値

ヒト由来の頭頸部扁平上皮癌細胞株はいずれも uPA 活性を認めたが、各細胞株間で uPA 活性値に差がみられ HSC-3 の高転移株である HSC-3-M3 が、最も活性が高かった。

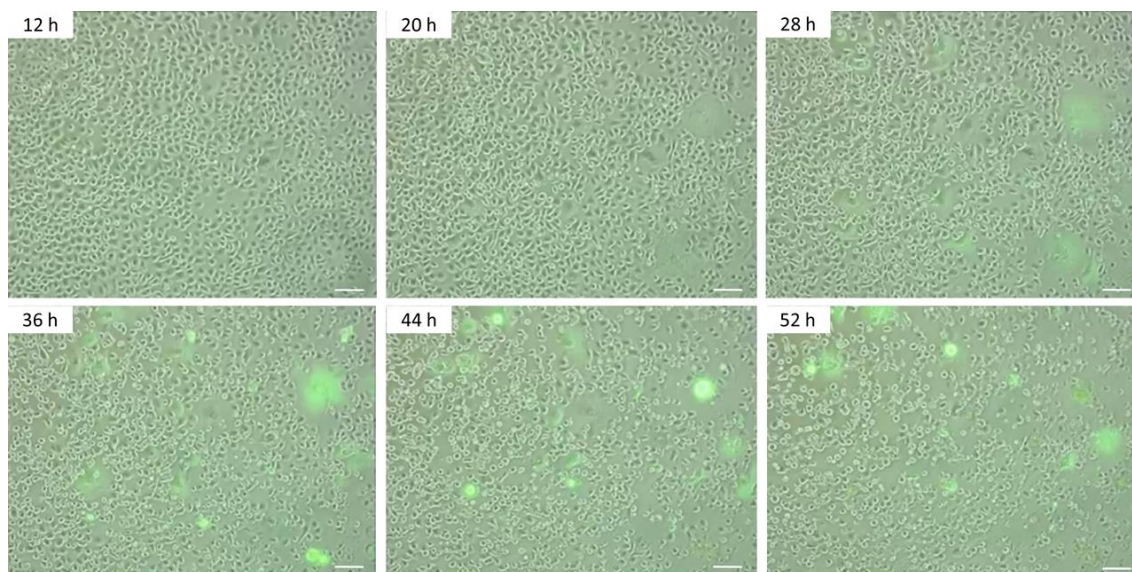
SD: standard deviation

図 4
A



各細胞株ウイルス感染後72時間
GFP蛍光像
Bar = 100 μ m

B



重ね合わせ画像
(位相差+GFP蛍光像)
Bar = 100 μ m

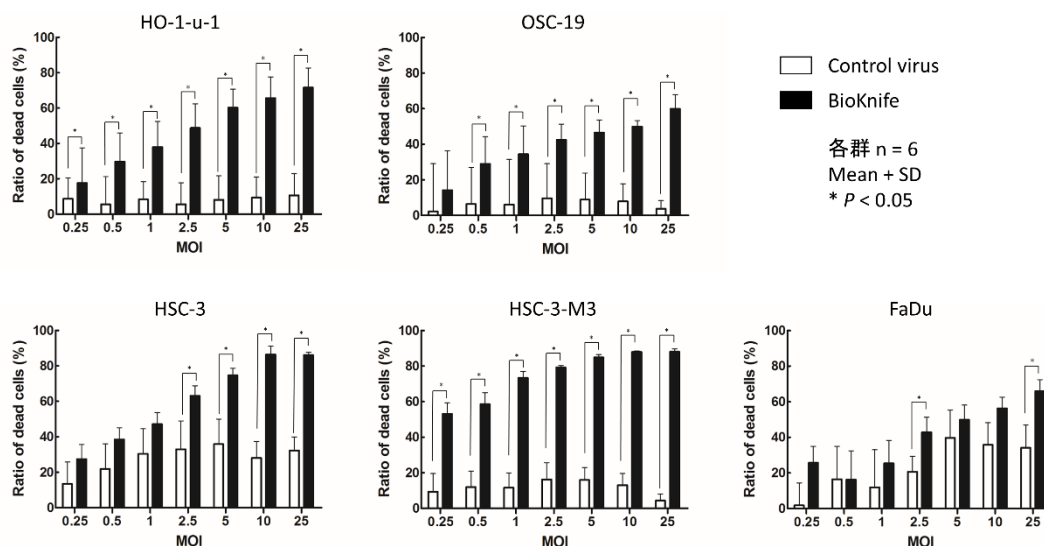
図4 ウイルス感染後のヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株の経時的変化

