

# 薬剤耐性頭頸部扁平上皮癌における新規治療法の開発

名古屋市立大学大学院

耳鼻咽喉・頭頸部外科 講師 江崎伸一

## 1. 研究の背景・目的

ウイルスを利用した癌の治療の報告については 1950 年代より散見される。近年のウイルスの機能解析や遺伝子工学技術の進歩により、ウイルスの正常組織に対する病原性を排除し、癌細胞で特異的に増殖し、破壊するような治療が可能になってきた。このように増殖可能なウイルスを癌治療に用いる治療法を「oncolytic virotherapy (腫瘍溶解ウイルス療法)」と称し、現在様々な種類のウイルスが臨床治験、前臨床的研究に用いられている。

頭頸部悪性腫瘍の約 90%を占める扁平上皮癌は、手術療法、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療や、各々の治療の進歩により予後が劇的に改善してきた。しかし、5 年生存率は未だ 40%程度と高くはない。その理由の一つとして、大半が診察時には既に進行癌で見つかり、局所再発、遠隔転移しやすいことが挙げられている。また、再発した腫瘍は従来の治療に抵抗性を示すことが多く、有効な治療選択肢が限られているのが現状である。腫瘍溶解ウイルスは従来の化学療法と異なる機序で抗腫瘍効果を示すため、新規治療法の選択肢となる可能性が期待される。

今回、再発腫瘍への新規治療法の開発を目的として本研究を行う。再発腫瘍は過去に用いた化学療法剤に耐性となり治療に難渋することが多いため、頭頸部癌治療に頻用されるシスプラチン、5-FU に耐性な薬剤耐性株を作成する。薬剤耐性を獲得する前後での腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果を比較検討する。また、担癌モデルマウスを作成し、腫瘍溶解ウイルス HF10 の抗腫瘍効果を動物モデルで検討する。

## 2. 研究の対象ならびに方法

### 1) 薬剤耐性細胞株の作成と腫瘍溶解ウイルス HF10 の抗腫瘍効果

ヒト由来頭頸部扁平上皮癌 UM-SCC-23 に低濃度のシスプラチン、5-FU を段階的に濃くしながら培養し、各薬剤の耐性株を得た。得られた細胞株を 96 well plate に接種し、翌日に各薬剤を 72 時間投与し、細胞生存率を MTS assay (Promega 社) を用いて検討し、薬剤耐性の有無を確認した。

HF10 は単純ヘルペスウイルス 1 型の自然発生弱毒株 HF より分離された腫瘍溶解ウイルスである。HF10 の抗腫瘍効果を調べるために、各耐性株を 96 well plate に接種し、翌

日に各薬剤を 72 時間投与し、細胞の生存率を MTS assay で検討した。

## 2) 薬剤耐性株への HF10 の抗腫瘍効果 (in vivo)

各細胞株を 6 週齢の雌ヌードマウス (BALB/c-nu/nu) の背部に接種し、皮下腫瘍を作成した。腫瘍径が 5 mm を越えた時点で、HF10 ( $1 \times 10^7$  pfu/0.1 mL) もしくは同量の PBS を腫瘍内に接種し、2 日後に再度接種した。経時的に腫瘍径を測定し、担癌モデルマウスにおける HF10 の抗腫瘍効果を検討した。腫瘍径が 10mm を越えたところで sacrifice し、マウスの生存期間を検討した。

組織学的に検討するため、上記と同様の条件で HF10 を 2 回接種し、24 時間、96 時間後に皮下腫瘍を採取し、パラフィンで包埋して薄切した。連続切片をヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色、抗 HSV 抗体免疫染色を行い、組織学的に検討した。

## 3. 研究結果

### 1) 薬剤耐性細胞株の作成と HF10 の抗腫瘍効果

ヒト由来頭頸部扁平上皮癌 UM-SCC-23 (23 親株) からスプラチン耐性株 (23CR 株)、5-FU 耐性株 (23WR 株) を得て、各細胞の薬剤耐性を確認した (図 1A、B)。

次に HF10 の抗腫瘍効果を調べるために、各細胞に HF10 を様々なウイルス力価 (MOI) で感染させて 72 時間後の生存細胞率を測定した。23 親株、23CR 株、23WR 株で比較検討したところ、HF10 の抗腫瘍効果は 23CR 株で最も著明であった (図 1C)。

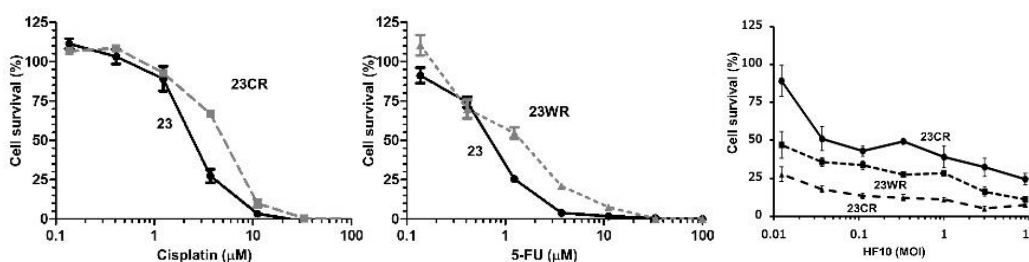


図 1 (A) 23CR 株はシスプラチン耐性を示した。(B) 23WR 株は 5-FU 耐性を示した。(C) HF10 による殺細胞性は各細胞に認められたが、23CR において最も顕著であった。

