OUKA
Osaka University 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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学位論文

腫瘍融解性単純ヘルペスウイルスによる immunogenic cell death の誘導

大阪大学大学院歯学研究科　統合機能口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座　口腔外科第二教室

高須　彩子

緒言

腫瘍融解性ウイルス療法（ウイルス療法）は，弱毒化した複製可能型ウイルスを感染させ，その細胞変性効果により腫瘍を破壊する治療法である．ウイルスは腫瘍細胞に感染して複製することで宿主である腫瘍細胞を破壊するとともに，子孫ウイルスを産生して周囲に感染を拡大し，より広範囲で腫瘍を破壊する．さらに，この過程で免疫担当細胞を賦活化し腫瘍免疫を増強すると考えられている[1]–[8].

腫瘍融解性ウイルスは DNA ウイルス，RNA ウイルスを問わず，vaccinia virus, herpes virus, adenovirus, reovirus, Newcastle disease virus (NDV)など多くのウイルス種に及んでおり，基礎的ならびに臨床的な研究が行われている[9], [10]. なかでも herpes simplex virus type 1 (HSV-1)では臨床研究が進んでおり，進展したメラノーマ症例で腫瘍内に局所投与することで顕著な腫瘍縮小効果が得られている．臨床研究はすでに Phase III にまで進み，原発巣だけでなく転移巣に対する効果も期待されている[11].

われわれは，これまでに複製可能型の腫瘍融解性 HSV-1 を開発している．これは HSV-1 F 株の神経毒性遺伝子 gamma34.5 を欠失させ，そこに LacZ 遺伝子が挿入された R849 株[12]と，自然変異体である HF 株[13], [14]との組換え体で RH2 と命名した[15]. RH2 は gamma 34.5 を持たず，ヒト癌細胞に対して細胞融合能を示すウイルスで，全塩基配

列は決定され, gamma34.5 遺伝子の欠失, 細胞融合能に関与する gB 遺伝子の変異など詳細な構造が判明している[16]. RH2 の親ウイルスにあたる HF 株をクローニングした HF10 は頭頸部癌, 乳癌, 膵臓癌で抗腫瘍効果がみられ, 現在米国で臨床研究が行われているが[17]–[19], RH2 は HF10 よりも神経毒性の面で優れたウイルスといえる. また, 近交系マウスで形成した扁平上皮癌内に RH2 を投与すると投与腫瘍だけでなく, 他部位に形成した腫瘍の増殖も抑制されることを観察している[20]. したがって, 今後の HSV-1 を用いたウイルス療法では, ウイルスによる直接的な腫瘍融解効果だけでなく, 腫瘍免疫を増強するために必須となる腫瘍抗原, 免疫担当細胞, ならびに免疫賦活化のメカニズムの解明が重要となる.

腫瘍免疫に関する最近の注目すべき進歩は immunogenic cell death (ICD)という概念の導入である[21]. これは生体外で抗腫瘍薬, 放射線照射された癌細胞が癌ワクチンとしての働く現象を元にして考案されたもので, ストレスあるいは傷害を受けた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ることで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指している. 代表的な DAMPs として, ATP, high mobility group box 1 protein (HMGB1), calreticulin (CRT), heat shock protein (HSP)70, HSP90 などが挙げられる. ATP は細胞外に放出

され，樹状細胞に対する find me シグナルとなる．HMGB1 も細胞外に放出され，様々な免疫細胞の誘導や樹状細胞の成熟を促進する．CRT は小胞体内にみられるタンパク質で，細胞表面に発現することで樹状細胞に対する eat me シグナルとなる．HSP70 は，細胞表面へ発現あるいは細胞外に放出されるものである[22].

腫瘍融解性 HSV が腫瘍免疫の増強に働くとする報告は多いが[20], [23], [24], ICD の研究はまだ進んでいない．HSV-2 による乳癌細胞，子宮内膜癌細胞からの HMGB1 の細胞外放出の報告以外は[8], HSV-1 で ICD を実証した報告はみられない．われわれは RH2 による近交系マウスの扁平上皮癌に対する腫瘍免疫賦活化効果を明らかにしている[20]. そこで今回，マウス扁平上皮癌の系を用い，HSV-1 RH2 の腫瘍細胞への感染で ICD が誘導される可能性について検討した．

材料と方法

1. 細胞培養

細胞として, サル腎由来 Vero 細胞, マウス皮膚扁平上皮癌由来 SCCVII 細胞[25]を用いた. Vero 細胞は理化学研究所 Cell Bank (Ibaraki, Japan) より購入し, SCCVII 細胞は京都大学原子炉実験所増永慎一郎博士から分与された. Vero 細胞は Eagle の最小必須培地 minimum essential medium (MEM; Nissui, Tokyo, Japan) に 2 mM L-glutamine (Wako, Osaka, Japan), 5%仔牛血清 calf serum (CS; JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) を添加したものを培養液として, 5%CO_2 存在下に 37℃で培養した. SCCVII 細胞は 10% CS を添加したものを培養液とした. Vero 細胞, SCCVII 細胞は 0.1% trypsin (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) と 1% ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA; Wako) で処理して細胞浮遊液を調整し, 継代培養を行った.

2. ウイルス産生と力価測定

ウイルスとして HSV-1 RH2 を用いた. RH2 の増殖および力価測定は Vero 細胞を用いた. 力価はプラック形成法にて測定した. すなわち, Vero 細胞を 24 穴プレートに 2×10^5 cells/well 播種し, 2 日間培養し単層を形成させた. 希釈したウイルス液を Vero 細胞に接種し, 1 時間吸着させた. Phosphate buffered saline (PBS(-); Nissui) にて洗浄し未吸着ウ

イルスを除去したのち, 0.3%メチルセルロース(Wako)含有培養液を重層し, 37℃で培養した. 細胞変性が明瞭となった時点で細胞をエタノールで固定し, 1%クリスタルバイオレット(Wako)にて染色して細胞変性部位に一致して得られるプラックを数え, 希釈倍率から感染力価 plaque forming unit (PFU)を算出した[15], [26], [27].

3. 試薬

細胞死阻害剤として, Z-VAD-FMK (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を 10μM, necrostatin-1 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)を 20μM, Z-YVAD-FMK (BioVision, Milpitas, CA, USA)を 20μM および 50μM の濃度で用いた[28].

