

## 最終試験の結果の要旨

|  |           |       |                  |
|--|-----------|-------|------------------|
| 報告番号   | 総研第 739 号 | 学位申請者 | 渡邊 真季            |
| 審査委員   | 主査        | 寺園 英之 | 学位 博士 (医学・歯学・学術) |
|  | 副査        | 永野 聡  | 副査 橋口 照人         |
|  | 副査        | 三井 薫  | 副査 鈴木 紳介         |
| <p>主査および副査の5名は、令和6年2月13日、学位申請者 渡邊 真季 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) Surv.m-CRA-2 の併用治療による副作用は認められたか。<br/> (回答) 体重という指標では全ての治療群に有意な差は認められなかった。</p> <p>質問2) 治療遺伝子の搭載によるリンパ球浸潤等は認められたか。<br/> (回答) 詳細な組織学的解析は未実施のため確認できていない。</p> <p>質問3) 使用したシリアンハムスターモデルは免疫不全等の特徴があるか。<br/> (回答) 免疫を有したハムスターにハムスター由来の細胞移植を行ったモデルである。</p> <p>質問4) <i>In vitro</i> で CXCL10 搭載 Surv.m-CRA-2 を感染させた場合の CXCL10 発現量が MOI 依存的ではないのはなぜか。<br/> (回答) ウイルスは感染した細胞内で増殖したのち細胞を壊して放出される。特に高 MOI で感染させたがん細胞株ではウイルスによる殺傷が早期に起こり細胞内での増殖が少ないため、CXCL10 発現量が MOI 依存的に増加しなかった。</p> <p>質問5) CXCL10 搭載 Surv.m-CRA-2 単独治療と併用治療で CXCL10 の発現を制御するプロモーターが異なるのはなぜか。<br/> (回答) 単独治療において、作製した中で2番目に発現活性強度の高い CMV プロモーター制御下に CXCL10 を発現した Surv.m-CRA-2 の治療効果がそれほど強力ではなかったため、発現活性強度をさらに高めるために CXCL10 の発現制御に最も発現活性強度の高い CA プロモーターを用いた。</p> <p>質問6) 3種併用治療においてそれぞれの免疫遺伝子を制御するプロモーターが異なるのはなぜか。<br/> (回答) 異なる働きをするサイトカインそれぞれについて至適発現をする必要があるため、GM-CSF および IL-2 搭載 Surv.m-CRA-2 については我々自身の以前の研究を参考にした。</p> <p>質問7) 治療遺伝子搭載 Surv.m-CRA-2 では E3 領域を欠失させているが、E3 領域を持つ Surv.m-CRA/none と比較してウイルス増殖能等に差があるか。<br/> (回答) 我々自身の以前の研究では E3 領域を欠損した Surv.m-CRA は E3 領域有りの Surv.m-CRA と比較してより高い細胞傷害作用を示していたが、本研究においては、E3 領域有りの Surv.m-CRA/none と E3 領域欠損の CXCL10 搭載 Surv.m-CRA-2 との間にウイルス増殖能の顕著な差は認められなかった。</p> <p>質問8) ハムスターにはコロナウイルスが感染するが、コロナ禍での実験はどのような点に注意していたか。<br/> (回答) Specific-pathogen free の動物であるため、実験者から病原体を持ち込まないように管理していた。</p> <p>質問9) Hamster CXCL10 遺伝子ではなく Mouse CXCL10 遺伝子を用いたのはなぜか。<br/> (回答) 開発当初は Hamster CXCL10 の Ref seq はなく、信頼性の低い配列情報しか入手できなかったため、ホモロジーの高い Mouse CXCL10 遺伝子を用いた。</p> <p>質問10) 治療遺伝子未搭載の Surv.m-CRA/none でも腫瘍溶解作用はあるか。<br/> (回答) Surv.m-CRA/none には腫瘍溶解作用がある。今回は難治性がんモデルを用いて免疫遺伝子の搭載による治療効果増強に焦点を当てた。ヒトの細胞ではハムスター細胞よりもウイルス増殖が旺盛に起こるため、第1相臨床試験でも安全性と一部有効性を確認できている。</p> |           |       |                  |

