

主論文の要旨

**Combination Treatment of Human Pancreatic Cancer
Xenograft Models with the Epidermal Growth Factor
Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Erlotinib and
Oncolytic Herpes Simplex Virus HF10**

ヒト膵癌異種移植モデルにおける上皮成長因子受容体チロシンキ
ナーゼ阻害薬エルロチニブと腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス
HF10 との併用療法

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

山村 和生

【背景・目的】

手術手技の向上や診断能の目覚ましい発展にもかかわらず、膵癌は依然予後不良な疾患である。近年、化学療法の分野では分子標的治療薬の研究・開発が進み、わが国でも2011年7月より上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬であるエルロチニブが切除不能進行膵癌に対して保険適用となった。EGFRはさまざまな癌細胞の表面に発現し、癌細胞の増殖、浸潤、転移、血管新生などに関わっているが、エルロチニブはEGFRのリン酸化を阻害することでこれらを抑制する分子標的治療薬である。しかしランダム化比較第3相試験の結果、エルロチニブの進行膵癌における生存期間延長効果は極わずかであり、予後改善のためには新たな治療戦略の開発が望まれる。

腫瘍溶解性ウイルスを用いた癌治療は難治癌に対する先進医療として注目されており、われわれは以前より腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス HF10 の研究を行っている。HF10 は自然発生的変異を遂げた 1 型単純ヘルペスウイルス（HSV-1）であり、過去には切除不能進行膵癌患者、転移性乳癌患者に対して腫瘍内局所投与を行い、高い安全性と抗腫瘍効果を確認している。このように HF10 をはじめとする腫瘍溶解性ウイルスは癌治療における有望な治療戦略のひとつとして期待されているが、腫瘍内局所投与における問題点として腫瘍内でのウイルスの拡散性が低いことが挙げられる。腫瘍増大に伴う腫瘍内間質圧（IFP）の上昇がウイルス拡散の障壁となっており、腫瘍血管の新生による腫瘍内微小血管圧（MVP）の上昇が IFP 上昇に強く関与していることが知られている。さらに、ヘルペスウイルス感染により血管内皮細胞成長因子（VEGF）が発現され、血管新生が促進されることが諸家より報告されている。

以上のことを踏まえ、今回われわれはエルロチニブの持つ血管新生抑制作用に注目した。エルロチニブの腫瘍内 IFP 低下作用により HF10 の良好な腫瘍内分布が得られると考え、ヒト膵癌異種移植モデルにおける HF10 とエルロチニブとの併用効果の検討を行った。

【方法】

1. ヒト膵癌細胞株 BxPC-3、PANC-1 に対する HF10、エルロチニブの単剤および併用による増殖抑制効果の検討

5×10³個のBxPC-3、PANC-1を96ウェルプレートで培養し、24時間後にHF10を、multiplicity of infection (MOI) = 0.1、1、10で感染させ、0、24、48、96時間後にMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) アッセイで各MOIの0時間後と比較して増殖抑制効果を検討した。同様に、細胞株を培養して24時間後に0、2、4、6、8、10 μMの濃度となるエルロチニブを加え、24、48、96時間後にMTTアッセイで24時間後のコントロール群（0 μM）と比較して増殖抑制効果を検討した。さらに、細胞株を培養して24時間後、48時間後にMOI = 1のHF10と10 μMの濃度となるエルロチニブを加え、各単剤と両者の併用による増殖抑

制効果を同様にMTTアッセイで比較検討した。

2. HF10の細胞内エントリーに対するエルロチニブの影響の検討

細胞株を6ウェルプレートで培養し、10 μ Mの濃度となるエルロチニブもしくは等量の溶媒を加え、1時間後にMOI = 0.1のHF10を感染させた。感染後2時間で培養液を交換、48時間後に3回の凍結・融解を行った後、ブランク形成法でHF10のタイタリングを施行した。

3. 皮下腫瘍モデルにおける *in vivo* 抗腫瘍効果、HF10の腫瘍内分布、血管新生抑制効果の検討

5週令のBALB/c Slc-nu/nuマウスにBxPC-3の皮下腫瘍を作成し、腫瘍体積が100 mm³になった時点で4つの治療群（コントロール群、HF10群、エルロチニブ群、併用群）に分類した（各群N = 10）。治療スケジュールとして、1～3日目に1×10⁵ plaque forming unit (PFU) のHF10を腫瘍内投与し、1～10日目に10 mg/kgのエルロチニブを腹腔内投与した。腫瘍径を2回/週計測し、腫瘍体積は長径×(短径)²/2で算出した。6週間経過観察して4群間で腫瘍体積を比較し、コントロール群に対する各治療群の腫瘍体積の平均値よりfractional tumor volume (FTV) を算出し、HF10とエルロチニブの相加相乗効果について検討した。さらに、薬剤投与に伴う有害事象の評価のため、体重のモニタリングを行った。