4. MTT assay

生細胞率の測定は MTT assay にて行った. すなわち, 96 穴プレートの各ウェルに SCCVII 細胞を 1×10^4 cells/well 播種し, 一晩培養した. RH2 を接種し, 1 時間の吸着後, 未吸着ウイルスを除去し, 培養液を 100μl 加えて 37℃で培養した. 一定時間培養した後, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyletetrazolium bromide (MTT; Dojindo, Kumamoto, Japan) 50mg を PBS (-) 10ml に溶解した MTT 溶液を加えた. さらに 4 時間培養した後, 2-プロパノール (Wako) 反応停止

液を 100µl 加え, 生成物を完全溶解させた. これをマイクロプレートリーダー (Benchmark Plus ; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にて吸光度 (630nm 対照波長で 570nm 波長) を測定し, ウイルスを感染させていない対照に対する比率から生細胞率を算出した. 非感染対照には PBS(-) を用いた[15], [26], [27].

5. ATP assay

24 穴プレートの各ウェルに SCCVII 細胞を 1×10^5 cells/well 播種し, 一晩培養した. RH2 を multiplicity of infection (MOI)=10 および 100 で接種し, 1 時間の吸着後、未吸着ウイルスを除去し, 培養液を 500µl 加え培養した. 一定時間培養した後, 培養上清を回収し, 6,200 rpm, 5 分間遠心にて死細胞を除去し培養上清を分離した. 得られた培養上清 100µl に ENLITEN ATP Assay System (Promega, Madison, WI, USA) の発光試薬を 100µl 加え混和し, ルミノメーター (Turner Biosystems TD-20/20; Promega) にて蛍光度を測定した. ATP 希釈標準液より検量線を作成し, 蛍光度から ATP 濃度を算出した[28], [29].

6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による HMGB1 の測定

24 穴プレートの各ウェルに SCCVII 細胞を 1×10^5 cells/well 播種し, 一晩培養した. RH2 を MOI=10 および 100 で接種し, 1 時間の吸着後, 未

吸着ウイルスを除去し, 培養液を 500μl 加え培養した. 一定時間培養した後, 培養上清を回収し, 6,200 rpm, 5 分間遠心にて死細胞を除去し培養上清を分離した. HMGB1 は HMGB1 ELISA Kit II (SHINO-TEST, Kanagawa, Japan) を用いて測定した. すなわち, キット付属の抗体結合プレートに検体希釈液 100μl および得られた培養上清 10μl を分注し, 37℃で 24 時間反応させ, 洗浄後, 標識抗体液を 100μl 加えて室温で 2 時間反応させた. 洗浄後, 発色試薬を 100μl 加え 30 分間反応させ, 反応停止液を 100μl 加えてマイクロプレートリーダー(Benchmark Plus; Bio-Rad) にて 450nm の吸光度を測定した. HMGB1 希釈標準液より検量線を作成し, 吸光度から HMGB1 濃度を算出した[8], [28].

7. 蛍光抗体法

細胞膜 CRT の検出のため, 6 穴プレートの各ウェルに SCCVII 細胞を 1×10^5 cells/well 播種し, 一晩培養した. RH2 を MOI=10 で接種し, 1 時間の吸着後, 未吸着ウイルスを除去し, 培養液を 2ml 加え培養した. 24 時間培養したのち, 全細胞を回収し, PBS(-)にて 2 回洗浄し, 4%パラホルムアルデヒドで 5 分間固定した. 固定後, 細胞を PBS(-)で 2 回洗浄し, ブロッキングバッファー(3%BSA 含有 PBS(-))で希釈(1:250)した一次抗体, マウスモノクローナル抗 CRT 抗体 (Abcam, Tokyo, Japan) を加え 30 分間反応させた. PBS(-)で 2 回洗浄したのち, ブロッキングバ

ッファーで希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC)標識二次抗体，ヤギポリクローナル抗マウス IgG 抗体 (Abcam) (1:100)および Alexa Fluor® 633 conjugate wheat germ aggulutinin (WGA 633) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (5μg/ml) を加え 30 分間反応させた. PBS(-)で 2 回洗浄し，封入剤 ProLong® Gold Antifade Reagent with 4’6-diamido-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) (CST Japan, Tokyo, Japan) を用いてスライドガラスにマウントした. 核および細胞膜の観察には, Hoechst 33342 (Dojindo) および Alexa Flour 633 wheat germ agglutinin (WGA 633) を用いた. すなわち, 細胞を固定, 洗浄したのち, Hoechst 33342 蛍光色素液(1:5)および WGA 633(5μg/ml)を加えて混和し, スライドガラスにマウントした. 標本は共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP8; Leica Microsystems, Mannheim, Germany) にて観察した[30].

8. ウェスタンブロット法

細胞をセルスクレーパーで回収し 5,000×g, 3 分間遠心してペレットにしたのち, プロテアーゼインヒビターを含む RIPA buffer に懸濁した. 氷上にてソニケーターを用いて細胞を破壊し, 15,000×g, 5 分間, 4℃で遠心して全細胞タンパク質抽出液を得た. 細胞膜画分の分離は, Cell Suface Protein Isolation Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)を用いて行

った. タンパク質の定量は DC^{TM} プロテインアッセイ(BioRad)を用いた. タンパク質試料は Mini-PROTEAN TGX Precast Gel (Bio-Rad) を用いて泳動し, polyvinylidene difluoride メンブレン (Millipore, Billerica, MA, USA) にセミドライ型転写装置 (Bio-Rad) を用いて 50 mA で 60 分間転写させた. 5%スキムミルクを含む PBS-T (0.05% Tween 20 含有) で 1 時間ブロッキングを行った後, ブロッキングバッファーに希釈した 1 次抗体, マウスモノクローナル抗 HSP70 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)(1:400)およびウサギポリクローナル抗 β-actin 抗体 (CST Japan)(1:1000)を 4℃で一晩反応させた. 次に, ブロッキングバッファーに希釈した 2 次抗体, ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (CST Japan)(1:5000)および HRP 標識抗マウス IgG 抗体(Cell Signaling)(1:5000)をそれぞれ室温で 1 時間反応させ, ECL Western Blotting Analysis System (Amersham, Little Chalfront, UK) を用いて検出した[31], [32].

