

頭頸部扁平上皮癌における
頸部リンパ節転移・遠隔転移に対する
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

た なか ゆう や
田 中 雄 也

(耳鼻咽喉科学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

目 次

第1章 緒言	1 頁
1.1 研究の背景と意義	1 頁
1.2 研究目的	3 頁
第2章 遺伝子組み換えセンダイウイルスによるセンチネルリンパ節転移標的治療に関する検討	4 頁
2.1 背景	4 頁
2.2 方法	8 頁
2.3 結果	17 頁
2.4 考察	22 頁
第3章 遺伝子組み換えセンダイウイルスによる抗腫瘍免疫誘導に関する検討	26 頁
3.1 背景	26 頁
3.2 方法	27 頁
3.3 結果	32 頁
3.4 考察	35 頁
第4章 総括	40 頁
第5章 結論	41 頁
第6章 謝辞	42 頁
引用文献	43 頁
図表	52 頁

第1章 緒言

1.1 研究の背景と意義

頭頸部扁平上皮癌は全世界で7番目に多い癌であり、近年の化学療法、放射線療法および手術療法を組み合わせた集学的治療による標準療法の進歩により局所制御率の向上が得られつつあるものの、いまだ5年生存率が50-60%と予後不良な疾患である¹⁾。頭頸部癌の予後を左右する因子として、原発巣の進展度・深達度や頸部リンパ節転移の有無、癌の細胞異型度・組織学的分化度、遠隔転移の有無など様々挙げられるが、その中でも頸部リンパ節転移（lymph node metastasis ; LNM）と遠隔転移は頭頸部癌患者の重要な予後因子であり、頭頸部扁平上皮癌の転移の制御は喫緊の課題である²⁾。

分子生物学の進歩とウイルスの遺伝子組み換え技術の発達に伴い、1991年にMartuzaらによって遺伝子組み換え単純ヘルペスウイルスI型を用いた実験的脳腫瘍治療が報告されて以来³⁾、腫瘍溶解ウイルス療法（oncolytic virotherapy）は難治性悪性腫瘍に対する全く新しい作用機序の治療法として期待され、多くの研究機関で精力的に研究されている⁴⁻⁹⁾。しかし、腫瘍溶解性ウイルスの臨床応用に関しては、全身的な炎症反応の誘発や宿主遺伝子への影響による癌化など、思わぬ副反応が起こる危険性を常に孕んでいるため、安全性の配慮は非常に重要である¹⁰⁻¹³⁾。また、安全で治療効果の高い、実用的な腫瘍溶解性ウイルスを作製するためには、正常細胞で複製されず、腫瘍細胞でのみ複製、伝播、細胞障害性を発揮することが重要であり、腫瘍特異的な分子を利用して細胞障害性を発揮する腫瘍溶解性ウイルスを作製する必要がある。

ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（urokinase-type plasminogen activator : uPA）はセリンタイプのプロテアーゼであり、線溶系においてはプラスミノゲンを切断活性化させる役割を持つ。悪性腫瘍では、広く発現してお

り、細胞外マトリックスを破壊し細胞運動を容易にするなど癌の浸潤・転移に有利に働く。発現強度は癌の悪性度と相関があり、頭頸部扁平上皮癌でも高発現を認める^{14, 15)}。一方で正常組織においては創傷治癒における組織リモデリング過程を除いて、ほとんど発現を認めない¹⁶⁾ことから、優れた治療ターゲットとなりうることが示唆される。

齧歯類の呼吸器感染症起因ウイルスであるセンダイウイルス (SeV) は、転写・複製がすべて細胞質内で行われ、複製の際の DNA 相がないことを特徴とする RNA ウイルスで、宿主染色体と相互作用が原則的になく、人に対する病原性は報告されていない¹⁷⁾。そこで SeV の安全面をさらに強化するために、SeV の粒子形成を司る M 遺伝子を欠損させることで、感染した細胞から周囲へのウイルス伝播の危険をなくし、かつ腫瘍特異的な殺細胞効果を強化するために、細胞膜融合を誘起する F 蛋白遺伝子を改変することで、癌特異的なプロテアーゼである uPA を発現した癌細胞のみを特異的に細胞死へ導くよう設計された新しい概念の治療ウイルスが開発された¹⁸⁾。この uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルスにより、根治切除不能な原発腫瘍への直接投与による腫瘍縮小・生存期間延長効果や、切除断端陽性の進行癌に対して術後局所投与による再発予防効果が期待でき、これまで Miyagawa Y らが確立した甲状腺未分化癌同所移植マウスモデル¹⁹⁾や我々が確立した頭頸部扁平上皮癌同所移植マウスモデル²⁰⁾で uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルスの有意な腫瘍縮小効果や生存期間延長効果を報告してきた。

そこで我々は、腫瘍溶解性センダイウイルスを原発巣に投与することにより、原発巣に対する治療効果に加え、腫瘍溶解性センダイウイルスがリンパ流に従って転移リンパ節に移行し、頸部リンパ節転移を抑制する可能性や、腫瘍溶解性センダイウイルスによる腫瘍溶解後の、腫瘍抗原に感作された免疫担当細胞

による抗腫瘍免疫を誘導する可能性を模索しようと考えた。もし腫瘍溶解性センダイウイルスを用い頸部リンパ節転移、特に原発巣からリンパ流が最初に流入するリンパ節であるセンチネルリンパ節の転移を標的とした治療や抗腫瘍免疫による遠隔転移を標的とした治療が実現できれば、転移巣の縮小効果や予防効果だけでなく、導入化学療法や手術、(化学)放射線療法などとの併用により転移制御の相加・相乗効果が期待できる。特にその場合、腫瘍溶解性センダイウイルス療法が原発巣および転移巣の両方に効果が期待できるので、原発巣に対する手術をさらに低侵襲化することができ、患者の QOL 向上のみならず、頭頸部癌の予後向上を目指した新たな治療戦略を展開できるものと思われる。

1.2 研究目的

本研究では、uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルスが頭頸部扁平上皮癌の原発巣に対して治療効果を発揮するだけでなく、頸部リンパ節転移や遠隔転移に対する治療効果を期待した、転移巣を標的とした新規治療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①センチネルリンパ節転移標的治療および②遠隔転移を標的とした抗腫瘍免疫誘導の2方向から検討する。

第 2 章 遺伝子組み換えセンダイウイルスによるセンチネルリンパ節転移標的治療に関する検討

2.1 背景

頸部リンパ節転移 (LNM) は頭頸部癌患者の予後を決定づける最重要因子であり、早期癌においても高率に頸部リンパ節に転移していることが知られている²¹⁾。しかしながら、臨床的 N0 症例であっても微小転移を示す LNM 症例も見られ、LNM の正確な診断は未だに難しく、現在の超音波や computed tomography (CT)、magnetic resonance imaging (MRI)、positron emission tomography/CT (PET/CT) による画像診断の正確性はまだ十分とは言えない²²⁾。そのような状況の中、臨床的 N0 症例での LNM の診断・制御は最重要課題で、新たな診断技術や治療法の開発が強く求められている。

近年、原発巣からのリンパ流が最初に到達するリンパ節 (センチネルリンパ節、SN) を標的とした Sentinel Node Navigation Surgery (SNNS) が注目され、乳癌や悪性黒色腫、胃癌等で診断・治療への臨床応用が進んでいる²³⁻²⁷⁾。頭頸部癌では、潜在的に頸部リンパ節に微小転移している症例や原発巣治療後に後発的に頸部リンパ節転移する症例も比較的多く、原発巣治療の際に SN を同定し微小転移の有無を検索する意義は非常に大きい²⁸⁻³¹⁾。Miura らは、臨床的 N0 症例の口腔癌の患者に対して SNNS を行った多施設共同前向きコホートフェーズ II 試験で、SN の転移陰性症例は転移陽性症例と比較し有意に 3 年粗生存率が高く、SN 転移の有無によって治療方針を決定する SNNS が非常に有用であることを示している³²⁾。しかしながら、SNNS のデメリットとして、手術侵襲を伴うことや手術時間延長による身体への負担の増加、2 次リンパ節の描出や原発巣近傍の shine through 現象による SN 同定率の低下、薬剤によって測定に最適な時間が短いこと、術中迅速凍結標本では SN 内の微小転移の検出に限界がある、などが

挙げられ、いまだ改善すべき事項も多い。SN 同定率の向上に関しては、Arakiらは市販のフチン酸キットと臨床で頻用する indocyanine green (ICG) を混合する手法により、マウスモデルにおいて ICG の SN 検出能の長時間化や 2 次リンパ節が描出されにくいなどのメリットを報告している³³⁾。また、SN 内の微小転移検出の向上に関しては、術中に短時間で行える one step nucleic acid amplification 法を用いることで従来の検査の欠点を補うことができる可能性があるとして様々な領域で報告されており³⁴⁻⁴⁰⁾、多くの研究者によって SNNS の改良が行われている。

頭頸部癌の原発巣に対する低侵襲治療として、近年、経口的腫瘍切除術が機器の進歩とともに発展してきた。経口的腫瘍切除術の主な術式として CO₂ laser による Transoral laser microsurgery⁴¹⁾、手術用ロボットを用いた Transoral robotic surgery (TORS)⁴²⁾、内視鏡や腹腔鏡用鉗子類を用いて TORS と同等の手術環境を提供する Transoral videolaryngoscopic surgery (TOVS)⁴³⁻⁴⁷⁾などが挙げられる。TORS は 2009 年に米国食品医薬品局の認可を受け急速に普及し、その適応も拡大される傾向にあるが、日本においてはまだ頭頸部癌に対して保険適応がないのが現状である。一方で、日本では医療用ロボットと比べ安価な内視鏡を用い、TORS と同様の切除を可能とする手術環境の TOVS が普及しつつあり、咽喉頭癌に対する喉頭機能温存手術として症例を重ね、治療成績も良好である^{46, 48, 49)}。このような原発巣に対する低侵襲手術が発展してきている中、SNNS を含めた LNM に対する低侵襲治療の開発が求められてきているのは自然な流れである。

センダイウイルスは、1950 年代に日本で分離され、別名 Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)、マウスパラインフルエンザ I 型とも呼ばれる。センダイウイルスは、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、安全性の面でき

わめて優れている。わが国でも線維芽細胞増殖因子 fibroblast growth factor: FGF-2 を搭載した非伝播型組み換えセンダイウイルス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、これまでにヒトに対する重篤な副作用は報告されていない⁵⁰⁾。また、海外で行われたセンダイウイルスベクターを用いた HIV ワクチンの臨床治験においても、ヒトに対する重篤な副作用は報告されていない⁵¹⁾。従来から用いられてきたアデノウイルスベクターの代わりに安全性の高いセンダイウイルスベクターを用いる iPS 細胞作製用キット ((株)ID ファーマ、茨城) も市販され注目を集めており、安全面の優位性からセンダイウイルスは臨床応用する上で非常に有望なウイルスと言える。

これまでに、uPA 活性依存的に細胞膜融合を生じ、悪性腫瘍に対し細胞死を誘導する、新たな遺伝子組み換えセンダイウイルス (recombinant SeV, rSeV) (図 1) が作成されている^{52, 53)}。この腫瘍溶解性センダイウイルスは以下の遺伝子上の変更点を特徴とする。① matrix (M) 蛋白をコードする遺伝子を欠損させる。M 蛋白は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。M 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⁵³⁾。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 遺伝子の細胞質内領域ドメインを切り捨て、F 蛋白による細胞膜融合能力を最大化する⁵²⁾。これらの遺伝子改変の結果、この uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルス (rSeV/dMFct14(uPA2)、呼称” BioKnife”) は、様々なタイプの悪性腫瘍に感染することが可能であり、二次的なウイルス粒子を産生せず、腫瘍細胞表面に発現する uPA 活性依存的に、隣接する腫瘍細胞と細胞膜融合を引き起こすことで局所において抗腫瘍効果を示す (図 2)。BioKnife は

既に、高悪性度腫瘍である神経膠芽腫や胸膜中皮腫において同所移植マウスモデルを用いて治療効果を示している^{54,55)}。

一方で頭頸部癌の頸部リンパ節転移に対する、先行する他の腫瘍溶解性ウイルス療法の研究は渉猟する限りなく、直腸癌マウスモデルにおいて腫瘍溶解性アデノウイルスが局所リンパ節転移を抑制したという報告に留まっている⁵⁶⁾。頭頸部癌頸部リンパ節転移に関するマウスモデルは1990年代前半まで確立していなかったが、Matsuiらはヒト舌扁平上皮癌細胞株HSC-3をヌードマウスの舌に移植し、頸部リンパ節に転移した癌細胞を単離するという操作を3回繰り返すことによって、より高率に頸部リンパ節転移を引き起こす細胞株HSC-3-M3を確立した⁵⁷⁾。同所移植ヌードマウスモデルにおいて、HSC-3が頸部リンパ節転移を引き起こす確率は約30%であるのに対して、HSC-3-M3は約90%の確率で頸部リンパ節転移を引き起こす。

我々は、BioKnifeを原発巣に投与することにより、原発巣に対する治療効果に加え、BioKnifeがリンパ流に乗って転移リンパ節に移行し、LNMを抑制する可能性を考えた。もしBioKnifeを用いたSN転移標的治療が実現できれば、臨床的NO症例であっても、SN転移に特異的な予防的治療を行うことができ、後発リンパ節転移の再発防止効果が期待できる。また、導入化学療法や化学放射線療法などとの併用の際にもLNM制御が期待できる。特に、原発巣に対する低侵襲手術であるTOVSや頸部リンパ節転移に対するSNNSとSN転移標的治療を組み合わせることで、治療の低侵襲化による患者のQOL向上のみならず、頭頸部癌の予後向上を目指した新たな治療戦略を展開できるものと考えている。

この章では、腫瘍溶解性センダイウイルスBioKnifeが高頻度に頸部リンパ節転移を引き起こすヒト舌扁平上皮癌細胞株HSC-3-M3を用いた頭頸部扁平上皮癌頸部リンパ節転移マウスモデルにおいてBioKnifeが頸部リンパ節へ移行し、

LNM に対して抗腫瘍効果を発揮するかどうかを検討した。

2.2 方法

2.2.1 細胞株

対象細胞株として、ヌードマウスモデルで高頻度に LNM を引き起こすヒト舌扁平上皮癌細胞株 (HSC-3-M3) を使用した。HSC-3-M3 は、ヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3 を由来とする細胞株であり、HSC-3-M3 を樹立した金沢医科大学の太田先生に提供していただいた。HSC-3-M3 は Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を用いて培養した⁵⁷⁾。培地には、10% Fetal bovine serum (FBS)、50 units/mL Penicillin および 50 µg/mL Streptomycin を添加している。培養は 5% CO₂、37°C の湿潤環境のインキュベーター内で実施した。

uPA 活性測定に使用した対象細胞株としては、HSC-3-M3 に加えて、ヒト舌扁平上皮癌細胞株 (HSC-3)、ヒト下咽頭扁平上皮癌細胞株 (OSC-19、FaDu)、ヒト頬粘膜扁平上皮癌細胞株 (Ho-1-u-1)、マウス扁平上皮癌細胞株 (SCCVII) を使用した。HSC-3、OSC-19、および Ho-1-u-1 は Health Science Research Resources Bank (大阪) から、FaDu は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。購入した細胞株の培地は、添付文書で推奨されている培地を使用した。SCCVII の培地は Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI1640) を用いて培養した。培地には、10% FBS、50 units/mL Penicillin および 50 µg/mL Streptomycin を添加している。培養は 5% CO₂、37°C の湿潤環境のインキュベーター内で実施した。

2.2.2 遺伝子組み換えセンダイウイルス

センダイウイルスのゲノム構造は図 1 B の通りである。遺伝子は 6 つの主要な

遺伝子がコードされており、3'端から順にヌクレオカプシド蛋白 (NP)、RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化 (P) 蛋白、ウイルス粒子構造を内側から維持するマトリックス (M) 蛋白、宿主細胞への侵入に関わる膜融合 (F) 蛋白、結合に関わる赤血球凝集素／ノイラミニダーゼ (HN)、RNA ポリメラーゼの大サブユニットであるラージ (L) 蛋白が並んでいる。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 (F 蛋白遺伝子に変異を加えていない M 蛋白遺伝子欠損センダイウイルス rSeV/dM) の作製方法は先行論文の通りであり^{18, 52, 54, 55)}、いずれもレポーター遺伝子として Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をコードしている。本研究で使用したウイルスは全て共同研究企業である ID ファーマ社 (旧 Dनावec 社、東京) から提供を受け、使用まで -80°C で保存した。ウイルス作製手順について概略を示すと、まずサル腎臓由来細胞株 LLC-MK2 に対し、T7 プロモーター支配下に N、P、L 蛋白を発現するプラスミド、M/GFP 置換かつ F 変異型の SeV のアンチゲノム (+鎖) を発現するプラスミド、および T7 RNA ポリメラーゼを発現するプラスミドをトランスフェクションする。これによって、導入細胞質において Ribonucleoprotein (RNP) の形成とその後のゲノムの複製・転写が行われる。LLC-MK2 細胞を凍結・融解して回収したウイルス構成物を M 蛋白および F 蛋白を発現させた LLC-MK2 細胞へ投与し、一回分の M 蛋白と F 蛋白を供給することによってウイルス粒子を生成する。これによって作製された遺伝子組み換えセンダイウイルスは、一度は感染可能であるが次世代のウイルス粒子を構成できない。また、BioKnife に関しては、uPA 活性依存的に宿主細胞と隣接する細胞との間に細胞膜融合を誘導する性質を持つ。

2.2.3 HSC-3-M3 に対する遺伝子組み換えセンダイウイルスの *in vitro* 殺細胞効

果に関する検討

2.2.3.1 uPA 活性測定

培養中の頭頸部扁平上皮癌細胞株それぞれを回収後、HSC-3、OSC-19、Ho-1-u-1、および FaDu に関しては、それぞれ 1×10^4 cells/well ずつ、HSC-3-M3 に関しては 5×10^3 cells/well を 96-well plate に、SCCVII に関しては 3×10^3 cells/well を 96-well plate に、培地 60 μ L/well と共に播種した。37°C・5% CO₂ 湿潤環境下でインキュベートし 48 時間後に well の上清を破棄、十分量の PBS で 3 回洗浄した後に、新たに培地 50 μ L と PBS 110 μ L を加えた。uPA 活性値の測定のため、uPA activity assay kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を添付文書の通り使用した。活性型 uPA によって切断された発色基質の検出には ARVO X3 (PerkinElmer Japan, 大阪) を使用し、405 nm の吸光度を測定した。

