The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腫瘍融解性単純ヘルペスウイルスによるimmunogenic cell deathの誘導
Author(s)	髙須, 彩子
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52340
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　高須　彩子　）	
論文題名	腫瘍融解性単純ヘルペスウイルスによるimmunogenic cell deathの誘導

論文内容の要旨

【背景と目的】

腫瘍融解性ウイルス療法は弱毒化したウイルスを感染させ，腫瘍を破壊する治療法で，腫瘍細胞の破壊に伴う腫瘍免疫の増強効果も注目されている．単純ヘルペスウイルス１型（HSV-1）は最も臨床研究が進んでいるウイルスのひとつで，われわれはこれまでに，神経毒性遺伝子gamma34.5を欠失し，細胞融合能に関与するgB遺伝子に変異を持つ複製可能型の腫瘍融解性HSV-1 RH2を開発した．そして近交系マウスの実験系でRH2の腫瘍内投与による腫瘍免疫の強化を観察している．

生体外で抗癌剤処理，放射線照射された癌細胞は癌ワクチンとしての働きを示すことから，腫瘍細胞のimmunogenic cell death（ICD）という概念が提唱されている．これは，腫瘍細胞が死に至る過程でdamage-associated molecular patterns（DAMPs）と呼ばれる分子を放出あるいは細胞表面に露出させ，抗原提示細胞に認識されて腫瘍免疫が活性化することをさしている．DAMPsとしてATP，high mobility group protein B1（HMGB1），calreticulin（CRT），heat shock protein（HSP）70，HSP90などが挙げられる．抗癌剤，放射線，紫外線だけでなくウイルスによってもICDは誘導されることが知られている．しかし，HSV-1感染によるICD誘導を細胞レベルで明らかにした報告はみられない．そこで，HSV-1 RH2を扁平上皮癌細胞に感染させる系を用いて，ICDを誘導するDAMPsの動態について検討を行った．

【材料と方法】

細胞としてマウス扁平上皮癌由来SCCVII細胞，サル腎由来Vero細胞を用いた．腫瘍融解性ウイルスとしては，HSV-1 RH2を用いた．ウイルスの感染力価はプラック形成法にて，細胞生存率はMTT assayにて測定した．ATPはATP assay，HMGB1はELISAキットを用いて測定した．CRTの発現は抗CRTモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い，共焦点顕微鏡にて観察した．HSP70は抗HSP70抗体を用いてイムノブロット法にて検出した．細胞のannexin Vならびにpropidium iodide（PI）染色性はフローサイトメトリーにて測定した．RH2感染SCCVII細胞の核および細胞の形態はHoechst 33342およびWGAを用いて蛍光染色し，共焦点顕微鏡にて観察した．細胞死阻害剤存在下でのRH2感染による細胞傷害率はLDH release assayにて測定した．感染細胞の培養上清を濃縮し，ウイルスを不活化後，近交系マウスC3H/HeJJclの背部皮下に形成させた腫瘍内に投与し，経時的に腫瘍体積を測定した．

【結果】

1. SCCVII細胞に対してHSV-1を感染多重度 10あるいは100で接種すると，細胞は円形化し浮遊状態となった．生細胞率は24時間で非感染対照の60%まで低下した．2. HSV-1を感染させたSCCVII細胞の培養上清を回収してATP量を測定したところ，感染24時間で増加した．3. 培養上清中のHMGB1は非感染細胞でも経時的に増加したが，HSV-1感染によりその値はさらに上昇し，感染30時間で高値を示した．4. 感染で円形化した細胞を抗CRT抗体で蛍光染色すると，細胞表面に集合する像が観察された．5. HSP70の培養上清における存在をイムノブロットで調べたが，非感染対照と同じレベルであった．6. 誘導される細胞死について，フローサイトメトリーで解析した結果，annexin V 染色陽性でPI染色陽性細胞が増加した．核および細胞は腫大し，核の断片化はみられなかった．7. ネクロプトーシス阻害剤necrostatin-1存在下では細胞傷害率は低下しなかったが，pan-caspase阻害剤Z-VAD-FMKおよびcaspase-1阻害剤Z-YVAD-FMK存在下では細胞傷害率は低下した．8. 近交系マウスに形成した腫瘍にHSV-1感染SCCVII細胞の培養上清濃縮液を投与すると，腫瘍体積の増加は非投与マウスと比較して有意に抑制された．

【考察と結論】

SCCVII細胞にHSV-1を感染させた場合，経時的に生細胞は減少し，細胞死が誘導された．この変化に伴い細胞外へ放出されるATPおよびHMGB1量を測定したところ，どちらも感染24時間で増加がみられ，樹状細胞をはじめとする免疫細胞を活性化すると考えられた．小胞体の可溶性タンパク質CRTは円形化細胞の細胞表面でみられるようになり，樹状細胞の活性を促進すると考えられた．HSP70の細胞表面ならびに細胞外での増加はなかった．ICDは当初immunogenic apoptosisとも呼ばれていたが，最近ではネクローシス，ネクロプトーシス，オートファジーによる細胞死，パイロトーシスも含まれるようになっている．今回，annexin V 染色陽性でかつPI染色陽性の分画が増加し，caspase-1依存性であったことから，HSV-1による細胞死にはパイロトーシスが関与すると考えられた．ATP，HMGB1の放出増加は細胞膜破綻によるものといえる．近交系マウス腫瘍に対するHSV-1投与による腫瘍免疫の増強は分かっていたが，感染細胞の培養上清でも効果がみられたことから，培養上清中のDAMPsが腫瘍免疫に貢献することが分かった．

以上より，扁平上皮癌細胞に腫瘍融解性HSV-1 RH2を感染させた場合，扁平上皮癌細胞はパイロトーシスを起こしDAMPsの放出と細胞表面への局在の変化を伴うICDが誘導され，それが腫瘍免疫の増強に関与することが示唆された．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　高須彩子　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	由良　義明
	副 査	教授	豊澤　悟
	副 査	准教授	前田　隆史
	副 査	講師	相川　友直

論文審査の結果の要旨

本研究は，腫瘍融解性単純ヘルペスウイルス 1 型 RH2 を用いた癌治療において,腫瘍免疫の増強に関与する immunogenic cell death(ICD)について検討したものである。

その結果，RH2 をマウス扁平上皮癌細胞に感染させると，ICD に特徴的な damage-associated molecular patterns(DAMPs)である ATP，high mobility group box 1 protein(HMGB1)の細胞外放出，calreticulin(CRT)の細胞表面への移行がみられ，細胞死の形態は caspase-1 依存性のパイロトーシスであった。この ICD が腫瘍免疫の増強に関与すると考えられた。

以上の結果は，癌のウイルス療法における腫瘍免疫機構を解明する上で有意義な示唆を与えるものであり，博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。