9. フローサイトメトリー解析

6 穴プレートの各ウェルに SCCVII 細胞を 1×10^5cells/well 播種し, 一晩培養した. RH2 を MOI=10 で接種し, 1 時間の吸着後, 未吸着ウイルスを除去し, 培養液を 2 ml 加え培養した. 24 時間培養した後, 全細胞を回収し, PBS(-) で洗浄した. 細胞のペレットを annexin V-FITC を含

む annexin-binding buffer (Invitrogen) で懸濁し, propidium iodide (PI; Invitrogen) を加えて室温で 15 分間反応させた. その後, annexin-binding buffer を 400µl 加え, annexin V-FITC および PI の染色性を FACS Calibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), Cell Quest software を用いて解析した[28].

10. Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

RH2 感染による細胞傷害性は, 細胞から培養液中に放出される LDH 量から評価した. すなわち, 96 穴プレートの各ウェルに SCCVII 細胞を 1×10^4 cells/well 播種し, 一晩培養した. RH2 を MOI=10 で接種し, 1 時間の吸着後, 未吸着ウイルスを除去し, 細胞死阻害剤含有培養液 100µl/well を加え 37℃で培養した. 24 時間後, PBS(-)を 100µl 加え, 各ウェルの上層部から 50µl の上清を微量毒性試験用試薬 MTX"LDH" (Kyokuto, Tokyo, Japan)のキット付属の 96 穴プレートに移した. これに LDH 反応性の基質発光試薬を 50µl 加え, 37℃で 30 分間反応させたのち, 各ウェルに反応停止液を 100µl 加えて混和した. マイクロプレートリーダー (Benchmark Plus; Bio-Rad) にて波長 560 nm で吸光度を測定した. ネガティブコントロールではウイルス液の代わりに PBS(-)を, 細胞死阻害剤含有培養液の代わりに DMSO 含有培養液を用い, ポジティブコントロールでは 0.8% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 含有培

養液を用いた. LDH 放出量を測定し, 下記の計算式から細胞の死細胞率を算出して細胞傷害率とした[20], [28].

$$\text{細胞傷害率}(\%)=\frac{(\text{検体})-(\text{ネガティブコントロール})}{(\text{ポジティブコントロール})-(\text{ネガティブコントロール})}\times 100$$

11. 培養上清濃縮液の調整とマウス腫瘍における抗腫瘍効果の測定

5 週齢メスの近交系マウス C3H/HeJJcl (Clea, Tokyo, Japan) の背部皮下に PBS (-) で調整した SCCVII 細胞 1×10^6 cells/100µl を, 27G 注射針にて接種し腫瘍を形成した. 腫瘍径が 7 mm に達した時点で実験に使用した. 培養上清濃縮液の調整は, SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で感染させ, 無血清培養液にて培養した. 24 時間後の培養上清を回収し, 6200rpm, 10 分間遠心し死細胞を除去し, 培養上清を分離した. 得られた培養上清を Amicon® Ultra-15 3K Centrifugal Filter Devices (Merck, Darmastadt, Germany) を用いて 5,000×g, 70 分間遠心し, タンパク質量を 30 倍濃縮し, 濃縮液を得た. 得られた濃縮液は-30℃で保存した. 濃縮液中のウイルスは紫外線照射 (0.15mW/cm^2, 1 時間) により不活化した. マウス腫瘍内に濃縮液 50µl を 27G 注射針にて投与し, 投与は 2 日間隔で 3 回行った. 対照群では PBS(-) 50µl を投与した. 初回投与から 31 日目まで経時的に腫瘍の長径と短径を測定し, 体積は下記の計算式で算出した[20], [24].

腫瘍体積(mm^3)=長径(mm)×{短径(mm)}^{2}×0.52

動物実験は大阪大学の動物倫理委員会の承認を得て行った.

12.統計解析

実験結果は平均±標準偏差(mean±SD)で表記した. 統計処理は

2群間の比較はStudentの*t*検定を用いた. 有意水準5%以下を有意差ありとした.

結果

1. RH2 感染による細胞形態と生細胞率の変化

RH2 感染による SCCVII 細胞での細胞変性効果を知るため, 各種ウイルス量で接種し, 経時的に細胞形態を観察した. SCCVII 細胞に RH2 を MOI=0.1, 1 で感染させた場合, 細胞の形態変化はみられなかった. より高いウイルス量の MOI=10, 100 で感染させると, 12 時間後には円形化した細胞が出現し, 24 時間後には円形化し浮遊する細胞が増加した(図 1).

SCCVII 細胞に細胞変性を惹起できるウイルス接種条件として, MOI=10, 100 を選択し, RH2 感染による細胞傷害性を生細胞率の低下で評価した. 感染 12, 24, 36 時間後に MTT assay を行い, 非感染対照と比較して生細胞率を求めたところ, MOI=10 では感染 24 時間後には生細胞率は 55%に低下し, 36 時間後には 36%まで低下した. MOI=100 で感染させた場合には, 感染 24 時間後に 35%, 36 時間後には 16%まで低下した(図 2).

2. RH2 感染による細胞外 ATP, HMGB1 の測定

ICD を生じた細胞からは DAMPs である ATP, HMGB1 が細胞外へ放出される[33]. SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10, 100 で感染させると, 細胞変性を生じるため, この条件下で ATP の細胞外放出を検討した.

RH2 感染 12, 24, 30, 36 時間後の培養上清を回収し ATP 量を測定した結果, 感染 12 時間後では ATP の増加はみられなかったが, 24 時間後には MOI 依存的に増加し MOI=10, 100 でそれぞれ 1.8 pM, 3.6 pM となった(図 3). 36 時間までそのレベルが持続した。

培養液中 HMGB1 の場合, 非感染の対照でも培養を継続することで 24 時間までその値は次第に増加した. RH2 感染細胞では 12 時間までは増加しなかったが, 24 時間後には増加し, 30 時間でより高値となった. そのため, MOI=10,100 のいずれにおいても対照との間で有意差が認められた. 36 時間後には 30 時間と比較して低下した. 非感染細胞でも 36 時間で細胞外 HMGB1 の低下がみられた(図 4).

