



図 増殖性遺伝子組換え HSV-1 G47Δ の構造

HSV-1 のゲノムは 152 kb の大きさで、2 つの固有配列領域 (unique sequences : U_L と U_S) とその両端に位置する繰り返し配列 (terminal repeat : TR, inverted repeat : IR) からなる。①両コピーの $\gamma 34.5$ 領域の欠失により、病原性の消失と腫瘍選択的ウイルス複製が得られる。② $ICP6$ の不活化により、増殖が盛んで RR 活性が上昇している細胞において選択的にウイルスは複製する。③ $\alpha 47$ の欠失により、ウイルスに感染した細胞の MHC Class I の提示低下が防止される。また $\gamma 34.5$ 欠失ウイルスの複製能力が腫瘍細胞で改善するが、正常細胞への毒性に変化はない。

エンベロープおよびその内側のキャプシドは野生型 HSV-1 と同じである。G47Δは、臨床応用された第二世代複製型遺伝子組換え HSV-1 G207 の改良型で、第三世代複製型遺伝子組換え HSV-1 に位置づけられる。正常組織では複製せず腫瘍細胞においてのみウイルス複製を可能にするため、ウイルスゲノムの遺伝子組換え操作により、3 つの非必須遺伝子 (合計 4 箇所) が人為的に除去或いは不活化されている¹⁾。すなわち、2 つコピーが存在する $\gamma 34.5$ 遺伝子の双方の欠失と、マーカーの LacZ 遺伝子の挿入による ICP6 遺伝子 (ribonucleotide reductase (RR) の大サブユニットをコードする) の不活化、および $\alpha 47$ 遺伝子の欠失という三重変異を有する (添付資料 5(2)11)。G47Δは、 $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失と ICP6 遺伝子不活化の二重変異を有する遺伝子組換え HSV-1 G207 のウイルスゲノムに、 $\alpha 47$ 遺伝子の欠失変異を加えることによって作製された。

$\gamma 34.5$ は HSV-1 の病原性に関連した遺伝子で、これを欠失させた変異株は正常細胞でのウイルス複製能が著しく減弱することが判明している¹⁷⁾。正常細胞ではウイルス感染が起こると二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (double stranded RNA-activated protein kinase: PKR) がリン酸化され、それが翻訳開始因子 eIF-2 α をリン酸化し、その結果ウイルス蛋白を含む細胞内での蛋白合成が遮断される。 $\gamma 34.5$ 遺伝子産物はリン酸化 PKR に拮抗してウイルス蛋白の合成を可能にするが、 $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失 HSV-1 は正常細胞では複製を行えない。しかし、正常細胞と異なり、腫瘍細胞では普遍的に PKR のリン酸化が低いため、 $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失の HSV-1 でも複製可能となると考えられている¹⁸⁾。

RR はウイルス DNA 合成に必要な酵素であるが、この遺伝子をもとに不活化すると、ウイルスは非分裂細胞では複製できず、分裂が盛んで RR 活性の上昇した細胞でのみウイルスの欠落酵素が補われてウイルス複製が可能となる。 $\alpha 47$ 遺伝子のコードする蛋白質は、宿主細胞の抗原提示関連トランスポーター (TAP) を阻害して細胞表面の MHC Class I の発現を抑え

ることによって、ウイルス蛋白の提示を抑制し、宿主の免疫サーベイランスから逃れる作用を有する。従って $\alpha 47$ 遺伝子欠失 HSV-1 では宿主細胞の MHC Class I 発現が維持され、抗腫瘍免疫細胞に対する刺激が強くなると期待される。また G47 Δ は、 $\alpha 47$ 遺伝子と重なる US11 遺伝子のプロモーターも欠失するため、US11 遺伝子の発現時期が早まり、これが $\gamma 34.5$ 変異の second site suppressor として機能して $\gamma 34.5$ 欠失 HSV-1 において減弱したウイルス複製能を腫瘍細胞に限って復元する。

これらの三重変異により、G47 Δ は、ウイルス複製に関して高い腫瘍特異性を示し、腫瘍細胞に局限した高い殺細胞効果を呈する一方、正常組織では毒性を呈さない。親ウイルス G207 に比較して、その安全性を維持しながら、抗腫瘍効果が格段に改善された。また G207 に比べ、高い力価のウイルス製剤が生産できることもあり、同じ容量でも高い治療効果が期待できる。G47 Δ は、ウイルスゲノム上、間隔の離れた 4 箇所の人為的変異を有することから、野生型 HSV-1 に戻る(revert)可能性がゼロに等しい点でも安全性の高いゲノム構造となっている。G47 Δ は HSV-1 strain F 由来であることから、37°C では複製するが 39.5°C では複製しないという温度感受性を有する。

臨床製剤の製造に先立ち、使用する G47 Δ の全ゲノムの塩基配列の解析を行い、 $\gamma 34.5$ 、ICP6、 $\alpha 47$ の 3 つの遺伝子の改変箇所が設計どおりであることが確認された。遺伝子改変部付近の塩基配列解析結果を添付する（添付資料 5(2)11）。