2.2.3.2 HSC-3-M3 に対する遺伝子組み換えセンダイウイルスによる抗腫瘍効果の経時的観察

HSC-3-M3 (1×10^5 cells) 35-mm dish に播種し、37°C・5% CO₂ 湿潤環境下で 24 時間インキュベート後に rSeV/dM (コントロールウイルス) あるいは BioKnife を 10 multiplicities of infection (MOI) ずつ投与した。以後、蛍光顕微鏡 BZ8000 (キーエンス、大阪) を用い、37°C・5% CO₂ 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経時的な定点観測を実施した。ウイルス投与 0 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後、および 96 時間後に、位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で撮影した画像を重ね合わせ比較検討した。

2.2.3.3 HSC-3-M3 に対する遺伝子組み換えセンダイウイルスによる殺細胞効果の測定

HSC-3-M3 (4×10^3 cells/100 μ L/well) を 96-well plate に播種した。24 時間培養後、播種細胞に対しそれぞれ 0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10 MOI 相当の rSeV/dM

または BioKnife を投与した。ウイルス投与 100 時間後に Cell count kit-8 (同仁堂、熊本) を用いた 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。Kit 試薬のテトラゾリウム塩 WST-8 は細胞内脱水素酵素によって還元され水溶性のホルマザンが生成されるが、このホルマザンの生成量は生細胞数比と比例するため、ホルマザンの 450 nm の吸光度を測定、比較することで生細胞数の比率が求められる。吸光度測定は ARVO X3 を使用した。0 MOI における細胞生存数を 100% (陰性コントロール) とし、各ウイルス力価の殺細胞効果 (%) を次式によって算出した： $(1 - (\text{測定吸光度} - \text{バックグラウンド吸光度}) / (\text{陰性コントロール吸光度} - \text{バックグラウンド吸光度})) \times 100$ (%)。

2.2.4 舌扁平上皮癌頸部リンパ節転移マウスモデル

動物モデルには、5~8 週齢の Balb/c ノードマウス雌 (日本 SLC、静岡) を用い、BioKnife 投与群、rSeV/dM (コントロールウイルス) 投与群、リン酸化緩衝液 (PBS) 投与 (無治療コントロール) 群に分けて実施した。マウスの全身麻酔には、ケタミン (75 μg /マウス体重 g)、メドトミジン (1.0 μg /マウス体重 g)、PBS 混合液の腹腔内注射を使用した。

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: 16053) および組換え DNA 実験安全委員会 (承認番号: 2012-24) 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および飼育は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 研究室で行った。

高率に頸部リンパ節転移する舌扁平上皮癌同所移植ノードマウスモデルを作成した。HSC-3-M3 (1×10^5 cells/20 μL PBS) 細胞浮遊液を、全身麻酔下のヌー

ドマウス舌左縁に 30G 針を装着した Hamilton シリンジを用いて、注入移植した。

まず、頸部リンパ節転移の頻度を求めるため、移植後 14 日目 (n = 5) と移植後 21 日目 (n = 5) に犠牲死させ、すべての頸部リンパ節を摘出した。検体は、10% 中性ホルマリンで固定した後にパラフィン包埋し 5 μm 厚で薄切し、連続切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、頸部リンパ節転移を有するマウスの比率 (少なくとも 1 つ以上の頸部リンパ節転移を有するマウス数/全マウス数 \times 100 (%)) を算出した。

2.2.5 遺伝子組み換えセンダイウイルスの頸部リンパ節への移行に関する検討

2.2.4 項のマウスモデルにおいて、腫瘍移植 14 日後に rSeV/dM (1×10^6 CIU /20 μL PBS) あるいは PBS (20 μL) をマウスの舌左縁の腫瘍に全身麻酔下で注入した。in vivo imaging system による解析では、rSeV/dM (2.5×10^6 CIU /20 μL PBS) 投与群および無治療コントロール (PBS 20 μL) 群に加えて、BioKnife (2.5×10^6 CIU /20 μL PBS) 投与群を作成した。腫瘍移植 21 日後に犠牲死させ、以下の実験で遺伝子組み換えセンダイウイルスが頸部リンパ節へ移行するかどうかを検討した。

2.2.5.1 免疫組織学的検討

2.2.5 項のマウスモデルにおいて、採取した頸部リンパ節を固定せずにそのまま OCT compound に包埋して、液体窒素で凍結した。10 μm 厚の薄切切片に対して、ドンキーの正常血清でブロッキングした後に、1:100 で希釈した rabbit monoclonal anti GFP antibody (Lifetechnologies, Gaithersburg, MD, USA) を滴下し、加湿箱内に 4°C で一晩静置した。PBS で洗浄後、1:200 で希釈した二次抗体 (Alexa Fluor 488, IgG; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を滴下し、加湿箱内で 2 時間室温静置した。PBS で洗浄後、褪色防止用封入剤 (VECTASHIELD with DAPI; Vector

laboratories、Burlingame、CA、USA) で封入した。Nikon C1 system (ニコン、東京) で蛍光顕微鏡画像を取得した。定量的評価のために、頸部リンパ節内の GFP 蛍光強度および無作為に抽出したバックグラウンドの蛍光強度を画像解析ソフト ImageJ version1.48p (アメリカ国立衛生研究所、MD、USA) を用いて測定し、次式にて頸部リンパ節内 GFP 蛍光強度を算出し、コントロール群の舌検体の値で標準化した。: 頸部リンパ節内の GFP 蛍光強度 - (無作為に抽出した 5 箇所バックグラウンドの蛍光強度の合計/5) (arbitrary unit [a.u.])。

2.2.5.2 GFP mRNA の定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

2.2.5 項のマウスモデルにおいて、頸部リンパ節における GFP レポーター遺伝子の発現を確認するため real time RT-PCR を行った。マウス 1 匹あたりの全ての頸部リンパ節をまとめて n = 1 として扱い、各群 n = 5 で解析を行った。摘出した頸部リンパ節は直ちに 25 mg 以下の小片とし十分量の RNA later 液 (Applied Biosystems、東京) に浸漬し 4°C で保存した。RNA の抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, USA) を用いた。使用したプライマーの配列は、GFP forward 5'-CGTCCAGGAGCGCACCATCTTC-3'、GFP reverse 5'-GGTCTTTGCTCAGGGCG GACT-3'、GAPDH forward 5'-TACGACAAGTCCCTCAAGATTG-3'、GAPDH reverse 5'-TCTGGGTGGCAGTGATGG-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、神奈川) で購入した。One Step SYBR PrimeScript RT-PCR キット (タカラバイオ、滋賀) と Thermal Cycler Dice Real time System II (タカラバイオ、滋賀) を用いて 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 30 サイクル 94°C 1 分 60°C 1 分 72°C 1 分、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かを確認した。測定した SYBR Green I の蛍光強度を Light Cycler data analysis software TP 900 ver. 4.02 (タカラバイオ, 滋賀) の $\Delta\Delta C_t$ 法で解析し、それぞれのサンプルの GAPDH の発現量で補正し相対定量した。

2.2.5.3 *in vivo* imaging system による頸部センチネルリンパ節内の GFP レポーター遺伝子発現の検出

2.2.5 項のマウスモデルにおいて、頸部 SN 内の GFP レポーター遺伝子の発現を確認するため *in vivo* imaging system による解析を行った。

腫瘍移植 21 日後に、IVIS system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用して、全身麻酔下のマウスに対して頸部リンパ節内の ICG および GFP のシグナルを *in vivo* および *ex vivo* で測定した。センチネルリンパ節を同定するために、測定 1 時間前に ICG stock solution 20 μL を舌左縁の腫瘍に注入した。ICG stock solution は、ICG 25 mg (Diagnogreen for injection; 第一三共、東京) を蒸留水 5 mL に溶解し、さらに蒸留水で 10 倍希釈し、最終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した。ICG の測定には 780 nm の励起光と 845 nm のフィルターを使用した。GFP の測定には 480 nm の励起光と 520 nm のフィルターを使用した。

2.2.6 遺伝子組み換えセンダイウイルスの頸部リンパ節転移抑制に関する検討

2.2.4 項のマウスモデルにおいて、腫瘍移植 14 日、16 日、および 18 日後にそれぞれ、BioKnife (1×10^6 CIU /20 μL PBS)、rSeV/dM (1×10^6 CIU /20 μL PBS) あるいは PBS (20 μL) をマウスの舌左縁の腫瘍に全身麻酔下で注入した。腫瘍径はデジタルノギスを用いて計測し、長径 a (mm)、短径 b (mm) として腫瘍体積を次式のように算出した：腫瘍体積 (mm^3) = $4\pi/3 \times a/2 \times (b/2)^2 \doteq 4 \times a/2 \times b^2/4 = ab^2/2$ 。マウスの体重が -20% を超える、あるいは舌腫瘍が自潰したマウ

スは安楽死させ、実験から除外した。腫瘍移植 25 日後に犠牲死させ、以下の実験で遺伝子組み換えセンダイウイルスが頸部リンパ節転移を抑制するかどうかを検討した。

2.2.6.1 頸部リンパ節転移の陽性率

LNM の頻度を求めるため、腫瘍移植後 25 日目に犠牲死させたマウスの全ての頸部リンパ節を摘出した。検体は、10%中性ホルマリンで固定した後にパラフィン包埋し 5 μm 厚で薄切し、連続切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、LNM を有するマウスの比率 (少なくとも 1 つ以上の LNM を有するマウス数/全マウス数 \times 100 (%))、および全ての頸部リンパ節における LNM の陽性率 (転移陽性の頸部リンパ節の数/全ての頸部リンパ節の数 \times 100 (%)) を算出した。

2.2.6.2 免疫組織化学的検討

2.2.6 項のマウスモデルにおいて、頸部リンパ節内の転移巣に遺伝子組み換えセンダイウイルスが感染しているかどうかを確認するため、抗 SeV 抗体を使用して免疫組織化学的染色を行った。

パラフィン切片を脱パラフィン化して再水和処理した後に、10 mM pH 6.0 クエン酸ナトリウム緩衝液にスライドを入れ、電子レンジで 10 分間沸騰しないように注意しながら加熱し、抗原賦活化処理を行った。ブロッキングには、protein block serum-free reagent (DAKO、Carpinteria、CA、USA) を用いた。1 次抗体は、Sendai virus polyclonal antibody (MBL International Corporation、Wobum、MA、USA) の 100 倍希釈液を滴下し、加湿箱内に 4°C で一晩静置した。PBS で洗浄後、非特異的な 1 次抗体の結合を防止するため、NaCl 29.22 g/L、NaH₂PO₄·2H₂O 0.172 g/L、NaHPO₄·12H₂O 3.19 g/L、および Tween20 1ml を 1L の蒸留水に溶解した溶液に 10 分間室温静置した。ストレプトアビジン-ビオチン複合体法

(VECTASTAIN Elite ABC rabbit IgG キット、PK-6101、Vector Laboratories, Inc.、Burlingame, CA, USA) を添付文書の通りに用いた。ビオチン化二次抗体を加湿箱内に 30 分間室温静置した。PBS で洗浄した後に、内因性ペルオキシダーゼの不活化のため 3%過酸化水素メタノール溶液に 5 分間浸漬処理した。ベクタステイン ABC リガントを加湿箱内で 30 分間室温静置した後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) で発色した。対比染色としてヘマトキシリンを用いた。検体は CCD カメラ (DP26、オリンパス、東京) で撮影した。

2.2.6.3 GFP mRNA の定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

2.2.6 項のマウスモデルにおいて、頸部リンパ節における GFP レポーター遺伝子の発現を確認するため real time RT-PCR を行った。マウス 1 匹あたりの全ての頸部リンパ節をまとめて $n = 1$ として扱い、各群 $n = 5$ で解析を行った。方法は、2.2.5.2 項と同様である。

2.2.6.4 遺伝子組み換えセンダイウイルスによるアポトーシス誘導の検討

2.2.6 項のマウスモデルにおいて、頸部リンパ節内の転移巣で遺伝子組み換えセンダイウイルスがアポトーシスを誘導しているかどうかを確認するため、ApopTag peroxidase *in situ* apoptosis detection kit (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を添付文書の通り使用してアポトーシスを検出した。

パラフィン切片を脱パラフィン化して再水和処理した後に、proteinase K (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) の溶液を滴下し、加湿箱内に 15 分間室温静置した。PBS で洗浄した後に、内因性ペルオキシダーゼの不活化のため 3% 過酸化水素メタノール溶液に 5 分間浸漬処理した。PBS で洗浄後、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) の溶液を滴下し、加湿箱内で 37°C で 1 時間静置した。PBS で洗浄後、anti-digoxigenin conjugate (peroxidase) の溶液を滴下し室温

静置し、DAB で発色した。対比染色として 0.5% w/v メチルグリーン (Sigma-Aldrich) を用いた。検体は CCD カメラで撮影した。

2.2.7 統計手法

実験結果の値は、平均 ± 標準誤差で表している。検討には、統計ソフト Prism 5 (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA) および Microsoft Excel add-in software Statcel (Ver. 3, OMS publishing、埼玉) を用いた。2 群間の比較には Mann-Whitney U-test、3 群間の比較には Kruskal-Wallis test の後に Steel-Dwass test を用いた。頸部リンパ節転移率の群間比較には、Fisher 直接確率検定を行った。5 % 以下を統計学的有意とした。

2.3 結果

2.3.1 HSC-3-M3 に対する遺伝子組み換えセンダイウイルスの *in vitro* 殺細胞効果

2.3.1.1 頭頸部扁平上皮癌細胞株における uPA 活性値

高頻度に頸部リンパ節転移するヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3-M3 が、高頻度には転移しない他の頭頸部扁平上皮癌細胞株と比較し uPA 活性が高いかどうかを検討するため、*in vitro* における細胞表面の uPA 活性値を測定した。図 3 に示すように、HSC-3-M3 の uPA 活性は、他の頭頸部扁平上皮癌細胞株と比較し最も高い uPA 活性値を示した (OSC19 2.26 ± 0.04 、Ho-1-u-1 2.94 ± 0.01 、HSC-3 4.35 ± 0.02 、HSC-3-M3 7.97 ± 0.01 、FaDu 1.80 ± 0.01 、SCCVII 1.68 ± 0.01 units/mL)。また、BioKnife に関する先行論文で使用した高悪性度の他癌腫の uPA 活性値⁵⁴⁾ と比較しても HSC-3-M3 は同程度の uPA 活性値を示している。

2.3.1.2 HSC-3-M3 に対する BioKnife の経時的な抗腫瘍効果

ウイルス投与後の HSC-3-M3 の形態変化を観察した。図 4 A に実験プロトコルを示す。位相差顕微鏡像と GFP 蛍光顕微鏡像を重ね合わせた像において、コントロールウイルスである rSeV/dM 投与群では HSC-3-M3 の形態に変化はなく細胞死を引き起こさなかったが、BioKnife 投与群では投与 48 時間後には巨大な融合細胞を認め、投与 72-96 時間後には HSC-3-M3 の細胞死を引き起こした(図 4 B)。定点観測による連続撮影によって得られたタイムラプス顕微鏡像では、BioKnife 投与直後は腫瘍細胞の形態に明らかな変化を認めなかったが、投与 24 時間後を過ぎた頃から GFP 発現を伴う細胞が出現し、周辺の細胞と融合し多核巨細胞化する過程を観察した。投与 72-96 時間後で多核巨細胞は破裂するように細胞死し始めることが確認された。

2.3.1.3 HSC-3-M3 に対する BioKnife の殺細胞効果

HSC-3-M3 に対する BioKnife の殺細胞効果を *in vitro* で検討した。図 5 に示すとおり、HSC-3-M3 に対する BioKnife の殺細胞効果は、rSeV/dM と比較して有意に高く、BioKnife 投与群においてはウイルス力価依存的に殺細胞効果を示した。rSeV/dM 投与群はいずれの力価においても高い殺細胞効果は認めなかった。

2.3.2 舌扁平上皮癌頸部リンパ節転移マウスモデルの確立

高率に頸部リンパ節転移する舌扁平上皮癌同所移植ヌードマウスモデルを作成するため、HSC-3-M3 細胞浮遊液をヌードマウス舌左縁に注入移植した。移植後 14 日目にすべての頸部リンパ節を摘出し、連続切片を作成して、頸部リンパ節転移を有するマウスの比率を検討したところ、5 匹中 3 匹 (60%) に転移を認めた。また、移植後 21 日目の頸部リンパ節転移を有するマウスの比率も同様に求め、5 匹中 4 匹 (80%) に転移を認めた。

2.3.3 遺伝子組み換えセンダイウイルスの頸部リンパ節への移行に関する検討

舌扁平上皮癌頸部リンパ節転移マウスモデルにおいて、腫瘍移植 14 日後に rSeV/dM (1×10^6 CIU /20 μ L PBS) あるいは PBS (20 μ L) をマウスの舌左縁の腫瘍に注入し、移植 21 日後に犠牲死させ、rSeV/dM のレポーター遺伝子である GFP が舌及び頸部リンパ節で発現しているかどうかを抗 GFP 抗体による免疫組織学的染色で検討した。図 6 A に実験プロトコルを示す。無治療コントロール群では舌と頸部リンパ節のいずれにおいても GFP の発現を認めなかったが、rSeV/dM 投与群の舌および頸部リンパ節において GFP の発現を認めた(図 6 B)。また、画像解析ソフトにより頸部リンパ節内の GFP 発現を定量化したところ、rSeV/dM 投与群において無治療コントロール群と比較し有意に GFP が発現していた(舌: 無治療コントロール群 1.0 arbitrary unit [a.u.] \pm 0.58 vs rSeV/dM 投与群 20.9 a.u. \pm 3.5 ; $p < 0.01$ 、頸部リンパ節: 無治療コントロール群 0.4 a.u. \pm 0.3 vs rSeV/dM 投与群 28.2 a.u. \pm 10.6 ; $p < 0.01$) (図 6 C)。