3. RH2 感染による CRT の細胞内局在の変化

ICD を誘導する抗腫瘍薬は, CRT を細胞表面に露出させる[34], [35]. SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で感染させ, 24 時間後に CRT の細胞内局在を蛍光抗体染色法にて観察した. 核は DAPI で染色し, 細胞膜は WGA で染色した. 対照群では CRT は細胞質内にびまん性に観察されたが, RH2 感染細胞では CRT は WGA で染色される細胞表面に一致して集積した染色像を示すようになった(図 5).

4. RH2 感染による HSP70 発現への影響

HSP70, HSP90 は ICD 誘導にともなって小胞体から細胞表面に移動することまた細胞外へも放出される[36]. RH2 感染 24 時間後の SCCVII 細胞から培養上清, 全細胞タンパク質抽出液ならびに細胞膜画分を調整し, 抗 HSP70 抗体を用いてウェスタンブロット法を行った. β-actin は全細胞タンパク質抽出液の検体でのみ検出され, 細胞膜画分の分離が確認された. HSP70 は, 陽性対照として抗腫瘍薬 mitoxantrone; MTX (2μM) で処理した細胞の培養上清中で増加したが, RH2 感染細胞では非感染対照と同じレベルであり, 細胞外への HSP70 の放出の増加はなかった. これに対して, 全細胞タンパク質抽出液ならびに細胞膜画分ではいずれの検体でも HSP70 は検出されなかった(図 6).

5. RH2 感染によるアポトーシスならびにネクローシスの誘導

正常細胞ではホスファチジルセリンは細胞膜の内層に存在するが、アポトーシス細胞ではホスファチジルセリンが外層に露出するため, 高い親和性を持つ annexin V と反応するようになる. ネクローシス細胞は DNA 染色色素である PI を遮断することができず, PI の染色性が陽性となる[37], [38]. ただ, アポトーシスでも後期になると PI の透過性が高まる. RH2 により誘導される細胞死がアポトーシスであるかを明らかにするため, RH2 を MOI=10 で SCCVII 細胞に感染させ, annexin

V-FITC と PI で染色後, flow cytometry にて解析したところ, annexin V 染色陽性で PI 染色陰性の早期アポトーシス細胞, annexinV 陰性で PI 陽性のネクローシス細胞は増加しなかったが, annexin V 染色陽性かつ PI 染色陽性細胞が経時的に増加し, その割合は感染 24 時間後では全体の 32%に達した(図 7). すなわち, RH2 感染により annexin V 染色陽性かつ PI 染色陽性細胞であるアポトーシス後期あるいはネクローシス細胞が増加した.

アポトーシス細胞では核の断片化, ネクローシスでは細胞と核の腫大がみられる. RH2 感染 SCCVII 細胞を Hoechst 33342 と WGA で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ, 細胞ならびに核の腫大がみられた(図 8A). 核および細胞の直径は, 非感染対照と比較して高値となり, 両群間で有意差がみられた(図 8B). Hoechst 33342 で核染色を行い細胞核の形態を観察したが, アポトーシス細胞に特徴的な核の断片化像はみられなかった(図 8A).

ネクローシスと類似した細胞死として, プログラムされたネクローシスであるネクロプトーシスが知られている[39]. Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1)阻害剤 necrostatin-1 はネクロプトーシスによる細胞死を抑制する[40]. アポトーシスは pan-caspase 阻害剤 Z-VAD-FMK で抑制される. これら阻害剤存在下に MOI=10 で RH2 感染を行い, 24 時間後の細胞傷害率を LDH release assay にて測定した.

RH2 感染単独による細胞傷害率は 13%であったのに対し, necrostatin-1 存在下では細胞傷害率は 12%であり阻害剤のない場合と比較して有意差はなかったが, Z-VAD-FMK 存在下では 5%と有意に低下し, 対照との間に有意差を認めた (図 9A). 最近, 細胞内寄生細菌やウイルスを貪食したマクロファージで感染が成立すると, caspase-1 依存性のプログラム細胞死であるパイロトーシスを起こすことが知られている[41], [42]. そこで, RH2 感染細胞を caspase-1 阻害剤 Z-YVAD-FMK 存在下で培養し細胞傷害率を測定した. Z-YVAD-FMK 20μM では対照と比較して差はなかったが, 50μM の高濃度では細胞傷害率は低下し, 対照との間で有意差がみられた(図 9B).

6. RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清濃縮液投与による担癌近交系マウスにおける腫瘍体積の変化

SCCVII を接種して腫瘍を形成させた担癌 C3H 近交系マウスでは, RH2 を腫瘍内に投与すると腫瘍免疫が増強される[20]. これまでの本研究における実験結果から, RH2 感染で DAMPs である ATP, HMGB1 の細胞外への放出, CRT の細胞表面への露出がみられた. 培養上清へ放出される DAMPs も腫瘍免疫の増強に関与している可能性があるため, RH2 感染 SCCVII 細胞の培養上清の濃縮液を調整し抗腫瘍効果を検討した. すなわち, 30 倍濃縮液を紫外線照射したのち, 50 μl を近交系

マウスの SCCVII 腫瘍内に 2 日間隔で 3 回投与し, 腫瘍体積を経時的に測定した. PBS(-)を投与した対照群では 25 日目には 2996 mm^3 に達したが, 培養上清濃縮液を投与した群の腫瘍は 1587 mm^3 と増殖が抑制され, 両群間で有意差が認められた(図 10).