(A) いずれの頭頸部扁平上皮癌細胞株においても BioKnife 投与後に多核巨細胞を認める。下咽頭癌細胞株 (FaDu) においては、他の細胞株に比べ巨細胞の出現数が少ない。

(B) 舌癌細胞株 (HSC-3) に対する BioKnife 投与後の定点観測による連続撮影。数字はウイルス感染後の経過時間 (時間)。当初 HSC-3 は勢いよく増殖するが、ウイルス感染 20 時間後ごろから細胞融合を認め GFP 発現陽性の巨細胞形成が出現し始める。その後巨細胞は、はじけるように急速に縮小し、細胞密度の低下を認める。

図 5

A



B

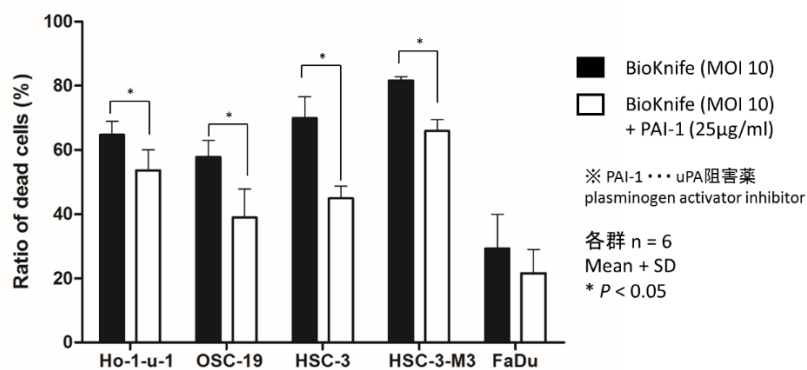


図 5 ヒト頭頸部扁平上皮癌に対する BioKnife の殺細胞効果

(A) BioKnife はコントロールウイルスと比べ高い殺細胞効果を示した。また殺細胞効果は濃度依存的であった。下咽頭癌細胞株 (FaDu) に対する殺細胞効果は、他の細胞株に比べ低い傾向であった。

(B) uPA 阻害薬 PAI-1 による BioKnife の殺細胞性効果の抑制効果の検討。uPA 活性が最も低値である FaDu 以外の頭頸部扁平上皮癌細胞株では、BioKnife の殺細胞性効果は、PAI-1 により有意に抑制された。

