

主論文の要旨

Curative effect of HF10 on liver and peritoneal metastasis mediated by host antitumor immunity

宿主抗腫瘍免疫における肝転移および腹膜転移に対する
HF10 治療効果の検討

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)

堀田 佳宏

【緒言】

大腸癌は 2015 年現在、日本の死亡原因の第 1 位、癌関連死の第 2 位である。多くの進行大腸癌患者が肝転移、腹膜転移により根治的手術を受ける事ができない。以上の現状を踏まえて、我々は HF10 の腫瘍免疫への影響に着目し、肝転移・腹膜転移モデルのマウスに対して HF10 の背部腫瘍への局所投与が与える宿主免疫への影響について検討した。

【対象・方法】

遺伝子改変を行っていない通常免疫を持ったマウスを用い、マウス大腸癌細胞株である MC26 を移植した。MC26 に対する HF10 の細胞障害性を MTT 分析で調査した。マウスの背部に 1×10^6 の MC26 を皮下注射し、さらに脾臓および腹腔内に 1×10^6 の MC26 を注入し、肝転移モデルと腹膜再発モデルを作成した。それぞれ無治療群・HF10 治療群の 2 つのグループに分けて計 4 つのグループで比較・検討を行った。腫瘍注入後、皮下腫瘍に対して 10・17・24 日目に 1×10^7 の HF10 注入を行い腫瘍径と生存期間を観察した。腫瘍注入後、17 日目に腹膜転移モデルの脾臓からリンパ球を抽出後、MC26 に対する細胞障害性を MTT 分析で計測した。肝転移モデルの胸腺からリンパ球を抽出後、IFN- γ の発現をエリスポット分析を用いて観察した他、摘出肝組織を用いて qPCR を行い、HF10 の定量を行った。

【結果】

MTT 分析では MC26 に対する HF10 の強い細胞障害性が確認できた (Figure 1)。動物実験において、腹膜転移モデルの皮下腫瘍体積の比較では、無治療群に比べて有意な腫瘍抑制効果を認めた。腹膜転移モデルの生存率の比較では、無治療群に比べて治療群において生存日数中央値で 4.5 日の延長を認め統計学的有意差を認めた。肝転移モデルの皮下腫瘍体積の比較では無治療群に比べて有意な腫瘍抑制効果を認めた。肝転移モデルの生存率の比較でも無治療群に比べて治療群において生存日数中央値で 8.9 日間の延長を認め、有意に生存期間が延長した (Figure 2A)。各モデル 5 匹ずつを 17 日目に殺処分し腹腔内を観察し、肝転移モデルでは肝臓・脾臓重量の比較を行い、摘出肝組織で qPCR を行い HF10 のウイルス量の計測を行った。また、胸腺からリンパ球を抽出し、MC26 に対する細胞障害性を検討した。腹膜転移モデルでは脾臓からリンパ球を抽出し、MC26 に対する細胞障害性を検討した。腹膜転移モデルの腹腔内所見で無治療群では小結節が多発していたが治療群では散見されるのみであった (Figure 2B)。肝転移モデルの摘出肝臓と脾臓の比較では、肉眼的に無治療群では小結節が多発していたが、治療群では散見されるのみであった。肝臓および脾臓の重量の比較でも統計学的有意差を認めた (Figure 2C)。肝転移 HF10 治療群の摘出肝組織を用いた qPCR では、HF10 は治療後 1 日目、7 日目ともに極めて低い値であった (Figure 3A)。肝転移 HF10 治療群の治療後 1 日目、7 日目の摘出肝組織、皮下腫瘍を用いて HF10 による免疫染色を行った。HF10 染色数の比較で、HF10 治療後 1 日目、7 日目ともに肝組

