



Title	腫瘍溶解性ウイルスと抗PD-1抗体の併用療法のマウスメラノーマモデルにおける検証 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐々木, 雄輝
Description	配架番号 : 2901
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16409号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95401
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SASAKI_Yuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 佐々木 雄輝

学 位 論 文 題 名

腫瘍溶解性ウイルスと抗 PD-1 抗体の併用療法のマウスメラノーマモデルにおける検証
(Studies on oncolytic virus and anti-programmed cell death protein 1 antibody combination therapy
in a murine melanoma model)

【背景と目的】

腫瘍溶解性ウイルスとは、遺伝子改変や変異によって腫瘍細胞特異的に増殖するウイルスのことである。腫瘍溶解性ウイルスの特徴として、正常な細胞では増殖せず、腫瘍細胞内でのみ増殖し、腫瘍細胞を内側から破壊することが挙げられる。増殖したウイルスは周囲の腫瘍細胞にも感染して増殖し、腫瘍を「溶解」させる。そしてもう 1 つの大きな特徴として、宿主の免疫を賦活化することで、全身に抗腫瘍効果を発揮し、投与部以外の腫瘍も縮小することが挙げられる。この、注入部位の腫瘍を破壊する”Direct”な抗腫瘍効果と、全身の免疫を賦活化する”Indirect”な抗腫瘍効果の 2 つが車の両輪のように同時に作用することで、腫瘍溶解性ウイルスは効果的に腫瘍を駆逐すると考えられている。腫瘍溶解性ウイルスと抗 Programmed cell death protein 1 (PD-1) 抗体の併用療法は、腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍に T 細胞を誘導し、抗 PD-1 抗体が腫瘍浸潤 T 細胞の機能を回復させることで、腫瘍内微小環境を再構築して相乗的に抗腫瘍効果を高めることが示唆されている。しかし、切除不能な進行期メラノーマに対する併用療法の有効性を検証した第 III 相臨床試験では、併用療法は全生存期間と無増悪生存期間において優位性を示すことができなかった。この臨床試験では、腫瘍がすでに全身に広がっており、腫瘍溶解性ウイルスの Direct な効果がほとんど発揮されず、Indirect な効果のみしか適用されていなかったと考えられる。そこでわれわれは、Direct と Indirect の両方の抗腫瘍効果が発揮できる状態であれば、併用療法は腫瘍の進行を効果的に抑制できると考え、これをマウスメラノーマモデルで検証した。

【材料と方法】

マウスメラノーマ細胞として Clone M-3 を使用し、腫瘍溶解性ウイルスとして単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の弱毒化株である Canerpatrev (C-REV) を使用した。ウイルスのタイトレーションには Vero 細胞を用いたプラークアッセイを行い、Clone M-3 に対する C-REV の感染性の確認のために抗 HSV-1 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。また、Clone M-3 に対する C-REV の腫瘍溶解性を確認するために細胞生存アッセイを行った。次に、DBA/2Cr マウスを用いてマウス後肢足蹠メラノーマモデルを作製し、マウスを投与薬剤によって対照群、抗 PD-1 抗体群、C-REV 群、併用群の 4 群に割り付けた。薬剤投与は 7 日目、9 日目、11 日目に行い、その後最長 4 週目まで、マウスの全身状態の観察と腫瘍体積の測定を行った。2 週目時点で tumor-draining lymph node (TDLN), non-tumor-draining lymph node (NTDLN), 脾臓, 肺を摘出し、リアルタイム PCR およびフローサイトメトリーに用いた。4 週目時点で肺を摘出し、リアルタイム PCR および組織学的解析に用いた。

【結果】

C-REV は *in vitro* で Clone M-3 に対する感染性を示し、濃度時間依存的な抗腫瘍効果を有していた。マウス後肢足蹠メラノーマモデルにおいて、C-REV と抗 PD-1 抗体の併用療法は、単剤療法よりもより強力に原発腫瘍の増大を抑制した。また、併用療法は 4 週目時点の TDLN および肺におけるメラノーママーカー *Tyrp-1* 発現も有意に低下させ、リンパ節転移および肺転移を抑制することが示唆された。肺における *Tyrp-1* 発現は、Melan-A 免疫染色における Melan-A 免疫陽性細胞の発現と相関を認めた。2 週目時点の TDLN および NTDLN は、併用療法によって総リンパ球数、B 細胞数、T 細胞数が著明に増加し、それを反映して肉眼的にリンパ節腫大も認められた。フローサイトメトリーによるリンパ球分画解析の結果、併用療法は B 細胞、CD4⁺ヘルパーT 細胞の活性化とナイーブ T 細胞のエフェクターメモリーT 細胞への誘導を単剤療法より強力に促進することが明らかになった。さらに、Type 1 ヘルパーT 細胞 (Th1) および Type 2 ヘルパーT 細胞 (Th2) に関連するサイトカインの遺伝子発現を解析したところ、併用群では Th2 サイトカインの発現増加と Th1 サイトカインの発現低下を認めたことから、併用療法が Th2 優位の免疫応答を誘導し、液性免疫を強化することで適応免疫を増強することが示唆された。また、2 週目の脾臓においても TDLN と同様の傾向のリンパ球分画変化を認め、腫瘍溶解性ウイルスの全身性の免疫賦活化効果が、併用療法によってより強化されることが示唆された。

【考察】

今回の結果から、C-REV と抗 PD-1 抗体の併用療法は、単剤療法と比較して、腫瘍増大、リンパ節転移および肺転移を有意に抑制することが示された。そして、実際に免疫応答を担う T 細胞や B 細胞の機能変化として、二次リンパ組織である TDLN、NTDLN、脾臓において、B 細胞および CD4⁺ヘルパーT 細胞の増強、ナイーブ T 細胞のエフェクターメモリーT 細胞への誘導が生じていることが明らかとなった。さらに、TDLN および NTDLN では併用療法による Th2 優位の免疫応答誘導が示唆された。これらの結果から、併用療法がナイーブ T 細胞を活性化し、CD4⁺ヘルパーT 細胞の増加と Th2 方向への分化を誘導することで、B 細胞を活性化して液性免疫を増強することで適応免疫に影響を与え、持続的な抗腫瘍免疫の賦活化と免疫記憶の形成に寄与している可能性が示唆された。

【結論】

C-REV と抗 PD-1 抗体の併用療法は、Direct と Indirect の療法の抗腫瘍効果が発揮できるマウスメラノーマモデルにおいて、単剤療法よりも効果的に腫瘍の増大と転移を抑制した。併用療法は、Th2 優位の免疫応答を誘導することで、液性免疫中心の獲得免疫を増強し、全身に抗腫瘍効果をもたらしている可能性が示唆された。この結果は、切除可能なメラノーマにおけるネオアジュバントとしての腫瘍溶解性ウイルスと抗 PD-1 抗体の併用療法の有用性を支持するものである。