

Epithelial cell adhesion molecule を  
介して感染する  
受容体標的化腫瘍溶解性 HSV の開発

研究室 ゲノム病態医科学研究室

学位申請者 柴田 智子

## 目次

	頁
目次	2
第1章 序論	4
1-1 腫瘍溶解性ウイルス療法	
1-2 受容体標的化 oHSV	
1-3 Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) について	
1-4 本研究の目的	
第2章 結果	
2-1 EpCAM 標的化 gD の構築と機能解析	6
2-1-1 EpCAM 標的化 gD の構築	
2-1-2 EpCAM 標的化 gD は EpCAM 特異的な細胞内侵入を成立させた	
2-2 EpCAM 標的化 oHSV の作製	6
2-3 EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入の特異性の評価	7
2-3-1 EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入は EpCAM 特異的であった	
2-3-2 EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入は抗 EpCAM 抗体により阻害された	
2-4 EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播の特異性の評価	8
2-4-1 EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播は EpCAM 特異的であった	
2-4-2 BxPC-3 (ヒト膵がん細胞株) における内在性 EpCAM の発現は EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播に必要である。	
2-5 EpCAM 標的化 oHSV による抗腫瘍効果の検討	9
2-5-1 EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞のみに細胞内侵入を示し、その頻度は非標的化 HSV と同程度であった	
2-5-2 EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞にプラーク形成を示した	
2-5-3 EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞をウイルス量依存的に殺傷した	
2-5-4 EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞を移植したヌードマウスにおいて抗腫瘍効果を示した	
第3章 考察	11
3-1 受容体標的化 oHSV の意義	
3-2 EpCAM を標的とした受容体標的化 oHSV の有用性	
3-3 受容体標的化 oHSV の細胞内侵入および細胞間伝播を制御する因子は何か	
3-4 結語	

第 4 章	実験材料・実験操作	14
4-1	実験材料	
4-2	実験操作	
第 5 章	参考文献	25
	図	31
	謝辞	49

## 第1章 序論

### 1-1 腫瘍溶解性ウイルス療法

腫瘍溶解性ウイルス療法とはがん細胞に選択的に感染し、殺傷効果を示すウイルスを用いたがんに対する治療法のことである。中でも変異の導入や遺伝子工学的な改変を施された単純ヘルペスウイルス (HSV) が利用されており、がんに対する新規治療法として注目されている (Miest and Cattaneo, 2014; Russell et al., 2012; Lichty et al., 2014)。臨床試験に進んでいる多くの腫瘍溶解性 HSV (oncolytic HSV; oHSV) は正常細胞での複製に必要である infected cell polypeptide (ICP) 34.5 や ICP6 を不活化あるいは欠失させている (Chou et al., 1990; Mineta et al., 1995; MacLean et al., 1991; Kemeny et al., 2006; Hu et al., 2006; Todo et al., 2001)。しかしながら、臨床試験において、正常細胞での複製を制御した oHSV はヒトに対する安全性は確保されていたものの、治療効果に改善の余地が見られた。その原因として複製能を改変したことによる抗腫瘍効果の低下が考えられる (Markert et al., 2000)。また HSV の細胞内侵入の受容体の 1 つである nectin-1 の発現が低いためにがん細胞において HSV の感染に抵抗性を示すことが報告されている (Huang et al., 2007; Yu et al., 2007)。したがって、複製に関する遺伝子を改変せずに、がん細胞特異的に細胞内侵入する oHSV の開発が可能となれば大きな意義を有すると考えられる。

### 1-2 受容体標的化 oHSV

HSV の細胞内侵入には少なくともウイルスエンベロープ上の 5 つの糖タンパク質が関わっている (Cai et al., 1988; Ligas et al., 1988; Desai et al., 1988; Hutchinson et al., 1992)。ウイルス粒子はまず糖タンパク質 B (glycoprotein B; gB) と糖タンパク質 C (gC) を介して細胞表面のヘパラン硫酸に吸着する (Shukla and Spear, 2001)。吸着は細胞内侵入の効率を良くするためにウイルス粒子を細胞表面に集めるが、この過程は可逆的であり、必須ではない。細胞内侵入は、糖タンパク質 D (gD) とその受容体である herpesvirus entry mediator (HVEM)、nectin-1、あるいは 3-O-sulfated heparin sulfate と相互作用することに依存している (Montgomery et al., 1996; Geraghty et al., 1998; Shukla et al., 1999)。gD とその受容体との結合は gD の構造変化の引き金となり、膜融合を実行する gB と糖タンパク質 H (gH) /糖タンパク質 L (gL) のヘテロダイマーを活性化する (Carfi et al., 2001; Fusco et al., 2005; Krummenacher et al., 2005)。その結果、ウイルスのエンベロープと細胞膜が融合し、カプシドが細胞内に侵入する (図 1)。

本研究グループの内田らは遺伝子工学的に gD を改変することにより gD 受容体を介しては侵入せず、epidermal growth factor receptor (EGFR) や carcinoembryonic antigen (CEA) といった、がん関連抗原を介してのみ感染する HSV の作製に成功した (Uchida et al., 2013)。gD の 2-24 番目のアミノ酸を欠失することにより HVEM との、38 番目のアミノ酸をチロシンからシステインに変異させることにより nectin-1 との結合能を不能とした。その上で 1 番目と 25 番目の間に EGFR や CEA に対する抗体に由来する単鎖抗体 (scFv) を挿入することによって標的分子特異的な細胞内侵入を実現している。さらに gB:D285N/A549T (gB:N/T) 変異 (Uchida et al., 2010) を HSV に導入することにより、非特異的な感染を増加させることなく、標的細胞へ約 100 倍、細胞内侵

入の効率を増強した (Uchida et al., 2012)。本論文では細胞膜表面の分子を標的とする oHSV を受容体標的化 oHSV と呼ぶ。

### 1-3 Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) について

EpCAM は 1 型膜貫通糖タンパク質であり、1979 年に大腸がんの抗体スクリーニングにより同定された分子 (Herlyn et al., 1979) である。

がん細胞では多くの上皮系腫瘍に発現していることが知られており (Patriarca et al., 2012)、EpCAM の高発現は乳がん、卵巣がん、膀胱がん、前立腺がんなどにおいて予後不良に関連する。また EpCAM はがん幹細胞にも発現していると報告されている (Gires et al., 2009)。

発現解析などの結果からこれまでに EpCAM を標的とした治療法の開発が進められてきた (Armstrong et al., 2003; Chaudry et al., 2007; Liljefors et al., 20005; Riethmuller et al., 1998; Weiner et al., 1988; Marme et al., 2002)。抗体医薬の 1 つである EpCAM と CD3 を認識するハイブリッドモノクローナル抗体のカツマキソマブは欧州において悪性腹水の治療法として承認されている (Heiss et al., 2010)。

### 1-4 本研究の目的

本研究では受容体標的化 oHSV のさらなる適用拡大を目指し、これまでのがん細胞に対する治療法の研究が進められてきた EpCAM を標的とした受容体標的化 oHSV を作製し、その標的特異性および抗腫瘍効果を評価する (図 2)。

## 第 2 章 結果

### 2-1 EpCAM 標的化 gD の構築と機能解析

EpCAM を標的化するために抗 EpCAM 抗体に由来する単鎖抗体 (scFv) を gD に挿入し、EpCAM 特異的な細胞内侵入の成立の可否について検討した。

#### 2-1-1 EpCAM 標的化 gD の構築

抗 EpCAM 抗体の scFv を構築するために抗 EpCAM 抗体産生ハイブリドーマ MY24 (Yamaguchi et al., 2014) から RNA を抽出し、cDNA を合成した。cDNA を鋳型に縮重プライマーを用いた PCR を施行することにより軽鎖と重鎖の可変領域 ( $V_L$ 、 $V_H$ ) を増幅した。 $V_L$  と  $V_H$  をグリシンとセリンからなる 15 アミノ酸のリンカーで接続し scFv を構築した。これを改変 gD の 1 番目と 25 番目のアミノ酸の間に挿入し、EpCAM 標的化 gD を作製した (図 3)。

#### 2-1-2 EpCAM 標的化 gD は EpCAM 特異的な細胞内侵入を成立させた

EpCAM 標的化 gD による HSV の EpCAM 特異的な細胞内侵入の成立を簡便に検討するために一過性相補アッセイ (図 4) を施行した。一過的に野生型 gD をエンベロープに表出させた gD ノックアウト HSV は gD 受容体を発現する CHO-nectin-1 細胞に細胞内侵入を示し、陽性対照が作動していることを確認した (図 5)。また gD:d2-24/Y38C を持つ gD ノックアウト HSV は CHO-nectin-1 細胞において EGFP の発現が見られないことから点変異 Y38C により nectin-1 を介した細胞内侵入が抑制されていることが示された (図 5)。EGFR 標的化 gD を持つ gD ノックアウト HSV は CHO-EGFR 細胞に細胞内侵入を示した (図 5)。CHO-nectin-1 細胞に見られる EGFP の弱い発現は酸性処理による細胞外のウイルスの不活化が十分でなかったことによるバックグラウンドと考えられる。それに対し、EpCAM 標的化 gD は CHO-EpCAM 細胞のみに細胞内侵入を示した (図 5)。以上の結果から抗 EpCAM 抗体 MY24 から作製した scFv を改変 gD に挿入することにより、EpCAM 標的化 gD は EpCAM 特異的に HSV の細胞内侵入を成立させうることが明らかとなった。

### 2-2 EpCAM 標的化 oHSV の作製

EpCAM 標的化 gD が HSV の細胞内侵入を成立させうることが明らかとなったため、EpCAM 標的化 oHSV を bacterial artificial chromosome (BAC) システムを用いて組換え作製した。

EpCAM 標的化 oHSV のゲノム全長を有する BAC プラスミド (pKB3G-gB:N/T-gDscEpCAM) を構築した (図 6)。ゲノム中の  $U_L 3$  と  $U_L 4$  の間に細胞内侵入の指標となる EGFP 発現カセットの挿入、 $U_L 27$  (gB) に細胞内侵入の効率を増強させる変異 gB:D285N/A549T (Uchida et al., 2010) の挿入、そして  $U_L 37$  と  $U_L 38$  の間に loxP 配列に挟まれた BAC の挿入が施されたプラスミド pKB3G-gB:N/T (Uchida and Glorioso et al., unpublished) をバックボーンとして、 $U_S 6$  (gD) を EpCAM 標的化 gD (gD:d2-24/Y38C-scEpCAM) の配列に組換えた。BAC プラスミドを制限酵素 *Hind* III、*Bst* BI、*Bam*HI、*Xho* I で切断した際のバンドパターンを解析することにより、意図した組換えが生じたことを確認した。

pKB3G-gB:N/T-gDscEpCAM を Cre リコンビナーゼ発現 Vero/Cre-EpCAM 細胞に遺伝子導入し

た。産生されたウイルス粒子には loxP 配列で挟まれた BAC を含む配列 (図 6) が除去されたウイルスゲノムがパッケージングされる。産生された EpCAM 標的化 oHSV を 2 回の限界希釈を行うことにより単離した。

### 2-3 EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入の特異性の評価

EpCAM 標的化 gD は HSV の細胞内侵入を成立させたが、HSV のゲノムに EpCAM 標的化 gD を組込んだ EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入が EpCAM 特異的であるかどうかは不明であった。そこで、①改変 HSV の標的抗原を強制発現させた細胞への侵入、②抗体を用いた細胞内侵入の阻害を検討することにより EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入の特異性を評価した。

#### 2-3-1 EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入は EpCAM 特異的であった

細胞内侵入の特異性を検討するために gD 受容体、EGFR、EpCAM のいずれも発現していない CHO-K1 細胞とその亜株である CHO-nectin-1、CHO-HVEM、CHO-EGFR、CHO-EpCAM 細胞に非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を感染させた。

非標的化 HSV は gD 受容体を発現していない CHO-K1、CHO-EGFR、CHO-EpCAM 細胞に細胞内侵入を示さなかったが、gD 受容体を発現した CHO-HVEM、CHO-nectin-1 細胞に細胞内侵入を示した (図 7A 上段)。また、EGFR 標的化 oHSV は CHO-K1、CHO-HVEM、CHO-nectin-1 細胞に細胞内侵入を示さなかったが、EGFR を発現した CHO-EGFR 細胞には細胞内侵入を示した (図 7A 中段)。それに対して、EpCAM 標的化 oHSV は CHO-K1、CHO-HVEM、CHO-nectin-1、CHO-EGFR 細胞に細胞内侵入を示さなかったが、EpCAM を発現した CHO-EpCAM には細胞内侵入を示した (図 7A 下段)。

またマウスメラノーマ細胞株 B78H1 とその亜株を用いて同様の実験を行ったところ EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM を発現した B78-EpCAM にのみ細胞内侵入を示した (図 7B 下段)。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は本来の gD 受容体である HVEM ならびに nectin-1 を介した細胞内侵入が不能となっており、EpCAM 標的化 gD により EpCAM 特異的に細胞内侵入がもたらされることが明らかとなった。

#### 2-3-2 EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入は抗 EpCAM 抗体により阻害された

EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入が EpCAM 特異的であることをさらに検証するために、抗 EpCAM 抗体が EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入を阻害できるかどうかについて検討した。

Vero/EpCAM 細胞に抗体 (IgG1 あるいは MY24) を加えて、1 時間静置した後に、非標的化 HSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を抗体存在下で感染させて、細胞内侵入を検討した (図 8A)。非標的化 HSV の細胞内侵入は、対照抗体および MY24 の前処置によって阻害されなかった。一方、EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入は対照抗体によっては阻害されなかったが、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  あるいは 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の MY24 を用いると EGFP のシグナルが抗体濃度依存的に弱くなった ; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ではわずかに確認できたが、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では全く検出されなくなった。

また EpCAM を発現するヒト膵がん細胞株の BxPC-3 細胞 (図 12) を用いて同様の実験を行ったところ EpCAM 標的化 oHSV は MY24 により細胞内侵入が阻害されるが、対照抗体によっては阻害されなかった (図 8B)。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入は EpCAM を介していることが強く支持された。

## 2-4 EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播の特異性の評価

HSV の娘ウイルスは細胞間隙を經由して隣接する細胞へと感染（細胞間伝播）する。EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入は EpCAM 特異的であることが明らかとなったが、細胞間伝播も EpCAM 特異的であるかどうかは不明である。そこで、①標的抗原を強制発現させた細胞への細胞間伝播、②EpCAM の内在的な発現をノックダウンした細胞株を用いた細胞間伝播を検討することにより EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播の特異性を評価した。

### 2-4-1 EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播は EpCAM 特異的であった

細胞間伝播の特異性を評価するため、非標的化 HSV、EpCAM 標的化 oHSV をそれぞれ細胞に侵入させ、細胞外に娘ウイルスが放出される前に gD 受容体あるいは EpCAM のみを発現している細胞に重層した後のプラーク形成能を検討した（図 9）。

非標的化 HSV は gD 受容体を発現しない B78H1、B78-EpCAM 細胞にプラーク形成を示さず、重層したドナー細胞に由来すると思われる EGFP のシグナルのみが観察された。一方、gD 受容体を発現する B78-HVEM、B78-nectin-1 にはプラーク形成を示した（図 10 上段）。

EpCAM 標的化 oHSV は B78H1、B78-HVEM、B78-nectin-1 細胞にプラーク形成を示さず、重層したドナー細胞に由来すると思われる EGFP のシグナルのみが観察された。それに対し、EpCAM を発現する B78-EpCAM にはプラーク形成を示した（図 10 下段）。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播は EpCAM 特異的であることが示唆された。

### 2-4-2 BxPC-3(ヒト膵がん細胞株)における内在性 EpCAM の発現は EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播に必要である

内在的に発現する EpCAM は EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播を成立させるかどうか評価するため、内在的に EpCAM 遺伝子を発現している BxPC-3（ヒト膵がん）細胞を用いて解析を行うこととした。細胞間伝播の特異性を検討するために、BxPC-3 細胞における EpCAM の発現を short interfering RNA（siRNA）により低下（ノックダウン）させた。細胞間伝播において細胞膜表面の EpCAM の発現が重要であるため、siRNA 導入から 4 日目（図 11A）の BxPC-3 細胞の膜表面の分子の発現をフローサイトメトリー解析により検討した。その結果、EpCAM に対する siRNA（siEpCAM）により EpCAM の発現はノックダウンされたが、HVEM、nectin-1、EGFR の発現量はノックダウンされないことが示された（図 11B）。これらの細胞を用いて EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播を解析した。

2-4-1 と同様に実験を行い、非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV、EpCAM 標的化 oHSV が形成したプラークサイズを計測した。非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV は siEpCAM を導入した BxPC-3 細胞のプラークサイズは陰性対照 siRNA を導入した BxPC-3 細胞と比較して減少しなかった（図 11C）。一方、EpCAM 標的化 oHSV では、siEpCAM を導入した BxPC-3 細胞のプラークサイズは有意に減少した（図 11C）。

以上のことから EpCAM の内在的な発現をノックダウンすることにより EpCAM 標的化 oHSV



のプラークサイズが減少したことから、EpCAM 標的化 oHSV のヒト膀胱がん細胞株 BxPC-3 への細胞間伝播は内在性の EpCAM の発現に依存していることが示された。

以上 2 種類の細胞間伝播の特異性の評価の結果から、EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 特異的に細胞間伝播を成立させることが示唆された。