織ではほとんど染色は認めなかった (Figure 3B)。腹膜転移無治療群の脾臓から抽出したリンパ球のMC26 に対する細胞障害性をMT T 分析で検討した。24 時間、48 時間、72 時間で計測を行った結果、コントロール、10 倍、100 倍でそれぞれ差は認めなかった (Figure 4A)。腹膜転移HF10 治療群では48 時間で最も高い細胞障害性を示し、有意差を認めた (Figure 4B)。肝転移無治療群の胸腺から抽出したリンパ球を用いて同様の実験を行った。肝転移無治療群ではそれぞれ差は認めなかった (Figure 4C)。一方、肝転移HF10 治療群では腹膜転移モデルと同様に48 時間で最も高い細胞障害性を示し、有意差を認めた (Figure 4D)。肝転移モデルから抽出したリンパ球を用いてエリスポット分析を行い、IFN γ の発現を計測したが無治療群に対して治療群で有意にスポット発現数が多く認められた (Figure 5)。

【考察】

HF10 の治療効果は、様々な悪性腫瘍に対して調査されてきた。2003 年以来、我々は再発乳癌や進行頭頸部癌に対して HF10 を用いた第一相臨床試験を行っており、2005 年から切除不能膀胱癌に対する治療として HF10 を適用している。しかし、臨床研究で対象となるのは進行切除不能症例で、多くが肝転移や腹膜転移を伴っている。そのため、大腸癌転移を伴う免疫適合マウスを用いて全身疾患に対する HF10 の可能性を調査した。HF10 治療で生き残ったマウスが腫瘍再移植に対して抵抗性を示し、その効果は宿主抗腫瘍免疫による効果であるという報告や左右の背部にそれぞれ腫瘍を形成したマウスの片側の腫瘍に対してのみ HF10 注入を行った結果、他方の腫瘍にも強い腫瘍抑制効果が認められた報告がある。以上の報告から HF10 は直接的腫瘍溶解作用以外の抗腫瘍効果を有している事が示された。本研究では、免疫応答の観点からこれらの事象を調査するため肝転移・腹膜転移を有する大腸癌マウスに対する HF10 の治療効果を研究した。生体外で MC26 に対する殺細胞効果を確認した後、MC26 を脾臓に注入して作成した多発肝転移モデルと MC26 を腹腔内に注入して作成した腹膜転移モデルを用いて調査を行った。同時に両モデル背部への MC26 の皮下注射を行い、皮下腫瘍のみへの HF10 注入による全身疾患への治療効果を研究した。両モデルで有意に全身の腫瘍増殖が阻害され、生存期間が延長された。肝転移モデル HF10 治療群で有意に肝臓・脾臓の重量が低値であった。肝転移モデルの肝組織を用いて PCR 分析や抗ヘルペスウイルス抗体による免疫染色を行った結果、ウイルス濃度は HF10 注入後 1 日目で皮下腫瘍組織より低く、7 日目では有意に低かった事から肝転移に対する治療効果は直接的腫瘍溶解作用のみではないと考えた。宿主の抗腫瘍免疫が全身疾患に対する抗腫瘍効果の主な働きである事を調査するため、リンパ球による実験を行った。特に、HF10 治療群のリンパ球は無治療群より高い殺細胞効果を示した。加えて、肝転移モデル全体からリンパ球を採取しエリスポット分析を行い、IFN- γ の発現を測定した。治療群全体から採取したリンパ球では腫瘍特異抗原が認められ、無治療群より多くの発現が認められた。HF10 治療後、ウイルス抗原が宿主免疫を刺激し、 dendritic 細胞や NK 細胞による貪食を介して腫瘍やウイルス抗原を認識する事で細胞作用を持つ CD8 陽性 T 細胞

が刺激されると考えられる。一方、CD4 陽性ヘルパーT 細胞に刺激された B 細胞からの抗体産生には少なくとも dendritic 細胞の初活動から 4 週間必要で、本研究結果は殺細胞性 T 細胞を介した初期免疫を反映していると考ええる。

【結語】

HF10 の局所投与によって宿主の抗腫瘍免疫が賦活化され、腫瘍免疫を介した全身疾患への治療効果が確認された。肝転移や腹膜播種などの遠隔転移部位にも HF10 の直接的な感染ではなく、抗腫瘍免疫により腫瘍抑制効果を示すことが示唆された。