考察

悪性腫瘍に対する化学療法や放射線治療は通常アポトーシスによる細胞死を引き起こすが，このような細胞死に免疫学的な効果はなく，むしろ免疫に対抗するものと考えられてきた[22]．しかし，ICD の概念が提唱され，癌治療における免疫系の意義が問われるようになっている．DAMPs は正常細胞に由来する分子で細胞へのストレス，組織傷害に反応して免疫を開始し持続させる分子で，細胞，組織によって差はあるが，タンパク質，DNA，RNA あるいは代謝産物である．他に ATP，尿酸，ヘパラン硫酸も DAMPs に含まれるとされている[43]．実際に研究されているのは，ATP，BCL-2，CRT，cyclophilin A，F-actin，HSP70，HSP90，HMGB1 などである．一方，これら DAMPs を介する ICD の誘導剤としては，mitoxantrone，oxaliplatin，UV，gamma ray，anthracyclines，shikonin，7A7(EGFR-antibody)，cyclophosphamide，bortezomib，cardiac glycosides，hypericin-based PDT，coxackievirus などが知られている[22]．また，ウイルス感染でもウイルス療法の発展にともなって，adenovirus[44]，parvovirus[28]，[45]，HSV，measles virus[46]，Newcastle disease virus[47]，reovirus[48]，coxsackievirus B3[29]で ICD との関連性が研究されている．

RH2 は細胞融合が細胞層全体に拡大し，ヌードマウス腫瘍でも多核巨細胞が形成され，さらに gamma34.5 遺伝子が欠失していることが確

認されたウイルスである[15]. しかも, 近交系マウスの系を用いた実験で, $CD8^+$T 細胞が関与する腫瘍免疫が働いている[20]. 今回, この近交系マウスの系を用いて扁平上皮癌細胞における ICD を検討した. C3H/HeJJcl マウスはヒト HSV-1 に対する感受性が低い[49]. そこで, まず C3H/HeJJcl マウス由来の培養 SCCVII 細胞に対する RH2 の感染実験を行った. SCCVII 細胞に RH2 を接種すると, 細胞は 12 時間後には円形化し, 24 時間後には浮遊した. RH2 感染により経時的に細胞形態は変化したが, ヒト扁平上皮癌でみられるような細胞融合はみられなかった. RH2 を MOI=10 および 100 で接種すると, 生細胞率は感染 24 時間後にはそれぞれ 55%, 35%まで低下したことから, 高い MOI で感染させるとマウス扁平上皮癌細胞でも RH2 の感染は成立すると考えられた.

そこで, RH2 感染による DAMPs のうち ATP、HMGB1、CRT、HSP70 について検討した. 細胞外 ATP は, 樹状細胞のプリン作動性 $P2X_7$受容体に作用して, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 protein (NLRP3) 依存的 caspase-1 活性化複合体(インフラマソーム)が誘導され, IL-1β の産生を促す. IL-1β は IFN-γ 産生性 $CD8^+$T 細胞の分極や癌細胞に対する獲得免疫に関与するとされている[50], [51]. ATP の細胞外放出は adenovirus, coxsackievirus で報告されている[29], [44]. Coxsackievirus では感染 7 時間後から放出がみられている. SCCVII 細

胞に RH2 を感染させると，感染 12 時間では明らかでなかったが，24 時間で非感染対照と比較して明らかな ATP の上昇が認められた．

HMGB1 は核に豊富に存在するクロマチン結合性タンパク質で，核内ではタンパク質の転写を調整するが，細胞外の HMGB1 は ICD に関与する．癌ワクチンを用いた研究から，HMGB1 を欠失させると腫瘍細胞チャレンジを抑制できないこと，Toll-like receptor との結合が化学療法による腫瘍の排除に必要とされている[22]．ネクローシス細胞からは受動的に HMGB1 は放出され，これが好中球，マクロファージ，単球から TNF，IL-1，IL-6，IL-8 などのサイトカインの産生を促すとされている[52], [53]. HSV-2 感染では，核と細胞質にある HMGB1 が，経時的に細胞外において増えていく．これは細胞のネクローシスと一致していた. RH2 感染細胞において，HMGB1 の放出は感染 24 時間で非感染対照と比較して明らかな上昇が認められた．したがって，核，細胞質に存在する HMGB1 は培養を継続することで，この扁平上皮癌細胞では細胞外にも分泌されることが分かった．ウイルスが感染して細胞膜が傷害を受けることで，この分泌機能が促進されると考えられた．

RH2 感染による細胞表面の変化として，HSP70 の細胞膜への表層への移行，細胞外への放出はみられなかったが，CRT の細胞表面への移行が観察された．細胞表面に露出した CRT は，マクロファージの low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) を介して貪食作用

を増強する[54]. 樹状細胞にCRT受容体があるとの報告や[55], CRTの細胞表面への移行が増加した細胞ではMHCクラスIの活性が増加しているとの報告もあり[56], 抗原提示に働くと考えられる.

ICD誘導に関連して検出されるDAMPsは, 細胞, 誘導剤によって異なっている. Adenovirusやmeasles virusではin vitroでATPおよびHMGB1の細胞外への放出, CRTの細胞表面への露出を認めたため, ICDを生じたとされている[44], [46]. Bordeら[57]は, ヒト子宮内膜上皮細胞を用いてHSV-2の感染を行い, ウイルスの複製にしたがってアポトーシスを生じるが, その後のネクローシスにともなってHMGB1が放出されたとしている. また, Workenhら[8]は, ICP0遺伝子を欠失させたHSV-2によってヒト骨肉腫細胞からHMGB1が放出され, caspase-3が活性化されたがHSV-1での放出はなかったこと, しかし, 実験動物ではHSV-1投与で血中のHMBG1が上昇したことを報告している. ただ, どの細胞からDAMPsが放出されているのかは不明である. 今回, HSV-1 RH2によるin vitroにおける細胞外への放出および細胞表面への露出を明らかにしたことで, HSV-1でもICDが誘導されることが明らかとなった.