## 2-5 EpCAM 標的化 oHSV による抗腫瘍効果の検討

HSV による殺がん細胞効果は細胞内侵入の頻度とその後の細胞間伝播の効率に依存すると考えられる。そこでさまざまながん細胞に対する EpCAM 標的化 oHSV の細胞内侵入の頻度と細胞間伝播の効率を検討した。その上で、がん細胞の殺傷効果、異種移植マウスを用いた抗腫瘍効果を評価した。

### 2-5-1 EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞のみに細胞内侵入を示し、その頻度は非標的化 HSV と同程度であった

7 種類のヒトがん細胞株における HVEM、nectin-1、EGFR、EpCAM の発現をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、図 12 に示されているように 7 種類のヒトがん細胞株は EpCAM の発現と EGFR の発現により 4 つのグループに分類された。

これらのがん細胞に非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を感染させた (図 12)。

非標的化 HSV は 7 種類全ての細胞に感染を示した (図 13 上段)。それに対し、EGFR 標的化 oHSV は EGFR の発現がほぼ陰性のがん細胞にわずかに細胞内侵入を示したが、EGFR 陽性がん細胞では非標的化 HSV と同程度の細胞内侵入を示した (図 13 中段)。それに対し、EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陰性がん細胞に細胞内侵入を示さず、EpCAM 陽性がん細胞では非標的化 HSV と同程度の細胞内侵入を示した (図 13 下段)。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞に細胞内侵入を示すことが明らかとなった。

### 2-5-2 EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞にプラーク形成を示した

がん細胞に対するウイルスのプラーク形成能を評価し、細胞間伝播による殺傷効果を検討した。

非標的化 HSV は 7 種類のヒトがん細胞株にプラーク形成を示した (図 14)。それに対し、EGFR 標的化 oHSV は EGFR 陽性がん細胞にのみプラーク形成を示し、U87 細胞においては非標的化 HSV よりも大きなプラークを形成した (図 14)。一方、EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞にのみプラーク形成を示し、HuCCT1、HepG2、SK-OV-3 細胞においては非標的化 HSV よりも大きなプラーク形成を示した (図 14)。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞においてのみプラーク形成を示すことが示唆された。

### 2-5-3 EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞をウイルス量依存的に殺傷した

ここまでの検討で EpCAM 標的化 oHSV が EpCAM 陽性がん細胞においてのみ細胞内侵入とプラーク形成を行うことが示された。そこで、この結果が細胞の殺傷においても観察されるか検討

するために非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を感染させ、これらのウイルスのがん細胞殺傷効果ならびにそのウイルス量依存性について検討した。

非標的化 HSV は 7 種類のがん細胞全てにおいてウイルス量依存的に殺傷効果を示した。それに対し、EGFR 標的化 oHSV と EpCAM 標的化 oHSV は標的抗原を発現していないがん細胞に対しては MOI3 においても殺傷効果を示さなかったが、標的抗原を発現しているがん細胞に対してはウイルス量依存的に殺傷効果を示した (図 15)。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞をウイルス量依存的に殺傷することが示された。

#### 2-5-4 EpCAM 標的化 oHSV は EpCAM 陽性がん細胞を移植したヌードマウスにおいて抗腫瘍効果を示した

EpCAM 標的化 oHSV は *in vitro* において EpCAM 特異的な細胞内侵入ならびに細胞間伝播を示し、EpCAM 陽性がん細胞を殺傷することが示された。しかし腫瘍組織においては、がん細胞は間質と共存しているため、その増殖や生存はがん細胞のみを培養している *in vitro* の条件だけでは HSV による実際のがん治療効果を検討するには不十分である。そこで *in vivo* において EpCAM 標的化 oHSV の抗腫瘍効果を検討した。

マウスの皮下に SW620 (EpCAM 陽性大腸がん細胞株) をヌードマウスの右大腿部に移植し、160~200 mm<sup>3</sup> に達した段階で PBS あるいは EpCAM 標的化 oHSV を腫瘍内投与した。

その結果、PBS 投与群は腫瘍体積が増大し、投与後 30 日を経過した時点では 1,400 mm<sup>3</sup> 前後にまで増大した。一方、EpCAM 標的化 oHSV を投与した群では投与後 5 日目までは腫瘍体積が増大したが、5 日目から 8 日目までの間、腫瘍体積が減少した。8 日目以降は腫瘍体積が増大したが PBS と比較すると増大速度は緩やかであった。30 日を経過した時点では 800 mm<sup>3</sup> 前後と PBS 群の約 60% 程度の腫瘍体積に留まった。2 群間の差を Analysis of variance 解析を用いて検定したところ有意 (P<0.05) であった。したがって EpCAM 標的化 oHSV は腫瘍の増大を抑制したことが示された (図 16)。

以上の結果から EpCAM 標的化 oHSV は SW620 を移植したヌードマウスにおいて抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

## 第3章 考察

本研究グループの内田らはHSVのgDを改変することによる標的化oHSVの作製に成功した。標的化oHSVを様々な種類のがんの治療に用いるためには標的化プラットフォームに様々な標的抗原に対するscFvを適用していくことが重要である。そこで本研究ではさらなる適用拡大を目指し、抗EpCAM抗体から作製したscFvを標的化改変gDプラットフォームに挿入したEpCAM標的化oHSVを作製した。EpCAM標的化oHSVの細胞内侵入ならびに細胞間伝播の特異性を評価するとともに抗腫瘍効果の検討を行った。

### 3-1 受容体標的化oHSVの意義

すでに臨床開発に進んでいる腫瘍溶解性HSVはウイルス複製に必要な遺伝子を不活化あるいは欠損させることにより弱毒化している。この改変により正常細胞では増殖せず、がん細胞でのみ増殖することが可能である。しかしながら、がん細胞特異的なウイルスの増殖が得られる一方、腫瘍溶解性が低下しうることが指摘されている (Mineta et al., 1995)。それに対し、受容体標的化oHSVは複製の段階ではなく細胞内侵入の段階を標的としているため、がん細胞における複製能を維持しつつ、正常細胞は殺傷しないという2つの目的を達成する、これまでのものとは異なる特性を有する標的化技術となりうる。

細胞内侵入の段階でのウイルスの制御の報告例は、interleukin-13 receptor  $\alpha 2$  を標的としたRoizmanらのグループ (Zhou and Roizman, 2006)、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) を標的としたCampadelli-Fiumeらのグループ (Menotti et al., 2008; Menotti et al., 2009)、そしてEGFRとCEAを標的とした本研究グループ (Uchida et al., 2013) のみと限定的である。その点、本研究グループの受容体標的化gDプラットフォームはがん関連抗原のEGFRやCEAのみならずEpCAMを標的できたことからその汎用性が高いと考えられる。

### 3-2 EpCAMを標的とした受容体標的化oHSVの有用性

EpCAMは上皮系由来の腫瘍に幅広く発現しており、腫瘍の形成と転移に関与することから治療の標的として研究が進められてきた。免疫組織学的な研究では、多くのグループが、様々な種類のがん細胞においてそれぞれの組織由来の正常細胞と比較してEpCAMが高発現していると報告している (Patriarca et al., 2012)。さらにEpCAMはヒト正常細胞では基底膜側に発現しているが、前がん性あるいは悪性の細胞では細胞膜表面全体に発現の分布が変わる (Winter et al., 2003) ことから、EpCAMを標的とした治療法は正常細胞よりもがん細胞に到達しやすいと考えられる。これらの可能性を検証するためにはさらなる研究が必要である。さらに非標的細胞での複製を阻害するmicro RNAを用いた方法と組み合わせることにより非がん細胞の殺傷の危険性を減らすアプローチも考えられる (Mazzacurati et al., 2015)。このように、EpCAM標的化oHSVをバイオ医薬品として開発してゆくためにさらなる解析および検討が必要である。

### 3-3 受容体標的化 oHSV の細胞内侵入および細胞間伝播を制御する因子は何か

受容体標的化 oHSV による腫瘍特異的な殺傷効果を担保するためには細胞内侵入と細胞間伝播の両方において腫瘍特異的であることが重要である。HSV の細胞間伝播はウイルスの細胞内侵入の膜融合のメカニズムと似ており、gB、gD、gH、gL の4つの糖タンパク質と gD 受容体を必要とするが、2つの過程は異なると報告されている。たとえば、Rauch らの報告では、gD の変異体は細胞内侵入を許容しないが、gD 受容体がなくても細胞間伝播を許容する (Rauch et al., 2000)。類似の報告としてアルファヘルペスウイルス亜科の仮性狂犬病ウイルスにおいて、gD は細胞内侵入に必要なが、細胞間伝播には必要ない (Babic et al., 1993; Peeters et al., 1992; Peeters et al., 1993; Rauh et al., 1991)。gE と gI の2つの糖タンパク質は HSV-1 の細胞間伝播に重要であるが、細胞内侵入においては必須ではない (Johnson and Huber, 2002.)。さらに本研究グループの内田らは gD 受容体の発現が不十分な細胞への侵入を促進する gB:N/T 変異だけでなく、細胞間伝播を促進する gH:N753K/A778V を報告した (Uchida et al., 2013)。

これらの報告から細胞内侵入と細胞間伝播は異なる律速段階により制御されており、gB と gH は2つの過程で異なる役割を担っていると考えられる。そのため本研究では受容体標的化 oHSV の細胞内侵入と細胞間伝播の特異性を別々の評価系を用いて検討した。本研究の結果より EpCAM 標的化 oHSV の細胞間伝播は標的分子特異的に制御されていることが示唆された。したがって2つの過程を制御できている点、殺傷効果が標的分子特異的であるという腫瘍溶解性ウイルスとして有利な性質を有していると考えられる。

EpCAM 標的化 oHSV は HepG2、HuCCT1、SK-OV-3 細胞において非標的化 HSV よりも大きいプラークを形成した。この現象は、単鎖抗体以外は同じ構造をもつ EGFR や CEA では見られなかった (Uchida et al., 2013) ことから2つの受容体標的化 HSV よりも EpCAM 標的化 oHSV は高い抗腫瘍活性を有することが示唆された。この分子メカニズムについては明らかではないが、標的分子の発現レベルがプラーク形成の効率に影響していると推測される。その理由として3つのがん細胞における細胞膜表面の標的分子の発現をフローサイトメトリー解析により検討したところ EpCAM は発現を確認できたが、nectin-1 の発現はフローサイトメトリー解析では検出できなかったためである。しかしながら、細胞内侵入と細胞膜表面の受容体の発現量は関係しないという報告もある。例えば、内田らはヒト大腸がん細胞株の HT29 とヒト膵がん細胞株の BxPC-3 はどちらも HVEM を細胞表面に発現しているが、HVEM のみを介して感染する gD 変異体を有する HSV は BxPC-3 にのみ感染した (Uchida et al., 2009)。正確なメカニズムは解明されていないが、細胞間伝播の効率を含め HSV の鍵となる特性は標的分子の性質によって影響を受けると考えられる。

また培養細胞における受容体を介した細胞間伝播の増強は腫瘍においても細胞間伝播を増強するかどうかは明らかとなっていない。その理由として、腫瘍を構成する細胞はがん細胞のみならず、異なる種類の非がん細胞から構成されていること、細胞外マトリックスが腫瘍細胞への直接的な接触を制限する可能性が考えられるからである。細胞間伝播の増強が抗腫瘍効果の増強に反映されるかどうかについては *in vivo* におけるさらなる解析が必要である。

### 3-4 結語

本研究の結果より、EpCAM 標的化 oHSV は細胞内侵入のみならず、細胞間伝播においても EpCAM の発現に依存することが明らかとなり、がん細胞に対する殺傷効果および抗腫瘍効果を有することが示された。また EpCAM 標的化 oHSV は gD 受容体の発現が低いがん細胞において非標的化 HSV よりも大きなプラークを形成した。このことから、さらなる解析が必要ではあるが、gD 受容体の発現が低いがん細胞において EpCAM 標的化 oHSV は非標的化 HSV よりも高い抗腫瘍効果を示しうることが示唆された。私たちの受容体標的化 oHSV システムは、様々な種類のがんに対する新たなバイオ医薬品の開発に有用である可能性が示唆された。

## 第4章 実験材料・実験操作

### 4-1：実験材料

#### <細胞>

アフリカミドリザル腎細胞 Vero 細胞 (ATCC CCL-81)、Vero/Cre 細胞は DMEM 培地 (Nacalai Tesque) に 5% 牛胎児血清 (FBS)、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

Vero/Cre-EpCAM (Cre/EpCAM 安定発現 Vero 細胞亜株) は以下のようにして樹立した。PLAT-A 細胞にシャトルベクター pMxc-puro-hEpCAM (pSYM-4) を Lipofectamin 2000 (Life Technologies) を用いて遺伝子導入した。その後、hEpCAM 遺伝子を搭載したレトロウイルスを回収し、Vero/Cre 細胞 (David Leib 先生より供与) に感染させた。その後 4 µg/mL となるように puromycin を加え選抜を行い、Vero/Cre-EpCAM 細胞として樹立した。DMEM 培地に 5% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン、4 µg/mL の puromycin を加えた培養液で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

Vero/EpCAM (EpCAM 安定発現 Vero 細胞亜株) は以下のようにして樹立した。PLAT-A 細胞にシャトルベクター pSYM-4 を Lipofectamin 2000 (Life Technologies) を用いて遺伝子導入した。その後、hEpCAM 遺伝子を搭載したレトロウイルスを回収し、Vero 細胞に感染させた。その後 4 µg/mL となるように puromycin を加え選抜し、限界希釈を行うことにより Vero/EpCAM 細胞として樹立した。DMEM 培地に 5% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン、4 µg/mL の puromycin を加えた培養液で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1 細胞 (ATCC CCL-61)、CHO-nectin-1 (nectin-1 安定発現 CHO-K1 細胞亜株、Geraghty et al., 1998)、CHO-HVEM (HVEM 安定発現 CHO-K1 細胞亜株、Montgomery et al., 1996)、CHO-EGFR (EGFR 安定発現 CHO-K1 細胞亜株、Nakamura et al., 2004) は F12K 培地 (Gibco) に 10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン、1% ピルビン酸ナトリウムを加えた培養液で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

CHO-EpCAM (EpCAM 安定発現 CHO-K1 細胞亜株) は以下のようにして樹立した。CHO-K1 細胞に pTARGET-hEpCAM を Lipofectamine LTX & Plus Reagent (Life Technologies) を用いて遺伝子導入した。800 µg/mL となるように G418 (Wako) を加え選抜し、限界希釈を行うことにより CHO-EpCAM 細胞として樹立した。F12K 培地 (Gibco) に 10% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン、1% ピルビン酸ナトリウムを加えた培養液で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

マウスメラノーマ細胞 B78H1 細胞 (Gary Cohen 先生より供与)、B78-nectin-1 (nectin-1 安定発現 B78H1 発現亜株、Uchida et al., 2009)、B78-HVEM (HVEM 安定発現 B78H1 細胞亜株、Uchida et al., 2009) は DMEM 培地に 5% FBS、1% ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

B78-EpCAM (EpCAM 安定発現 B78H1 発現亜株) は以下のようにして樹立した。PLAT-A 細胞にシャトルベクター pSYM-4 を Lipofectamin2000 (Life Technologies) を用いて遺伝子導入した。

その後、hEPCAM 遺伝子を搭載したレトロウイルスを回収し、Vero 細胞に感染させた。その後 4 µg/mL となるように puromycin を加え選抜し、限界希釈を行うことにより B78-EpCAM 細胞として樹立した。DMEM 培地に 5 % FBS、1 % ペニシリン・ストレプトマイシン、4 µg/mL の puromycin を加えた培養液で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

SW620(ヒト大腸がん細胞株、ATCC CCL-227)、BxPC-3(ヒト膵がん細胞株、ATCC CRL-1469)、HuCCT1(ヒト胆管がん細胞株、RBRC-RCB1960)は RPMI1640 (Nacalai Tesque) 培地に 10 % FBS、1 % ペニシリン・ストレプトマイシン、1 % ピルビン酸ナトリウムを加えた培養液で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

HepG2(ヒト肝がん細胞株、ATCC HB-8065)、SK-OV-3(ヒト卵巣がん細胞株、ATCC HTB-77)、U87(ヒト神経膠腫細胞株、ATCC HTB-14)、A2058(ヒト悪性黒色腫細胞株、ATCC CRL-11147)、PLAT-A (Platinum-amphotropic、レトロウイルスの gag 遺伝子、pol 遺伝子、アンホトロピックなエンベロープタンパク質を持つ 293T 細胞亜株、東京大学医科学研究所先端医療研究センター 北村俊雄先生より供与)は DMEM 培地に 10 % FBS、1 % ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培養液で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。

## <プラスミド>

### ■ pTAC-2

TA クローニングベクター。バイオダイナミクス研究所より購入した。

### ■ pSP72

クローニングベクター。プロメガ社より購入した。

### ■ pTARGET-hEpCAM

CMV プロモーター制御下に hEpCAM を発現する。

PC3 (ヒト前立腺がん) 細胞より mRNA を回収し、cDNA を合成した。cDNA から hEpCAM の open reading frame (ORF) の配列を増幅するため EpCAM のプライマー (#2231EpCAM-158~180 5'-TCTTCTCGGCGCGCGCAGCAT-3'/#2232EpCAM-1170~1144 5'-GTGTCCATTTGCTATTTCCCTTCTTCT-3'、配列は NM\_002354) で PCR を施行した。PCR 産物を pTARGET (プロメガ社) に TA クローニングにてライゲーションを行い作製した。