上記と同じモデルにおいて、舌および頸部リンパ節における GFP mRNA の発現を検討したところ、rSeV/dM 投与群において無治療コントロール群と比較し有意に GFP mRNA が発現していた(舌: 無治療コントロール群 1.5 arbitrary units [a.u.] \pm 0.5 vs rSeV/dM 投与群 139.3 a.u. \pm 59.0 ; $p < 0.05$ 、頸部リンパ節: 無治療コントロール群 3.2 a.u. \pm 1.6 vs rSeV/dM 投与群 64.9 a.u. \pm 42.8 ; $p < 0.05$) (図 6 D)。

rSeV/dM と BioKnife のレポーター遺伝子である GFP がセンチネルリンパ節内で発現しているかどうかを確認するために *in vivo* imaging system を使用して検討したところ、無治療コントロール群では ICG のシグナルが集積しているセンチネルリンパ節内に GFP の発現を認めなかったが、rSeV/dM 投与群および BioKnife 投与群においては ICG で同定したセンチネルリンパ節内で GFP の発現

を認めた (図 6 E)。

2.3.4 遺伝子組み換えセンダイウイルスの頸部リンパ節転移抑制に関する検討

舌扁平上皮癌頸部リンパ節転移マウスモデルにおいて、腫瘍移植 14 日、16 日、および 18 日後にそれぞれ、BioKnife (1×10^6 CIU /20 μ L PBS)、rSeV/dM (1×10^6 CIU /20 μ L PBS) あるいは PBS (20 μ L) をマウスの舌左縁の腫瘍に注入し、移植 25 日後に犠牲死させ、全ての頸部リンパ節を摘出し、LNM を有するマウスの比率、および全ての頸部リンパ節における LNM の陽性率を算出した。図 7 A に実験プロトコルを示す。無治療コントロール群と rSeV/dM 投与群において、腫瘍移植後 23 日目から 25 日目にかけて原発巣の舌腫瘍が自潰したマウス及び舌腫瘍が自潰し突然死したマウスがそれぞれの群に 4 匹ずついたので、それらを解析から除外した。LNM を有するマウスの比率は、無治療コントロール群 ($n = 6$) および rSeV/dM 投与群 ($n = 6$) においていずれも 83.3%であったが、BioKnife 投与群 ($n = 10$) においては 30.0%で、他の群と比較して有意にリンパ節転移を抑制した ($p < 0.05$ 、図 7 B、 n はマウスの匹数)。全ての頸部リンパ節における LNM の陽性率は、無治療コントロール群 ($n = 21$) および rSeV/dM 投与群 ($n = 18$) においてそれぞれ 42.9%および 27.8%であったが、BioKnife 投与群 ($n = 43$) においては 11.6%で、他の群と比較して有意に LNM を抑制した ($p < 0.05$ 、図 7 C、 n はリンパ節の個数)。上記のモデルにおいて、BioKnife 投与群が無治療コントロール群と比較し移植した舌腫瘍を有意に縮小させており ($p < 0.01$ 、図 7 D)、原発巣に対する抗腫瘍効果が LNM の抑制効果に影響を与えている可能性が示唆された。しかしながら、腫瘍移植後 14 日で 6 割、移植後 21 日で約 9 割程度のマウスが LNM を有するマウスモデルにおいて、腫瘍移植後 14 日から BioKnife を投与開始し、腫瘍移植後 25 日目における BioKnife 投与群の LNM を有するマ

ウスの比率が 30% (図 7 B) であったことを考えると、十分 BioKnife が LNM を抑制していると考えられた。

2.3.4.1 頸部リンパ節内の転移巣における遺伝子組み換えセンダイウイルスの感染の有無

上記と同じモデルにおいて、頸部リンパ節内の転移巣に遺伝子組み換えセンダイウイルスが感染しているかどうかを確認するため、抗 SeV 抗体を使用して免疫組織化学的染色を行ったところ、無治療コントロール群では抗 SeV 抗体は陰性だったが、rSeV/dM 投与群及び BioKnife 投与群で頸部リンパ節転移巣の腫瘍細胞の細胞質内で抗 SeV 抗体陽性 (茶色) であった (図 8 A)。

上記と同じモデルにおいて、舌および頸部リンパ節における *GFP* mRNA の発現を検討したところ、rSeV/dM 投与群および BioKnife 投与群において無治療コントロール群と比較し有意に *GFP* mRNA が発現していた (舌: 無治療コントロール群 2.21 arbitrary units [a.u.] \pm 1.21 vs rSeV/dM 投与群 251.81 a.u. \pm 95.47 ; $p < 0.05$ 、無治療コントロール群 2.21 a.u. \pm 1.21 vs BioKnife 投与群 238.21 a.u. \pm 96.34 ; $p < 0.05$ 、頸部リンパ節: 無治療コントロール群 3.40 a.u. \pm 2.09 vs rSeV/dM 投与群 50.02 a.u. \pm 13.43 ; $p < 0.05$ 、無治療コントロール群 3.40 a.u. \pm 2.09 vs BioKnife 投与群 47.51 a.u. \pm 13.09 ; $p < 0.05$) (図 8 B)。

2.3.4.2 頸部リンパ節内の転移巣における遺伝子組み換えセンダイウイルスによるアポトーシス誘導に関する検討

上記と同じモデルにおいて、頸部リンパ節内の転移巣で遺伝子組み換えセンダイウイルスがアポトーシスを誘導しているかどうかを確認するため、ApopTag peroxidase *in situ* apoptosis detection kit 使用してアポトーシスを検出したところ、無治療コントロール群ではまったくアポトーシスは検出されず、rSeV/dM 投与群では転移巣の腫瘍細胞に散在性にアポトーシスを認める (茶色) だけだった

が、BioKnife 投与群では明らかに腫瘍細胞が一塊としてアポトーシスを誘導していた（茶色）（図9）。

2.4 考察

頭頸部癌における臨床的 N0 症例に対する治療として予防的に頸部郭清術を行うか、厳重に経過観察を行うかは、診断機器や治療法に関する知識や技術の目覚しい進歩があったにも関わらず、未だに最適な解は得られず、多くの研究者や臨床家が長年議論しているところである。予防的頸部郭清術は根治的頸部郭清術と比べ機能を温存するために、筋肉や大血管、神経などを可能な限り温存して手術を行うが、長期間頸部のつっぱり感やしびれ、予定外の神経障害に悩まされることが多い。また、口腔癌の潜在的な LNM は 20–30% だと言われている²⁹⁻³¹⁾ので、口腔癌の予防的頸部郭清術を行った 70–80% の症例は不要な頸部郭清術を行うことになる。Weiss らは、潜在的 LNM の確率が 20% を超えるようなら、予防的頸部郭清術を行うべきであると報告している⁵⁸⁾。そのような状況の中で、現在の画像診断機器では検出できない臨床的 N0 症例の頸部リンパ節の微小転移に対して、低侵襲かつがん特異的に治療効果を発揮する薬剤等の登場が期待されていた。

本章では、uPA 活性依存的に細胞膜融合を誘導する腫瘍溶解性センダイウイルス BioKnife が、舌扁平上皮癌頸部リンパ節転移マウスモデルにおいて頸部リンパ節へ移行し、微小転移巣に感染し、抗腫瘍効果を発揮するかどうか検討した。重要な実験結果としては、①原発巣に注入した rSeV はセンチネル理論に従って頸部リンパ節へ移行し、頸部リンパ節内でレポーター遺伝子である GFP 遺伝子を発現したこと、②BioKnife が LNM に感染し、LNM を抑制したこと、③BioKnife が感染した LNM 内でアポトーシスが誘導されたこと、が挙げられる。

②に関しては、原発巣に対する BioKnife の抗腫瘍効果が LNM に対する抗腫瘍効果の評価に影響を与えることを危惧して、予備実験でまず舌扁平上皮癌頸部リンパ節転移マウスモデルにおける腫瘍移植 14 日後と 21 日後の LNM を有するマウスの比率を測定した。腫瘍移植 14 日後では 60% のマウスが、腫瘍移植 21 日後では 80% のマウスが LNM を有しており、HSC-3-M3 を樹立した Matsui らの報告⁵⁷⁾とほぼ一致していた。この実験結果から、rSeV を投与する腫瘍移植 14 日後に約 60% のマウスに頸部リンパ節転移していることが予想されるが、腫瘍移植 25 日後の検討では BioKnife 投与群のマウスの 30% に LNM を認めるのみであったので、BioKnife 投与群では有意に原発巣の縮小効果を認めると同時に、LNM に関しても BioKnife 投与群は他の 2 群と比較し有意に LNM を抑制したと考えられる。临床上、早期の頭頸部扁平上皮癌患者における潜在的 LNM に対して、腫瘍溶解性センダイウイルスによる治療はより現実的で低侵襲な治療になりうると考えられる。

BioKnife は、これまで神経膠芽腫同所移植マウスモデル⁵⁴⁾や胸膜中皮腫同所移植マウスモデル⁵⁵⁾、また我々の研究チームが確立した甲状腺未分化癌同所移植マウスモデル¹⁹⁾および頭頸部扁平上皮癌同所移植マウスモデル²⁰⁾において、良好な腫瘍縮小効果や生存率延長に寄与していることを報告してきている。これらの悪性腫瘍は uPA を高発現し、その uPA 活性が腫瘍の悪性度と相関していることが知られている⁵⁹⁻⁶²⁾。そのため、高悪性度の腫瘍に対して、BioKnife は効率よく抗腫瘍効果を発揮することが期待できる。本章では、BioKnife が uPA を高発現している HSC-3-M3 を移植した原発巣のみならず LNM に対しても治療効果を発揮したので、高頻度に転移する悪性度の高い頭頸部扁平上皮癌に対する臨床応用が期待される。

リンパ流に関しては、がん細胞の転移の経路になりうる一方で、治療因子を

投与する経路としても利用されている。LNM を標的とした腫瘍溶解性ウイルス療法についてほとんど報告はないが、Kikuchi らは腫瘍溶解性アデノウイルスが直腸癌マウスモデルにおいて原発巣に対するウイルス投与により局所リンパ節転移を抑制したことを報告している⁵⁶⁾。本研究では、BioKnife がセンチネル理論に従って頸部リンパ節に移行し、LNM を抑制することを示したが、Kikuchi らの報告と比較した際に我々の研究にのみ見られる特徴としては、①ICG を利用し、SN を同定した上で rSeV のレポーター遺伝子の発現状況を確認したこと、②免疫組織化学的に rSeV が LNM 内に感染し、uPA 依存的に腫瘍を溶解する BioKnife がアポトーシスを誘導していることを証明したことである。BioKnife 投与群が rSeV/dM 投与群と比較し有意に LNM を抑制した理由としては、図 8 B が示すように BioKnife 投与群と rSeV/dM 投与群において同程度の GFP mRNA を発現することから転移リンパ節内の LNM における感染効率は同じだと推測されるが、BioKnife が uPA 依存的に LNM の細胞膜融合・アポトーシスを誘導し、効率的に腫瘍細胞を排除するため、LNM を有意に抑制したのではないかと考えている。

本研究の限界としては、rSeV がリンパ流に沿って LNM に到達するまでの過程が分からないことである。仮説としては、①rSeV が直接リンパ流に乗って転移リンパ節に移行し、LNM に直接感染する経路や、②免疫担当細胞による rSeV の貪食や rSeV が感染したがん細胞そのものを担体として LNM まで移行する経路が考えられる。rSeV の頸部リンパ節への移行経路を証明するためには、さらなる研究が必要である。

本研究の結果から、腫瘍溶解性センダイウイルスは、臨床的 N0 症例であっても、最初に転移をきたす SN に対して特異的な予防的治療を行うことができ、後発リンパ節転移の予防効果が期待できる。また、導入化学療法や化学放射線療

法などとの併用の際にも LNM の制御が期待できる。特に、原発巣に対する低侵襲手術である経口的腫瘍切除術や LNM に対する SNNS を SN 転移標的治療と組み合わせることで、不要な頸部郭清術を回避することができ、さらには SN 転移標的治療で現在画像診断では検出できない頸部リンパ節の微小転移を抑制することから、治療の低侵襲化による患者の QOL 向上のみならず、頭頸部癌の予後向上を目指した新たな治療戦略を展開できるものと考えている。これまでに頭頸部領域で SN 転移を標的とした治療法の報告はほとんどなく、本研究では臨床応用が容易な手法を用いており、BioKnife による SN 転移標的治療は新たな頭頸部癌低侵襲治療になりうると考えている。

第3章 遺伝子組み換えセンダイウイルスによる抗腫瘍免疫誘導に関する検討

3.1 背景

頭頸部癌における重要な予後因子として頸部リンパ節転移と遠隔転移が挙げられ、頭頸部癌の遠隔転移は頸部リンパ節転移ほど頻度が高くないものの、遠隔転移を有する症例は根治を期待できず、予後は極めて不良である²⁾。化学療法や放射線療法、手術療法を併用する集学的治療に関する報告では、化学療法や放射線療法、手術療法の併用だけでは遠隔転移を制御することができず、生存期間延長の可能性はあるものの効果は限定的だとする報告^{2, 63, 64)}がほとんどで、遠隔転移に対する治療成績や患者 QOL の観点からも新たな治療戦略の見直しが必要である。

腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞に特異的に感染して、細胞死させるウイルスである。腫瘍溶解性ウイルスが感染したがん細胞は溶解し、新たなウイルス粒子が周囲のがん細胞に感染していくが、一方で腫瘍特異的にがん細胞を溶解させることにより、がんから特異的な抗原が放出され、宿主の抗腫瘍免疫活性を上昇させることが報告されている^{65, 66)}。宿主の免疫には、ウイルスを不活化して腫瘍溶解性ウイルス療法の障害となる自然免疫がある一方で、がん細胞に特異的に感染することにより、免疫系の作用を腫瘍に指向させ、抗腫瘍免疫を長時間持続させることができる獲得免疫がある^{67, 68)}。腫瘍溶解性ウイルスの臨床応用に関しては、米国食品医薬品局は 2015 年に初めて、切除不能悪性黒色腫に対して、抗腫瘍免疫を増強する GM-CSF 遺伝子を搭載した腫瘍溶解性ヘルペスウイルス (talimogene laherparepvec) を認可している⁶⁹⁾。また、神経膠腫マウスモデルにおいて、腫瘍溶解性アデノウイルスを連続投与することによって抗腫瘍免疫を誘導し、生存期間延長に寄与したとの報告があり⁷⁰⁾、免疫刺激因子をウイルスベクターに搭載していなくても、がん特異的な細胞溶解により抗腫

瘍免疫を誘導できることが示唆された。

我々は、腫瘍溶解性センダイウイルスを原発巣に投与することにより、原発巣に対する治療効果に加え、腫瘍溶解性センダイウイルスががん細胞を特異的に細胞死させ、放出されたがん抗原により抗腫瘍免疫が誘導される可能性を考えた。もし腫瘍溶解性センダイウイルスを用いた遠隔転移標的治療が実現できれば、臨床的 M0 症例であっても、遠隔転移に特異的な予防的治療を行うことが期待できる。また、導入化学療法や化学放射線療法などとの併用の際にも遠隔転移制御が期待できるので、患者の QOL 向上のみならず、頭頸部癌の予後向上を目指した新たな治療戦略を展開できるものと考えている。

この章では、腫瘍溶解性センダイウイルス BioKnife がマウス由来の扁平上皮癌細胞株 SCCVII を用いた頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおいて BioKnife が抗腫瘍免疫を誘導し、擬似転移巣に対して抗腫瘍効果を発揮するかどうか、またそのメカニズムについて検討した。

3.2 方法

3.2.1 細胞株

対象細胞株として、正常免疫を有する C3H/HeN マウス由来の扁平上皮癌細胞株である SCCVII を使用した。SCCVII は Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI1640) を用いて培養した。培地には、10% Fetal bovine serum (FBS)、50 units/mL Penicillin および 50 µg/mL Streptomycin を添加している。培養は 5% CO₂、37°C の湿潤環境のインキュベーター内で実施した。

3.2.2 遺伝子組み換えセンダイウイルス

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 (rSeV/dM) の作製方法は 2.2.2 項で述べた通りであり、いずれもレポーター遺伝子として Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をコードしている。本研究で使用したウイルスは全て共同研究企業である ID ファーマ社 (旧 DNAVEC 社、東京) から提供を受け、使用まで -80°C で保存した。

3.2.3 SCCVII に対する遺伝子組み換えセンダイウイルスの *in vitro* 殺細胞効果に関する検討

SCCVII の uPA 活性値は、図 3 で示した通り、他の頭頸部扁平上皮癌細胞株と比較し最も低く、予備実験において BioKnife の単回投与では十分な殺細胞効果を得ることができなかつたので、以下に示す実験を行った。

3.2.3.1 SCCVII に対する遺伝子組み換えセンダイウイルス連続投与による抗腫瘍効果の経時的観察

SCCVII (1×10^5 cells) を 35-mm dish に播種し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 湿潤環境下でインキュベートし、BioKnife を 10 multiplicities of infection (MOI) ずつ、腫瘍播種 24 時間後 (単回投与)、あるいは腫瘍播種 24、48、72、96 時間後 (4 日連続投与) に投与した。以後、蛍光顕微鏡 BZ8000 (キーエンス、大阪) を用い、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 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経時的な定点観測を実施した。ウイルス投与 24 時間後、48 時間後、72 時間後、および 96 時間後に、位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で撮影した画像を重ね合わせ、BioKnife 単回投与群と 4 日連続投与群を比較検討した。

3.2.3.2 SCCVII に対する遺伝子組み換えセンダイウイルス連続投与による殺細胞効果の測定

SCCVII 3×10^3 cells/100 μL /well を 96-well plate に播種した。rSeV/dM 投与群および BioKnife 投与群のそれぞれの群において、単回投与群、2 日連続投与群、4

日連続投与群の3群を設定した。単回投与群は腫瘍播種24時間後に、2日連続投与群は腫瘍播種24、48時間後に、4日連続投与群は腫瘍播種24、48、72、96時間後に rSeV/dM または BioKnife を投与した。ウイルスの投与力価に関しては、それぞれの群において播種細胞に対し1、5、10、25 MOI 相当の rSeV/dM または BioKnife を投与した。初回のウイルス投与100時間後に Cell count kit-8 (同仁堂、熊本) を用いた WST-8 試験を行い、相対的な生細胞数比を評価した。吸光度測定および各ウイルス力価の殺細胞効果の算出方法は 2.2.3.3 項で述べた通りである。

3.2.4 頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデル

動物モデルには、5~8週齢の C3H/HeN マウス雌 (日本 SLC、静岡) を用い、BioKnife 投与群、rSeV/dM (コントロールウイルス) 投与群、PBS 投与 (無治療コントロール) 群に分けて実施した。実験計画の承認や動物に対する各種処置・飼育、マウスの全身麻酔の方法は、2.2.4 項と同様である。