ICDの概念が提唱された時点では, ICDはimmunogenic apoptosisとも呼ばれ, 細胞死はアポトーシスによるとされていた. しかしながら, 研究の進歩によってネクローシス, プログラムされたネクローシスで

あるネクロプトーシス, オートファジーを伴う細胞死, パイロトーシスも ICD と関連することが示されている[43]. Adenovirus ではアポトーシスとネクローシス[44], coxsackievirus では caspase 依存的なアポトーシス[29], HSV-2 の感染によるマウス乳癌細胞では casapse-3 の活性化ともなうアポトーシスとされている[8]. 本研究で用いたマウス扁平上皮癌細胞では, RH2 を感染させると annexin V にも PI にも染色陽性細胞が増加し, アポトーシス後期あるいはネクローシスを生じることが分かった. しかし, アポトーシス細胞で見られる核の断片化はなく, データは示していないが caspase-3 の活性化もみられず, ネクローシスで特徴的な細胞および核の腫大がみられた. また, プログラムされたネクローシスであるネクロプトーシスについて阻害剤で検討したが, 阻害はみられずネクロプトーシスの可能性は否定的となった. したがって, RH2 感染で annexin V および PI で染色された細胞はアポトーシスではなくネクローシス細胞に近似すると考えられた. ただし, pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK の存在下では細胞傷害率は低下しており, アポトーシスに特徴的な caspase も活性化していると考えられた. これに関連して, 細菌やウイルスに感染したマクロファージでは caspase-1 が活性化して DAMPs の放出を伴う細胞死パイロトーシスを起こすことが報告されている. 現に caspase-1 阻害剤 Z-YVAD-FMK 存在下に RH2 感染を伴うと SCCVII 細胞での細胞傷害

率は低下した. パイロトーシスでは, ネクローシスと同様に細胞や核の腫大を特徴とする細胞形態を示す[58]. また Colunga ら[59]は, メラノーマにおける HSV-2 感染で caspase-1 に依存するプログラム細胞死が関与していると報告している. したがって、RH2 感染による細胞死には caspase-1 依存性のパイロトーシスが関与すると考えられた.

SCCVII 細胞を用いた担癌マウスの系で RH2 による腫瘍免疫の増強はすでに示されている[20]. 今回の研究で, 培養上清への ATP, HMGB1 の放出が確認され, この培養上清にも腫瘍免疫を増強する作用があるか否かを知るため, 上清濃縮液を 3 回の投与したところ, 腫瘍増殖は抑制され, 対照との間で有意差を認めた. この系ではウイルスを投与していないことから, RH2 感染によって放出された DAMPs が腫瘍免疫に関与していること, つまり RH2 感染によって ICD が生じ, 腫瘍増殖の抑制につながったと考えられた.

以上より, マウス扁平上皮癌の培養系で RH2 を感染させると, ATP, HMGB1 の放出, CRT の細胞表面への露出を伴う ICD を生じることが示唆された. RH2 感染により細胞死に至る過程で細胞外に放出された DAMPs が腫瘍抗原とともに腫瘍免疫の誘導に貢献すると言える. 今後, それぞれの DAMPs が腫瘍抗原の認識にどのように関与するのかを検討する必要がある.

結論

1. RH2 を SCCVII 細胞に感染させると, 細胞は円形化して浮遊し, 経時的に感染力価に依存した細胞傷害性がみられた.
2. RH2 を SCCVII 細胞に感染させると, 細胞外 ATP および細胞外 HMGB1 は増加し, 細胞質内の CRT は細胞表面に移行した. 細胞外 HSP70 には影響はなかった.
3. RH2 を SCCVII 細胞に感染させると, annexin V 染色陽性, 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.
4. RH2 感染 SCCVII 細胞をネクロプトーシス阻害剤 necrostatin-1 存在下で培養すると, 細胞傷害性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性は低下した.
5. マウス背部皮下に形成した腫瘍内に, ウイルスを不活化させた RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清濃縮液を投与すると, 腫瘍体積の増加が抑制された.

以上より, HSV-1 RH2 をマウス扁平上皮癌細胞に感染させると, caspase-1 依存性のパイロトーシスを起こし, DAMPs の細胞外への放出, 細胞表面への露出を伴う 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.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えて頂き，御指導，御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 (口腔外科学第二教室)，由良義明 教授に謹んで感謝の意を表します．また，本研究に対し特別の御配慮，御協力を頂きました口腔外科第二教室の皆様に厚く御礼申し上げます．

文献

[1] R. M. Diaz, F. Galivo, T. Kottke, P. Wongthida, J. Qiao, J. Thompson, M. Valdes, G. Barber, and R. G. Vile, “Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus.,” *Cancer Res.*, 67, 2840–8, 2007.

[2] R. J. Prestwich, F. Errington, E. J. Ilett, R. S. M. Morgan, K. J. Scott, T. Kottke, J. Thompson, E. E. Morrison, K. J. Harrington, H. S. Pandha, P. J. Selby, R. G. Vile, and A. Melcher, “Tumor infection by oncolytic reovirus primes adaptive antitumor immunity.,” *Clin. Cancer Res.*, 14, 7358–66, 2008.

[3] R. J. Prestwich, E. J. Ilett, F. Errington, R. M. Diaz, L. P. Steele, T. Kottke, J. Thompson, F. Galivo, K. J. Harrington, H. S. Pandha, P. J. Selby, R. G. Vile, and A. Melcher, “Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication.,” *Clin Cancer Res.*, 15, 4374–81, 2009.

[4] P. Wongthida, R. M. Diaz, F. Galivo, T. Kottke, J. Thompson, J. Pulido, K. Pavelko, L. Pease, A. Melcher, and R. Vile, “Type III IFN interleukin-28 mediates the antitumor efficacy of oncolytic virus VSV in immune-competent mouse models of cancer.,” *Cancer Res.*, 70,

4539–49, 2010.

[5] P. T. Sobol, J. E. Boudreau, K. Stephenson, Y. Wan, B. D. Lichty, and K. L. Mossman, “Adaptive antiviral immunity is a determinant of the therapeutic success of oncolytic virotherapy.,” *Mol Ther.*, 19, 335–44, 2011.

[6] I. Diaconu, V. Cerullo, M. L. M. Hirvinen, S. Escutenaire, M. Ugolini, S. K. Pesonen, S. Bramante, S. Parviainen, A. Kanerva, A. S. I. Loskog, A. G. Eliopoulos, S. Pesonen, and A. Hemminki, “Immune response is an important aspect of the antitumor effect produced by a CD40L-encoding oncolytic adenovirus.,” *Cancer Res.*, 72, 2327–38, 2012.

[7] P.-Y. Huang, J.-H. Guo, and L.-H. Hwang, “Oncolytic Sindbis virus targets tumors defective in the interferon response and induces significant bystander antitumor immunity in vivo.,” *Mol Ther.*, 20, 298–305, 2012.