④ G47 Δ の生物学的特徴

1) 培養細胞におけるウイルス複製能力：

G47 Δ は、臨床応用された第二世代複製型遺伝子組換え HSV-1 G207 の改良型であることから、G47 Δ の生物学的特徴については G207¹⁹⁾との比較検討が主になされた。ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH、ヒト膠芽腫細胞株 U87MG、ヒト膠芽腫細胞株 U373、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株 SQ20B、およびアフリカミドリザル腎細胞株 Vero において、G47 Δ は G207 に比し優れた複製能力を示し、multiplicity of infection (MOI) = 0.01 にて感染後 24 時間後の産生ウイルスの回収量は G207 に比し 4 倍から 1000 倍高かった¹⁾。U87MG は MOI=2 でも検討を行い、感染後 24 時間後のウイルスの回収量は G207 に比し 12 倍高かった¹⁾。ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP および Du145 においても、MOI=2 で感染させた 24 時間後の G47 Δ の産生ウイルス回収量は G207 に比し 22 倍高かった²⁰⁾。

G47 Δ と野生型 HSV-1 との比較では、MOI=2 における産生ウイルスの回収量は、U87MG では感染 24 時間後において 9.5 倍、U138 では感染 22 時間後において 125 倍、野生型 HSV-1 のほうが G47 Δ より高く、野生型 HSV-1 に比べると G47 Δ の複製能は減弱している。

G47 Δ は細胞周期を停止させたヒト初代培養ケラチノサイト（HKC）において、MOI $\leq$ 10 でウイルス複製による殺細胞効果を現さなかった²¹⁾。G207 は MOI=0.1 で正常星状細胞や正常神経細胞の培養細胞においてウイルス複製による殺細胞効果を現さなかった¹⁹⁾。

2) 培養細胞における殺細胞効果：

ヒト膠芽腫細胞株 U87MG、U373、U138、ヒト悪性黒色腫細胞株 624 および 888 においては MOI = 0.01 にて、またマウス神経芽細胞腫株 Neuro2a においては MOI=0.1 にて、感染後 3-4 日で G47Δ は G207 に比しより速やかに細胞を死滅させた。U87MG 細胞株において G47Δ (MOI=0.01, day3) が 80% の細胞を死滅させたのに対し、G207 は 10% の細胞を死滅させたのみであった¹⁾。ヒト前立腺癌細胞株 LNCap と DU145 において、MOI=0.1 で、G47Δ は G207 に比べ有意に速やかな殺細胞効果を呈した²⁰⁾。

3) 感染宿主細胞の MHC Class I 発現に対する影響：

ヒト繊維芽細胞株 Detroit551 において、野生型 HSV-1 (strain F) または G207 は、感染 24 時間以内に宿主細胞の MHC Class I の発現を 40% 程度にまで低下させたのに対し、G47Δ は MHC Class I の発現を 100% 維持した¹⁾。ヒト悪性黒色腫細胞株を用いた検討では、MHC Class I の発現が元来比較的高い 938 株と 1102 株において、G47Δ は G207 に比べ、感染後の MHC Class I の発現低下を有意に抑制した。MHC Class I の発現が元来低い 624 株、888 株、および 1383 株においては G207 との差は見られなかった。

4) 腫瘍反応性 T 細胞の活性化作用：

ヒト悪性黒色腫細胞株 938 および 1102 において、G47Δ 感染腫瘍細胞は G207 感染腫瘍細胞に比べ、それぞれの細胞株に特異的に反応する腫瘍浸潤 T 細胞株の刺激によるインターフェロン γ の分泌を 25-40% 増加させた¹⁾。888 株においては、腫瘍浸潤 T 細胞刺激によるインターフェロン γ の分泌は G47Δ、G207 いずれの感染腫瘍細胞でもほとんど見られなかった。

5) マウス皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果

ヌードマウスの皮下に形成された U87MG ヒトグリオーマや A/J マウスの皮下に形成された Neuro2a マウス神経芽細胞腫に 1×10^6 plaque-forming units (pfu) を 2 回腫瘍内投与すると、G47Δ は G207 に比し有意に優れた腫瘍増殖抑制効果を示した。U87MG 皮下腫瘍を有するマウスにおいて、G207 治療群では 12 匹中 3 匹に治癒が見られたのに対し、G47Δ 治療群は 12 匹中 8 匹に治癒が見られた¹⁾。

アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株であるヒト HONDA およびマウス TRAMP を用いたマウス皮下腫瘍モデルにおいて、G47Δ を 2 回腫瘍内投与すると投与量依存性に腫瘍増殖が抑制された。また前モデルに対しては 2×10^5 pfu 2 回、後モデルに対しては 5×10^6 pfu 2 回の腫瘍内投与を行い、ホルモン療法を併用するとさらに治療効果の増強が得られた²⁰⁾。またホルモン療法後にホルモン不応性となり再発したヒト前立腺癌 HONDA に対しても G47Δ の腫瘍内投与は増殖抑制効果を示した²⁰⁾。

6) マウス脳腫瘍に対する抗腫瘍効果：