同種同系統のマウス由来の扁平上皮癌細胞株を使用し、頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルを作成した。擬似転移マウスモデルを選択した理由は、予備実験で口腔底に SCCVII を移植し原発巣を作成しても、腫瘍移植後28日目の時点で肺転移等の遠隔転移が認められなかったからである。SCCVII (1×10^5 cells/20 μ L PBS) 細胞浮遊液を、一次腫瘍として全身麻酔下の C3H/HeN マウスの口腔底に 30G 針を装着した Hamilton シリンジを用いて注入移植した。腫瘍移植1、2、3、4日後に、BioKnife 投与群 (n = 10)、rSeV/dM 投与群 (n = 10)、無治療コントロール群 (n = 10) において、それぞれ BioKnife (1.0×10^6 CIU /20 μ L PBS) あるいは rSeV/dM (1.0×10^6 CIU /20 μ L PBS) あるいは PBS (20 μ L) を、全身麻酔下で腫瘍を移植した口腔底に注入した。4回目のウイルスあるいは PBS

を投与した4日目に、擬似転移として左側腹部に SCCVII (1×10^5 cells/20 μ L PBS) 細胞浮遊液を注入し、二次腫瘍を作製した。腫瘍径はデジタルノギスを用いて計測し、長径 a (mm)、短径 b (mm) として腫瘍体積を次式のように算出した：
腫瘍体積 (mm^3) = $4\pi/3 \times a/2 \times (b/2)^2 \doteq 4 \times a/2 \times b^2/4 = ab^2/2$ 。マウスの体重が-20%を超えたマウスは安楽死させ、実験から除外した。腫瘍移植 25 日後に犠牲死させ、以下の実験で遺伝子組み換えセンダイウイルスが擬似転移巣を抑制するメカニズムについて検討した。

3.2.4.1 細胞傷害性 T 細胞アッセイ

一次腫瘍にウイルスを投与し、SCCVII 細胞に対して腫瘍特異的免疫反応による細胞傷害性が増強するかどうかを検討するため、細胞傷害性 T 細胞アッセイを行った。3 群の犠牲死したマウスの脾臓をそれぞれ、氷上の 10% FBS 含有 RPMI1640 を入れた 60 mm dish 内に浸し、70- μ m strainer (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用し脾臓をすり潰して脾臓細胞を採取した。混入した赤血球は ACK lysing buffer (Life technologies, Waltham, MA) を使用し除去した。脾臓細胞は 3 回 PBS で洗浄し、10% FBS 含有 RPMI1640 で遠心、再懸濁した。このエフェクター細胞を含む脾臓細胞の細胞傷害性を活性化させるため、100 グレイ照射した SCCVII 細胞 (1×10^6 cells) と 5 日間共培養した。その後、共培養した脾臓細胞はエフェクター細胞として回収した。エフェクター細胞とターゲット細胞である SCCVII 細胞 (1×10^3 cells) を、それぞれ 100:1、33:1、10:1、3:1 の割合で 96-well plate に撒き、5% CO_2 、37°C の湿潤環境下で 4 時間インキュベートした。細胞傷害性 T 細胞アッセイは、DNA フラグメンテーション ELISA キット (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を添付文書の通り使用した。このキットは、5-bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) がターゲット細胞の細胞死によって放出された DNA を標識するために使用されており、培養上清に放出された BrdU 標識 DNA

断片を検出する ELISA キットである。

3.2.4.2 フローサイトメトリーによる脾臓の免疫担当細胞誘導の解析

一次腫瘍にウイルスを投与し、SCCVII 細胞に対して免疫担当細胞が誘導されるかどうかを検討するため、脾臓における樹状細胞、CD4 細胞、CD8 細胞の細胞数を、フローサイトメトリー (FACSAria II、BD Biosciences、San Jose、CA) を使用して解析した。3 群の犠牲死したマウスの脾臓をそれぞれ、氷上の 10% FBS 含有 RPMI1640 を入れた 60 mm dish 内に浸し、70- μ m strainer を使用し脾臓をすり潰して脾臓細胞を採取した。その後、培地を 0.5 mg/mL のコラゲナーゼ (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) および 0.025 mg/mL の DNase I (Roche Diagnostics、Indianapolis、IN) を含有した RPMI1640 に替え、5% CO₂、37°C の湿潤環境下で 2 時間インキュベートした。再度 70- μ m strainer を使用し脾臓細胞を回収し、ACK lysing buffer を使用し赤血球を除去した後、3 回 PBS で洗浄し、FACS バッファー (2% Fetal calf serum と 0.05% NaN₃ を含有した PBS) で遠心、再懸濁した。樹状細胞を同定するために、FITC-conjugated anti-mouse Siglec-H 抗体 (1:10、BioLegend、San Diego、CA)、Pacific Blue™-conjugated anti-mouse CD317 抗体 (1:10、BioLegend)、APC-conjugated anti-mouse CD11c 抗体 (1:10、BioLegend) を使用して 30 分間氷上で染色した。CD4 細胞を同定するために、APC-conjugated anti-mouse CD4 抗体 (1:10、eBioscience、San Diego、CA) を使用して 30 分間氷上で染色した。CD4 細胞を同定するために、FITC-conjugated anti-mouse CD8a 抗体 (1:10、eBioscience) を使用して 30 分間氷上で染色した。

3.2.4.3 免疫組織化学的染色による擬似転移巣における免疫担当細胞誘導に関する検討

BioKnife 投与群でどの免疫担当細胞が直接擬似転移巣の縮小に関与しているかを検討するため、抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体、抗 DEC205 抗体を用いて免

疫組織化学的染色を行った。抗 DEC205 抗体は樹状細胞を同定するために使用した。免疫組織化学的染色の方法は過去の文献の通りである⁷¹⁾。rat anti-mouse CD4 抗体 (BD Pharmingen、San Diego、CA)、rat anti-mouse CD8a 抗体 (BD Pharmingen)、rat anti-mouse DEC205 抗体 (AbD Serotec、San Diego、CA) の希釈倍率はそれぞれ 1:100、1:100、1:25 である。検体は CCD カメラ (DP26、オリンパス、東京) で撮影した。

3.2.5 統計手法

実験結果の値は、平均 ± 標準誤差で表している。検討には、統計ソフト Prism 5 (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA) および Microsoft Excel add-in software Statcel (Ver. 3, OMS publishing、埼玉) を用いた。2 群間の比較には Mann-Whitney U-test を用いた。3 群間の比較については、フローサイトメトリー解析では one-way ANOVA の後 Williams test を行い、その他の実験では Kruskal-Wallis test の後 Steel-Dwass test を行った。5 % 以下を統計学的有意とした。

3.3 結果

3.3.1 SCCVII に対する遺伝子組み換えセンダイウイルスの *in vitro* 殺細胞効果に関する検討

C3H/HeN マウス由来の扁平上皮癌細胞株 SCCVII に対する BioKnife 連続投与後の SCCVII の形態変化を観察した。BioKnife 投与群において、単回投与群、4 日連続投与群の 2 群を設定した。位相差顕微鏡像と GFP 蛍光顕微鏡像を重ね合わせた像において、BioKnife 単回投与群では SCCVII の形態に変化はなく細胞死を引き起こさなかったが、BioKnife 4 日連続投与群では投与 48 時間後には GFP を発現する融合細胞を認め、投与 96 時間後には明らかな SCCVII の細胞死を引き起こした (図 10A)。定点観測による連続撮影によって得られたタイムラプ

顕微鏡像では、BioKnife 投与直後は腫瘍細胞の形態に明らかな変化を認めなかったが、投与 24 時間後を過ぎた頃から GFP 発現を伴う細胞が出現し、周辺の細胞と融合し多核巨細胞化する過程を観察した。投与 72–96 時間後で多核巨細胞は破裂するように細胞死し始めることが確認された。

WST-8 試験では、rSeV/dM 投与群と BioKnife 投与群の 2 群をさらに、単回投与群、2 日連続投与群、4 日連続投与群の 3 群に分けて測定した。WST-8 試験は、rSeV/dM と BioKnife の力価は 0–25 MOI の範囲で、ウイルス投与 100 時間後に測定している。SCCVII に対する BioKnife 投与群の殺細胞効果は、rSeV/dM 投与群と比較して有意に高く、ウイルス力価依存的かつ投与回数依存的に殺細胞効果を示した（2 日連続投与における 25 MOI : $p < 0.05$ 、4 日連続投与における 10 MOI と 25 MOI それぞれ : $p < 0.05$ 、図 10B–D）。BioKnife 投与群は、25 MOI の高力価および 4 日連続投与で一番高い殺細胞効果を示した（10 MOI において Kruskal-Wallis test で $p = 0.003$ 、Steel-Dwass test で BioKnife 単回投与群 vs 2 日連続投与群と BioKnife 単回投与群 vs 4 日連続投与群においてそれぞれ $p < 0.05$ 、25 MOI において Kruskal-Wallis test で $p = 0.005$ 、Steel-Dwass test で BioKnife 単回投与群 vs 2 日連続投与群と BioKnife 単回投与群 vs 4 日連続投与群においてそれぞれ $p < 0.05$ 、図 10E）。

3.3.2 頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおける BioKnife による擬似転移巣の抑制効果

頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおいて、BioKnife を原発巣に投与することにより擬似転移巣が抑制されるかどうかを *in vivo* で検討した。*in vitro* の殺細胞効果の測定で BioKnife 4 日連続投与が最も殺細胞効果を示したことを踏まえて、この *in vivo* の擬似転移マウスモデルにおいても 4 日連続投与を採用

した。頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルの実験プロトコルを図 1 1 A に示す。BioKnife 投与群、rSeV/dM 投与群、無治療コントロール群の 3 群間で原発巣の腫瘍抑制効果に有意な差は認めなかったが (Kruskal-Wallis test で $p = 0.199$ 、図 1 1 B)、BioKnife 投与群と無治療コントロール群の間で擬似転移巣の有意な腫瘍抑制効果を認めた (Kruskal-Wallis test で $p = 0.043$ 、Steel-Dwass test で無治療コントロール群 vs BioKnife 投与群において $p < 0.05$ 、図 1 1 C)。この結果から、SCCVII に対する BioKnife 連続投与の殺細胞効果によって腫瘍特異的免疫反応が誘導され、擬似転移巣を縮小させたと考え、以下の実験を行った。

3.3.2.1 細胞傷害性 T 細胞アッセイ

頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおいて、BioKnife を原発巣に投与することにより腫瘍特異的免疫反応を誘導するかどうか検討するため、脾臓細胞を採取して細胞傷害性 T 細胞アッセイを行った (図 1 2)。エフェクター細胞：ターゲット細胞比が 33 : 1 の時、BioKnife 投与群が他の 2 群と比較して SCCVII に対する有意な細胞傷害性を示した (Kruskal-Wallis test で $p = 0.001$ 、Steel-Dwass test で無治療コントロール群 vs BioKnife 投与群と rSeV/dM 投与群 vs BioKnife 投与群においてそれぞれ $p < 0.05$)。また、エフェクター細胞：ターゲット細胞比が 100 : 1 の時、3 群間で SCCVII に対する有意な細胞傷害性を示した (Kruskal-Wallis test で $p < 0.001$ 、Steel-Dwass test で無治療コントロール群 vs rSeV/dM 投与群、無治療コントロール群 vs rSeV/dM 投与群、rSeV/dM 投与群 vs BioKnife 投与群においてそれぞれ $p < 0.05$)。これらの結果から、BioKnife 投与群において SCCVII に対する有意な細胞傷害性が誘導され、擬似転移巣の縮小に関与していると考えられた。

3.3.2.2 フローサイトメトリーによる脾臓の免疫担当細胞誘導の解析

頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおいて、BioKnife を原発巣に投与

することにより全身性に免疫担当細胞を誘導するかどうか検討するため、脾臓におけるフローサイトメトリー解析を行った（図 1 3）。BioKnife 投与群と rSeV/dM 投与群の樹状細胞および CD4 細胞、CD8 細胞は、無治療コントロール群と比較して有意に増加を認めた（樹状細胞において one-way ANOVA で $p = 0.039$ 、Williams test で無治療コントロール群 2.3% vs rSeV/dM 投与群 4.6%、無治療コントロール群 2.3% vs BioKnife 投与群 4.3%においてそれぞれ $p < 0.05$ 、CD4 細胞において one-way ANOVA で $p = 0.011$ 、Williams test で無治療コントロール群 15.2% vs rSeV/dM 投与群 23.8%、無治療コントロール群 15.2% vs BioKnife 投与群 25.1%それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.01$ 、CD8 細胞において one-way ANOVA で $p = 0.008$ 、Williams test で無治療コントロール群 4.1% vs rSeV/dM 投与群 5.8%、無治療コントロール群 4.1% vs BioKnife 投与群 8.4%それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.01$ ）。これらの結果から、ウイルスの投与により全身性に免疫担当細胞が誘導され、特に BioKnife 投与群が他の 2 群と比較して CD8 細胞を誘導する傾向を認めた。

3.3.2.3 擬似転移巣における免疫担当細胞誘導に関する検討

BioKnife 投与群でどの免疫担当細胞が直接擬似転移巣の縮小に関与しているかを検討するため、抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体、抗 DEC205 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。抗 DEC205 抗体は樹状細胞を同定するために使用した（図 1 4）。どの群においても擬似転移巣内には樹状細胞と CD4 細胞を認めなかったが、BioKnife 投与群において CD8 細胞が擬似転移巣に浸潤している像を観察した。これらの結果から、擬似転移巣の腫瘍抑制効果は CD8 細胞が直接関与していることが示唆された。

3.4 考察

腫瘍溶解性ウイルスは、直接的な抗腫瘍効果だけでなく、その腫瘍溶解の過程で宿主の抗腫瘍免疫が誘導・賦活化されることにより、遠隔転移病変に対しても抗腫瘍効果を発揮することが報告されている^{65,66)}。悪性黒色腫においては、免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体と腫瘍溶解性ウイルスを併用することによって、有意に治療効果を増強したと報告されている⁷²⁾。

本章では、uPA 活性依存的に細胞膜融合を誘導する腫瘍溶解性センダイウイルス BioKnife が、頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおいて癌を特異的に細胞死させることで抗腫瘍免疫を誘導し、擬似転移巣を抑制するかどうか、またそのメカニズムについて検討した。重要な実験結果としては、①原発巣に BioKnife を 4 日連続注入することにより、原発巣の縮小は認められなかったものの、擬似転移巣を抑制したこと、②原発巣に rSeV を 4 日連続注入することにより、脾臓において樹状細胞や CD4 細胞、CD8 細胞が誘導され、特に BioKnife 投与群において CD8 細胞を強く誘導する傾向を認めたこと、③BioKnife 投与群において、CD8 細胞が擬似転移巣に浸潤しており、CD8 細胞が擬似転移巣に対する抗腫瘍効果の主役であると考えられたこと、が挙げられる。これらの実験結果から、原発巣に十分な殺細胞効果を発揮する力価の BioKnife を投与すれば、擬似転移巣を抑制するだけの抗腫瘍免疫を誘導できることが証明されたと考える。

本研究で使用した SCCVII の uPA 活性に関しては、図 3 に示す通り、他の頭頸部癌細胞株と比較しても一番低い細胞株であった。実験系として、uPA 活性の高い細胞株を選択したいところであるが、マウスの免疫系を観察するためにはそのマウス由来の細胞株を使用する他なく、現在のところ渉猟する限り、マウス由来の頭頸部扁平表皮癌細胞株は SCCVII のみである。本研究では、有効な殺細胞効果を発揮するため、BioKnife の連続投与を行い、SCCVII に対して良好

な殺細胞効果を発揮することができた。これまでの BioKnife に関する先行論文では、胸膜中皮腫同所移植マウスモデル⁵⁵⁾や我々の研究チームが確立した甲状腺未分化癌同所移植マウスモデル¹⁹⁾、舌扁平上皮癌同所移植マウスモデル²⁰⁾において BioKnife を連続投与することにより治療効果の向上を得たことを報告しており、第 2 章の SN 転移標的治療のマウスモデルにおいても BioKnife の連続投与により有意な頸部リンパ節転移の抑制を得ることができた。BioKnife に感染した腫瘍細胞は、retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)や NF-κB を活性化することにより uPA を発現することが報告されており⁵⁵⁾、BioKnife を複数回投与することにより uPA が低い腫瘍細胞でもより大きな抗腫瘍効果が得られるのだと予想される。

原発巣に BioKnife を 4 日連続注入しても、原発巣に対して腫瘍抑制効果を認めなかったのは、SCCVII 細胞株の細胞増殖能が非常に高いからだと考えている。腫瘍増殖速度の観察結果として、図 1 1 に示す通り、Day 0 に移植した原発巣の腫瘍増殖速度と、Day 4 に移植した擬似転移巣の腫瘍増殖速度は異なっている。過去の文献から、腫瘍をマウスに移植するだけでも、自然免疫および獲得免疫が誘導され、異時的に移植された腫瘍の拒絶の度合いは移植するタイミングによることが分かっている⁷³⁾。そのため、擬似転移巣の増殖速度は原発巣に比較して遅くなり、癌特異的な抗腫瘍免疫の誘導を観察するのに適した条件が整うのだと考える。

フローサイトメトリーの結果で、rSeV/dM 投与群と BioKnife 投与群の両群とも無治療コントロール群と比較して有意に免疫担当細胞を誘導していたにも関わらず、BioKnife 投与群が細胞傷害性 T 細胞アッセイで他の 2 群と比較し有意に高い細胞傷害性を示したことや *in vivo* の実験で無治療コントロール群と比較し有意に擬似転移巣を抑制したことは、BioKnife が uPA 依存的に SCCVII の細