また、異なる実験系として、HF10群と併用群におけるHF10の腫瘍内分布を比較するために、治療開始後1週目、2週目でそれぞれ皮下腫瘍を摘出し、抗HSV-1抗体によるHSV-1の免疫染色を施行した。さらに、治療開始2週目における各治療群の腫瘍内血管新生を評価するために、2週目で摘出した腫瘍に対して、抗CD31抗体による微小血管の免疫染色を行い、倍率200倍でランダムに10視野を選択し、1視野あたりの平均微小血管数をmicrovessel density (MVD) として算出した。

腫瘍体積、MVDの群間での比較はT検定で行った。

4. 腹膜播種モデルにおける生存期間の検討

5週令のBALB/c Slc-nu/nuマウスにBxPC-3の腹膜播種を作成し、コントロール群、HF10群、エルロチニブ群、併用群の4群に分類し治療を行った（各群N = 10）。1～3日目に1×10⁵ PFU のHF10を腹腔内投与し、1～10日目に10 mg/kgのエルロチニブを腹腔内投与して、治療開始から死亡までの期間を生存期間として4群間で比較した。生存曲線はKaplan-Meier法で作成し、生存期間の比較はlog-rank検定で行った。

【結果】

1. ヒト膵癌細胞株 BxPC-3、PANC-1 に対する HF10、エルロチニブの単剤および併用による増殖抑制効果の検討

BxPC-3 はエルロチニブにより容量かつ時間依存性に増殖抑制を受けており高い感受性を示したが、PANC-1 は抵抗性を示した (Fig. 1a)。一方、HF10 は BxPC-3、PANC-1 いずれに対しても高い細胞傷害活性を示した (Fig. 1b)。両者を併用したところ、BxPC-3 では各単剤に比較して有意に高い増殖抑制効果がみられたが、PANC-1 では併用効果は得られなかった (Fig. 1d)。

2. HF10の細胞内エントリーに対するエルロチニブの影響の検討

BxPC-3、PANC-1ともにエルロチニブの有無でHF10のタイタリング結果に有意差はなく、エルロチニブはHF10の細胞内エントリーに影響を与えないことが示唆された (Fig. 1c)。

3. 皮下腫瘍モデルにおける *in vivo*抗腫瘍効果、HF10の腫瘍内分布、血管新生抑制効果の検討

HF10、エルロチニブともにコントロール群に比して単剤で腫瘍の増大抑制効果を示したが、両者の併用によりさらに増大が抑制された (Fig. 2b)。FTV値を用いた解析の結果、治療開始14日以降で、HF10とエルロチニブの間には相乗効果が観察された (Table 1)。観察期間中、体重は4群間で有意差はなかった (Fig. 2c)。

摘出した皮下腫瘍の抗HSV-1抗体による免疫染色の結果、治療開始1週目ではHF10群、併用群ともに良好なHF10の腫瘍内分布が観察された。一方、治療開始2週目では、HF10群で腫瘍内のHF10が大部分クリアランスされていたのに対して、併用群ではHF10の良好な腫瘍内分布が維持されていた (Fig. 3c)。2週目の皮下腫瘍に対して抗CD31抗体による免疫染色を行ってMVDを算出した結果、コントロール群に比してエルロチニブ群では血管新生が抑制されておりHF10群では促進されていたが、併用群ではHF10による血管新生が抑制されていた (Fig. 4b)。

4. 腹膜播種モデルにおける生存期間の検討

コントロール群に比較して HF10 群では生存期間の有意な延長がみられたが、エルロチニブとの間に明らかな併用効果はみられなかった (Fig. 2d)。

【考察】

1. *in vitro* において、エルロチニブに対して BxPC-3 が感受性を示した一方、PANC-1

は抵抗性を示したが、これは、上皮間葉系マーカー発現の差異により細胞株のエルロチニブへの感受性が異なるとする諸家の報告に一致していた。感受性株の BxPC-3 では HF10 との併用効果が得られたが、両細胞株において、エルロチニブによる EGFR シグナリング阻害は HF10 の細胞内エントリーに影響を与えていなかった。

2. BxPC-3 の皮下腫瘍モデルでの検討の結果、HF10 とエルロチニブの間には相乗的な併用効果がみられた。免疫染色の結果より、HF10 感染に伴う血管新生がエルロチニブによって抑制され、その結果腫瘍内 IFP が低下したことにより、HF10 の腫瘍内分布が良好に維持されたことによると考えられた。
3. 腹膜播種モデルでの検討では、HF10 とエルロチニブの間には明らかな併用効果はみられなかった。今回の実験では皮下腫瘍モデルと同容量 (10 mg/kg) を用いたが、動物実験モデルでのエルロチニブを用いた諸家の報告ではより高容量 (25～100 mg/kg) を用いているものも多く、腹膜播種という life-threatening な病態を考慮すれば、生存期間延長のためにはより高容量が必要であった可能性が示唆された。

【結語】

今回の実験結果により、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス HF10 とエルロチニブとの併用療法はヒト膵癌に対する有望な治療戦略となりうることが示された。