MOI: multiplicity of infection, SD: standard deviation

図 6

A



B

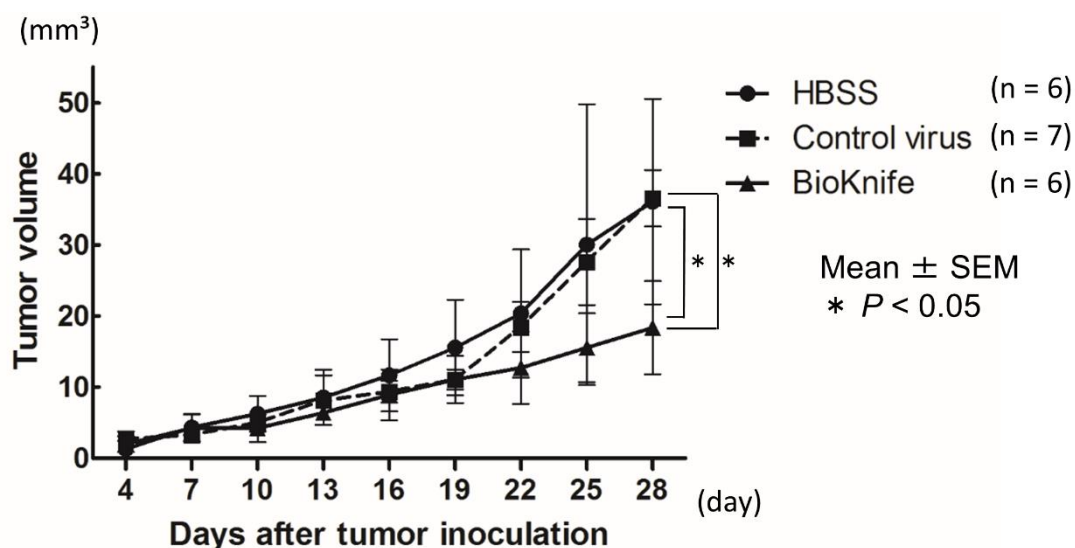


図 6 舌扁平上皮癌ヌードマウス同所移植モデルによる抗腫瘍効果の検討

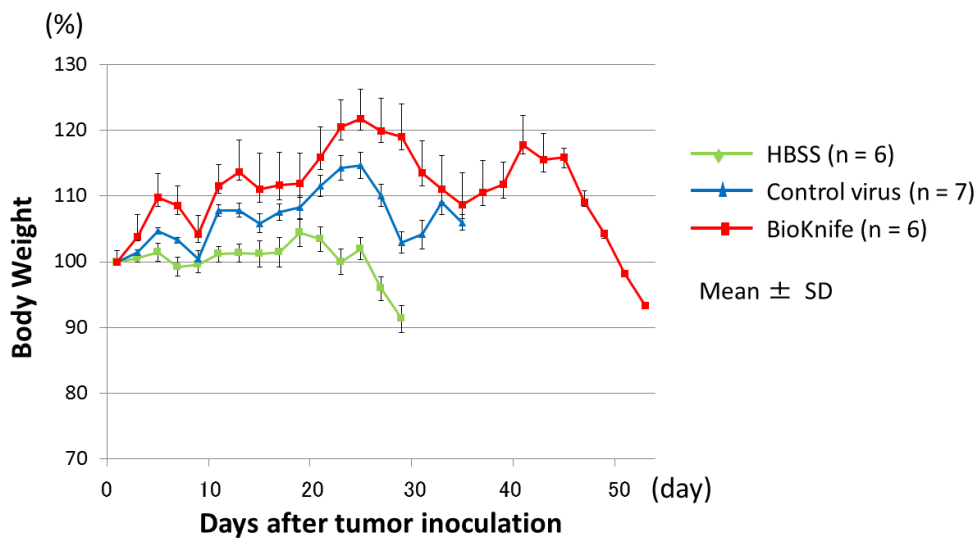
(A) 腫瘍 (HSC-3、 1×10^5 cells) 移植後 28 日目のヌードマウス同所移植モデルの舌腫瘍の外観。HBSS 投与群は舌全体に浸潤している。Control virus 投与群は舌正中を超えて浸潤し、辺縁に潰瘍性病変を認める。BioKnife 群は、両群に比較し腫瘍体積は小さかった。

(B) ヌードマウス同所移植モデルにおける腫瘍体積の経時的変化。BioKnife 投与群では、他の 2 群に比較し、腫瘍体積の増大が有意に抑制された (いずれも $P < 0.05$)。