[8] S. T. Workenhe, G. Simmons, J. G. Pol, B. D. Lichty, W. P. Halford, and K. L. Mossman, “Immunogenic HSV-mediated oncolysis shapes the antitumor immune response and contributes to therapeutic efficacy.,” *Mol Ther.*, 22, 123–31, 2014.

[9] B. D. Lichty, C. J. Breitbach, D. F. Stojdl, and J. C. Bell, “Going

viral with cancer immunotherapy.," *Nat Rev Cancer.*, 14, 559–67, 2014.

[10] J. Pol, N. Bloy, F. Obrist, A. Eggermont, J. Galon, and I. Cremer, "Oncolytic viruses for cancer therapy," *Oncoimmunology.*, 3, 1–13, 2014.

[11] H. L. Kaufman and S. D. Bines, "OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma," *Futur. Oncol.*, 6, 941–949, 2010.

[12] S. Andreansky, L. Soroceanu, R. Flotte, J. Chou, J. M. Markert, G. Y. Gillespie, B. Roizman, and R. J. Whitley, "Evaluation of genetically engineered herpes simplex viruses as oncolytic agents for human malignant brain tumors," *Cancer Res.*, 57, 1502–09, 1997.

[13] C. E. Wheeler, "The effect of temperature upon the production of herpes simplex virus in tissue culture," *J Immunol*, 81, 98–106, 1958.

[14] F. Ogawa, H. Takaoka, S. Iwai, K. Aota, and Y. Yura, "Combined oncolytic virotherapy with herpes simplex virus for oral squamous cell carcinoma," *Anticancer Res.*, 28, 3637–45, 2008.

[15] H. Takaoka, G. Takahashi, F. Ogawa, T. Imai, S. Iwai, and Y. Yura, "A novel fusogenic herpes simplex virus for oncolytic virotherapy of squamous cell carcinoma.," *Virol J.*, 8, 294, 2011.

[16] G. Takahashi, N. Meshii, M. Hamada, S. Iwai, and Y. Yura, “Sequence of a fusogenic herpes simplex virus, RH2, for oncolytic virotherapy.,” *J Gen Virol.*, 94, 726–37, 2013.

[17] A. Nakao, H. Kimata, T. Imai, T. .Kikumori, O. Teshigawara, T. Nagasaka, F. Goshima, and Y. Nishiyama, “Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent breast cancer,” *Ann Oncol.*, 15, 988–989, 2004.

[18] Y. Fujimoto, T. Mizuno, S. Sugiura, F. Goshima, S.-I. Kohno, T. Nakashima, and Y. Nishiyama, “Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma.,” *Acta Otolaryngol.*, 126, 1115–7, 2006.

[19] A. Nakao, H. Kasuya, T. T. Sahin, N. Nomura, A. Kanzaki, M. Misawa, T. Shirota, S. Yamada, T. Fujii, H. Sugimoto, T. Shikano, S. Nomoto, S. Takeda, Y. Kodera, and Y. Nishiyama, “A phase I dose-escalation clinical trial of intraoperative direct intratumoral injection of HF10 oncolytic virus in non-resectable patients with advanced pancreatic cancer.,” *Cancer Gene Ther.*, 18, 167–75, 2011.

[20] N. Meshii, G. Takahashi, S. Okunaga, M. Hamada, S. Iwai, A. Takasu, Y. Ogawa, and Y. Yura, “Enhancement of systemic tumor immunity for squamous cell carcinoma cells by an oncolytic herpes simplex

virus.," *Cancer Gene Ther.*, 20, 493–8, 2013.

[21] N. Casares, M. O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Métivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel, and G. Kroemer, "Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death.," *J Exp Med.*, 202, 1691–701, 2005.

[22] D. V Krysko, A. D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, and P. Vandenabeele, "Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy.," *Nat Rev Cancer.*, 12, 860–75, 2012.

[23] A. Israyelyan, E. J. Shannon, A. Baghian, M. T. Kearney, and K. G. Kousoulas, "Thalidomide suppressed the growth of 4T1 cells into solid tumors in Balb/c mice in a combination therapy with the oncolytic fusogenic HSV-1 OncdSyn.," *Cancer Chemother Pharmacol.*, 64, 1201–10, 2009.

[24] M. Nakamori, X. Fu, R. Rousseau, S.-Y. Chen, and X. Zhang, "Destruction of nonimmunogenic mammary tumor cells by a fusogenic oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity.," *Mol Ther.*, 9, 658–65, 2004.

[25] A. M. Ono K, Masunaga S, Akuta K, "Middle dose rate irradiation in

combination with carbogen inhalation selectively and more markedly increases the responses of SCCVII tumors," *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 29, 81–85, 1994.

[26] A. De Logu, G. Loy, M. L. Pellerano, L. Bonsignore, and M. L. Schivo, "Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by Santolina insularis essential oil," *Antivir. Res.*, 48, 177–185, 2000.

[27] P. W. Lyu SY, Rhim JY, "Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro.," *Arch Pharm Res.*, 28, 1293–1301, 2005.

[28] A. L. Angelova, S. P. Grekova, A. Heller, O. Kuhlmann, E. Soyka, T. Giese, M. Aprahamian, G. Bour, S. Rüffer, C. Cziepluch, L. Daeffler, J. Rommelaere, J. Werner, Z. Raykov, and N. Giese, "Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer.," *J Virol.*, 88, 5263–76, 2014.

[29] T. Okazaki, T. Marumoto, A. Takahashi, and K. Takayama, "Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. Cancer.," *Cancer Res.*, 72, 2609-21, 2012.

[30] a Tesniere, F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F.

Ghiringhelli, L. Aymeric, M. Michaud, L. Apetoh, L. Barault, J. Mendiboure, J.-P. Pignon, V. Jooste, P. van Endert, M. Ducreux, L. Zitvogel, F. Piard, and G. Kroemer, “Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin.,” *Oncogene.*, 29, 482–91, 2010.

[31] Y. Yoshioka, Y. Konishi, N. Kosaka, T. Katsuda, T. Kato, and T. Ochiya, “Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types,” *J Extracell Vesicles.*, 1, 1–9, 2013.