### ■ pMXc-puro-hEpCAM (pSYM-4)

hEpCAM を発現するレトロウイルスのシャトルベクター。

pTarget-hEpCAM から *Xba* I / *Sal* I により hEpCAM のフラグメントを切り出し、pSP72 の *Nhe* I / *Sal* I に挿入した (pSP72-hEpCAM、pSYM-3)。pSYM-3 から *Bam*H I / *Hind* III により hEpCAM のフラグメントを切り出し、pYO-14<sup>\*</sup> から *Hind* III / *Avr* II、*Avr* II / *Bam*H I により切り出されるフラグメントとライゲーションし、作製した。

<sup>\*</sup>pYO-14 (pMXc-puro-IL13R $\alpha$ 2) は以下のように作製した。

A375 (ヒト悪性黒色腫細胞株) より mRNA を回収し、cDNA を合成した。cDNA から IL13R $\alpha$ 2 の ORF の配列を増幅するために IL13R $\alpha$ 2 のプライマー (#2275 h IL13R $\alpha$ 2 (F) 5'-ATCTCGGAGAAATGGCTTCGTTTGC-3'/#2276 h IL13R $\alpha$ 2 (R) 5'-CCATGTCTCTTGATA

TGGAAAGTCTTC-3') で PCR を施行した。PCR 産物を pTARGET (プロメガ社) に TA クローニングにてライゲーションを行い、pTARGET-h IL13R $\alpha$ 2 を作製した。pTARGET-h IL13R $\alpha$ 2 から *Nhe* I / *Sal* I により IL13R $\alpha$ 2 のフラグメントを切り出し、T4 DNA ligase により突出末端をフィルアップし平滑末端にした。pMXc-puro (東京大学医科学研究所先端医療研究センター 北村俊雄先生より供与) を *Bam*HI により切断し、T4 DNA ligase により突出末端をフィルアップし平滑末端にした。平滑末端処理を行った pMXc-puro と IL13R $\alpha$ 2 の ORF を含む配列をライゲーションし、pMXc-puro-IL13R $\alpha$ 2 を作製した (pMXc-puro-IL13R $\alpha$ 2 ; pYO-14)。配列解析を行い、平滑末端処理により意図した配列となっていることを確認した。

#### ■ pgD:d2-24/Y38-scMYa24 (pSBT-21)

HSV-1 の gD プロモーター制御下に gD:d2-24/Y38C-scEpCAM を発現する。

抗 EpCAM 抗体産生ハイブリドーマ MY24 (Yamaguchi et al., 2014) から RNA を抽出し、cDNA を合成した。cDNA を軽鎖の可変領域 ( $V_L$ ) のプライマーセット (hu255 5'-GGAAGATCTGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA-3' / hu256 5'-CCGAATTCGGATACAGTTGGTGCAGCATC-3'、Mixed base code: R=a,g; Y=c,t; M=a,c; K=g,t; S=c,g; W=a,t; V=a,c,g; N=a,c,g,t.)、重鎖の可変領域 ( $V_H$ ) のプライマーセット (hu257 5'-GGAAGATCTSARGTNMAGCTGSAGSAGTC-3' / hu259 5'-GGAAGATCTSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG-3' / hu270 5'-CCGAATTCATAGACAGATGGGGTGTCTGTTTTGGC-3') により PCR で増幅した (Wang et al., 2000)。PCR 産物を  $V_L$  は pTAC-2 (バイオダイナミクス社) に TA クローニングにて挿入した (pTAC2-MYa24 $V_L$  ; pSBT-7)。 $V_H$  は *Bgl*II / *Eco*R I により切断し、pSP72 の *Bgl*II / *Eco*R I に挿入した (pSP72-MYa24 $V_H$  ; pSBT-5)。pSBT-7、pSBT-5 を配列解析し、抗体遺伝子の配列を確認した。その後、 $V_L$  は pSBT-7 を鋳型とし制限酵素サイトの付加と  $V_L$  の定常領域の除去を目的に hu323 5'-CCAGATCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTTATGTCCACATCAGTAGGA-3' / hu324 5'-CCGAATTCGCTAGCAGCCCGTTTTATCTCCAGCTTGGT-3' を用いて PCR を施行し、pTAC-2 に TA クローニングにて挿入した (pTAC2-scMYa24 $V_L$  ; pSBT-13)。 $V_H$  は pSBT-5 を鋳型とし 7 アミノ酸 (GGGGSGS) からなるリンカーの付加と定常領域の除去を目的に hu259/ hu322 5'-CCGGATCCTGAACCTCCACACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTC-3' を用いて PCR を施行した。PCR 産物を *Bgl*II / *Bam*HI により切断し、pSP72 の *Bgl*II / *Bam*HI に挿入した (pSP72-MYa24 $V_H$ -FX ; pSBT-24)。pSBT-13、pSBT-24 の抗体遺伝子の配列、付加した酵素サイト、リンカーの配列を確認した。その後、 $V_L$  と  $V_H$  の連結部位のリンカーを作製するために pgD:d2-24/Y38C-scEGFR を hu253 5'-CCCTCGAGGAGCTCAGATCTGACATTCTAATGACCCAATCTCCAC-3' / hu254 5'-CCGAATTCGGATCCGCCACCGCCGACCCGCCACCGCCGCTACCGCCCCGCCGCTAGCGGCCGCACGTTTGATTTCCAGCT-3' により PCR を施行し、scEGFR の  $V_L$  と 15 アミノ酸のリンカーを含むフラグメントを増幅させた。PCR 産物を *Sac*I / *Eco*R I により切断し、pCR II -TOPO (Invitrogen) に TA クローニングにて挿入した (pCR II -TOPO-scEGFR $V_L$  ; pTS-9)。また *Bgl*II を除去したクローニングベクター作製のため以下のフラグメントを用意した。①pSP-72 の *Sca*I / *Eco*R I によりマルチクローニングサイト (MCS) を含むフラグメントを切り出した。②gD プロモーターに制御される野生型 gD が挿入された pgDSac-FX から *Sca*I / *Eco*R I によりアンピシリン耐性遺伝子を含む



フラグメントを切り出した。①と②のフラグメントをライゲーションし、*Bgl* II を含まない MCS が挿入されたプラスミドを作製した (pSP72dBgl;pTS-19)。pTS-9 から *Sac* I/ *Xba* I により scEGFR の  $V_L$  とリンカーを含むフラグメントを切り出し、pTS-19 の *Sac* I/ *Xba* I に挿入した (pSP72-scEGFR $V_L$ ; pTS-20)。pTS-20 に MCSP に対する抗体の  $V_L$  を *Bgl* II/ *Nhe* I により入れ替えた (pSP72-SHM48 $V_L$ -LL; pTS-24)。pSBT-13 から *Bgl* II/ *Nhe* I により切り出される MY24 $V_L$  を pTS-24 の SHM48 $V_L$  と入れ替えた (pSP72-MYa24 $V_L$ -LL; pSBT-19)。pSBT-24 から *Bgl* II/ *Bam* HI により切り出される MY24 $V_H$  とリンカーのフラグメントを pSBT-19 の *Bam* HI サイトに挿入し、単鎖抗体を構築した (pSP72-scMYa24; pSBT-20)。pSBT-20 から *Bgl* II/ *Bam* HI により切り出される scMY24 のフラグメントを pgD:d2-24/Y38C (pHU174) の *Bam* HI に挿入し、gDscMY24 を作製した (pgD:d2-24/Y38C-scMYa24; pSBT-21)。

■ pgDSac-FX (pHU66, Tsvitov et al., 2007)

HSV-1 の gD プロモーター制御下に gD を発現する。

■ pgD:d2-24/Y38C (pHU174, Uchida et al., 2013)

HSV-1 の gD プロモーター制御下に gD:d2-24/Y38C を発現する。

■ pgD:d2-24/Y38C-scEGFR (pHU165, Uchida et al., 2013)

HSV-1 の gD プロモーター制御下に gD:d2-24/Y38C-scEGFR を発現する。

■ pgD:d2-24/Y38C-scMY24-AflKan (pSBT-26)

gD の ORF の上流に gD の 50bp の相同領域に挟まれた I-*Sce* I 切断部位とカナマイシン耐性遺伝子を持ち、gD:d2-24/Y38CscEpCAM が挿入された改変 gD プラスミド。

pEP-Kan-S2 (Dr. Klaus Osterrieder より供与) を gD の相同領域 50bp を含んだ hu101 5'-CCGAATTCTTAAGGTCTCTTTTGTGTGGTGCCTCCGGTATGGGGGGGGCTGCCGCCAGG ATGACGACGATAAGTAGGG-3'/ hu102 5'-CCGGATCCTTAAGCTACAACCAATTAACCAATTC TGATTAG-3'によりカナマイシン耐性遺伝子と I-*Sce* I サイトを含むフラグメントを増幅した。作製したフラグメントを *Afl* II により処理し、pHU174 の gD の ORF の上流に存在する *Afl* II に挿入した (pgD:d2-24/Y38C-Aflkan; pHU196)。

pSBT-20 から *Bgl* II/ *Bam* HI により切り出される scMY24 のフラグメントを pgD:d2-24/Y38C-Afl Kan の *Bam* HI に挿入し、作製した。

■ pRed/ET (GENE BRIDGES 社より購入した)

BAD プロモーター制御下に L-arabinose 遺伝子が活性化することにより Red/ET 遺伝子の発現が誘導され、組換えが促進される。

■ pBAD-I-*Sce* I (Tischer et al., 2006)

BAD プロモーター制御下に I-*Sce* I 遺伝子がクローニングされている。

## <ウイルス>

■ KgB:N/T-gDnull (以降、gD ノックアウト HSV)

KOS 株に由来し、U<sub>L</sub> 27 (gB) に細胞内侵入の効率を増強する点変異 (gB:D285N/A549T) が挿入されている。gD の ORF がレポーター遺伝子である EGFP に置き換わっている。(Uchida et al.,

2010)

■ KdB3G-gB:N/T (以降、非標的化 HSV)

KOS 株に由来し、U<sub>L</sub>3 と U<sub>L</sub>4 の間にエントリーのレポーター遺伝子である EGFP が挿入されている。また U<sub>L</sub>27 (gB) に細胞内侵入の効率を増強する点変異 (gB:D285N/A549T) が挿入されている。以下のようにして作製した。

①pKB3G-gB:N/T の作製

pEP-Kan-S2 を鋳型として EGFP の相同領域 50bp を含む hu245 5'-CCGAATTCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTAGGATGACGACGATAAGTAGGG-3' / hu246 5'-CCTCTAGAGGATCCCTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG-3'により PCR を施行し、カナマイシン耐性遺伝子と I-Sce I サイトを含むフラグメントを増幅した。フラグメントを *EcoR* I / *Xba* I により切断し、pSP72 に挿入した (pSP72-EGFP-Kan ; pYO-10)。シーケンス解析により目的の配列であることを確認した。pYO-10 から *Bam*HI により EGFP の相同領域とカナマイシン耐性遺伝子、I-Sce I サイトを含むフラグメントを切り出し、pEGFP-C1 (Clontech 社より購入した) の *Bam*HI サイトに挿入した (pEGFP-KAN ; pYO-11)。pYO-11 を鋳型として U<sub>L</sub>3 と U<sub>L</sub>4 の相同領域 50bp を含む hu249 5'-CCTCACTGCCCCGTCGCGCGTGTGGTGAATAAATAACACATAAATTTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGG-3' / hu250 5'-CCGACACTGAAATGCCCCCCCCCCCTTGC GGCGGTCCATTAAAGACAACACGCGTTAAGATACATTGATGAGTTTG-3'により PCR を施行し、標的フラグメントを調製した。pKB-gB:N/T (Uchida and Glorioso, unpublished)、pRed/ET が導入されたコンピテントセルにエレクトロポレーション法により標的フラグメントを導入し、EGFP を U<sub>L</sub>3 と U<sub>L</sub>4 の間に挿入するための組換えを行った。組換え操作後の BAC プラスミドは制限酵素 *Bgl* II、*Not* I を用いて目的の組換えが行われたことを確認した。

②KdB3G-gB:N/T (非標的化 HSV) の樹立

作製した BAC プラスミド pKB3G-gB:N/T を Vero 細胞に遺伝子導入し、ウイルスを産生し、回収した。回収したウイルスを 2 回の限界希釈により単離した。単離したウイルスを Vero/Cre 細胞に感染させ、BAC を除去し、KdB3G-gB:N/T (非標的化 HSV) を樹立した。

■ KdB3G-gB:N/T-gDscEGFR (以降、EGFR 標的化 oHSV)

KOS 株に由来し、U<sub>L</sub>3 と U<sub>L</sub>4 の間にエントリーのレポーター遺伝子である EGFP が挿入されている。また U<sub>L</sub>27 (gB) に細胞内侵入の効率を増強する点変異 (gB:D285N/A549T) が挿入されている。U<sub>S</sub>6 (gD) の 2-24 番目のアミノ酸を欠失させ HVEM との結合を不能とさせた上で、欠失させた部位に抗 EGFR 抗体である 528 の単鎖抗体 (scEGFR) を挿入した。また nectin-1 との結合を不能とするため 38 番目に点変異 (Y38C) が挿入した。以下のように作製した。

pEP-Kan-S2 を鋳型として hu101/102 により PCR を施行した。増幅させたフラグメントを *Afl* II で処理し、*Afl* II 処理した pHU165 に挿入した (pgD:d2-24/Y38C-scEGFR $\alpha$ KAN ; pHU195)。シーケンス解析を行い、目的のプラスミドが作製できたことを確認した。pHU195 を鋳型として hu15 5'-AAGCAGGGGTTAGGGAGTTG-3' / hu4ANL 5'-TCCGGACGTCTTCGGAGGCC-3'により PCR を施行し、gD:d2-24/Y38C-scEGFR を含む標的フラグメントを調製した。pKB3G-gB:N/T、

pRed/ET が導入されたコンピテントセルにエレクトロポレーション法により標的フラグメントを導入し、U<sub>s</sub> 6 (gD) を EGFR 標的化 gD (gD:d2-24/Y38C-scEGFR) の配列に組換えた。組換え操作後の BAC プラスミドは制限酵素 *EcoR* I、*Bgl* II、*Bst* B I を用いて目的の組換えが行われたことを確認した。

作製した BAC プラスミド pKB3G-gB:N/T-gDscEGFR を Vero 細胞に遺伝子導入し、ウイルスを産生し、回収した。回収したウイルスを 2 回の限界希釈により単離した。単離したウイルスを Vero/Cre 細胞に感染させ、BAC を除去し、KdB3G-gB:N/T-gDscEGFR (EGFR 標的化 oHSV) を樹立した。

#### ■ KdB3G-gB:N/T-gDscMY24 (以降、EpCAM 標的化 oHSV)

KOS 株に由来し、U<sub>L</sub> 3 と U<sub>L</sub> 4 の間にエントリーのレポーター遺伝子である EGFP が挿入されている。また U<sub>L</sub> 27 (gB) に細胞内侵入の効率を増強する点変異 (gB:D285N/A549T) が挿入されている。U<sub>s</sub> 6 (gD) の 2-24 番目のアミノ酸を欠失させ HVEM との結合を不能とさせた上で、欠失させた部位に抗 EpCAM 抗体である MY24 の単鎖抗体 (scEpCAM) を挿入した。また nectin-1 との結合を不能とするため 38 番目に点変異 (Y38C) が挿入した。以下のようにして作製した。pSBT-26 を鋳型として hu15/ hu4ANL により PCR を施行し、gD:d2-24/Y38C-scEpCAM を含む標的フラグメントを調製した。pKB3G-gB:N/T、pRed/ET が導入されたコンピテントセルにエレクトロポレーション法により標的フラグメントを導入し、U<sub>s</sub> 6 (gD) を EpCAM 標的化 gD (gD:d2-24/Y38C-scEpCAM) の配列に組換えた。組換え操作後の BAC プラスミドは制限酵素 *Hind* III、*Bst* B I、*Bam* H I、*Xho* I を用いて目的の組換えが行われたことを確認した。

構築した BAC プラスミド pKB3G-gB:N/T-gDscEpCAM を Vero/Cre-EpCAM 細胞に遺伝子導入した。産生された EpCAM 標的化 oHSV を 2 回の限界希釈を行うことにより単離し、KdB3G-gB:N/T-gDscEpCAM (EpCAM 標的化 oHSV) を樹立した。

#### < siRNA >

##### ■ Stealth RNAi Negative Control Duplexes (Low GC duplex : 12935-200)

Invirogen 社より購入した。

##### ■ TACSTD1HSS106226 (3\_RNAI) Invitrogen 社より購入した。

CCUACUGGAUCAUCAUUGAACUAAA

UUUAGUCAAUGAUGATCCAGUAGG

##### ■ TACSTD1HSS180961 (3\_RNAI) Invitrogen 社より購入した。

CCGUAAACUGCUUUGUGAAUAAUAA

UUAUUUUUACAAAAGCAGUUUACGG

## 4-2 : 実験操作

### < 一過性 gD 相補アッセイ >

Vero 細胞を  $5.0 \times 10^5$  cells/well で 6 穴プレートに播き込み、37 °C で培養した。播種した翌日、pHU66、pSP72、pHU174、pHU165、pSBT-21 を 3  $\mu$ g ずつ、Lipofectamine LTX & Plus Reagent (Life