HBSS: Hanks' balanced salt solution, SEM: standard error of the mean

図 7

A



B

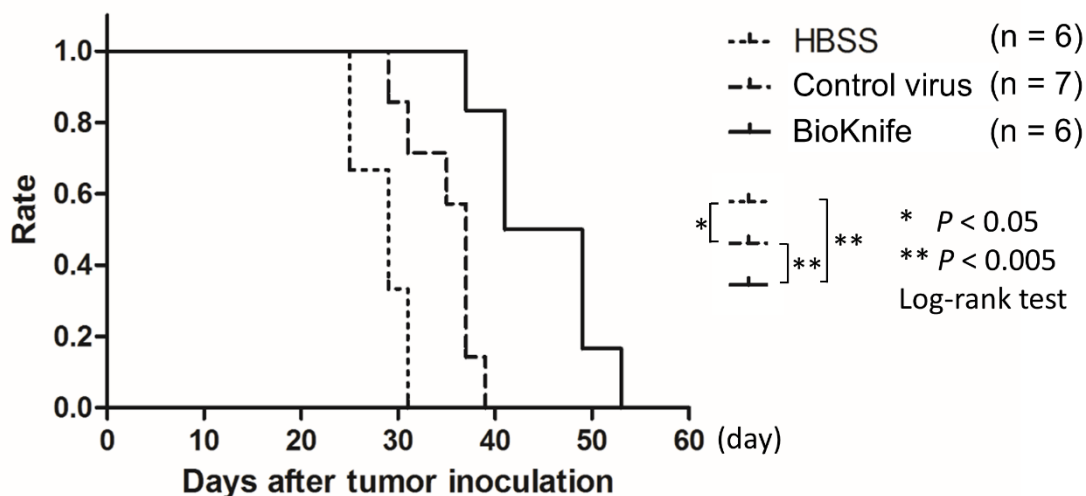


図 7 舌扁平上皮癌マウス同所移植モデルにおける生存期間延長への検討

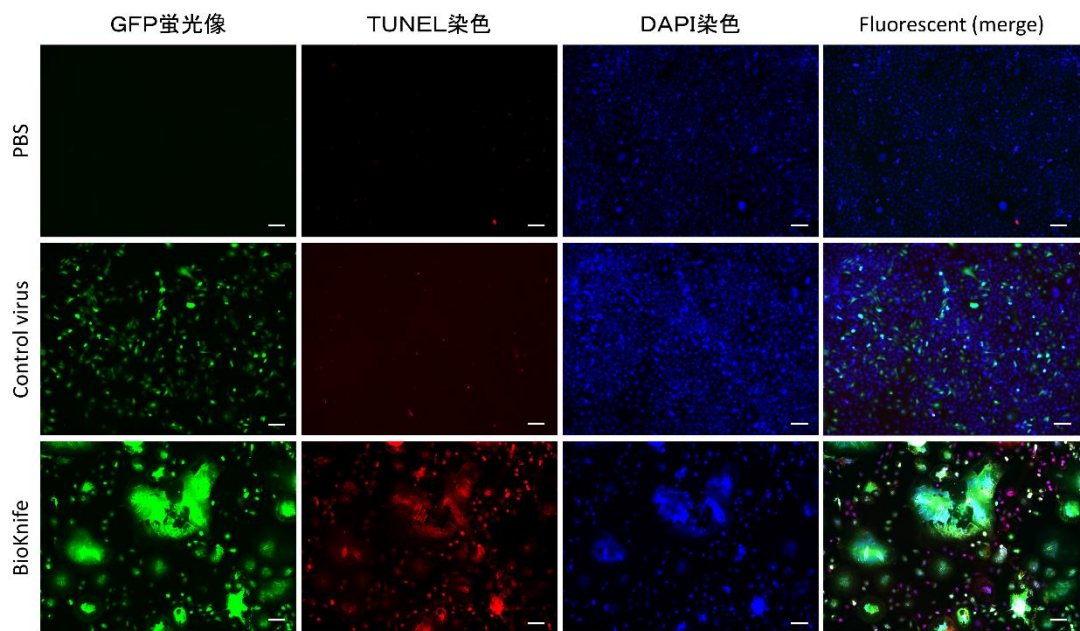
(A) 腫瘍 (HSC-3、 1×10^5 cells) 移植後の同所移植モデルにおける体重変化の割合。