### 2) 薬剤耐性株への HF10 の抗腫瘍効果 (in vivo)

23CR 株で皮下接種を作成し、腫瘍径が 5 mm を越えた時点で、HF10 ( $1 \times 10^7$  pfu/0.1 mL) もしくは同量の PBS を 2 回腫瘍内に接種した。HF10 は腫瘍を大幅に抑制し、マウスの生存を延長した (図 3A、B)。組織学的に検討したところ、HF10 接種 1 日後に腫瘍内

に壊死が認められ、同部位に HSV 抗体陽性細胞が認められた。また、4 日後にも同様の所見が認められた (図 2C)。

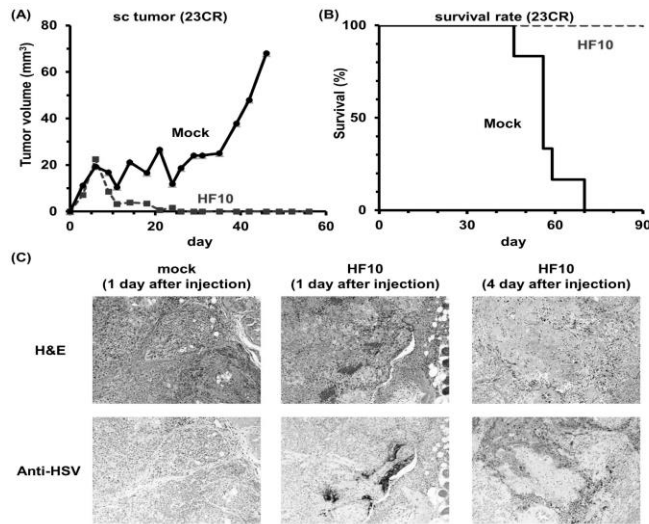


図 2 (A) HF10 接種により皮下腫瘍の抑制効果が認められた。(B) HF10 接種によりマウスの生存延長効果が認められた。(C) HF10 接種 24 時間後に H&E 染色で腫瘍内に壊死が認められ、同部位に抗 HSV 抗体陽性細胞が認められた。96 時間後はその所見が拡大していた。PBS を接種した群 (mock) では壊死、HSV 抗体陽性細胞とも認められなかった。

23WR 株でも同様に皮下接種を作成したところ、同様に HF10 による腫瘍抑制効果が認められ (図 3A、B)、は腫瘍を大幅に抑制し、マウスの生存を延長した。組織学的に検討したところ、HF10 接種 1 日後に腫瘍内に壊死が認められ、同部位に HSV 抗体陽性細胞が認められた。また、4 日後にも同様の所見が認められた (図 3C)。

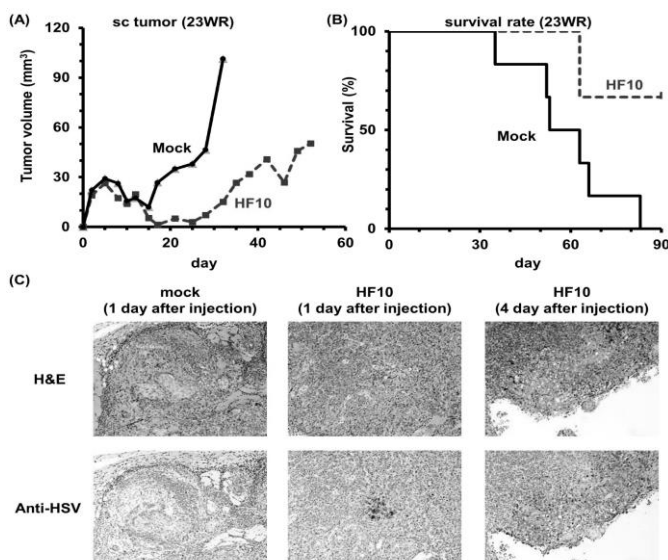


図 3 (A) HF10 接種により皮下腫瘍の抑制効果が認められた。(B) HF10 接種によりマウスの生存延長効果が認められた。(C) HF10 接種 24 時間後に H&E 染色で腫瘍内に壊死が認められ、同部位に抗 HSV 抗体陽性細胞が認められた。96 時間後はその所見が拡大していた。PBS を接種した群 (mock) では壊死、HSV 抗体陽性細胞とも認められなかった。

#### 4. 考察

本研究では、UMSCC-23 細胞よりシスプラチン耐性株、5-FU 耐性株を得たところ、どちらの耐性株にも HF10 の殺細胞効果が認められた。また、両耐性株で皮下腫瘍モデルマウスを作成したところ、HF10 の抗腫瘍効果がどちらのモデルにも認められた。シスプラチン耐性株においてとくに腫瘍抑制効果が強く認められた機序は不明であるが、シスプラチン耐性株では細胞増殖速度が亢進しており（未発表）、細胞周期などが影響している可能性が考えられる。現在細胞周期の解析、細胞周期の制御に關与する蛋白の発現を検討しているところである。

2022 年に初の腫瘍溶解ウイルス（デリタクト®）が条件付きで認可され、HF10 も認可を目指して臨床治験が行われている。どちらのウイルスも単純ヘルペスウイルス由来であり、抗腫瘍効果は HSV 受容体の発現の有無に依存している。どちらのウイルスも作用機序が従来の薬剤と異なる場所に存在するため、手術療法、放射線療法、化学療法を組み合わせた従来の治療跡に再発した腫瘍にも効果があることが期待できる。本研究を進めることにより、これらの腫瘍溶解ウイルスの適用範囲を広げていきたいと考えている。