Technologies) を用いて Vero 細胞へ遺伝子導入した。翌日に gD ノックアウト HSV を MOI 5 で Vero 細胞に感染させた。感染開始から 4 時間後、細胞外に存在する gD ノックアウト HSV を不活性化するため 0.1 M グリシン溶液[pH 3.0]を加え、3 分間室温でインキュベートした。DMEM (5% FBS 含) で 2 回洗浄し、新たに DMEM (5% FBS 含) を加え 37 °C で培養した。また同日に CHO-K1 細胞およびその垂株を  $1.0 \times 10^5$  cells/well で 48 穴プレートに播き込み、37 °C で培養した。感染開始から 24 時間後、感染させた細胞をセルスクレーパーにて剥がしチューブに回収した。細胞内のウイルスを回収するため、回収した細胞を超音波破碎した。超音波破碎した細胞を室温、3,000 rpm、15 分で遠心し、上清を回収し、ウイルス液を調製した。前日に播種した CHO-K1 およびその垂株に調製したウイルス液を 100  $\mu$ L/well で加え、37 °C、2 時間感染させた。2 時間後、F12K (10% FBS 含) を加え、37°C で培養した。感染開始から 24 時間後、細胞を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、EGFP を観察した。

### <EpCAM 標的化 oHSV の作製>

pRed/ET プラスミドを保持させた大腸菌 DH10B 細胞 (Invitrogen) に BAC プラスミド pKB3G-gB:N/T をエレクトロポレーション法により導入し、コンピテント細胞を調製した。調製したコンピテント細胞に pSBT-26 より hu15/ hu4ANL で増幅される N 末端に I-Sce I 切断部位とカナマイシン耐性遺伝子を持つ gD:d2-24/Y38C-scEpCAM のフラグメントをエレクトロポレーションにより導入した。その上で組換え促進タンパク質 Red/ET の発現を誘導し、pKB3G-gB:N/T-gDscEpCAM $\Delta$ flkan の組換えを行った。カナマイシン抵抗形質を獲得した大腸菌から BAC プラスミドを回収し、制限酵素処理により意図した組換えが生じていることを確認した。組換えが正しく行われたコロニーから再びコンピテント細胞を調製し、大腸菌内に保持させておいた pRed/ET と pBAD-I-Sce I の遺伝子発現を誘導し、カナマイシン耐性遺伝子を除去する組換えを生じさせ、pKB3G-gB:N/T-gDscEpCAM を作製した。

組換えウイルスの作製と loxP に挟まれた BAC 配列を除去するために BAC プラスミド pKB3G-gB:N/T-gDscEpCAM を Vero/Cre-EpCAM に Lipofectamine LTX & Plus Reagent (Life Technologies) を用いて遺伝子導入した。37 °C で 72 時間培養し、細胞上清 (ウイルス液) を回収した。得られたウイルス (KdB3G-gB:N/T-gDscEpCAM) を Vero/Cre-EpCAM 細胞で 2 回の限界希釈を行い単離し、EpCAM 標的化 oHSV を樹立した。

*in vitro* の実験に用いたウイルス液は次のように調製した。5 枚の 10 cm dish (Thermo) に培養した Vero/EpCAM 細胞に KdB3G-gB:N/T-gDscEpCAM を MOI 0.03/mL で感染させた。37 °C で 2 時間感染させた後に DMEM (5% FBS 含) を加え 96 時間培養した。細胞上清を回収し 3,000 rpm、15 分遠心し細胞を沈殿させた。上澄みのみを回収し、ウイルス液を調製した。対照である非標的化 gD を持つ KdB3G-gB:N/T、EGFR 標的化 gD を持つ KdB3G-gB:N/T-gDscEGFR は同時に Vero/EpCAM に MOI 0.03/mL で感染させ、72 時間後に回収し、同様の手順でウイルス液を調製した。

*in vivo* の実験に用いたウイルス液は次のように調製した。10 枚の 175 cm<sup>2</sup> のフラスコに培養した Vero/EpCAM 細胞に KdB3G-gB:N/T-gDscEpCAM を MOI 0.03/10 mL で感染させた。37 °C で 2

時間感染させた後に DMEM (5 % FBS 含) を 10 mL 加え 120 時間培養した。細胞表面に結合しているウイルスを培養上清中に放出させるため 5 M NaCl を終濃度 0.5 M となるようフラスコに加え、室温で 45 分間インキュベートした。50 mL チューブに培養上清を回収し、室温、15 分、3,000 rpm で遠心した。上清を 0.8  $\mu\text{m}$  孔径のフィルター (日本ジェネティクス社) に通し、ウイルス液に混在する細胞成分を除去した。ウイルス液を 4  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分、15,000 rpm で遠心し、ウイルス粒子を沈殿させた。上清を除去し PBS により再懸濁し、1 本のチューブにまとめた。4  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分、15,000 rpm で再度遠心し、上清を除去することにより洗浄した。洗浄後、1 mL の PBS に懸濁した。

### <エントリーアッセイ>

48 穴プレートに CHO-K1 細胞とその亜株、B78H1 細胞とその亜株、がん細胞を単層となるように播き込み、37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。細胞を播き込んだ翌日に非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を MOI 3/100  $\mu\text{L}$  となるように調整した。その後、細胞の培養液を取り除きウイルス液を 100  $\mu\text{L}$ /well で細胞に加えた。15 分毎にプレートをスワールし 37  $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間感染させた。感染から 2 時間後にそれぞれの培養に適した培地を 150  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。感染から 16 時間後、4 % パラホルムアルデヒド溶液により固定し、EGFP の蛍光を指標として細胞内侵入の有無を OLYMPUS IX70 倒立型研究用顕微鏡 (OLYMPUS) または倒立型位相差顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) により観察した。

### <エントリー阻害アッセイ>

48 穴プレートに Vero/EpCAM 細胞あるいは BxPC-3 細胞を単層になるように播き込み、37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。細胞を播き込んだ翌日に非標的化 HSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を MOI 3/50  $\mu\text{L}$  (Vero/EpCAM) あるいは MOI 5/50  $\mu\text{L}$  (BxPC-3) となるように調整した。抗体は Elution Buffer (IgG elution buffer : 1M Tris-HCl [pH 9.0]=10:1) を用いて 0、2、20、200  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{L}$  となるように希釈系列を作成した。その後、DMEM (無血清) を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加え、混合することにより 0、1、10、100  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{L}$  を調整した。調整後、細胞の培養液を取り除き、PBS 300  $\mu\text{L}$  により細胞を洗った。細胞を洗浄後、抗体希釈液を 100  $\mu\text{L}$ /well でそれぞれ加え、室温で 1 時間、抗原と抗体を反応させた。細胞全体の抗原に抗体を反応させるため 15 分毎にプレートをゆすった。抗体を加えてから 1 時間後、抗体溶液にウイルス液を 50  $\mu\text{L}$ /well で細胞に加えた。15 分毎にプレートをゆすり 37  $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間感染させた。感染から 2 時間後にウイルス・抗体溶液を取り除き、0.1M グリシン溶液 [pH 3.0] により酸性処理を行い、細胞外のウイルスを不活性化した。それぞれの培養に適した培地 300  $\mu\text{L}$  で 2 回洗浄後、培地 250  $\mu\text{L}$  を加え、37  $^{\circ}\text{C}$ 、6 時間、培養した。感染から 8 時間後、4 % パラホルムアルデヒドにより固定し、EGFP を指標として細胞内侵入の有無を OLYMPUS IX70 倒立型研究用顕微鏡 (OLYMPUS) あるいは倒立型位相差顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) により観察した。

### <動物培養細胞への siRNA の導入>

20  $\mu\text{M}$  の siRNA と Lipofectamine RNAiMAX Transfection reagent (Invitrogen 社) を Opti-MEM I (Life Technologies) に混合した。BxPC-3 細胞を  $5.0 \times 10^6$  cells で 10 cm dish に播種し、播種と同時に siRNA と遺伝子導入試薬の混合液を終濃度 20 nM となるように加えた。

### <フローサイトメトリー解析>

一次抗体\*<sup>2</sup> は PBS を用いて 2  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  in PBS となるように調製し、FACS チューブに 100  $\mu\text{L}/$  チューブで加えた (FACS チューブは氷上で保持した)。細胞を  $2.0 \times 10^5$  cells/サンプルとなるように回収し、室温、1,300 rpm、3 分遠心した。上清を取り除き、PBS 10 mL で洗った。室温、1,300 rpm、3 分遠心した。この操作を 2 回繰り返した。その後、1 サンプル当たり 100  $\mu\text{L}$  となるように PBS により懸濁し、抗体が分注された FACS チューブに 100  $\mu\text{L}/\text{tube}$  で分注した。15 分毎に FACS チューブを懸濁し、4  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分、抗原と抗体を反応させた。その後、4  $^{\circ}\text{C}$ 、1,500 rpm、5 分遠心し、細胞を沈殿させた。上清を取り除き、PBS 2 mL で抗原に結合していない抗体を洗い、4  $^{\circ}\text{C}$ 、1,500 rpm、5 分遠心した。この操作を 2 回繰り返した。PBS を用いて Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Life Technology 社, A-11001) を 2  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  で調製し、100  $\mu\text{L}/$  チューブとなるように加え、一次抗体を蛍光標識した。15 分毎に FACS チューブを懸濁し、4  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分、抗体を反応させた。その後、4  $^{\circ}\text{C}$ 、1,500 rpm、5 分遠心し、細胞を沈殿させた。上清を取り除き、PBS 2 mL で一次抗体に結合しなかった抗体を洗い、4  $^{\circ}\text{C}$ 、1,500 rpm、5 分遠心した。この操作を 2 回繰り返した。作製したサンプルは FACS Calibur (日本 BD) を用いて細胞膜表面の抗原の発現を解析した。

\*<sup>2</sup>一次抗体は以下の抗体を用いた。

■ LEAF Purified Mouse IgG1, kisotype control antibody (MG1-45 : 401405)

Biolegend 社より購入した

■ LEAF Purified mouse IgG2a, kisotype control antibody (MOPC-173 : 400224)

Biolegend 社より購入した

■ mouse anti-HVEM monoclonal antibody (CW10 : sc21718)

Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。

■ mouse anti-nectin1 monoclonal antibody (R1.302.12 : sc69718)

Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。

■ mouse anti-EGFR monoclonal antibody (528 : sc120)

Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。

■ mouse anti-EpCAM monoclonal antibody (MY24)

抗 EpCAM 抗体産生ハイブリドーマ株 MY24 (Yamaguchi et al., 2014) より抗体を産生させて回収し、精製した。

### <Infectious center アッセイ>

48 穴プレートに Vero/EpCAM 細胞 (以降、ドナー細胞) と B78H1 細胞およびその亜株 (以降、アクセプター細胞) を単層になるように播き込み、37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。細胞を播き込んだ翌日に

ドナー細胞の培地を取り除き、非標的化 HSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を MOI 5/100  $\mu\text{L}$  と なるように調製し、ウイルス液を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  でドナー細胞に感染させた。15 分毎にプレート をゆすり、37  $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間感染させた。感染から 2 時間後、ウイルス液を取り除き、細胞外のウイ ルスを不活性化するため 0.1 M グリシン溶液[pH 3.0]により酸性処理を行った。酸性処理後、 DMEM (5% FBS 含) で 2 回洗浄後、DMEM (5% FBS 含) 250  $\mu\text{L}$  を加え、37  $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間、培 養した。1 時間後 (感染から 3 時間後)、ドナー細胞をトリプシンにより剥がし、セルカウント した。アクセプター細胞の培地を取り除き、アクセプター細胞の上にドナー細胞を 30、100、300 cells/300  $\mu\text{L}$  で重層し、37  $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間培養した。1 時間後 (感染から 4 時間後)、1% メチルセル ロース (8% FBS 含む DMEM) を重層した。感染から 48 時間後、4% パラホルムアルデヒドに より固定した。EGFP の発現を指標とし、プラークの有無を OLYMPUS IX70 倒立型研究用顕微 鏡 (OLYMPUS) により観察した。

BxPC-3 細胞と siRNA を導入した細胞については、ドナー細胞は 48 穴プレート、アクセプタ ー細胞は 6 穴プレートに単層になるように播き込み、37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。培地は RPMI1640 (10% FBS 含)、1% メチルセルロース (8% FBS 含む RPMI1640) を用いた。それ以外は上記と同様に 操作した。感染から 72 時間後、4% パラホルムアルデヒドにより固定した。EGFP の発現を指 標とし、倒立型位相差顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) を用いてプラークを撮影した。プラーク面 積を Image J により計測 (n=15) し (Schneider et al., 2012)、コントロール siRNA を導入した細胞 のプラーク面積と比較した。

### <プラーク形成アッセイ>

48 穴プレートあるいは 6 穴プレートにがん細胞を単層になるように播き込み、37  $^{\circ}\text{C}$  で培養し た。細胞を播き込んだ翌日に非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を 30、300 pfu/100  $\mu\text{L}$  あるいは 30、300 pfu/1 mL となるようにそれぞれ調製した。その後、細胞 の培養液を取り除き、48 穴プレートには 100  $\mu\text{L}$  で調製したウイルス液を、6 穴プレートには 1 mL で調製したウイルス液を細胞に加えた。15 分毎にプレートをスワールし 37  $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間感染させ た。感染から 2 時間後に 1% メチルセルロース (8% FBS 含む DMEM または RPMI1640) を重 層した。感染から 96 時間後、4% パラホルムアルデヒドにより固定した。EGFP の発現を指標 にプラークを OLYMPUS IX70 倒立型研究用顕微鏡 (OLYMPUS) により撮影し、プラークのサイ ズを Image J を用いて測定した (n=15)。2 群間の検定は HepG2 については student t-test、HuCCT1、SK-OV-3 については Welch の T 検定を用いた。

### <殺細胞アッセイ>

96 穴プレートにがん細胞を  $2.5 \times 10^4$  cells/well となるように播き込み、37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。翌日 に非標的化 HSV、EGFR 標的化 oHSV あるいは EpCAM 標的化 oHSV を MOI 0.0003、0.003、 0.03、0.3、3 で加え、37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。感染から 4 日後に MTT アッセイにより生細胞の吸光度 を計測した (Mosmann., 1983)。ウイルス液を取り除き、PBS に溶解した 0.5 mg/mL の MTT 試薬 を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  で加え、37  $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間静置した。1 時間後、MTT 試薬を取り除き 100  $\mu\text{L}$  の 100%

エタノールを加え、生細胞によって還元されたホルマザンを可溶化した。その後、マイクロプレートリーダー SH-9000 Lab 型 (コロナ電気) により吸光度 570 nm、630 nm を測定した。生細胞の吸光度は  $OD_{570} - OD_{630}$  により求め、6 ウェルの平均値 (陰性対照のみ  $n=18$ ) を算出した。生細胞率を (ウイルスを加えたウェルの平均値) / (ウイルスを加えていないウェルの平均値)  $\times 100$  により算出し、グラフ化した。

### <SW620 異種移植マウスの治療効果>

ヌードマウスの右大腿部に 26G の針と 1 mL のシリンジを用いて SW620 を  $1.0 \times 10^7$  cells in PBS/100  $\mu$ L/箇所 で移植した。腫瘍体積は  $0.5 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$  により求めた (Tomayko et al., 1989)。腫瘍体積が 160  $\sim$  200  $\text{mm}^3$  に達した段階でヌードマウスを PBS 投与群、EpCAM 標的化 oHSV 投与群にグループ分けした。グループ分け後、26G の針と 1 mL のシリンジを用いてペントバルビタールを 7.5 mg/kg となるようにマウスの腹腔に投与し、麻酔をかけた。29G の針付きシリンジを用いて PBS 投与群は PBS を 50  $\mu$ L、EpCAM 標的化 oHSV 投与群は  $1.0 \times 10^8$  pfu in PBS/50  $\mu$ L を腫瘍内に投与した。腫瘍内に投与した日を 0 日とした。腫瘍体積は  $0.5 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$  により求めた。また 2 群間の検定は analysis of variant 解析を行い、P 値が 0.05 以下で有意差があるものとした。

### <統計解析>

*In vitro* の 2 群間の比較には Student t-test あるいは Welch の T 検定を行った。P 値が 0.05 以下で有意差ありとした。*In vivo* の 2 群間の比較には Analysis of variance 解析を行い、P 値が 0.05 以下で有意差ありとした。



## 第5章 参考文献

- Armstrong A, Eck SL. EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther* 2003; **2**: 320-6.
- Babic N, Mettenleiter TC, Flamand A, Ugolini G. Role of essential glycoproteins gII and gp50 in transneuronal transfer of pseudorabies virus from the hypoglossal nerves of mice. *J Virol* 1993; **67**: 4421-6.
- Cai WH, Gu B, Person S. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J Virol* 1988; **62**: 2596-604.
- Carfi A, Willis SH, Whitbeck JC, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ *et al.* Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA. *Mol Cell* 2001; **8**: 169-79.
- Chaudry MA, Sales K, Ruf P, Lindhofer H, Winslet MC. EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges. *Br J Cancer* 2007; **96**: 1013-9.
- Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 1990; **250**: 1262-6.
- Desai PJ, Schaffer PA, Minson AC. Excretion of non-infectious virus particles lacking glycoprotein H by a temperature-sensitive mutant of herpes simplex virus type 1: evidence that gH is essential for virion infectivity. *J Gen Virol* 1988; **69**: 1147-56.
- Fusco D, Forghieri C, Campadelli-Fiume G. The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 9323-8.
- Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 1998; **280**: 1618-20.
- Gires O, Klein CA, Baeuerle PA. On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 143; author reply 143.
- Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV *et al.* The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer* 2010; **127**: 2209-21.

Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 1438-42.

Huang YY, Yu Z, Lin SF, Li S, Fong Y, Wong RJ. Nectin-1 is a marker of thyroid cancer sensitivity to herpes oncolytic therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**: 1965-70.

Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, Graham NJ, Groves N, Guest PJ *et al*. A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 6737-47.

Hutchinson L, Browne H, Wargent V, Davis-Poynter N, Primorac S, Goldsmith K *et al*. A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J Virol* 1992; **66**: 2240-50.

Johnson DC, Huber MT. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* 2002; **76**: 1-8.

Kemeny N, Brown K, Covey A, Kim T, Bhargava A, Brody L *et al*. Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther* 2006; **17**: 1214-24.

Krummenacher C, Supekar VM, Whitbeck JC, Lazear E, Connolly SA, Eisenberg RJ *et al*. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *EMBO J* 2005; **24**: 4144-53.

Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 559-67.

Ligas MW, Johnson DC. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol* 1988; **62**: 1486-94.

Liljefors M, Nilsson B, Fagerberg J, Ragnhammar P, Mellstedt H, Frodin JE. Clinical effects of a chimeric anti-EpCAM monoclonal antibody in combination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2005; **26**: 1581-9.

MacLean AR, ul-Fareed M, Robertson L, Harland J, Brown SM. Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. *J Gen Virol* 1991; **72**: 631-9.

Marme A, Strauss G, Bastert G, Grischke EM, Moldenhauer G. Intraperitoneal bispecific antibody (HEA125xOKT3) therapy inhibits malignant ascites production in advanced ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2002; **101**: 183-9.

Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD *et al.* Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 2000; **7**: 867-74.

Mazzacurati L, Marzulli M, Reinhart B, Miyagawa Y, Uchida H, Goins WF *et al.* Use of miRNA response sequences to block off-target replication and increase the safety of an unattenuated, glioblastoma-targeted oncolytic HSV. *Mol Ther* 2015; **23**: 99-107.

Menotti L, Cerretani A, Hengel H, Campadelli-Fiume G. Construction of a fully retargeted herpes simplex virus 1 recombinant capable of entering cells solely via human epidermal growth factor receptor 2. *J Virol* 2008; **82**: 10153-61.

Menotti L, Nicoletti G, Gatta V, Croci S, Landuzzi L, De Giovanni C *et al.* Inhibition of human tumor growth in mice by an oncolytic herpes simplex virus designed to target solely HER-2-positive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 9039-44.

Miest TS, Cattaneo R. New viruses for cancer therapy: meeting clinical need. *Nat Rev Microbiol* 2014; **12**: 23-24.

Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL. Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1995; **1**: 938-43.

Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 1996; **87**: 427-36.

Nakamura T, Peng KW, Vongpunsawad S, Harvey M, Mizuguchi H, Hayakawa T *et al.* Antibody-targeted cell fusion. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 331-6.

Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 2012; **38**: 68-75.

Peeters B, de Wind N, Hooisma M, Wagenaar F, Gielkens A, Moormann R. Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *J Virol* 1992; **66**: 894-905.

Peeters B, Pol J, Gielkens A, Moormann R. Envelope glycoprotein gp50 of pseudorabies virus is essential for virus entry but is not required for viral spread in mice. *J Virol* 1993; **67**: 170-7.

Rauch DA, Rodriguez N, Roller RJ. Mutations in herpes simplex virus glycoprotein D distinguish entry of free virus from cell-cell spread. *J Virol* 2000; **74**: 11437-46.

Rauh I, Mettenleiter TC. Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration. *J Virol* 1991; **65**: 5348-56.

Riethmuller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegeler W, Raab R, Hoffken K *et al.* Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 1788-94.

Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012; **30**: 658-70.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**: 671-5.

Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD *et al.* A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 1999; **99**: 13-22.

Shukla D, Spear PG. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest* 2001; **108**: 503-10.

Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 2006; **40**: 191-7.

Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, Johnson PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 6396-401.

Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **24**: 148-54.

Tsvitov M, Frampton AR Jr., Shah WA, Wendell SK, Ozuer A, Kapacee Z, Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC. 2007. Characterization of soluble glycoprotein D-mediated herpes simplex virus type 1 infection. *Virology* 360:477-491

Uchida H, Shah WA, Ozuer A, Frampton AR, Jr., Goins WF, Grandi P *et al.* Generation of herpesvirus entry mediator (HVEM)-restricted herpes simplex virus type 1 mutant viruses: resistance of HVEM-expressing cells and identification of mutations that rescue nectin-1 recognition. *J Virol* 2009; **83**: 2951-61.

Uchida H, Chan J, Goins WF, Grandi P, Kumagai I, Cohen JB *et al.* A double mutation in glycoprotein gB compensates for ineffective gD-dependent initiation of herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 2010; **84**: 12200-9.

Uchida H, Marzulli M, Nakano K, Goins WF, Chan J, Hong CS *et al.* Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus. *Mol Ther* 2013; **21**: 561-9.

Uchida H, Chan J, Shrivastava I, Reinhart B, Grandi P, Glorioso JC *et al.* Novel mutations in gB and gH circumvent the requirement for known gD Receptors in herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread. *J Virol* 2013; **87**: 1430-42.

Wang Z, Raifu M, Howard M, Smith L, Hansen D, Goldsby R *et al.* Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods* 2000; **233**: 167-77.

Weiner LM, Moldofsky PJ, Gatenby RA, O'Dwyer J, O'Brien J, Litwin S *et al.* Antibody delivery and effector cell activation in a phase II trial of recombinant gamma-interferon and the murine monoclonal antibody CO17-1A in advanced colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1988; **48**: 2568-73.

Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 2003; **163**: 2139-48.

Yamaguchi M, Nishii Y, Nakamura K, Aoki H, Hirai S, Uchida H *et al.* Development of a sensitive screening method for selecting monoclonal antibodies to be internalized by cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; **454**: 600-603.

Yu Z, Adusumilli PS, Eisenberg DP, Darr E, Ghossein RA, Li S *et al.* Nectin-1 expression by squamous cell carcinoma is a predictor of herpes oncolytic sensitivity. *Mol Ther* 2007; **15**: 103-13.

Zhou G, Roizman B. Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely via the IL-13alpha2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 5508-13.

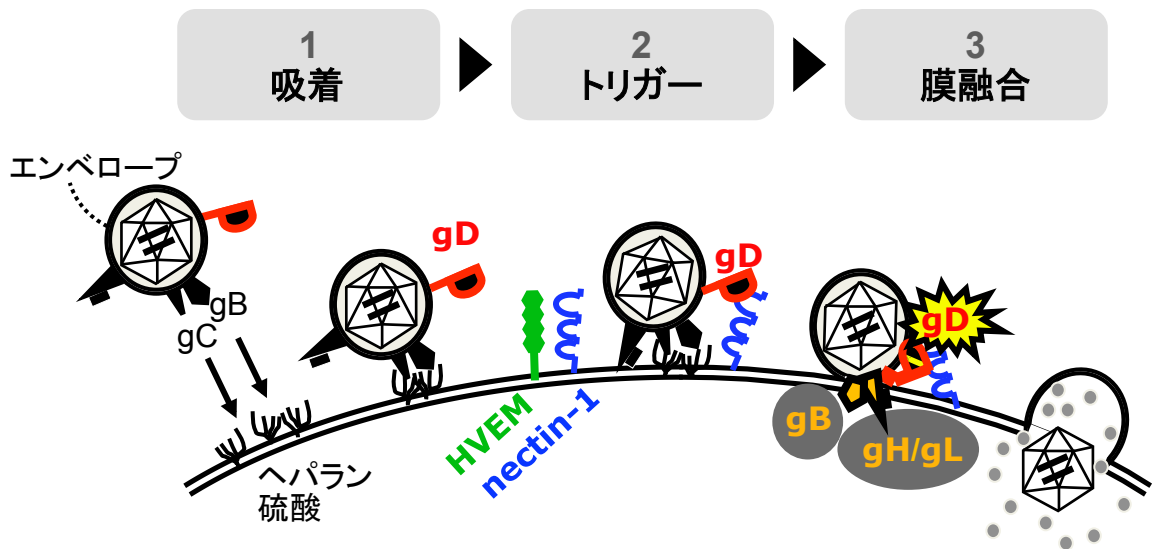
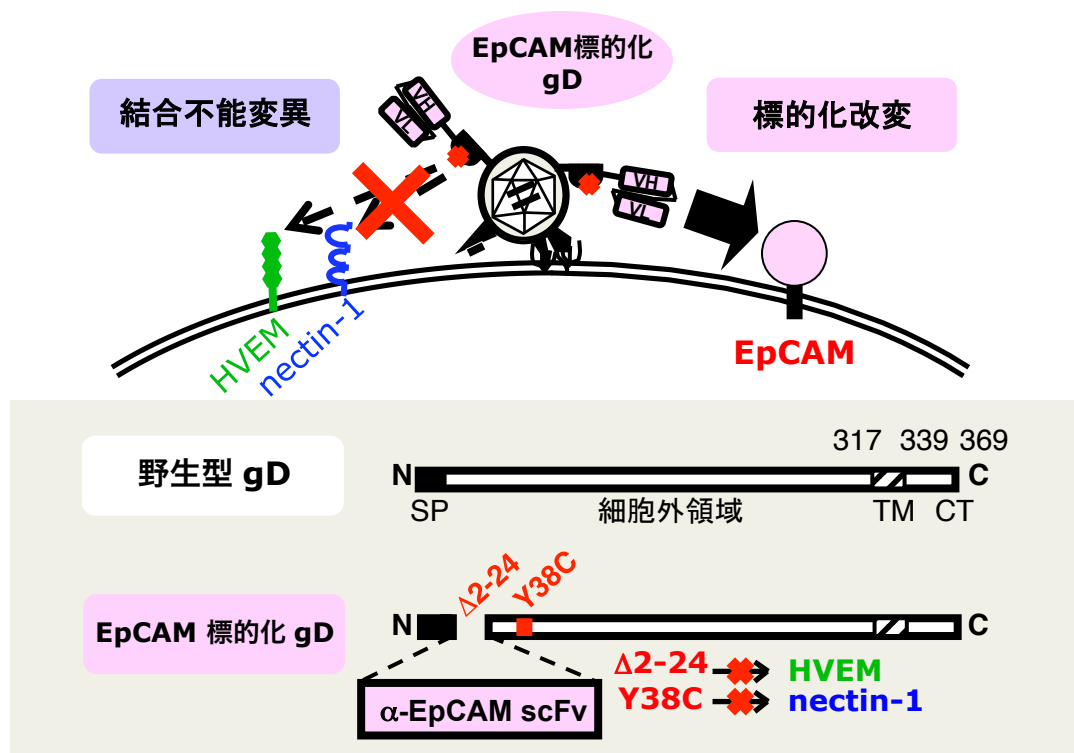


図1 HSV-1の細胞内侵入の機序

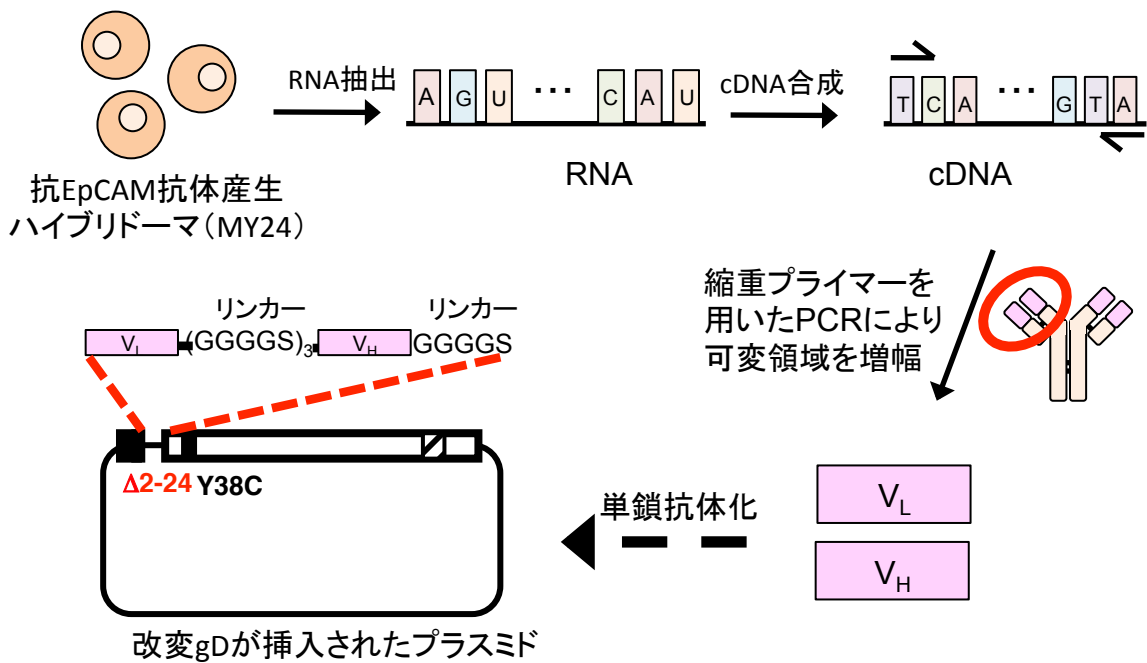
gCおよびgBが細胞膜表面のヘパラン硫酸に吸着する。gDがその受容体であるHVEMあるいはnectin-1に結合することにより構造変化を起こし活性化される。活性化されたgDはその下流で膜融合を実行するgH/gLおよびgBを活性化する。その結果、ウイルスエンベロープと細胞膜が融合し、カプシドが細胞内に侵入する



## 図2 本研究の目的

内田らはgDの2-24番目のアミノ酸の欠失と38番目のアミノ酸の変異により、gD受容体との結合を不能とした。その上で欠失部位に標的抗原に対する単鎖抗体 (scFv) を挿入することにより標的分子特異的に細胞内侵入できる受容体標的化oHSVの作製に成功した。そこで本研究ではepithelial cell adhesion molecule (EpCAM) を標的するEpCAM標的化oHSVを作製し、標的的特異性と抗腫瘍効果を検討することを目的とした。SP: signal peptide (シグナル配列)、TM: transmembrane domain (膜貫通領域)、CT: cytosolic tail (細胞内領域)





### 図3 単鎖抗体の構築と標的化改変gDの作製

抗EpCAM抗体産生ハイブリドーマMY24からRNAを抽出し、抗体遺伝子の軽鎖と重鎖の可変領域 (V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>) をクローニングした。V<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>をリンカーで接続し単鎖抗体 (scFv) を作製した。scFvを改変gDプラットフォームに挿入し、EpCAM標的化gDを構築した