## 最終試験の結果の要旨

739

質問 1 1) Surv.m-CRA による腫瘍溶解では、腫瘍はアポトーシスではなく壊死による細胞死を起こしているのか。

(回答) Surv.m-CRA による腫瘍溶解では、壊死を起こしている。Surv.m-CRA は腫瘍抑制遺伝子 p53 との結合領域である E1B55k タンパク質を欠損させているため、アポトーシス誘導を抑制している。In vitro でも Surv.m-CRA の感染によりネクローシス様の細胞溶解の形態を示している。

質問 1 2) 宿主がアデノウイルスに対して抗体を産生し治療効果が減弱しないのか。

(回答) アデノウイルスを静脈注射した場合には血行性に広がるため中和抗体が働く懸念があるが、腫瘍内への局所投与ではウイルスは細胞から近傍の細胞に伝播されるため中和抗体が働きにくい。また局所投与で治療効果が減弱したデータはこれまで確認されていない。

質問 1 3) 原発巣と転移巣の治療効果は同一のものか。

(回答) 原発巣は OV 投与による直接的な殺傷効果であるのに対し、転移巣へはウイルス投与を行っていないため、原発巣の治療によって誘導された全身性の抗腫瘍免疫応答による治療効果であり、作用機序は異なる。

質問 1 4) がん幹細胞に対する治療効果はどのように確認できるのか。

(回答) 我々自身の以前の研究で Surv.m-CRA はがん幹細胞に対してより治療効果を増強することを報告している。また、がん幹細胞特異的のマーカ一等で識別する等の解析により治療効果をj確認できる。

質問 1 5) ウイルス投与量が計  $1.5 \times 10^9$  pfu で 2 種併用の場合の内訳は何か。

(回答) 治療遺伝子搭載 Surv.m-CRA-2 は 3 種併用同様に  $0.5 \times 10^9$  pfu ずつで、Surv.m-CRA/none を  $0.5 \times 10^9$  pfu 加えて計  $1.5 \times 10^9$  pfu にしている。

質問 1 6) チャレンジテスト時 (ウイルス投与 14 日後) の原発腫瘍はどうなっているのか。

(回答) 腫瘍体積が減少しているものもあるが、完全退縮はしていない。

質問 1 7) 肺転移の腫瘍は原発腫瘍由来または遠隔部の腫瘍由来のどちらか。

(回答) 未解析のため不明だが、どちらも可能性はある。いずれにせよ 3 種併用では他の治療群と比較して、転移を生じた個体数が顕著に減少していた。

質問 1 8) 免疫遺伝子の搭載およびそれらの併用治療により起こると予想される副作用は何か。

(回答) タンパク質の全身投与では半減期が短く肝臓等へ集積することから、治療効果のために高用量投与を行った結果サイトカインストーム等の副作用が生じる。一方 OV 療法では局所のみでサイトカインを高濃度持続分泌させることができるため、このような副作用の懸念は少ない。しかし、免疫遺伝子を過剰発現させた場合にそのタンパク質の発現が局所にとどまらず全身に作用する可能性も考慮し、免疫遺伝子の発現を至適制御する必要がある。

質問 1 9) 搭載したサイトカインやケモカインは *in vivo* で血中にて検出できるのか。

(回答) 我々自身の以前の研究では、発現活性強度が高い CA プロモーターで発現制御したサイトカインの発現量がウイルス投与 7 日後に、投与 2 日後と比べて 1/100 程度に減少したものの検出可能であった。一方、より発現活性強度の低いプロモーターではウイルス投与 2 日後でのサイトカイン発現量は低レベルで、7 日後には検出限界以下だった。局所では免疫遺伝子が高濃度持続分泌し、全身性には一過性にしか分泌されないが、免疫遺伝子の至適発現制御の必要性が示された。

質問 2 0) ウイルス感染上清の ELISA 結果でエラーバーがほとんど見えない理由は何か。

(回答) 対数表記にすると見えないほどの標準誤差範囲で実験できたためである。

質問 2 1) Supplementary figure (WST-8 assay での位相差像) で主張したいことは何か。

(回答) がん細胞でのみネクローシス様の細胞溶解の形態を示していることである。

質問 2 2) 3 種類の Surv.m-CRA-2 の投与では、1 つの細胞に対して 3 因子が作用していない可能性もあり、3 遺伝子を 1 つの Surv.m-CRA-2 に搭載する方が治療効果が増強するのではないか。

(回答) 3 遺伝子を 1 つの Surv.m-CRA-2 に搭載する方がより治療効果を増強することができると考え、その研究に着手している。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。