胞膜融合・多核巨細胞化を引き起こし、アポトーシスを誘導して細胞死させることにより、癌特異的な抗原量が増え、より強い抗腫瘍免疫を誘導したからだと考えている。BioKnife が uPA 依存的に腫瘍細胞の細胞膜融合・多核巨細胞化を引き起こし、アポトーシスを誘導して殺細胞効果を発揮することは過去の文献においても^{54, 55)}、第 2 章の結果においても示されている。アポトーシスにより抗原量が増えることによって細胞傷害性 T 細胞が活性化され強い抗腫瘍免疫を誘導することは以前より指摘されており⁷⁴⁻⁷⁸⁾、この事実を支持している。なぜフローサイトメトリーの結果でコントロールウイルスである rSeV/dM 投与群でも免疫担当細胞の誘導が見られ、細胞傷害性 T 細胞アッセイで無治療コントロール群と比較し有意に高い細胞傷害性を示したかについては、紫外線で不活化した SeV を高力価で投与すると樹状細胞や CD4 細胞、CD8 細胞が誘導され、細胞傷害性 T 細胞が活性化されるという Kurooka らの報告⁷⁹⁾から推測できる。Kurooka らの報告ほどの高力価の SeV ではないが、コントロールウイルスである rSeV/dM を投与するだけでも脾臓において樹状細胞や CD4 細胞、CD8 細胞が誘導され、本研究での *in vitro* の実験で有効な殺細胞効果を示さず、*in vivo* の実験で有意差が出るほどの擬似転移巣抑制効果はなかったが、ある程度の抗腫瘍免疫が誘導されたのだと考えられる。

誘導された抗腫瘍免疫が癌特異的かどうかを支持するデータとしては、細胞傷害性 T 細胞アッセイにおいてコントロール群でエフェクター細胞：ターゲット細胞比を増やしてもターゲット細胞の傷害性を示さなかったことから、癌特異的な抗腫瘍免疫と無関係の自然免疫系および獲得免疫系のエフェクター細胞の影響は除外できていると考えている。

BioKnife による免疫担当細胞誘導に関する検討では、図 1 3 と図 1 4 で示すとおり、脾臓において樹状細胞、CD4 細胞、CD8 細胞が誘導され、擬似転移巣

に対して CD8 細胞が浸潤することを示した。多くの先行文献で、抗腫瘍免疫における樹状細胞、CD4 細胞、CD8 細胞の役割が検討されている。癌特異的な抗腫瘍免疫の確立には、様々な担癌マウスモデルにおいて樹状細胞が腫瘍特異的 T 細胞に抗原提示する必要があるとされている^{80, 81)}。また、悪性黒色腫マウスモデルにおいて、不活化したセンダイウイルスエンベロープ内に血小板を組み込んだ製剤を全身投与し腫瘍栄養血管内で血栓を引き起こすと、CD4 細胞と CD8 細胞が腫瘍に浸潤し抗腫瘍効果を発揮し、CD4 細胞あるいは CD8 細胞、特に CD8 細胞を除去した際に抗腫瘍効果が失われると報告されている⁸²⁾。これらのエビデンス及び本研究の結果から、BioKnife 投与によって放出された癌特異的な抗原を樹状細胞が CD4 細胞や CD8 細胞に抗原提示することによって癌特異的な抗腫瘍免疫が誘導され、直接的な擬似転移巣の抑制効果に関しては主に CD8 細胞によるものと推定された。

本研究により、BioKnife を原発巣に投与することにより癌特異的な抗腫瘍免疫が誘導されることが示されたので、臨床においてリンパ節転移や遠隔転移を有する患者においても転移巣の抑制効果や生存率延長に寄与する可能性や、臨床的 NOMO の患者においても転移の予防効果を期待できる。また、既存の抗癌剤や前述した免疫チェックポイント阻害薬の抗 PD-1 抗体などとの併用療法により、転移巣に対する治療の相加・相乗効果が期待できる。BioKnife の力価や投与回数、投与方法を検討する余地はあるが、BioKnife は uPA を高発現するような悪性度の高い頭頸部癌患者に対して、原発巣に対する治療効果だけでなく、転移巣に対しても治療効果及び予防効果を発揮する非常に有望な治療ウイルスになりうるものだと考える。

第4章 総括

今後の研究の発展性や展望について

腫瘍溶解性ウイルス療法は従来の標準治療とは抗腫瘍メカニズムが異なり、手術や放射線、がん化学療法の標準療法との併用により相加効果・相乗効果が期待できる。

早期の頭頸部癌患者に対しては、**BioKnife** 単独投与による原発巣の制御や頸部リンパ節転移の予防や頸部リンパ節における微小転移の制御が期待できる。また、低侵襲手術により原発巣を切除した後に頸部リンパ節転移の予防や治療のために切除部に **BioKnife** を投与することも有効だと考えられる。さらには抗腫瘍免疫誘導の観点から、原発巣に **BioKnife** を投与することで抗腫瘍免疫を誘導し、頸部リンパ節における微小転移の制御にも寄与できると思われる。

進行期の頭頸部癌患者に対しては、**BioKnife** をがん化学療法や分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬やがんワクチンを含めた免疫療法と併用することによって、抗腫瘍メカニズムが異なるため生存期間の延長を期待することができる。また、**BioKnife** に免疫刺激因子を搭載することによって、より強力な抗腫瘍免疫を誘導することも期待される。

先に述べたように、**BioKnife** は非常に安全性にも優れたウイルスであるので臨床応用するのに適した腫瘍溶解性ウイルスだと言える。**BioKnife** による腫瘍溶解性ウイルス療法は、さまざまな治療法と併用可能であるので、ここ数十年改善を認めなかった頭頸部癌の生命予後を改善させる日も来るのではないかと考えている。

第5章 結論

本研究では、uPA 活性依存的に抗腫瘍効果を発揮する腫瘍溶解性センダイウイルス BioKnife が頭頸部扁平上皮癌の原発巣に対して治療効果を発揮するだけでなく、頸部リンパ節転移や遠隔転移に対する治療効果を期待した、転移巣を標的とした新規治療の開発を目的として、BioKnife による①センチネルリンパ節転移標的治療および②原発巣治療の結果として誘導される抗腫瘍免疫による遠隔転移治療の2方向から検討し、舌扁平上皮癌頸部リンパ節マウスモデルおよび頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおいてその有効性を示した。

舌扁平上皮癌頸部リンパ節マウスモデルにおいて、BioKnife はセンチネル理論に従って頸部リンパ節に移行し、頸部リンパ節転移に感染することによって頸部リンパ節転移を抑制することが示された。臨床的 N0 症例であっても、最初に転移をきたす SN 特異的な予防的治療を行うことができ、後発リンパ節転移の予防効果が期待できる。また、原発巣に対する手術や（化学）放射線療法との併用の際にもリンパ節転移の制御が期待できる。

頭頸部扁平上皮癌擬似転移モデルにおいては、BioKnife を原発巣に投与することにより癌特異的な抗腫瘍免疫が誘導され、擬似転移巣が抑制されることが示された。臨床においては、リンパ節転移や遠隔転移を有する患者においても転移巣の抑制効果や生存率延長に寄与する可能性や、臨床的 NOM0 の患者においても転移の予防効果を期待できる。

BioKnife による腫瘍溶解性ウイルス療法は、治療の低侵襲化による患者の QOL 向上のみならず、頭頸部癌の予後向上を目指した新たな治療戦略を展開できるものと考えている。本研究は、臨床応用が容易な手法を用いており、センダイウイルスの安全性も高いことから、BioKnife の臨床応用による新たな頭頸部癌低侵襲治療の礎となることが期待される。

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防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座 荒木幸仁准教授、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）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、防衛医科大学校内科学（血液・膠原病アレルギー）木村文彦教授、前川隆彰先生、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、厚生労働省科学研究費基盤(C) (No. 18K09390、17K11415、16K11252、16K15726、16K01488、26462627 および 26462626)により実施した。

本研究の一部は AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer (2016年7月、シアトル)、the 2017 AAO-HNSF Annual Meeting (2017年9月、シカゴ)、American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018 (2018年4月、シカゴ)にて発表した。

引用文献

1. 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.
2. 頭頸部癌診療ガイドライン 2013 年版. 日本頭頸部癌学会編. 金原出版, 東京, 2013.
3. 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;252:854–6.
4. Vacchelli E, Eggermont A, Sautès-Fridman C, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G, et al. Trial watch: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2013;2:e24612.
5. Pol J, Bloy N, Obrist F, Eggermont A, Galon J, Cremer I, et al. Trial Watch: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2014;3:e28694.
6. Pol J, Buqué A, Aranda F, Bloy N, Cremer I, Eggermont A, et al. Trial Watch-Oncolytic viruses and cancer therapy. *Oncoimmunology* 2015;5:e1117740.
7. Vähä-Koskela MJ, Heikkilä JE, Hinkkanen AE. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett* 2007;254:178–216.
8. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012;30:658–70.
9. Bartlett DL, Liu Z, Sathaiyah M, Ravindranathan R, Guo Z, He Y, et al. Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Mol Cancer* 2013;12:103.
10. Kaiser J. Clinical research. Death prompts a review of gene therapy vector. *Science* 2007;317:580.
11. 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;80:148–58.

12. 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;118:3132–42.
13. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008;118:3143–50.
14. Gonias SL, Hu J. Urokinase receptor and resistance to targeted anticancer agents. *Front Pharmacol* 2015;6:154.
15. Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9:32–71.
16. 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;100:657–62.
17. Iida A, Inoue M. Concept and technology underlying Sendai virus (SeV) vector development. In: Nagai Y, ed. *Sendai Virus Vector: Advantages and Applications*. Tokyo: Springer, 2013;69–90.
18. Yonemitsu Y, Ueda Y, Hasegawa M. BioKnife, a modified Sendai virus, to resect malignant tumors. In: Nagai Y, ed. *Sendai Virus Vector: Advantages and Applications*. Tokyo: Springer, 2013;151–69.
19. Miyagawa Y, Yamashita T, Araki K, Tomifuji M, Ueda Y, Yonemitsu Y, et al. BioKnife, a urokinase-type plasminogen activator-dependent oncolytic Sendai virus, exterminate orthotopic anaplastic thyroid carcinoma. <http://epostersonline.com/ifhnos2014/poster/ifhnos2014.2d40b18>. July, 2014.
20. Tanaka S, Araki K, Yamashita T, Tanaka Y, Ueda Y, Shiotani A. Oncolytic Sendai Virus Therapy for Head and Neck Cancer. <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0194599817717251d>. Sep, 2017.
21. Tomifuji M, Imanishi Y, Araki K, Yamashita T, Yamamoto S, Kameyama K, et al. Tumor depth as a predictor of lymph node metastasis of supraglottic and hypopharyngeal cancers.

Ann Surg Oncol 2011;18:490–6.

22. de Bree R, Castelijns JA, Hoekstra OS, Leemans CR. Advances in imaging in the work-up of head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 2009;45:930–5.
23. Kuerer HM, Newman LA. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy for breast cancer: developments and resolving controversies. *J Clin Oncol* 2005;23:1698–705.
24. Liu LC, Lang JE, Lu Y, Roe D, Hwang SE, Ewing CA, et al. Intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer patients: a meta-analysis and single-institution experience. *Cancer* 2011;117:250–8.
25. Lyman GH, Somerfield MR, Bosserman LD, Perkins CL, Weaver DL, Giuliano AE. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2017;35:561–64.
26. Wong SL, Faries MB, Kennedy EB, Agarwala SS, Akhurst TJ, Ariyan C, et al. Sentinel lymph node biopsy and management of regional lymph nodes in melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Ann Surg Oncol* 2017 Dec 13. doi: 10.1245/s10434-017-6267-7. [Epub ahead of print]
27. Ichikura T, Chochi K, Sugawara H, Yaguchi Y, Sakamoto N, Takahata R, et al. Individualized surgery for early gastric cancer guided by sentinel node biopsy. *Surgery* 2006;139:501–7.
28. Tomifuji M, Shiotani A, Fujii H, Araki K, Saito K, Inagaki K, et al. Sentinel node concept in clinically N0 laryngeal and hypopharyngeal cancer. *Ann Surg Oncol* 2008;15:2568–75.
29. Civantos FJ, Stoeckli SJ, Takes RP, Woolgar JA, de Bree R, Paleri V, et al. What is the role of sentinel lymph node biopsy in the management of oral cancer in 2010? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010;267:839–44.
30. Stoecki SJ, Alkureishi LW, Ross GL. Sentinel node biopsy for early oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266:787–93.

31. Paleri V, Rees G, Arullendran P, Shoaib T, Krishman S. Sentinel lymph node biopsy in squamous cell cancer of the oral cavity and oral pharynx: a diagnostic meta-analysis. *Head Neck* 2005;27:739–47.
32. Miura K, Hirakawa H, Uemura H, Yoshimoto S, Shiotani A, Sugasawa M, et al. Sentinel node biopsy for oral cancer: A prospective multicenter Phase II trial. *Auris Nasus Larynx* 2017;44:319–26.
33. Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Ohnuki K, Umeda IO, et al. Novel indocyanine green-phytate colloid technique for sentinel node detection in head and neck: mouse study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;151:279–85.
34. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:4807–16.
35. Shi F, Zhang Q, Liang Z, Zhang M, Liu X. One-step nucleic acid amplification assay is an accurate technique for sentinel lymph node biopsy of breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2017;117:1185–91.
36. Yaguchi Y, Sugasawa H, Tsujimoto H, Takata H, Nakabayashi K, Ichikura T, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2011;18:2289–96.
37. Kumagai K, Yamamoto N, Miyashiro I, Tomita Y, Katai H, Kushima R, et al. Multicenter study evaluating the clinical performance of the OSNA assay for the molecular detection of lymph node metastases in gastric cancer patients. *Gastric Cancer* 2014;17:273–80.
38. Croner RS, Geppert CI, Bader FG, Nitsche U, Späth C, Rosenberg R, et al. Molecular staging of lymph node-negative colon carcinomas by one-step nucleic acid amplification (OSNA) results in upstaging of a quarter of patients in a prospective, European, multicentre study. *Br J Cancer* 2014;110:2544–50.
39. Yamamoto H, Tomita N, Inomata M, Furuhashi T, Miyake Y, Noura S, et al. OSNA-Assisted Molecular Staging in Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial in Japan. *Ann Surg Oncol* 2016;23:391–6.

40. Nakagawa K, Asamura H, Tsuta K, Nagai K, Yamada E, Ishii G, et al. The novel one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for the diagnosis of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a multicenter prospective study. *Lung Cancer* 2016;97:1–7.
41. Jäckel MC, Martin A, Steiner W. Twenty-five years experience with laser surgery for head and neck tumors: report of an international symposium, Göttingen, Germany, 2005. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:577–85.
42. Weinstein GS, O'Malley BW Jr, Magnuson JS, Carroll WR, Olsen KD, Daio L, et al. Transoral robotic surgery: a multicenter study to assess feasibility, safety, and surgical margins. *Laryngoscope* 2012;122:1701–7.
43. Shiotani A, Tomifuji M, Araki K, Yamashita T, Saito K. Videolaryngoscopic transoral en bloc resection of supraglottic and hypopharyngeal cancers using laparoscopic surgical instruments. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010;119:225–32.
44. Shiotani A, Tomifuji M, Araki K, Yamashita T. Transoral videolaryngoscopic surgery for en bloc resection of supraglottic and hypopharyngeal cancers. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;144:288–9.
45. Yamashita T, Tomifuji M, Araki K, Kurioka T, Shiotani A. Endoscopic transoral oropharyngectomy using laparoscopic surgical instruments. *Head Neck* 2011;33:1315–21.
46. Tomifuji M, Araki K, Yamashita T, Shiotani A. Transoral videolaryngoscopic surgery for oropharyngeal, hypopharyngeal, and supraglottic cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014;271:589–97.
47. Tanaka Y, Tomifuji M, Suzuki H, Yamashita T, Araki K, Shiotani A. Transoral videolaryngoscopic surgery with a navigation system for excision of a metastatic retropharyngeal lymph node. *ORL* 2014;76:357–63.
48. Tomifuji M, Araki K, Yamashita T, Mizokami D, Kamide D, Suzuki H, et al. Risk factors for dysphagia after transoral videolaryngoscopic surgery for laryngeal and pharyngeal cancer. *Head Neck* 2016;38:196–201.

49. Tanaka S, Tomifuji M, Araki K, Uno K, Tanaka Y, Mizokami D, et al. Vocal function after transoral videolaryngoscopic surgery (TOVS) for hypopharyngeal and supraglottic cancer. *Acta Otolaryngol.* 2017;137:403–10.
50. Yonemitsu Y, Matsumoto T, Maehara Y. Gene therapy for peripheral arterial disease using Sendai virus vector: From clinical studies to the phase I/IIa clinical trial. In: Nagai Y, ed. *Sendai Virus Vector: Advantages and Applications.* Tokyo: Springer, 2013; 185–99.
51. Nyombayire J, Anzala O, Gazzard B, Karita E, Bergin P, Hayes P, et al. First-in-Human Evaluation of the Safety and Immunogenicity of an Intranasally Administered Replication-Competent Sendai Virus-Vectored HIV Type 1 Gag Vaccine: Induction of Potent T-Cell or Antibody Responses in Prime-Boost Regimens. *J Infect Dis* 2017;215:95–104.
52. 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.
53. 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;77:6419–29.
54. 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;18:1778–86.
55. 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;20:769–77.
56. Kikuchi S, Kishimoto H, Tazawa H, Hashimoto Y, Kuroda S, Nishizaki M, et al. Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer. *Mol Ther* 2015;23:501–9.
57. Matsui T, Ota T, Ueda Y, Tanino M, Odashima S. Isolation of a highly metastatic cell line

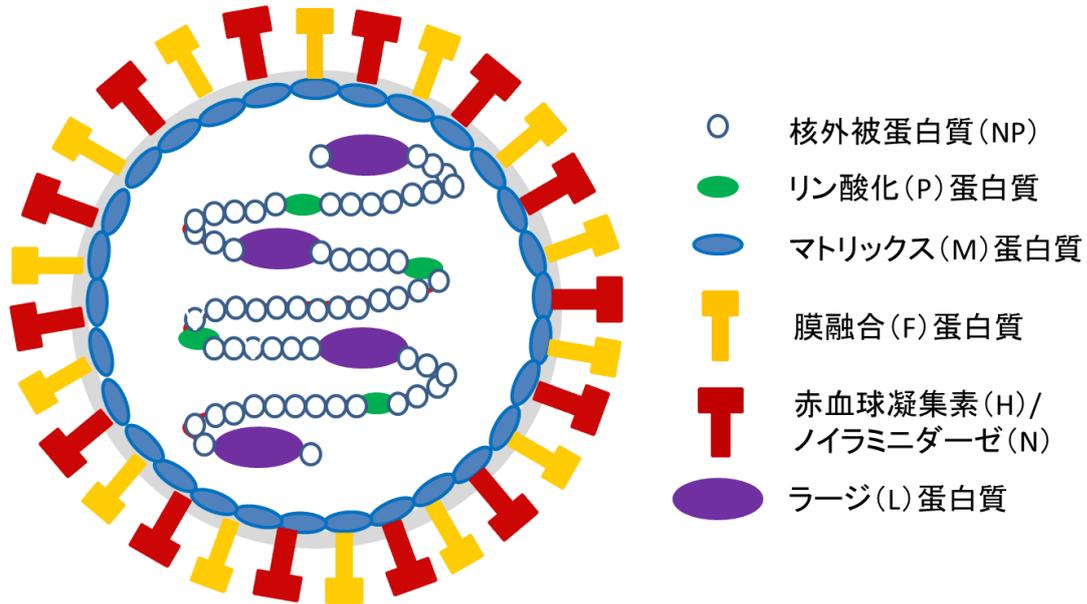
- to lymph node in human oral squamous cell carcinoma by orthotopic implantation in nude mice. *Oral Oncol* 1998;34:253–6.
58. Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS. Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:699–702.
 59. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 2003;3:489–501.
 60. Idell S, Pueblitz, S, Emri S, Gungen Y, Gray L, Kumar A, et al. Regulation of fibrin deposition by malignant mesothelioma. *Am J Pathol* 1995;147:1318–29.
 61. Horvatić Herceg G, Herceg D, Kralik M, Bence-Zigman Z, Tomić-Brzac H, Kulić A. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in thyroid neoplasms: a cytosol study. *Wien Klin Wochenschr* 2006;118:601–9.
 62. Hundsdorfer B, Zeilhofer HF, Bock KP, Dettmar P, Schmitt M, Kolk A, et al. Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity – clinical relevance and prognostic value. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;33:191–6.
 63. 平野滋, 北村博之, 宮田耕志, 金子賢一, 安里亮. 頭頸部癌の遠隔転移に対する治療効果. *耳鼻臨床* 1993. 86 : 12 ; 1769–73.
 64. 野谷健一, 半沢元章, 佐藤明, 福田博. 頭頸部悪性腫瘍の原発部・頸部制御例における遠隔転移 23 例の検討: 臨床経過と背景因子について. *日本口腔腫瘍学会誌* 1995. 7 : 2 ; 83–90.
 65. Melcher A, Parato K, Rooney CM, Bell JC. Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide. *Mol Ther* 2011;19:1008–16.
 66. Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2014;14:559–67.
 67. Tong AW, Senzer N, Cerullo V, Templeton NS, Hemminki A, Nemunaitis J. Oncolytic viruses for induction of anti-tumor immunity. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:1750–60.