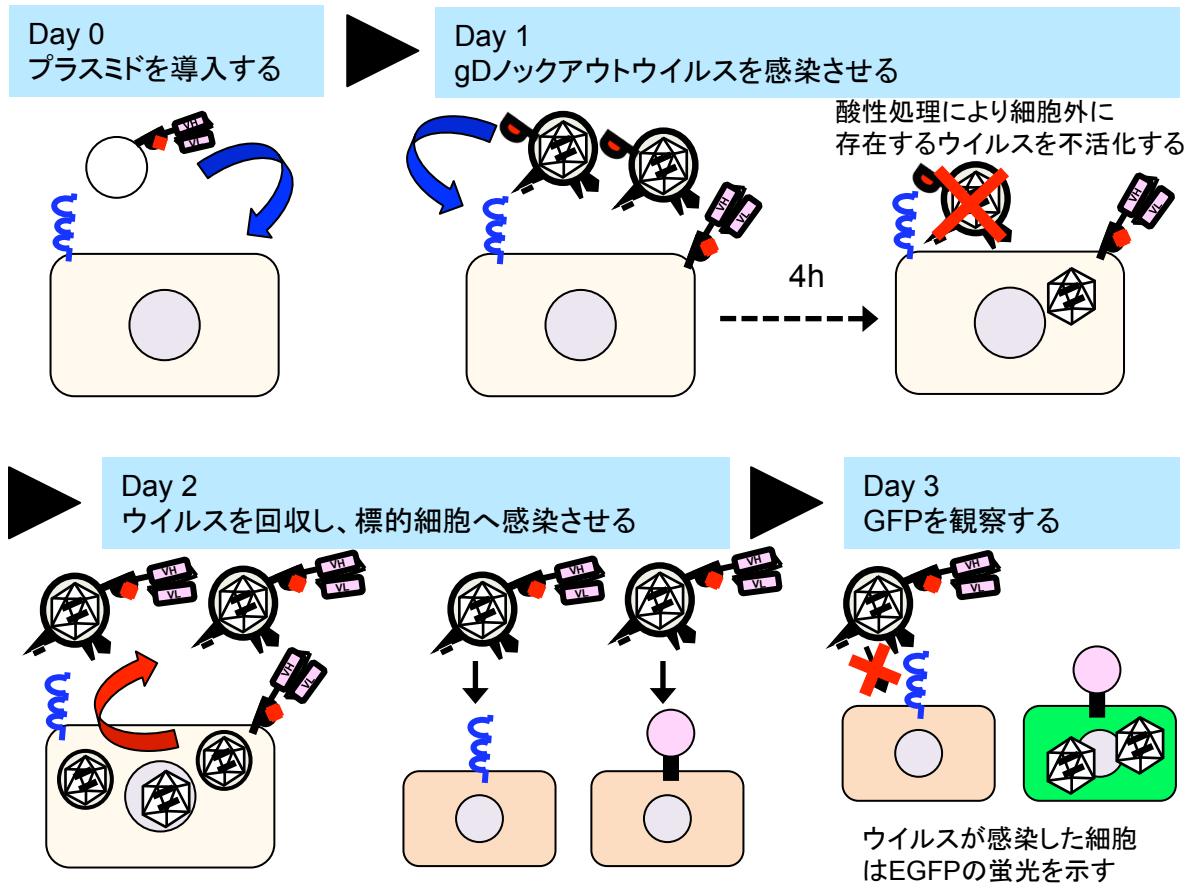
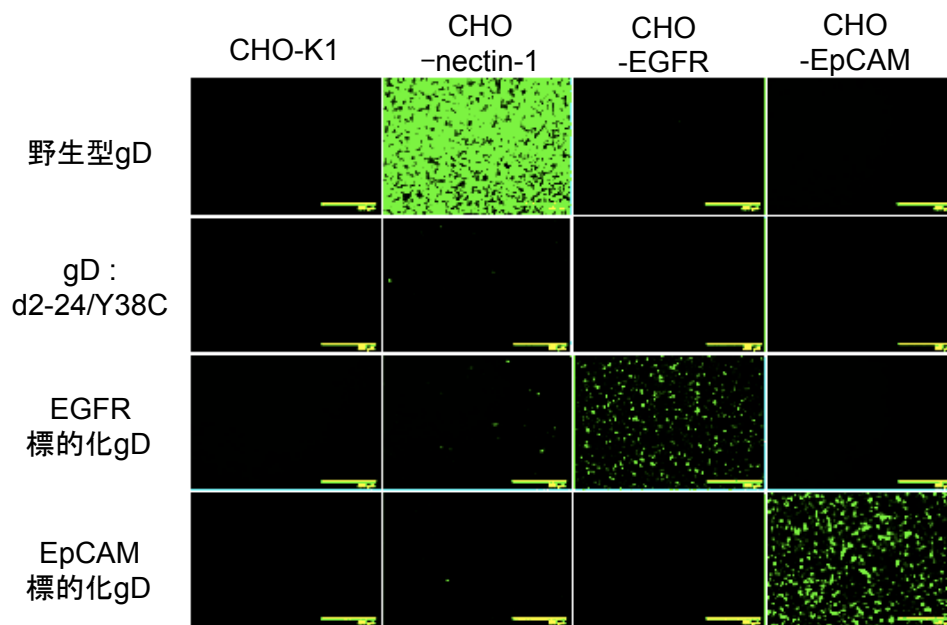
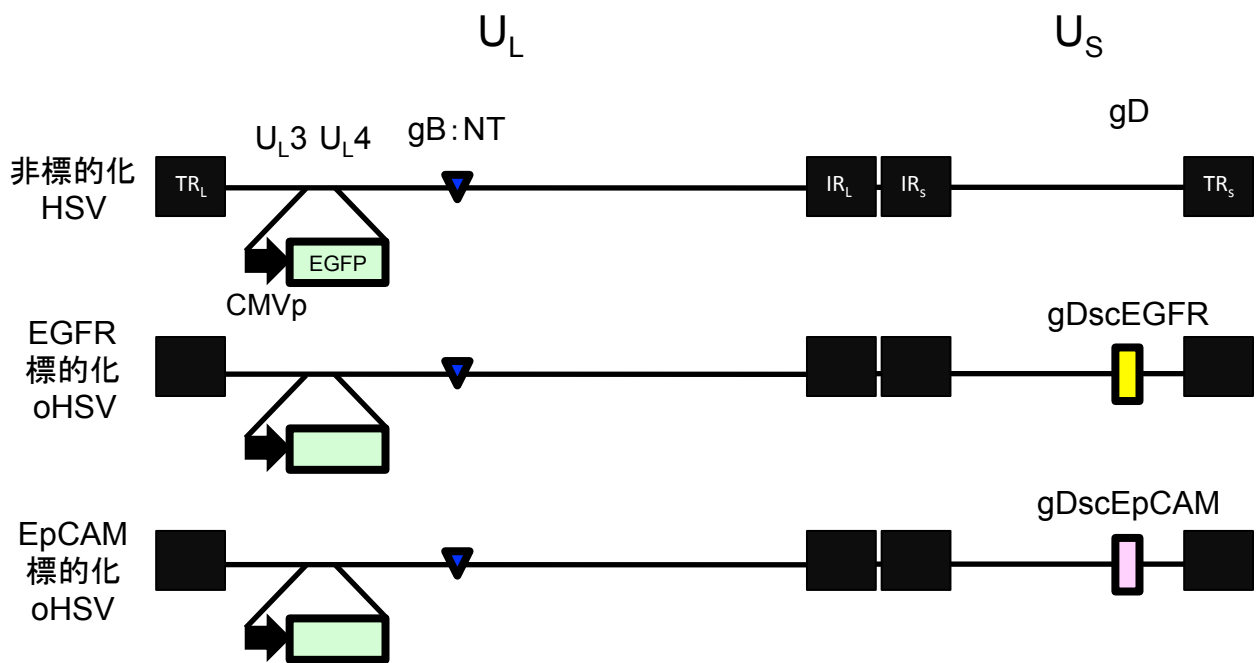


図4 標的化改変gDの評価方法（一過性相補アッセイ）の概略図

EpCAM標的化gDをVero細胞にトランスフェクションした。翌日に一過的に野生型gDを表出したgDノックアウトHSVを感染させた。感染から4時間後に酸性処理（0.1M glycine buffer [pH3.0]）し、細胞外のウイルスを不活化した。放出されるウイルス（トランスフェクションしたgDを一過的に持つ）を回収し、標的抗原を強制発現させた細胞、標的抗原を発現しない細胞に感染させた。翌日、EGFPの発現を指標に標的化gDによるHSVの細胞内侵入の成立を評価した

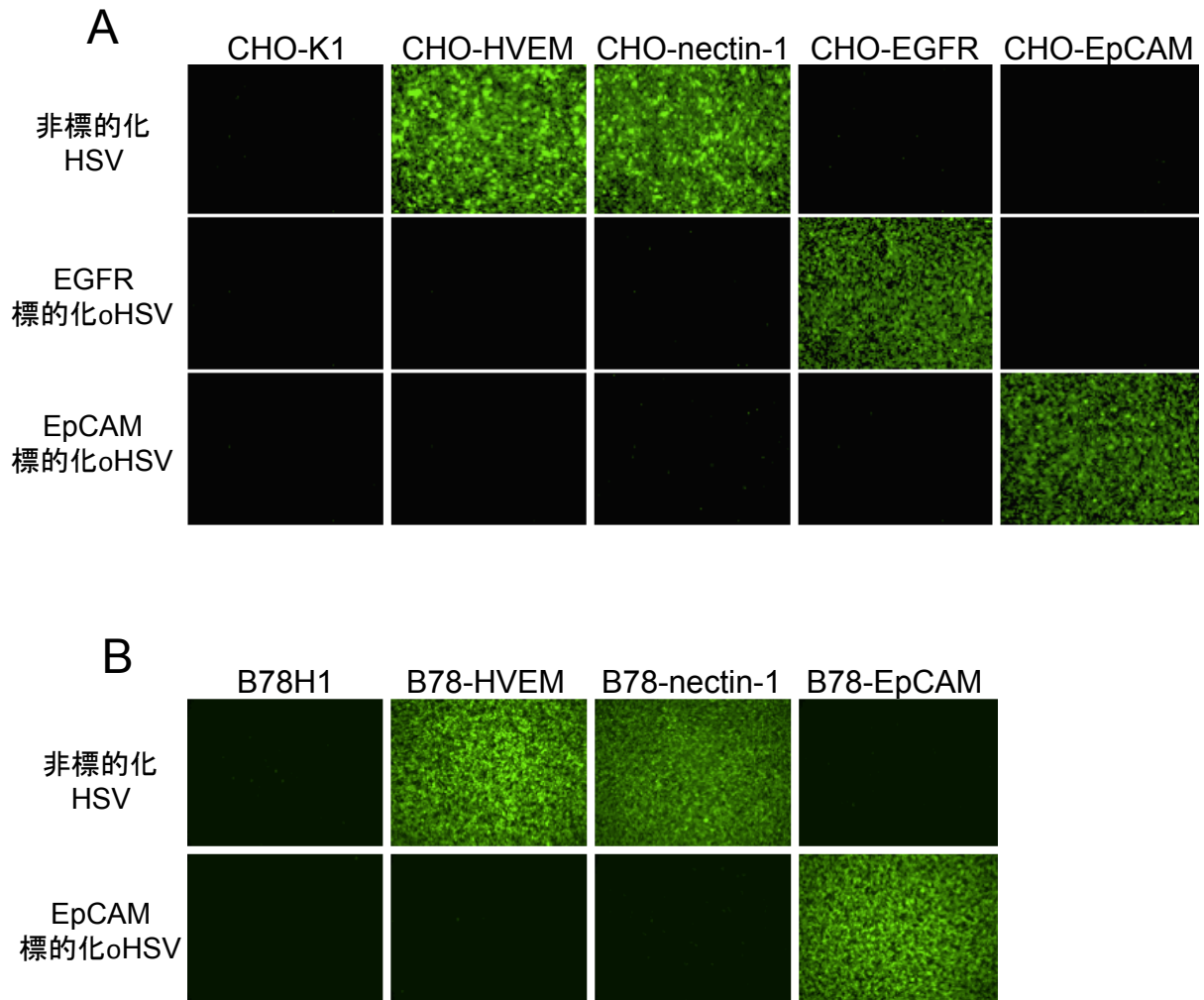


**図5 EpCAM標的化gDはEpCAM特異的な細胞内侵入を成立させた**  
 48穴プレートに播種したCHO-K1細胞とその亜株に、一過性にgDを表出させたHSVを感染させた。感染から24時間後に4%パラホルムアルデヒドにより固定し、蛍光顕微鏡によりEGFPの発現を観察した。バー：500 $\mu$ mを示す



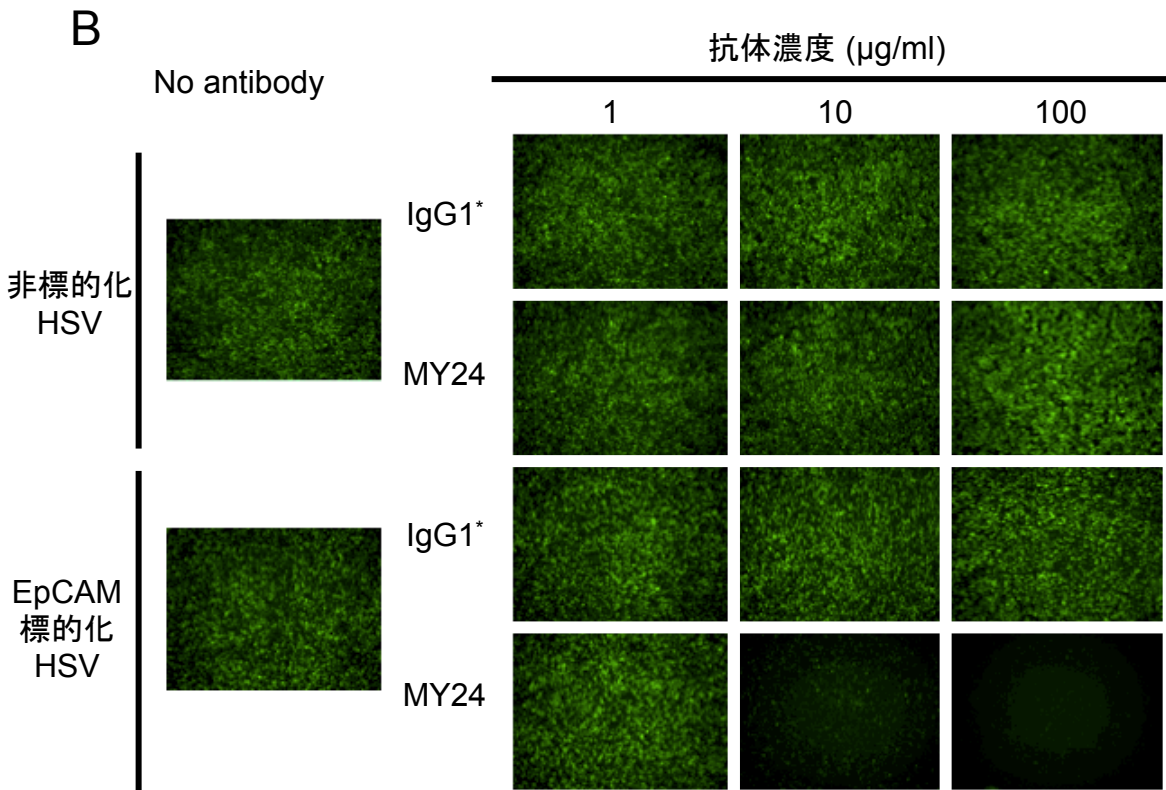
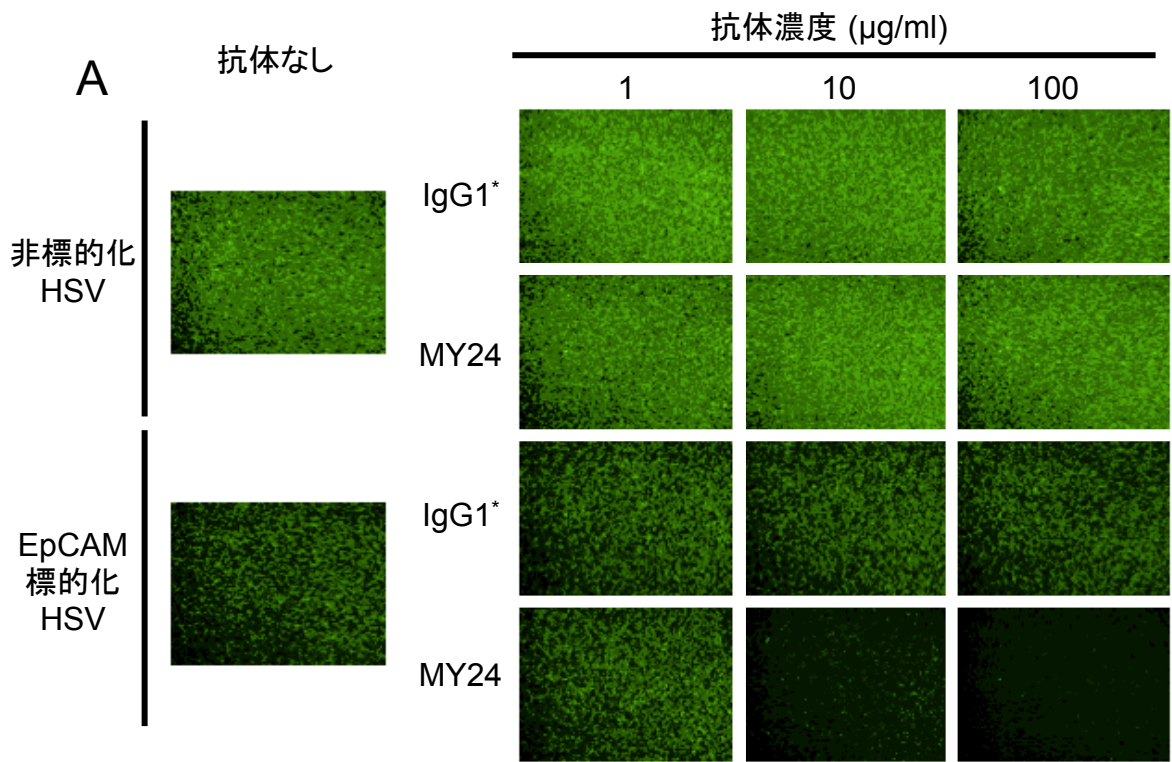
**図6 組換えHSVのゲノム構造**

本研究で使用した組換えHSVのゲノム構造を図示した。U<sub>L</sub>: long unique sequences、U<sub>S</sub>: short unique sequences (ユニーク配列)、TR<sub>L</sub>: terminal repeat long、IR<sub>L</sub>: internal repeat short、IR<sub>S</sub>: internal repeat short、TR<sub>S</sub>: terminal repeat short (末端部反復配列)、CMVp: ヒトサイトメガロウイルスの前初期遺伝子プロモーター、EGFP: 緑色蛍光タンパク質、gDscEGFR: 抗EGFR単鎖抗体を挿入した標的化改変gD、gDscEpCAM: 抗EpCAM単鎖抗体を挿入した標的化改変gD、gB:N/T: HSVの細胞内侵入を促進する変異 (gB:D285N/A549T)