(B) 生存曲線 (Kaplan-Meier 法)。BioKnife 投与群は、HBSS 投与群およびコントロールウイルス投与群に対して生存期間を有意に延長した (それぞれ $P < 0.005$)。一方、コントロールウイルス投与群は、HBSS 投与群に対して、生存期間を有意に延長した ($P < 0.05$)。

HBSS: Hanks' balanced salt solution, SD: standard deviation

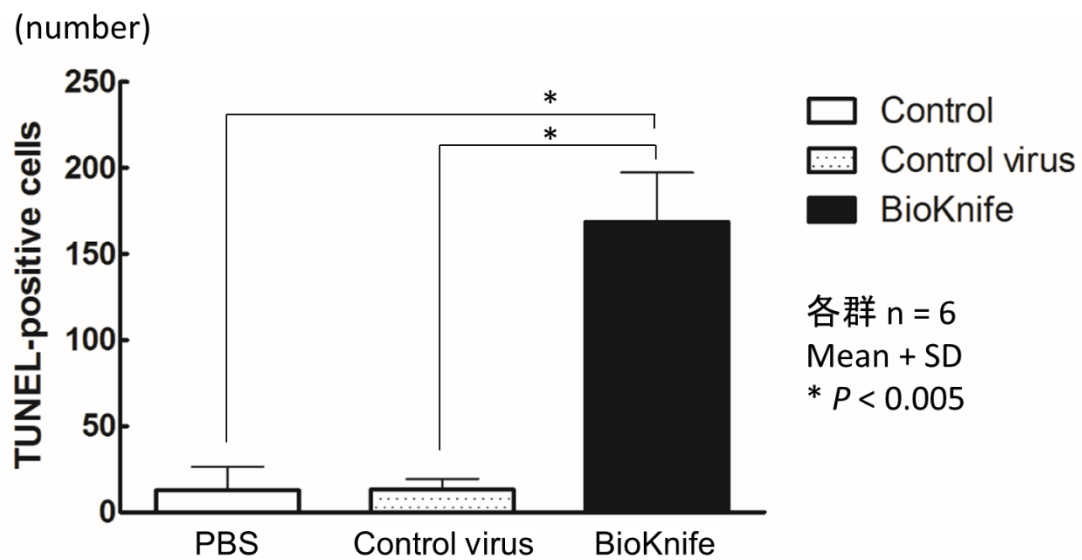
図 8

A



ウイルス感染後 (MOI 10) 72時間
Bar = 100 μ m

B



C

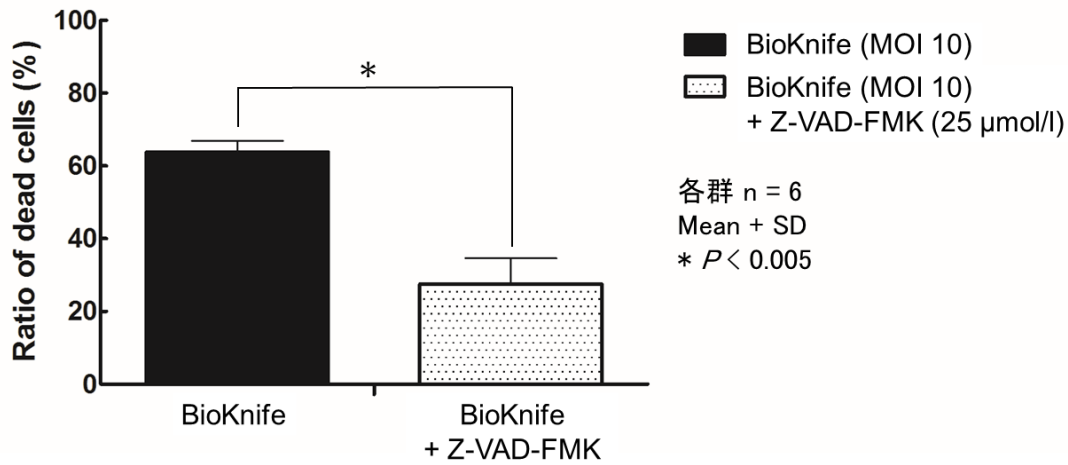


図 8 HSC-3 細胞株を用いた殺細胞効果の機序における検討 (*in vitro*)