68. Naik JD, Twelves CJ, Selby PJ, Vile RG, Chester JD. Immune recruitment and therapeutic synergy: keys to optimizing oncolytic viral therapy? *Clin Cancer Res* 2011;17:4214–24.
69. Johnson DB, Puzanov I, Kelley MC. Talimogene laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma. *Immunotherapy* 2015;7:611–9.
70. Jiang H, Clise-Dwyer K, Ruisaard KE, Fan X, Tian W, Gumin J, et al. Delta-24-RGD oncolytic adenovirus elicits anti-glioma immunity in an immunocompetent mouse model. *PLoS One* 2014;9:e97407.
71. Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol* 2006;8:218–32.
72. 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;24:166–74.
73. Akporiaye ET, Kudalore M, Stevenson AP, Kraemer PM, Stewart CC. Isolation and reactivity of host effectors associated with the manifestation of concomitant tumor immunity. *Cancer Res* 1988;48:1153–8.
74. Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:3542–9.
75. Russo V, Tanzarella S, Dalerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, et al. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2185–90.
76. Chen Z, Moyana T, Saxena A, Warrington R, Jia Z, Xiang J. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int J Cancer* 2001;93:539–48.
77. Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos P, Dauer M, Röbe J, et al. Apoptotic

pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res* 2002;62:2347–52.

78. Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, Scott B, Heath WR, Collins EJ, et al. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol* 2003;170:4905–13.
79. Kurooka M, Kaneda Y. Inactivated Sendai virus particles eradicate tumors by inducing immune responses through blocking regulatory T cells. *Cancer Res* 2007;67:227–36.
80. Woods K, Cebon J. Tumor-specific T-cell help is associated with improved survival in melanoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:4021–3.
81. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: Translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:17–58.
82. Nishikawa T, Tung LY, Kaneda Y. Systemic administration of platelets incorporating inactivated Sendai virus eradicates melanoma in mice. *Mol Ther* 2014;22:2046–55.

A



NP: 核外被蛋白質 (NP)

P: RNA ポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化 (P) 蛋白質

M: ウイルス粒子構造を裏打ちしているマトリックス (M) 蛋白質

F: 隣接細胞と細胞膜融合を引き起こす膜融合 (F) 蛋白質

HN: 細胞膜上のシアル酸と結合・分離に関わる赤血球凝集素 (H) / ノイラミニダーゼ (N)

L: RNA ポリメラーゼの大サブユニットであるラージ (L) 蛋白質

B

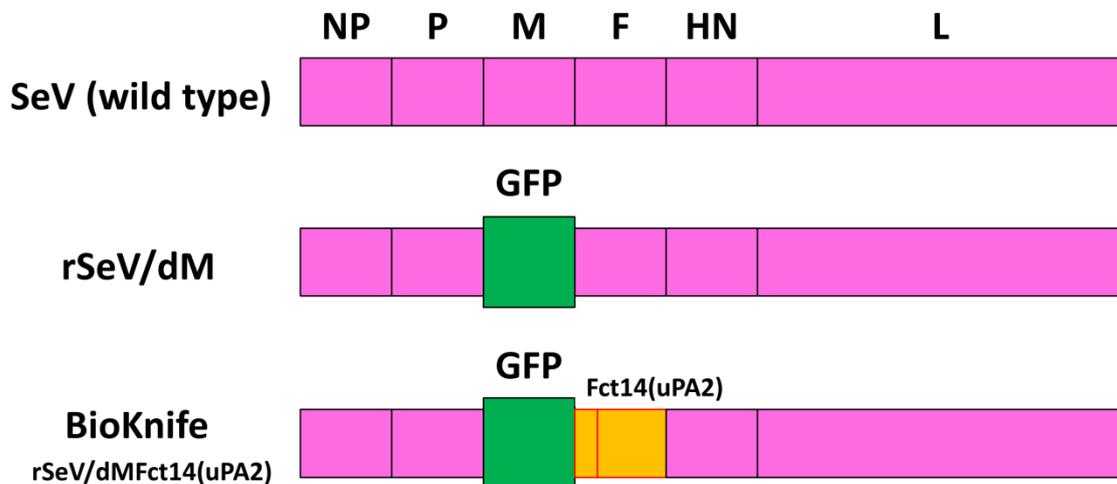


図1 センダイウイルス (SeV) 粒子と組み換えセンダイウイルスのゲノム構造

(A) SeV 粒子構造。マトリックス (M) 蛋白は、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。膜融合 (F) 蛋白は、トリプシン感受性アミノ酸配列を有し、トリプシン様タンパク分解酵素によって不活性型から活性型になり、隣接細胞と細胞膜融合を引き起こす。

(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)、呼称 “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 遺伝子を欠損させ、GFP レポーター遺伝子を挿入。

BioKnife：①M 遺伝子を欠損させ、GFP レポーター遺伝子を挿入。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。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。

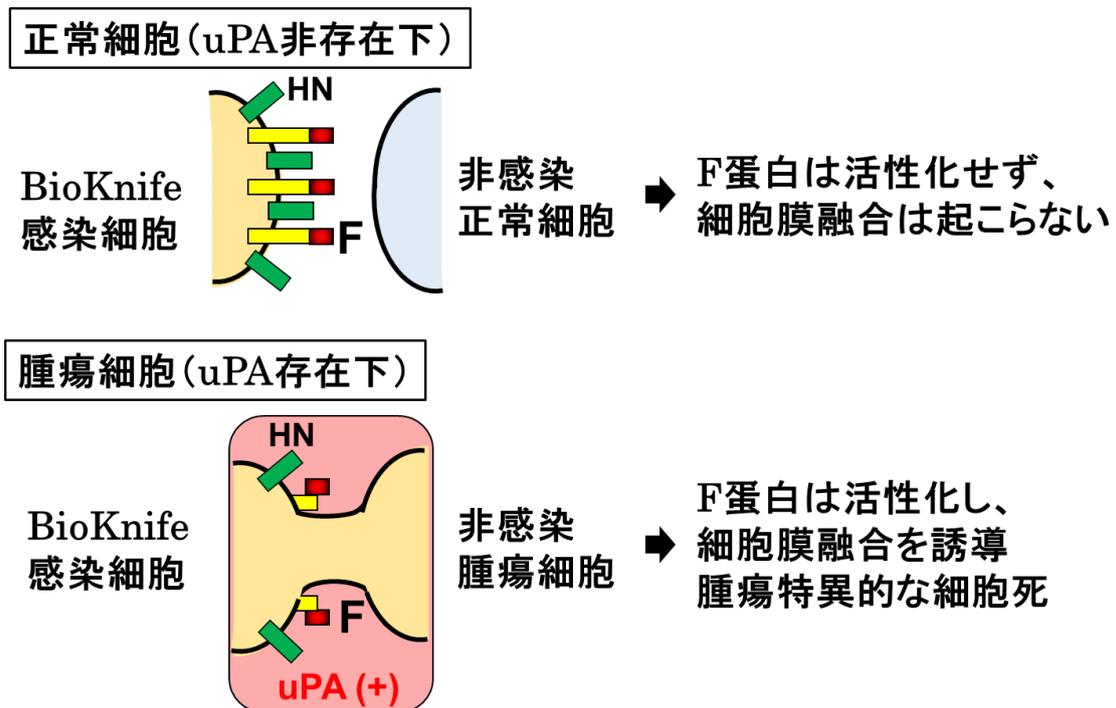


図2 BioKnifeの腫瘍細胞に対する殺細胞メカニズム

BioKnifeは、F蛋白をuPA依存的に活性化するように改変を行っている。BioKnifeに感染した細胞は、細胞膜上にF蛋白を発現するが、隣接する細胞がuPAを発現していない正常細胞の場合、F蛋白は活性化せず、膜融合を来さない。一方、隣接する細胞がuPA陽性腫瘍細胞の場合は、隣接する腫瘍細胞と膜融合を来し、多核巨細胞を形成し、最終的に細胞死を誘導する。

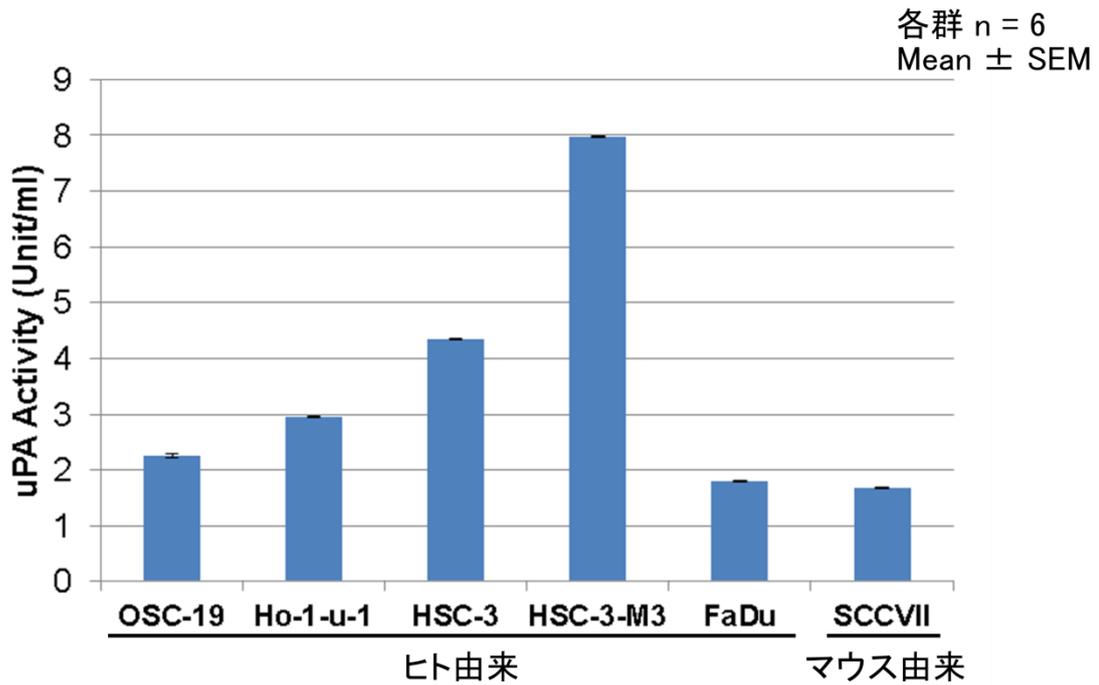
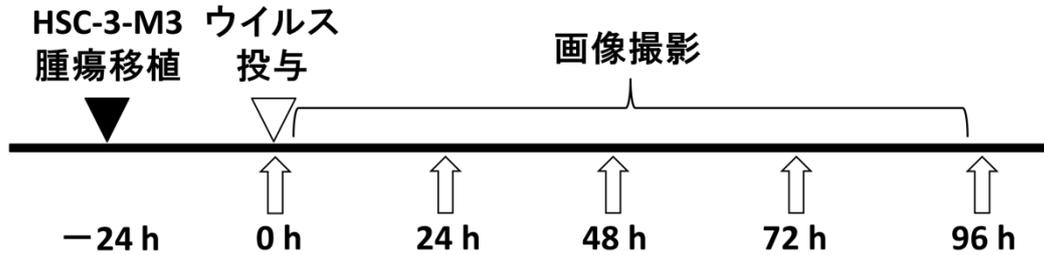


図3 頭頸部扁平上皮癌細胞株における uPA 活性値
 使用した頭頸部扁平上皮癌細胞株はいずれも uPA 活性を認め、その中でも HSC-3 の高転移株である HSC-3-M3 が最も活性が高かった。

SEM: standard error of the mean

Mean ± SEM: 平均 ± 標準誤差

A



B

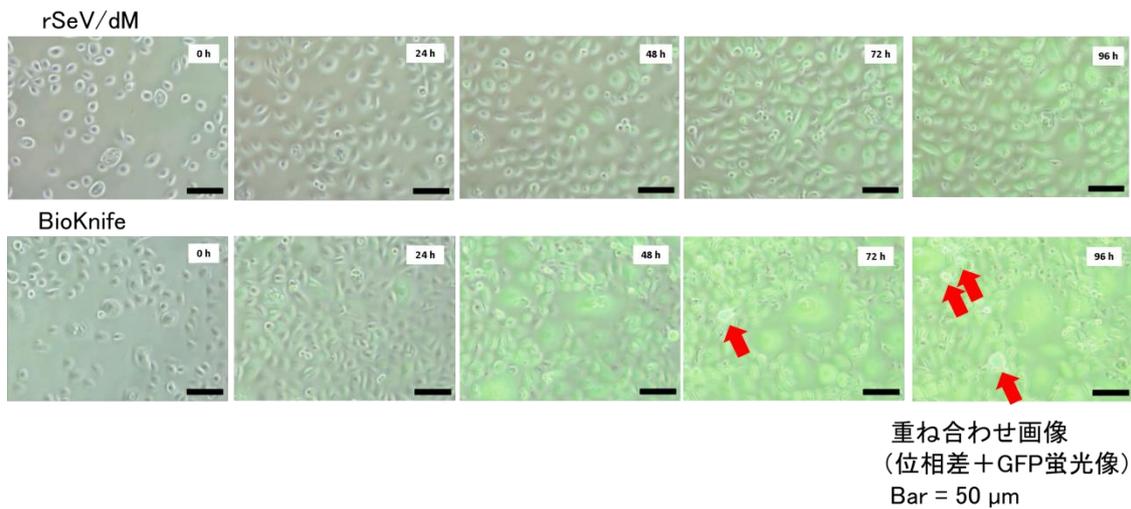


図4 HSC-3-M3 に対するウイルス感染後の抗腫瘍効果の経時的観察

(A) 実験プロトコル。

(B) 位相差顕微鏡像と GFP 蛍光顕微鏡像の重ね合わせ画像。上段のコントロールウイルスである rSeV/dM 投与群では投与 24 時間後からレポーター遺伝子である GFP の発現を認めるものの、HSC-3-M3 の形態に変化はなく細胞死を引き起こさなかったが、下段の BioKnife 投与群では投与 48 時間後には巨大な融合細胞を認め、投与 72-96 時間後には HSC-3-M3 の細胞死 (赤矢印) を引き起こした。写真右上の数字はウイルス感染後の経過時間 (時間)。

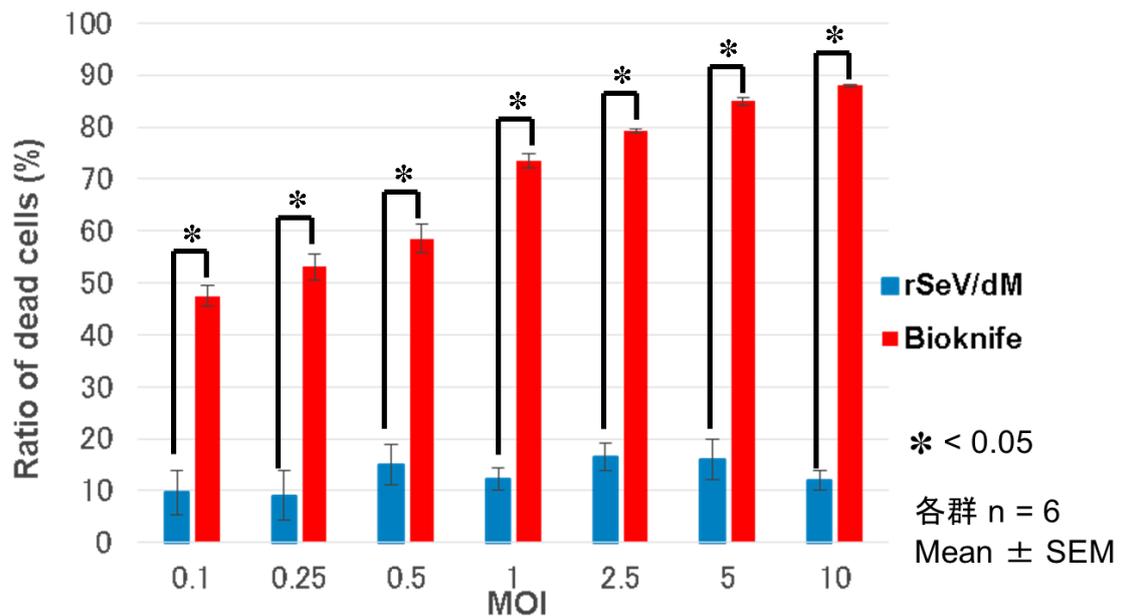


図5 HSC-3-M3 に対する BioKnife の殺細胞効果

ウイルス投与 100 時間後の殺細胞効果を測定した。HSC-3-M3 に対する BioKnife の殺細胞効果は、rSeV/dM と比較して有意に高く、BioKnife 投与群においてはウイルス力価依存的に殺細胞効果を示した。rSeV/dM 投与群はいずれの力価においても高い殺細胞効果は認めなかった。