**図7 EpCAM標的化oHSVの細胞内侵入はEpCAM特異的であった**

48穴プレートに播種したA) CHO-K1細胞とその亜株あるいはB) B78H1とその亜株に非標的化HSV、EGFR標的化oHSVあるいはEpCAM標的化oHSVをMOI 3で感染させた。感染から16時間後に4%パラホルムアルデヒドにより固定し、OLYMPUS IX70あるいは倒立型蛍光位相差顕微鏡BZ-X700によりEGFPの発現を観察した



### 図8 EpCAM標的化oHSVの細胞内侵入は抗EpCAM抗体により阻害された

48穴プレートに播種したA) Vero/EpCAM細胞、B) BxPC-3細胞に抗体 (IgG1 陰性対照抗体あるいはMY24) を加え、1時間室温で静置した。その後、非標的化HSVあるいはEpCAM標的化HSVを抗体存在下でMOI 3 (Vero/EpCAM) あるいはMOI 5 (BxPC-3) で感染させた。感染から2時間後に抗体とウイルスを取り除き、さらに細胞外に存在するウイルスを不活化するため酸性処理を行った。感染から8時間後に4%パラホルムアルデヒドにより固定し、OLYMPUS IX70あるいは倒立型蛍光位相差顕微鏡BZ-X700によりEGFPの発現を観察した。\*: アイソタイプコントロール

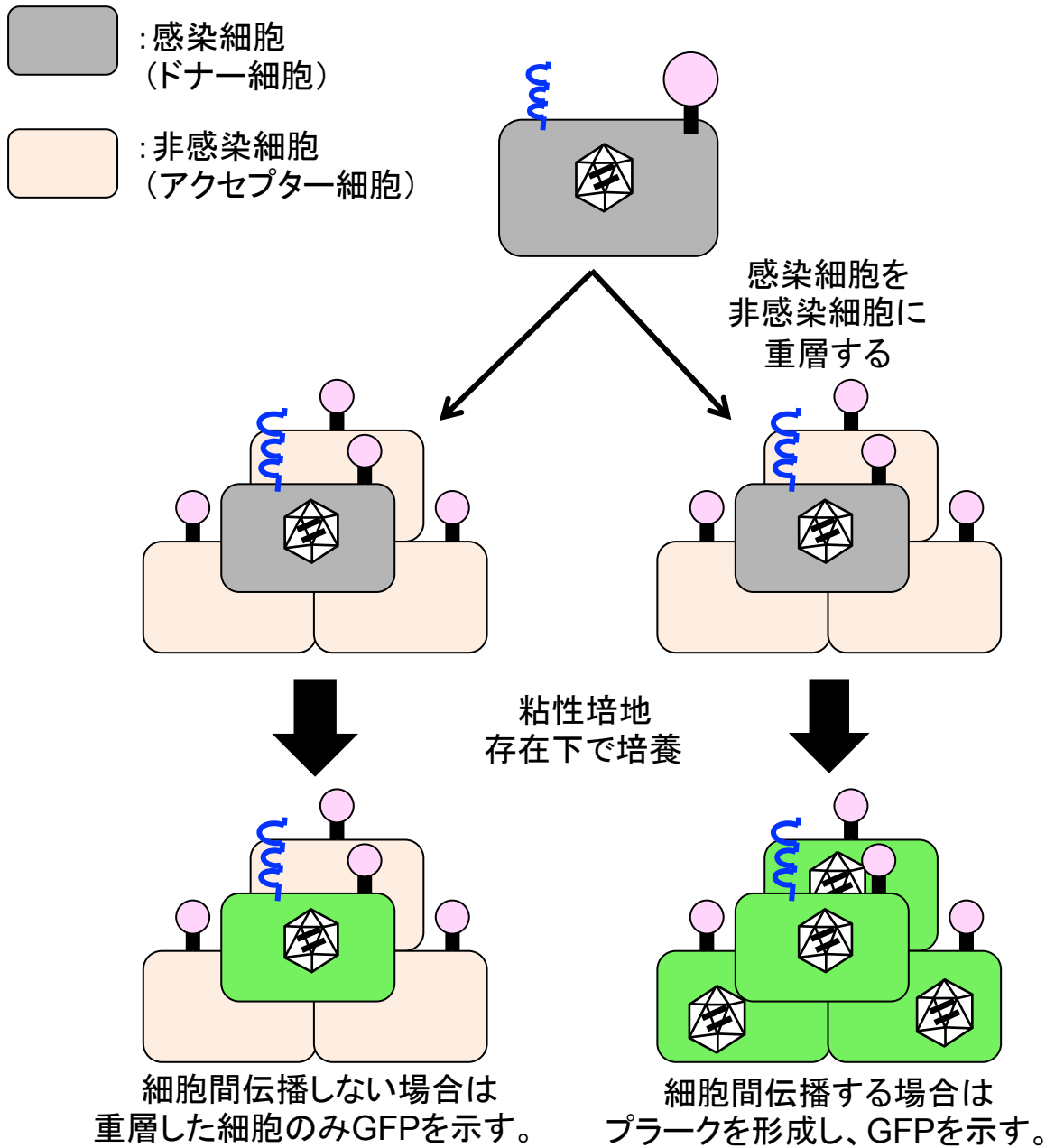
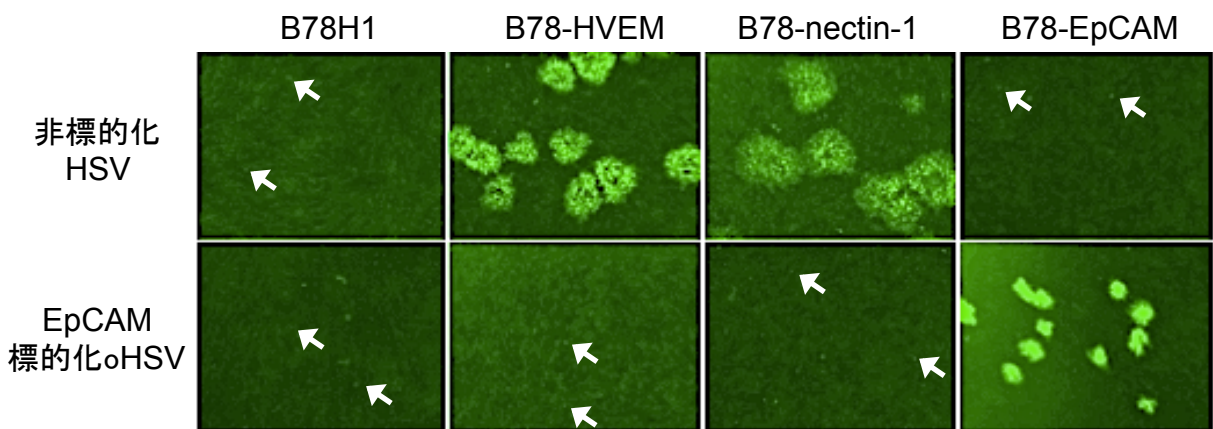


図9 細胞間伝播の評価方法 (infectious centerアッセイ) の概略図

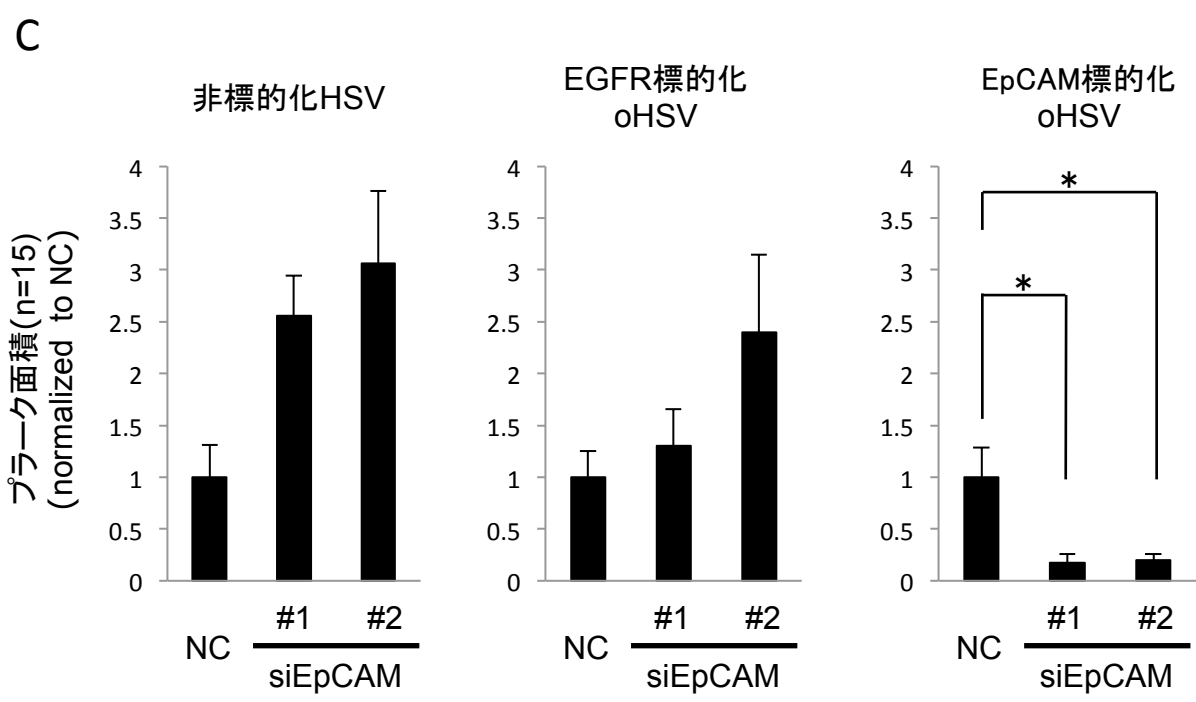
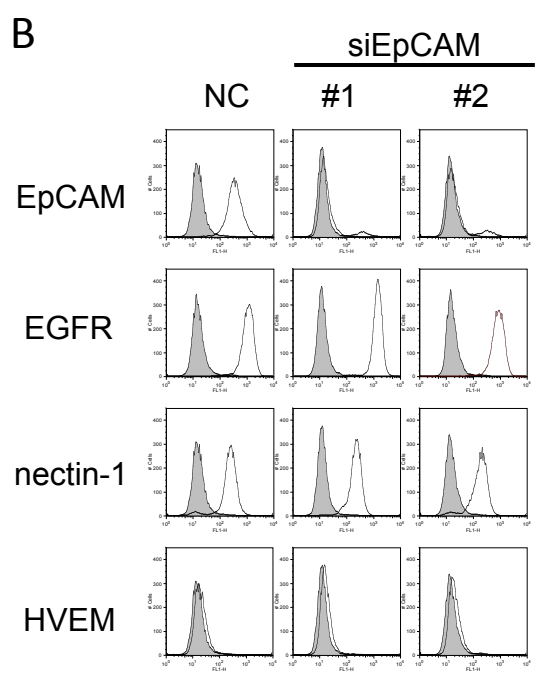
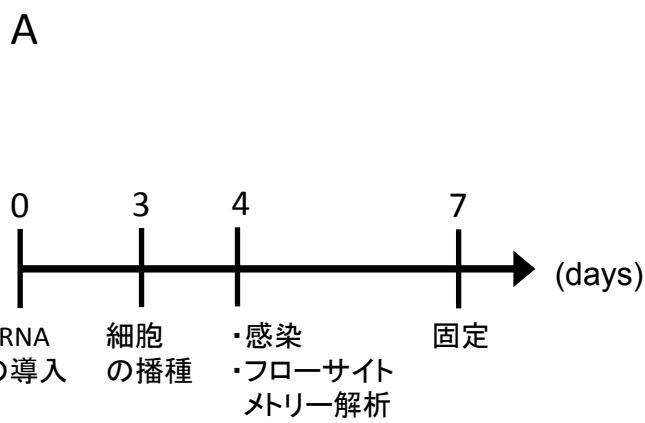
48穴プレートにgD受容体、EGFR、EpCAMを発現する細胞を播種する。同日にアクセプター細胞を48穴プレートに播種する。翌日、HSVをMOI 5でgD受容体、EGFR、EpCAMを発現する細胞に感染させる (ドナー細胞)。感染開始から2時間後に酸性処理し、細胞外に存在するHSVを不活化する。37°C、1時間培養後、ドナー細胞を非感染細胞 (アクセプター細胞) に重層する。ドナー細胞をアクセプター細胞に沈み込ませるために37°C、1時間培養後、メチルセルロースを重層する。重層から48時間後、プラーク形成の有無をEGFPの発現を指標に観察し、細胞間伝播の特異性を評価する





**図10 EpCAM標的化oHSVの細胞間伝播はEpCAM特異的であった**

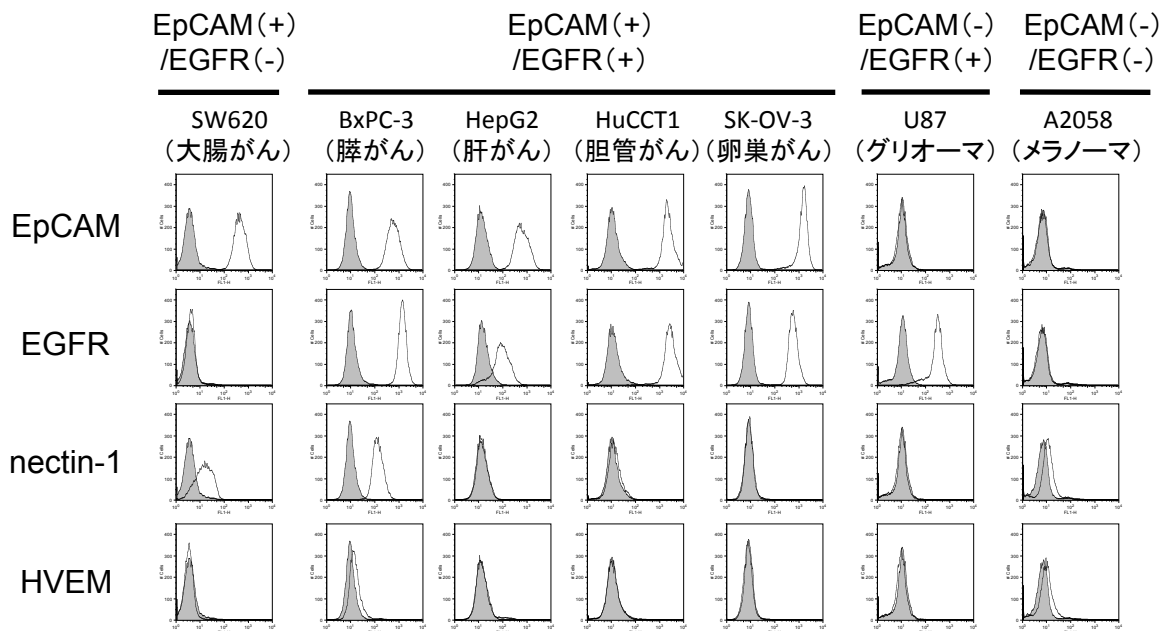
48穴プレートに播種したVero/EpCAM（ドナー細胞）に非標的化HSVあるいはEpCAM標的化oHSVをMOI 5で感染させた。2時間後に細胞外に存在するHSVを酸性処理により不活化した。その後、感染させたVero/EpCAMを48穴プレートに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種したB78H1とその亜株に重層し、さらに1%メチルセルロースを重層した。48時間後に4%パラホルムアルデヒドにより固定し、OLYMPUS IX70によりEGFPの発現を指標にプラークあるいは単一細胞へのウイルス侵入を観察した。倍率：40倍。矢印：単一細胞へのウイルス侵入（ドナー細胞）