(A) *in vitro*における腫瘍細胞に対する GFP 蛍光像、TUNEL 染色、DAPI 染色、蛍光顕微鏡像 (merge)。BioKnife 投与群では、融合細胞だけでなく、細胞融合をきたしていない細胞も TUNEL 染色陽性となった。

(B) TUNEL 陽性細胞のカウント数。BioKnife 投与群では、TUNEL 陽性細胞がほかの 2 群と比較して有意に増加していた (それぞれ $P < 0.005$)。

(C) 汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK 投与による HSC-3 における BioKnife の殺細胞性効果の変化。BioKnife の殺細胞性は、Z-VAD-FMK で抑制された ($P < 0.005$)。

PBS: phosphate buffered saline, MOI: multiplicity of infection, SD: standard deviation

図 9

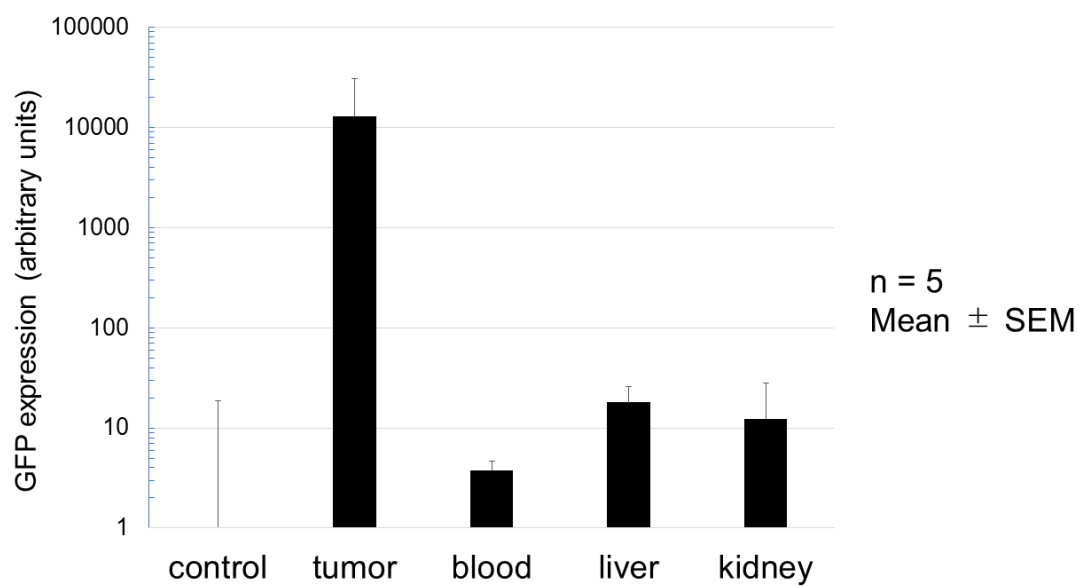


図 9 qRT-PCR による腫瘍、血液、肝臓、腎臓での相対的 GFP mRNA の発現
コントロールとして、舌癌マウス同所移植モデル HBSS 投与群の舌腫瘍を基準に相対定量とした。BioKnife 投与群での血液、肝臓、腎の GFP mRNA の発現は、局所投与された舌腫瘍の数百分の一の発現のみ認められた。

HBSS: Hanks' balanced salt solution, SEM: standard error of the mean