SEM: standard error of the mean

Mean ± SEM: 平均 ± 標準誤差

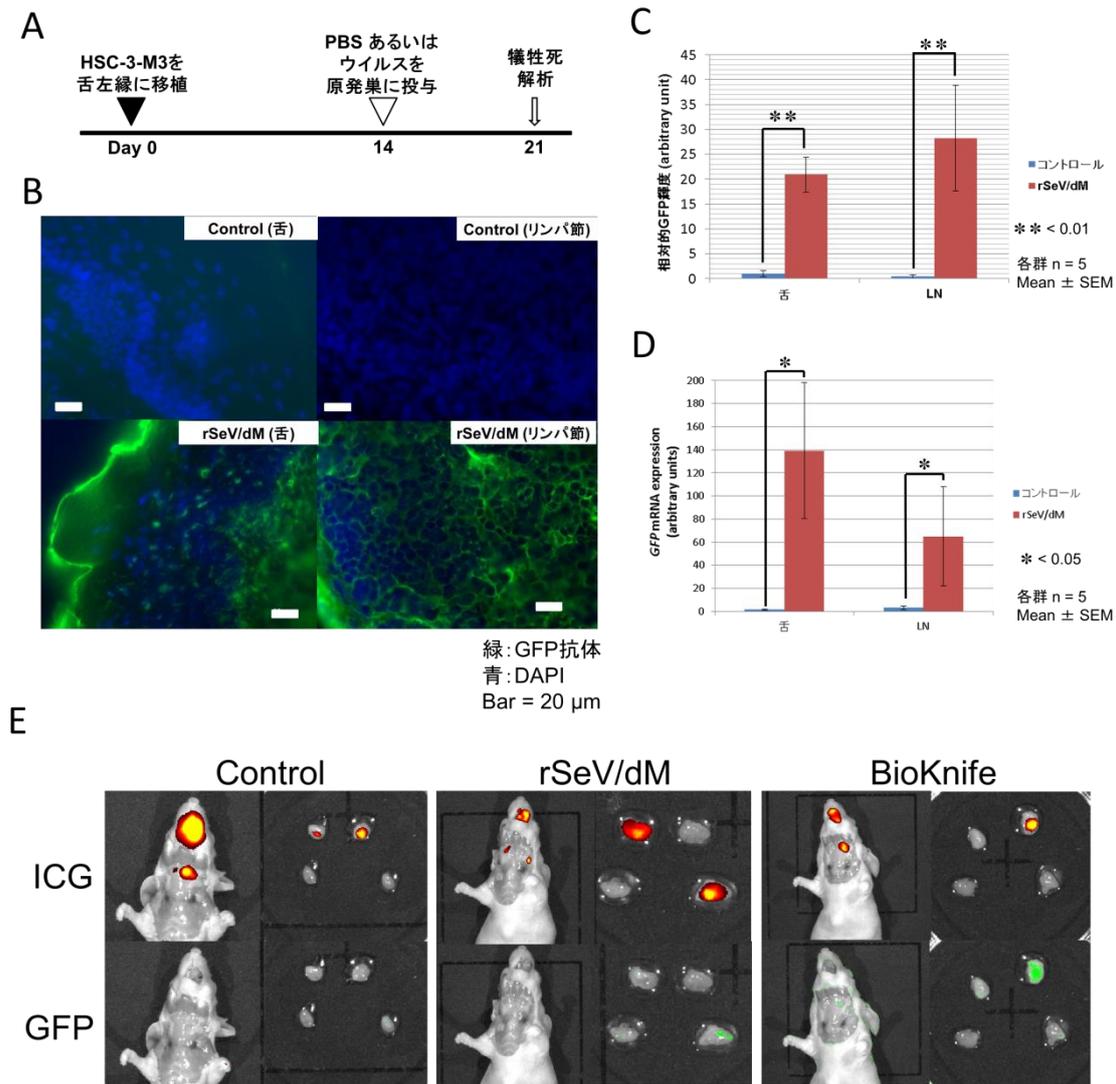


図6 原発巣へのウイルス投与後の頸部リンパ節への遺伝子組み換えセンダイウイルスの移行に関する検討

(A) 実験プロトコル。

(B) 抗 GFP 抗体を用いた免疫組織学的染色による検討。無治療コントロール群では舌と頸部リンパ節のいずれにおいても GFP の発現を認めなかったが、rSeV/dM 投与群の舌および頸部リンパ節において GFP の発現を認めた。

(C) 舌および頸部リンパ節内における GFP 発現の定量化。舌および頸部リンパ節いずれにおいても、rSeV/dM 投与群において無治療コントロール群と比較

し有意に GFP が発現していた。

SEM: standard error of the mean

Mean ± SEM: 平均 ± 標準誤差

(D) 舌および頸部リンパ節における GFP mRNA 発現の検討。舌および頸部リンパ節のいずれにおいても、rSeV/dM 投与群において無治療コントロール群と比較し有意に GFP mRNA が発現していた。

(E) *in vivo* imaging system を用いたセンチネルリンパ節内の GFP 発現の検討。無治療コントロール群では ICG のシグナルが集積しているセンチネルリンパ節内には GFP の発現を認めなかったが、rSeV/dM 投与群および BioKnife 投与群においてセンチネルリンパ節内の ICG のシグナルに一致して GFP の発現を認めた。

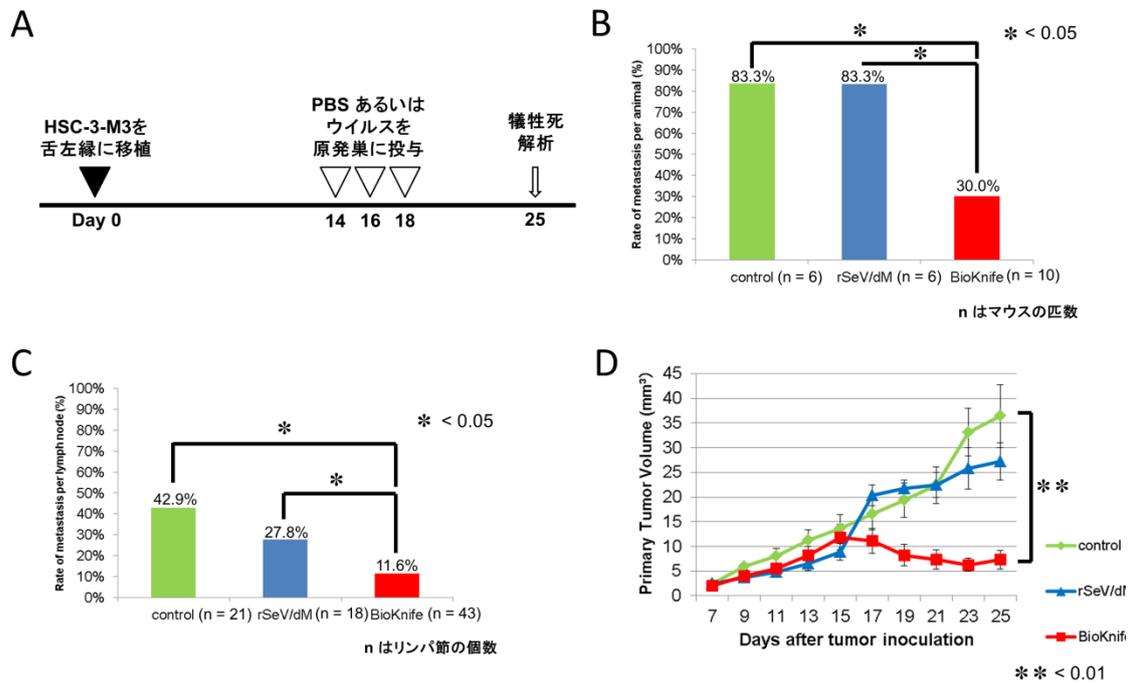


図7 原発巣へのウイルス投与後の頸部リンパ節転移抑制に関する検討

(A) 実験プロトコル。

(B) 頸部リンパ節転移を有するマウスの比率による頸部リンパ節転移抑制に関する検討。無治療コントロール群と rSeV/dM 投与群において、腫瘍移植後 23 日目から 25 日目にかけて原発巣の舌腫瘍が自潰したマウス及び舌腫瘍が自潰し突然死したマウスがそれぞれの群に 4 匹ずついたため、それらを解析から除外した。無治療コントロール群 (n = 6) および rSeV/dM 投与群 (n = 6) において頸部リンパ節転移を有するマウスの比率はいずれも 83.3%であったが、BioKnife 投与群 (n = 10) においては 30.0%で、他の群と比較して有意にリンパ節転移を抑制した (p < 0.05)。n はマウスの匹数。

(C) 頸部リンパ節転移の陽性率による頸部リンパ節転移抑制に関する検討。無治療コントロール群 (n = 21) および rSeV/dM 投与群 (n = 18) において全ての頸部リンパ節における頸部リンパ節転移の陽性率はそれぞれ 42.9%および 27.8%であったが、BioKnife 投与群 (n = 43) においては 11.6%で、他の群と比較して

有意にリンパ節転移を抑制した ($p < 0.05$)。n はリンパ節の個数。

(D) ウイルス投与後の原発巣に対する抗腫瘍効果。BioKnife 投与群が無治療コントロール群と比較し有意に移植した舌腫瘍を縮小させた ($p < 0.01$)。

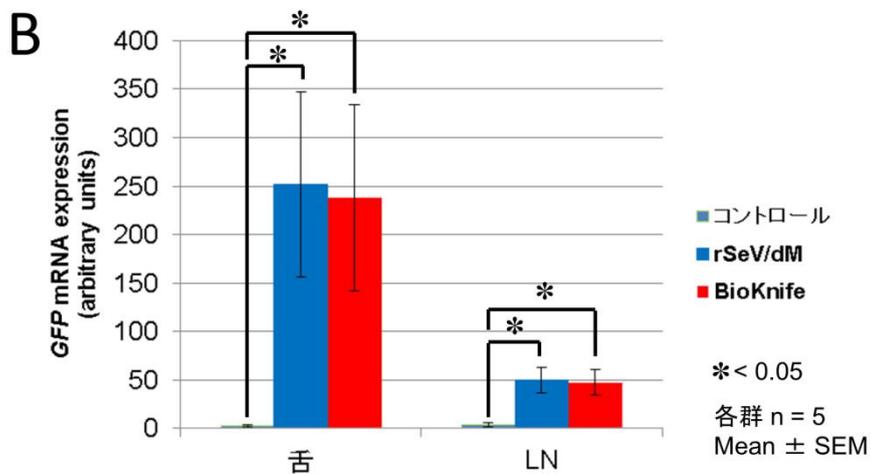
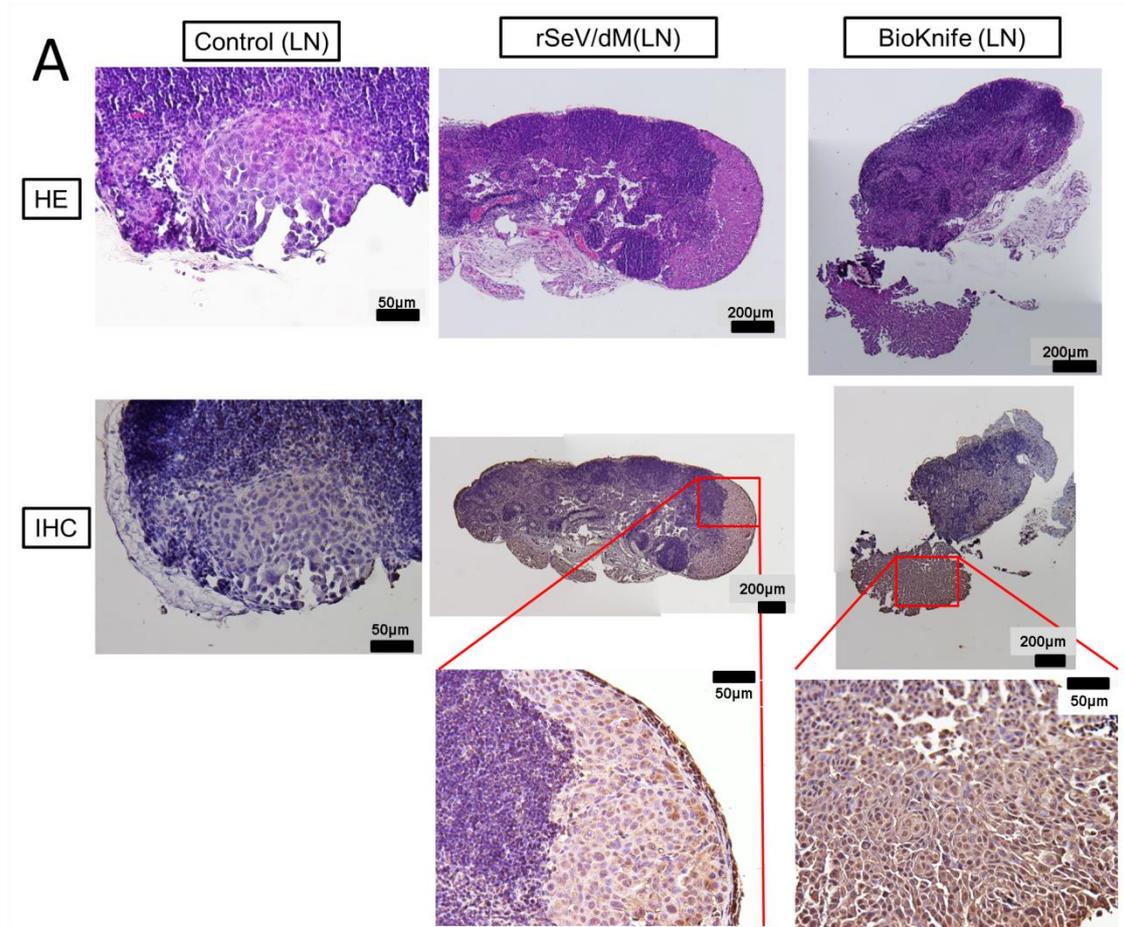


図8 ウイルス投与後の頸部リンパ節内の転移巣における感染の有無

(A) 抗 SeV 抗体を用いた免疫組織化学的染色による検討。無治療コントロール群は抗 SeV 抗体陰性だったが、rSeV/dM 投与群および BioKnife 投与群で頸部リンパ節転移巣の腫瘍細胞の細胞質内で抗 SeV 抗体陽性（茶色）であった。

(B) 舌および頸部リンパ節における *GFP* mRNA 発現の検討。rSeV/dM 投与群および BioKnife 投与群において無治療コントロール群と比較し有意に *GFP* mRNA が発現していた。

SEM: standard error of the mean

Mean ± SEM: 平均 ± 標準誤差

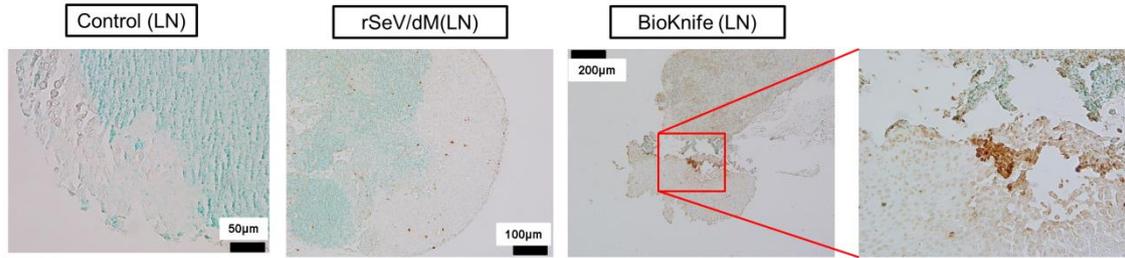


図9 ウイルス投与後の頸部リンパ節転移内のアポトーシス誘導に関する検討
 頸部リンパ節内の転移巣で遺伝子組み換えセンダイウイルスがアポトーシスを誘導しているかどうかを確認するため、ApopTag peroxidase in situ apoptosis detection kit を使用してアポトーシスを検出したところ、無治療コントロール群ではまったくアポトーシスは検出されず、rSeV/dM 投与群では転移巣の腫瘍細胞に散在性にアポトーシスを認める（茶色）だけだったが、BioKnife 投与群では明らかに腫瘍細胞が一塊としてアポトーシスを誘導していた（茶色）。