### 図11 BxPC-3（ヒト膵がん細胞株）における内在性EpCAMの発現は細胞間伝播に必要である

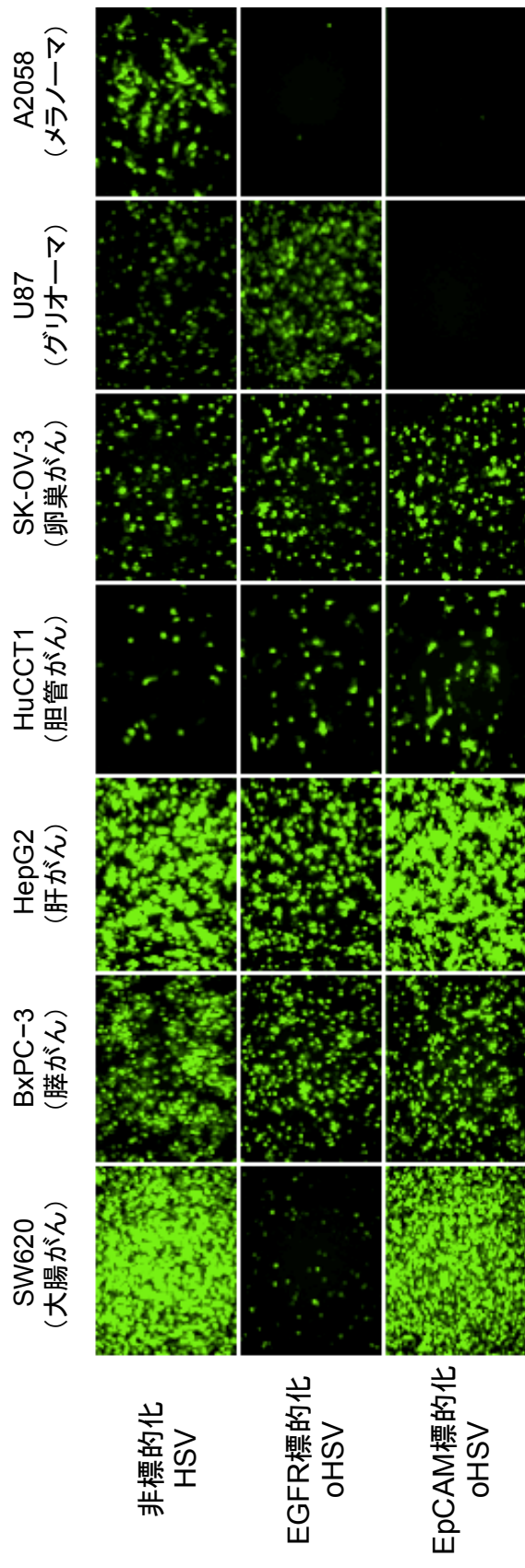
siEpCAMによりBxPC-3のEpCAMをノックダウンし、(A)の日程で評価を行った。siEpCAMを導入してから4日後にフローサイトメトリー解析により膜表面のEpCAMの発現を解析した(B)。NC: Negative control (LowGC)、灰塗りつぶし: アイソタイプコントロール、黒線: MY24、528、R1.302.12、CW10。(C) EpCAMをノックダウンしたBxPC-3とコントロール細胞を6穴プレートに播種した。48穴プレートに播種したBxPC-3(ドナー細胞)に非標的化HSV、EGFR標的化oHSV、あるいはEpCAM標的化oHSVをMOI 5で感染させた。2時間後に細胞外に存在するHSVを酸性処理により不活化した。その後、感染させたBxPC-3を6穴プレートに播種したコントロール細胞とEpCAMをノックダウンしたBxPC-3細胞に重層し、さらに1%メチルセルロースを重層した。72時間後に4%パラホルムアルデヒドにより固定した。倒立型蛍光位相差顕微鏡BZ-X700によりEGFPを指標にプラークを撮影した。プラーク(n=15)を撮影し、Image Jによりプラークの大きさを測定した。測定後、NCとの比を計算した。NC: Negative control (Low GC)、エラーバー: 相対標準偏差を示す。EpCAM標的化oHSVが形成したプラーク面積の有意差を求め、\*は有意差あり(P<0.05)を示す

細胞数  
↑  
蛍光強度  
→



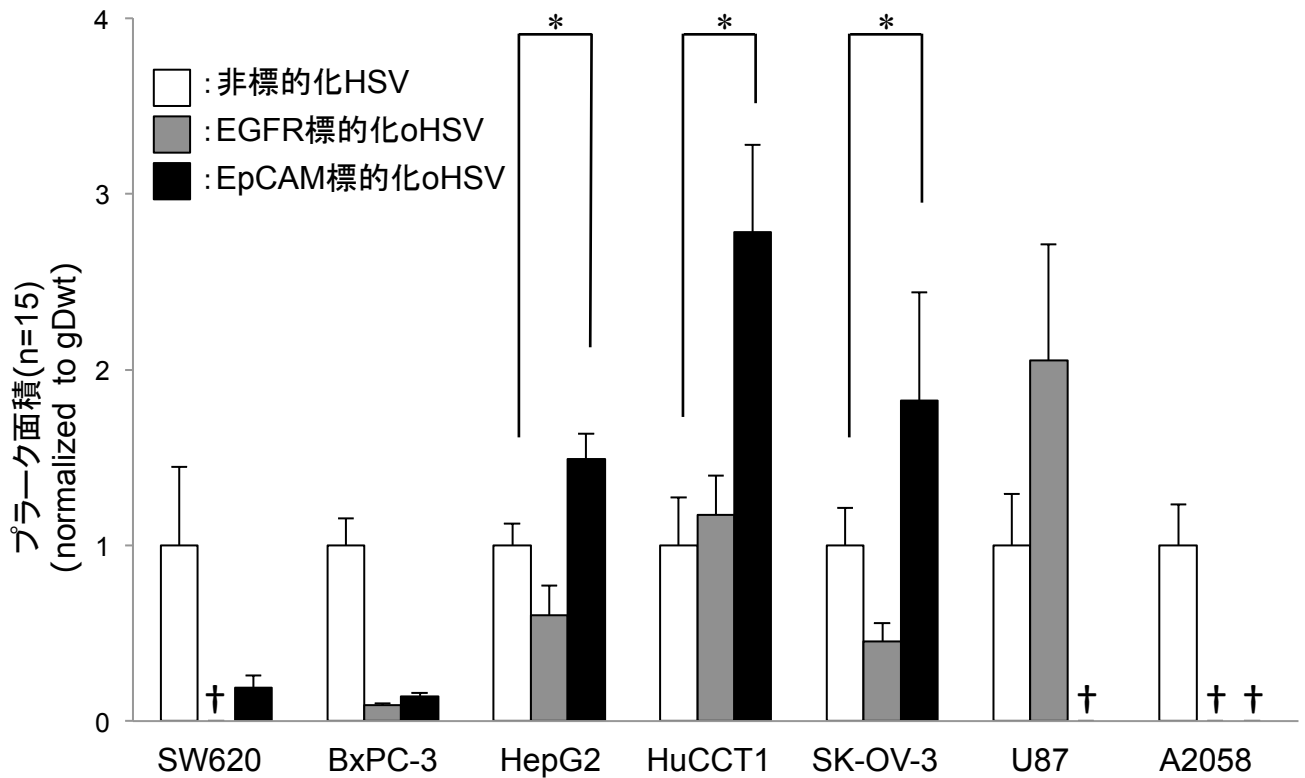
### 図12 がん細胞における標的抗原の発現

7種類のヒトがん細胞株における標的抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した。一次抗体として抗EpCAM抗体 (MY24)、抗nectin-1抗体 (R1.302.12)、抗HVEM抗体 (CW10)、抗EGFR抗体 (528)、あるいはそれぞれのアイソタイプコントロール抗体を用いた。灰塗りつぶし：アイソタイプコントロール、黒線：MY24、528、R1.302.12、CW10



**図13 EpCAM標的化oHSVはEpCAM陽性がん細胞のみに細胞内侵入を示し、その頻度は非標的化HSVに匹敵した**

48穴プレートに播種したがん細胞に非標的化HSV、EGFR標的化oHSVあるいはEpCAM標的化oHSVをMOI 0.3で感染させた。16時間後に4%パラホルムアルデヒドにより固定した。倒立型蛍光位相差顕微鏡BZ-X700によりEGFPを観察した。



**図14 EpCAM標的化oHSVはEpCAM陽性がん細胞にプラーク形成を示した**

48穴プレートあるいは6穴プレートに播種したがん細胞に非標的化HSV、EGFR標的化oHSVあるいはEpCAM標的化oHSVを30 pfu/well、300 pfu/wellで感染させた。感染から2時間後に1%メチルセルロースを重層した。感染から96時間後に4%パラホルムアルデヒドにより固定し、OLYMPUS IX70によりEGFPの蛍光を指標にプラークを撮影した。プラーク (n=15) を撮影し、Image Jによりプラークの大きさを測定した。測定後、非標的化HSVとの比を計算した。白：非標的化HSV、灰色：EGFR標的化oHSV、黒：EpCAM標的化oHSV。エラーバー：相対標準偏差、†：300 pfu/wellでプラーク形成が認められなかったことを示す。非標的化HSVとEpCAM標的化oHSVが形成したプラーク面積の有意差を求め、\*は有意差あり (P<0.05) を示す

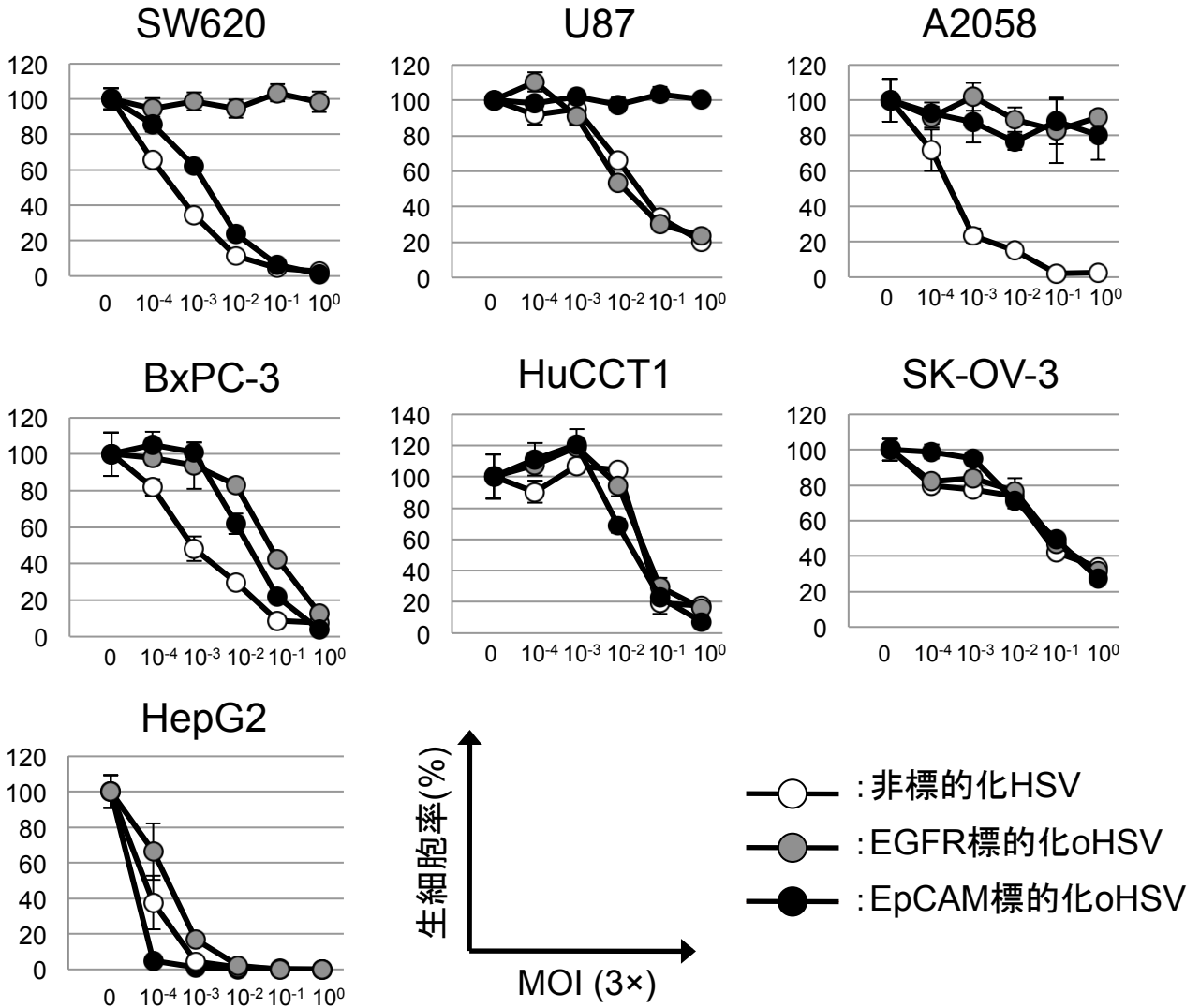


図15 EpCAM標的化oHSVはEpCAM陽性がん細胞をウイルス量依存的に殺傷した。96穴プレートに播種したがん細胞に非標的化HSV、EGFR標的化oHSVあるいはEpCAM標的化oHSVを感染させた。感染から96時間後に生細胞をMTT 試薬により判別後、microplate readerを用いて生細胞の吸光度を測定した (n=6)。ウイルスを感染させなかったウェルを100%とし、生細胞率を求めた。白：非標的化HSV、灰：EGFR標的化oHSV、黒：EpCAM標的化oHSV。エラーバー：相対標準偏差を示す。上段左：SW620 (EpCAM陽性/EGFR陰性がん細胞)、上段中：U87 (EpCAM陰性/EGFR陽性がん細胞)、上段右：A2058 (EpCAM陰性/EGFR陰性がん細胞)、中・下段：BxPC-3・HuCCT1、SK-OV-3、HepG2 (EpCAM陽性/EGFR陽性がん細胞)

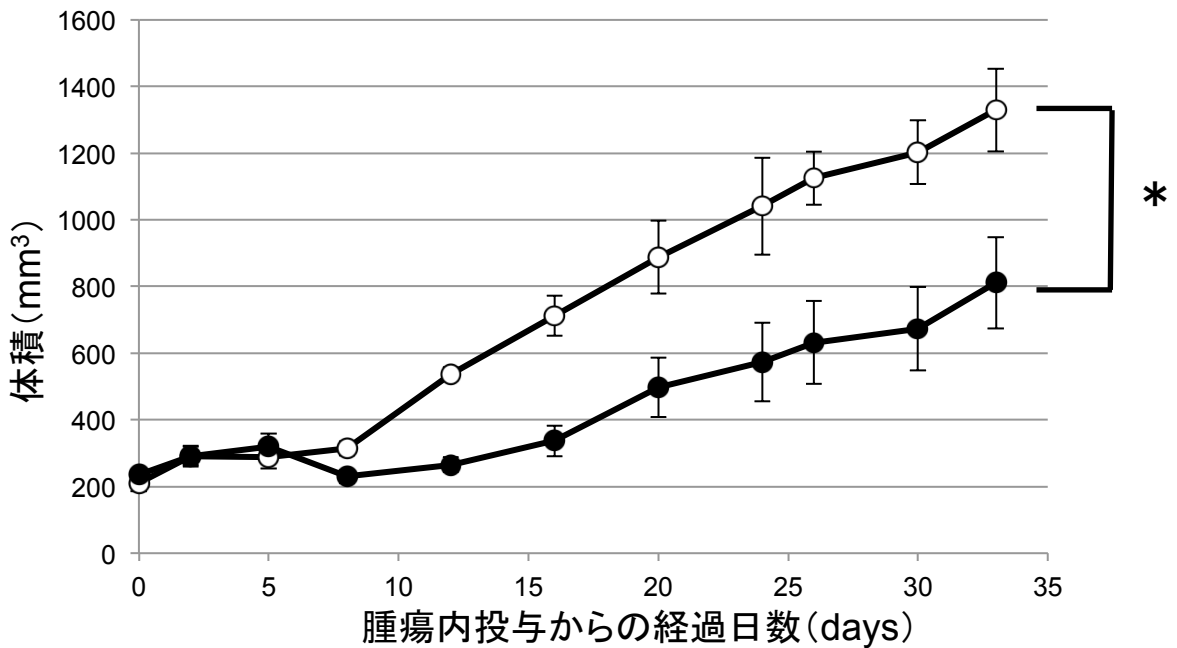


図16 EpCAM標的化HSVはEpCAM陽性がん細胞を移植したヌードマウスにおいて抗腫瘍効果を示した  
 SW620をヌードマウスの皮下に移植し、体積が約200 mm<sup>3</sup>に達した段階で腫瘍内にEpCAM標的化HSV (2.0×10<sup>8</sup> pfu/50 μL/tumor) あるいはPBS (50 μL/tumor) を投与した。白実線：PBS投与群 (n=4)、黒実線：EpCAM標的化HSV投与群 (n=4)、体積 = 0.5 × (長径) × (短径)<sup>2</sup>により求めた。エラーバーは標準誤差 (SE) を示す。\*はanalysis of variance 解析により有意差あり (P<0.05) を示す



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり多くの皆様のご指導・ご支援をいただきましたことを深く感謝申し上げます。

東京大学医科学研究所先端医療研究センター臓器細胞工学分野の田原秀晃先生、・内田宏昭先生には科学的思考・実験技術のみならず全面的にご指導・ご鞭撻いただきました。

東京薬科大学ゲノム病態医科学研究室の深見希代子先生には論文作成におきまして暖かいご指導をいただきました。

東京薬科大学腫瘍医科学研究室の濱田洋文先生、渡部哲郎先生（現：東京医科歯科大学）、福原武志先生（現：順天堂大学）、城山智貴さん、大久保優さん、鈴木拓真さん（現：東京薬科大学分子生化学研究室）、池田瞳さん（現：東京薬科大学免疫制御学研究室）、札幌医科大学の山口美樹先生、University of Pittsburgh の Joseph C. Glorioso 先生、 Justus B. Cohen 先生、宮川世志幸先生（現：日本医科大学）には論文作成にあたりご指導・ご協力いただきました。

Dartmouth Medical School の David Leib 先生、Free University of Berlin の Nikolaus Osterrieder 先生、Northwestern University の Patricia Spear 先生、University of Pennsylvania の Gary Cohen 先生、Roselyn Eisenberg 先生、Mayo Clinic の Stephen Russell 先生、東北大学大学院工学系研究科の熊谷泉先生、東京大学医科学研究所先端医療研究センター細胞療法分野の北村俊雄先生にはマテリアルを供与していただきました。

東京薬科大学細胞制御医科学研究室の田中弘文先生、分子生化学研究室の松下暢子先生、免疫制御学研究室の田中正人先生、細胞情報医科学研究室の谷佳津子先生、腫瘍医科学研究室の吉松康裕先生（現：東京医科歯科大学）、東京大学医科学研究所先端医療研究センター臓器細胞工学分野の皆様、東京薬科大学ゲノム病態医科学研究室の皆様、そして本研究を進めるにあたりお力添えをいただいた皆様に心より感謝いたします。