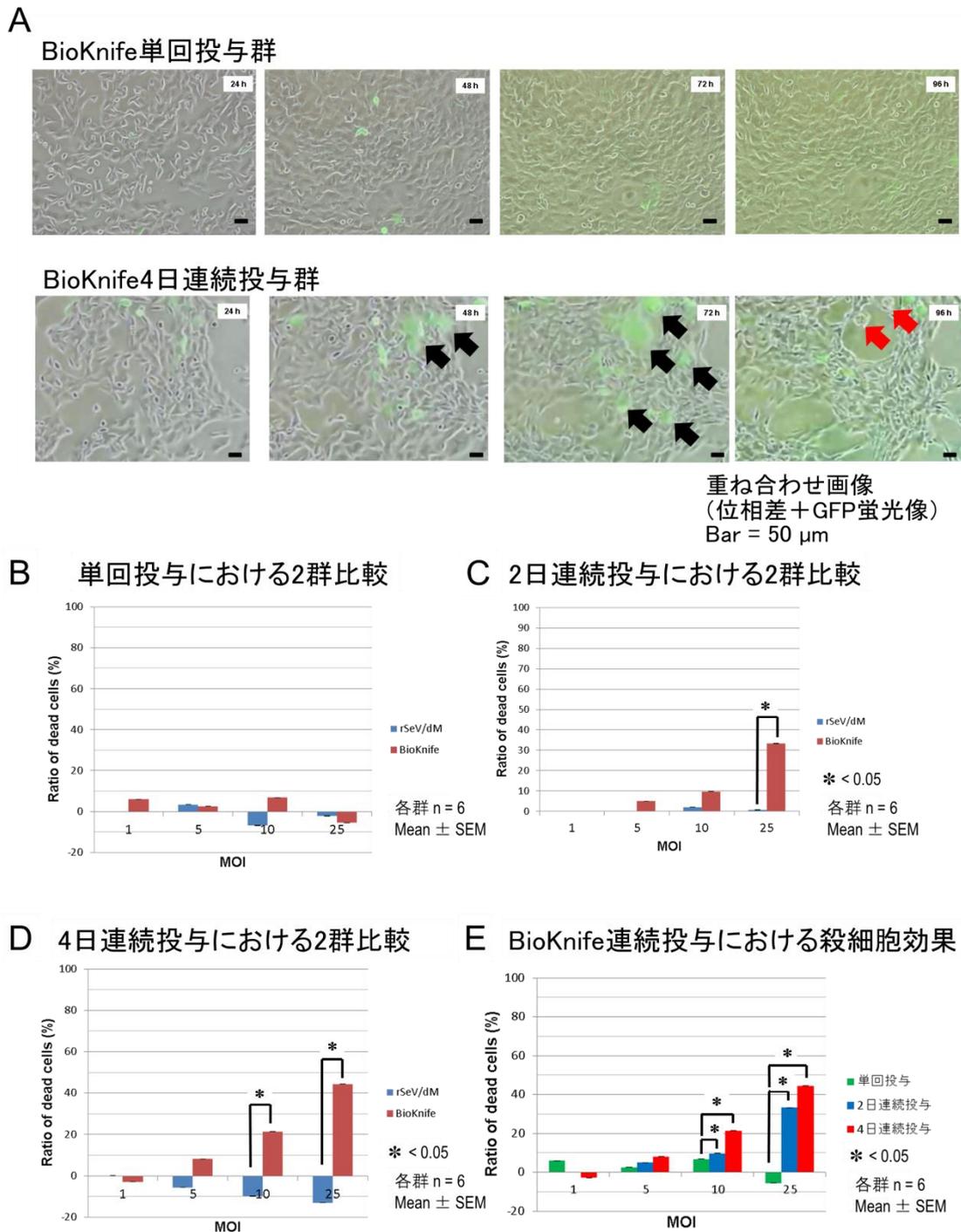


図10 SCCVIIに対するウイルス感染後の抗腫瘍効果の経時的観察および殺細胞効果に関する検討

(A) SCCVIIに対する BioKnife 単回投与と 4 日連続投与の経時的観察の比較。

位相差顕微鏡像と GFP 蛍光顕微鏡像を重ね合わせた像では、上段の BioKnife 単

回投与群では SCCVII の形態に変化はなく細胞死を引き起こさなかったが、下段の BioKnife 4 日連続投与群では投与 48 時間後には GFP を発現する融合細胞（黒矢印）を認め、投与 96 時間後には明らかな SCCVII の細胞死（赤矢印）を引き起こした。写真右上の数字はウイルス感染後の経過時間（時間）。

(B) 単回投与における rSeV/dM 投与群と BioKnife 投与群の比較。2 群ともに有意な殺細胞効果を認めない。

SEM: standard error of the mean

Mean \pm SEM: 平均 \pm 標準誤差

(C) 2 日連続投与における rSeV/dM 投与群と BioKnife 投与群の比較。BioKnife 投与群の殺細胞効果は、25MOI において rSeV/dM 投与群と比較して有意に高く、ウイルス力価依存的かつ投与回数依存的に殺細胞効果を示した。

(D) 4 日連続投与における rSeV/dM 投与群と BioKnife 投与群の比較。BioKnife 投与群の殺細胞効果は、10MOI および 25MOI において rSeV/dM 投与群と比較して有意に高く、ウイルス力価依存的かつ投与回数依存的に殺細胞効果を示した。

(E) BioKnife 連続投与における殺細胞効果の検討。BioKnife 投与群は、25 MOI の高力価および 4 日連続投与で一番高い殺細胞効果を示した。

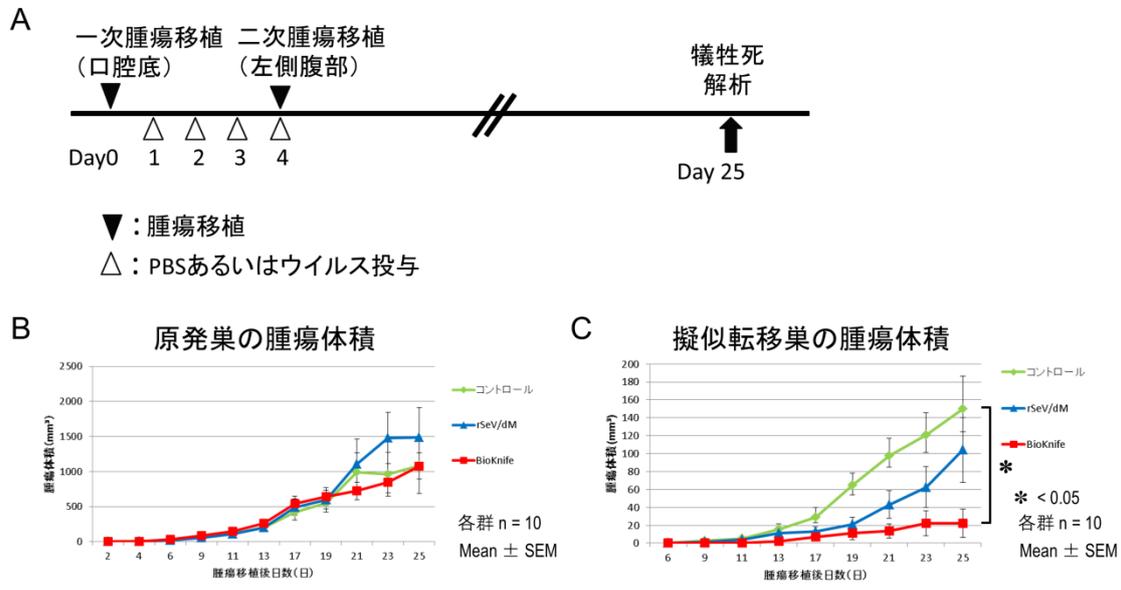


図 1 1 頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおける BioKnife による擬似転移巣の抑制効果

(A) 頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルの実験プロトコル。

(B) 原発巣における BioKnife の治療効果。BioKnife 投与群 (n = 10)、rSeV/dM 投与群 (n = 10)、無治療コントロール群 (n = 10) の 3 群間で原発巣の腫瘍抑制効果に有意な差は認めなかった。

(C) 擬似転移巣における BioKnife の治療効果。BioKnife 投与群 (n = 10) と無治療コントロール群 (n = 10) の間で擬似転移巣の有意な腫瘍抑制効果を認めた。

SEM: standard error of the mean

Mean ± SEM: 平均 ± 標準誤差

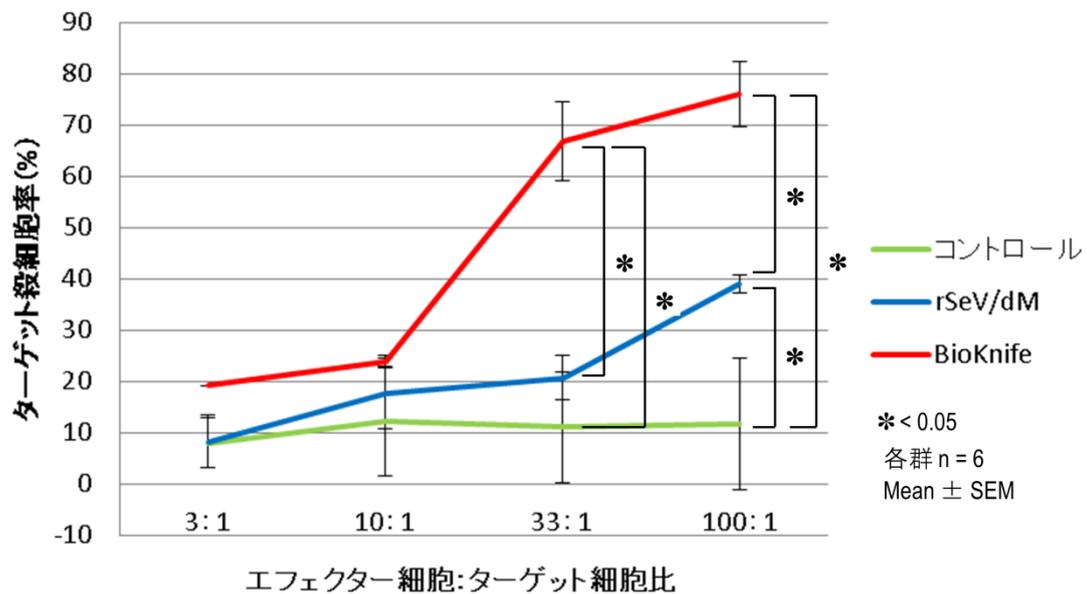


図 1 2 細胞傷害性 T 細胞アッセイ

頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおける、原発巣への BioKnife 投与による腫瘍特異的免疫反応の誘導。エフェクター細胞：ターゲット細胞比が 33 : 1 の時、BioKnife 投与群が他の 2 群と比較して SCCVII に対する有意な細胞傷害性を示し、エフェクター細胞：ターゲット細胞比が 100 : 1 の時、3 群間で SCCVII に対する有意な細胞傷害性を示した。

SEM: standard error of the mean

Mean ± SEM: 平均 ± 標準誤差

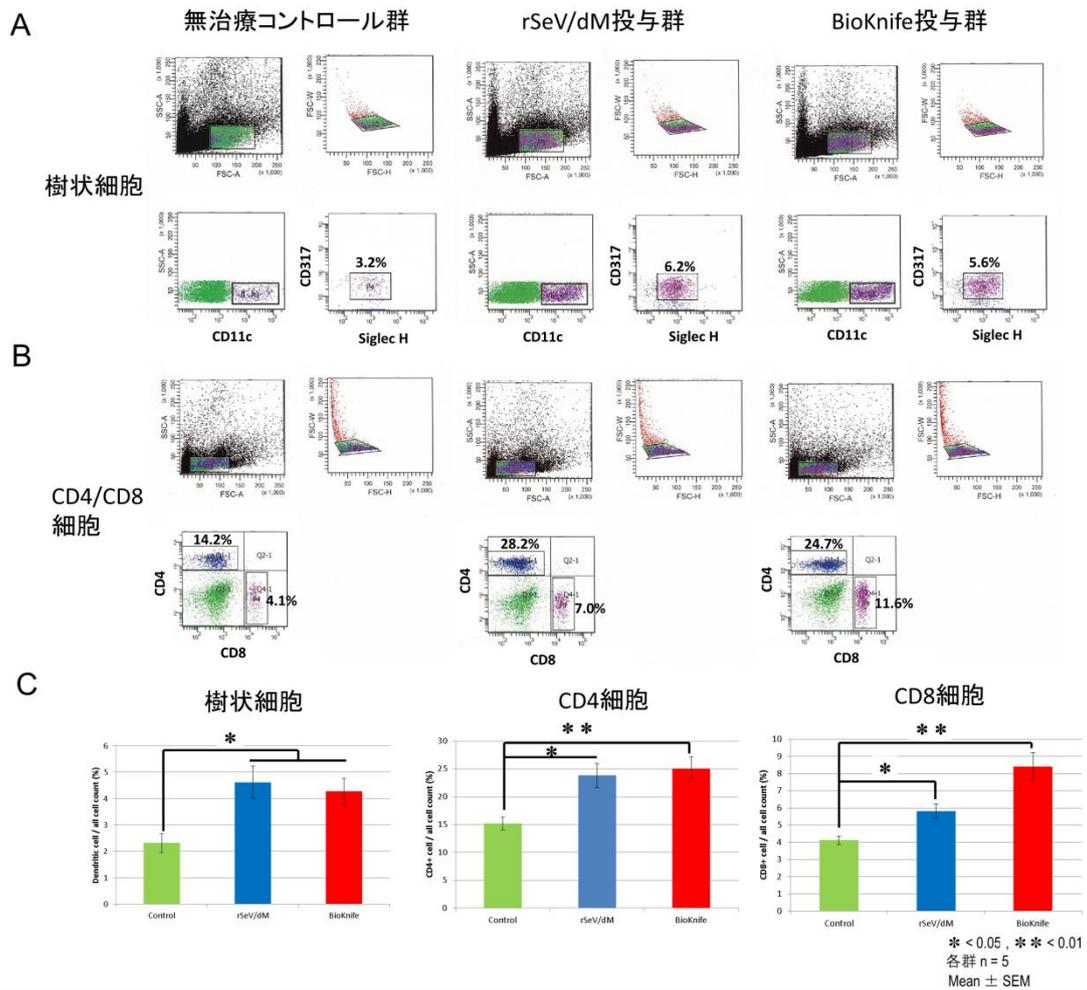


図 1 3 脾臓における免疫担当細胞誘導

頭頸部扁平上皮癌擬似転移マウスモデルにおける、原発巣への BioKnife 投与による脾臓内の免疫担当細胞の誘導。

(A, B) ウイルス投与後の樹状細胞および CD4/CD8 細胞誘導の代表例。各群の左上のドットプロットで対象細胞を絞り込むためのゲーティングを行い、右上のドットプロットでダブルレット細胞を除去している。

(C) 脾臓における樹状細胞、CD4 細胞、CD8 細胞誘導の 3 群間の比較。BioKnife 投与群と rSeV/dM 投与群の樹状細胞および CD4 細胞、CD8 細胞は、無治療コントロール群と比較して有意に誘導された。特に BioKnife 投与群が他の 2 群と比

較して CD8 細胞を誘導する傾向を認めた。

SEM: standard error of the mean

Mean \pm SEM: 平均 \pm 標準誤差

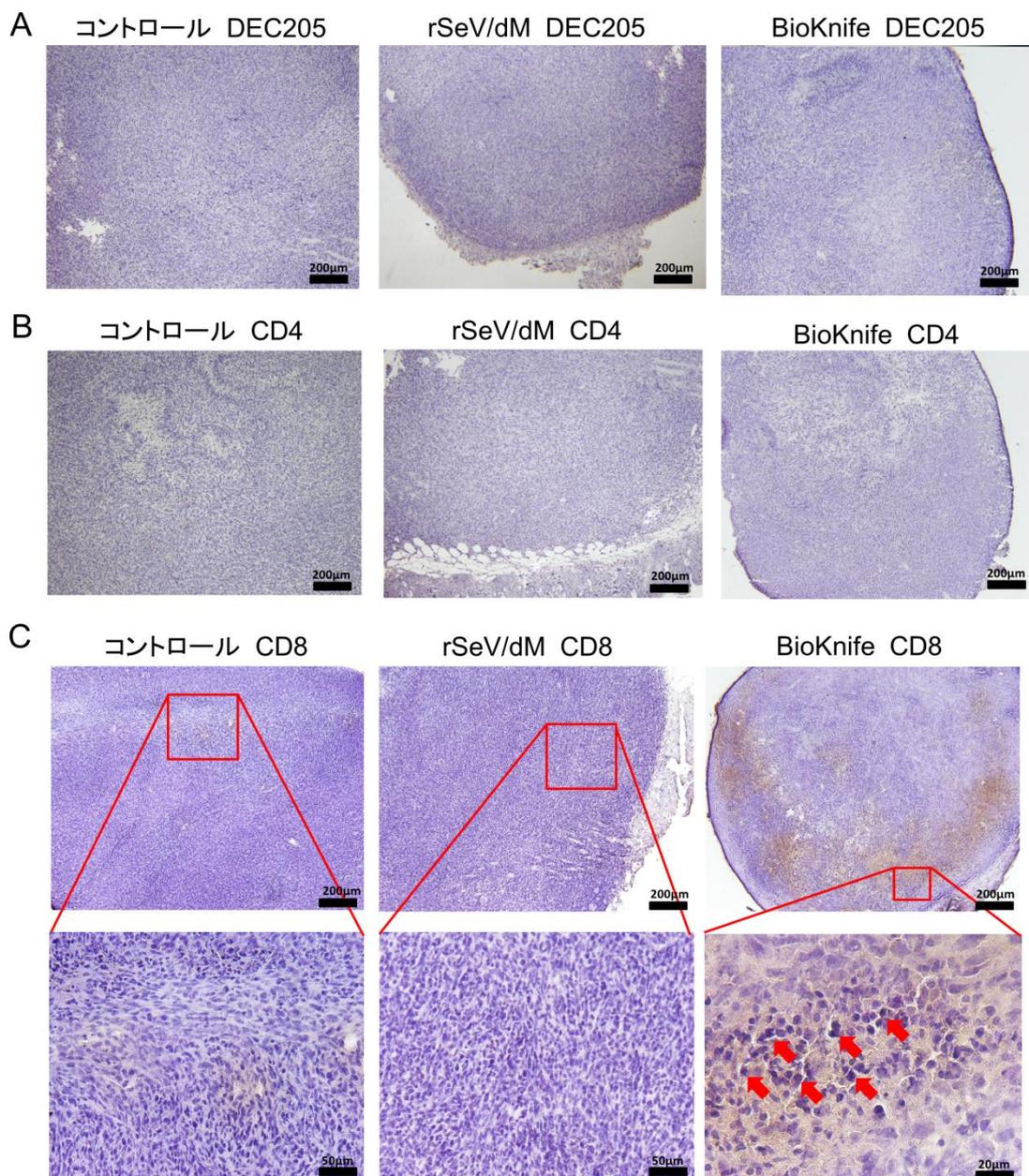


図 1 4 擬似転移巣における免疫担当細胞誘導

(A) 擬似転移巣における樹状細胞誘導の検討。いずれの群においても擬似転移巣内には樹状細胞を認めない。

(B) 擬似転移巣における CD4 細胞誘導の検討。いずれの群においても擬似転移巣内には CD4 細胞を認めない。

(C) 擬似転移巣における CD8 細胞誘導の検討。BioKnife 投与群において CD8

細胞が擬似転移巣に浸潤している像（赤矢印）を観察した。これらの結果から、擬似転移巣の縮小効果は CD8 細胞が直接関与していることが示唆された。