[32] Q. Sukkurwala, I. Martins, Y. Wang, F. Schlemmer, C. Ruckenstuhl, M. Durchschlag, M. Michaud, L. Senovilla, A. Sistigu, Y. Ma, E. Vacchelli, E. Sulpice, X. Gidrol, L. Zitvogel, F. Madeo, L. Galluzzi, O. Kepp, and G. Kroemer, “Immunogenic calreticulin exposure occurs through a phylogenetically conserved stress pathway involving the chemokine CXCL8.,” *Cell Death Differ.*, 21, 59–68, 2014.

[33] A. D. Garg, D. Nowis, J. Golab, P. Vandenabeele, D. V Krysko, and P. Agostinis, “Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation.,” *Biochim Biophys Acta.*, 1805, 53–71, 2010.

[34] T. Panaretakis, O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.-C. Bjorklund, D. C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D. B. Williams, and G.

Kroemer, “Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death.,” *EMBO J.*, 28, 578–90, 2009.

[35] M. Obeid, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J.-L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Métivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer, “Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death.,” *Nat Med.*, 13, 54–61, 2007.

[36] Tesniere, T. Panaretakis, O. Kepp, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, L. Zitvogel, and G. Kroemer, “Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death.,” *Cell Death Differ.*, 15, 3–12, 2008.

[37] C. Haanen, H. Steffens-nakken, and C. Reutelingsperger, “A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V,” *J Immunol Methods.*, 184, 39–51, 1995.

[38] G. Brumatti, C. Sheridan, and S. J. Martin, “Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells.,” *Methods.*, 44, 235–40, 2008.

[39] S. Jouan-Lanhouet, F. Riquet, L. Duprez, T. Vanden Berghe, N. Takahashi, and P. Vandenabeele, “Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models.,” *Semin Cell Dev Biol.*, 35, 2–13, 2014.

[40] Y. Matsuoka and Y. Tsujimoto, “Role of RIP1 in physiological enterocyte turnover in mouse small intestine via nonapoptotic death.,” *Genes Cells.*, 20, 11–28, 2015.

[41] B. Sangiuliano, N. M. Pérez, D. F. Moreira, and J. E. Belizário, “Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control.,” *Mediat. Inflamm.*, 2014, ID:821043, 2014.

[42] T. Bergsbaken, S. L. Fink, and B. T. Cookson, “Pyroptosis: host cell death and inflammation.,” *Nat Rev Microbiol.*, 7, 99–109, 2009.

[43] Z. S. Guo, Z. Liu, and D. L. Bartlett, “Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity.,” *Front Oncol.*, 4, 74, 2014.

[44] I. Liikanen, L. Ahtiainen, M. L. M. Hirvinen, S. Bramante, V. Cerullo, P. Nokisalmi, O. Hemminki, I. Diaconu, S. Pesonen, A. Koski, L. Kangasniemi, S. K. Pesonen, M. Oksanen, L. Laasonen, K. Partanen, T. Joensuu, F. Zhao, A. Kanerva, and A. Hemminki, “Oncolytic adenovirus with temozolomide induces autophagy and antitumor immune responses in cancer patients.,” *Mol Ther.*, 21, 1212–23, 2013.

[45] M. Moehler, K. Goepfert, B. Heinrich, C. J. Breitbach, M. Delic, P. R. Galle, and J. Rommelaere, “Oncolytic virotherapy as emerging immunotherapeutic modality: potential of parvovirus H-1.,” *Front*

Oncol., 4, 92, 2014.

[46] O. G. Donnelly, F. Errington-mais, L. Steele, E. Hadac, K. Scott, H. Peach, R. M. Phillips, J. Bond, K. Harrington, R. Vile, S. Russell, P. Selby, and A. Alan, "Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma," *Gene Ther.*, 20, 7–15, 2013.

[47] C. Koks, A. D. Garg, M. Ehrhardt, M. Riva, L. Vandenberk, L. Boon, S. De Vleeschouwer, P. Agostinis, N. Graf, and S. W. Van Gool, "Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death.," *Int J Cancer.*, 136, 313–25, 2015.

[48] F. Errington, L. Steele, R. Prestwich, K. J. Harrington, H. S. Pandha, L. Vidal, J. de Bono, P. Selby, M. Coffey, R. Vile, and A. Melcher, "Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity," *J Immunol.*, 180, 6018–6026, 2008.

[49] K. H. Chmielarczyk W, Domke I, "Role of interferon in the resistance of C3H/HeJ mice to infection with herpes simplex virus.," *Antivir. Res.*, 5, 55–9, 1985.

[50] F. Ghiringhelli, L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.-L. Perfettini,

F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Génin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. André, R. Lidereau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel, "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors.," *Nat Med.*, 15, 1170–8, 2009.

[51] D. D'Eliseo, L. Manzi, and F. Velotti, "Capsaicin as an inducer of damage-associated molecular patterns (DAMPs) of immunogenic cell death (ICD) in human bladder cancer cells.," *Cell Stress Chaperones.*, 18, 801–8, 2013.

[52] U. Andersson, H. Wang, K. Palmblad, A.-C. Aveberger, O. Bloom, H. Erlandsson-Harris, A. Janson, R. Kokkola, M. Zhang, H. Yang, and K. J. Tracey, "High mobility group 1 protein (Hmg-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes," *J Exp Med.*, 192, 565–570, 2000.

[53] G. Chen, MF. Ward, AE. Sama, H. Wang, "Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine.," *J Interferon Cytokine Res.*, 24, 329–333, 2004.

[54] S. J. Gardai, K. A. Mcphillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-ullrich, D. L. Bratton, P. Oldenborg, M.

Michalak, and P. M. Henson, “Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans -activation of LRP on the phagocyte,” *Cell.*, 123, 321–334, 2005.

[55] L. Zitvogel, O. Kepp, L. Senovilla, L. Menger, N. Chaput, and G. Kroemer, “Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway.,” *Clin Cancer Res.*, 16, 3100–4, 2010.

[56] N. D. C. Malini Raghavan, Sanjeeva J. Wijeyesakere, Larry Robert Peters, “Calreticulin in the immune system: ins and outs,” *Trends Immunol.*, 34, 13–21, 2014.

[57] C. Borde, S. Barnay-Verdier, C. Gaillard, H. Hocini, V. Maréchal, and J. Gozlan, “Stepwise release of biologically active HMGB1 during HSV-2 infection.,” *PLoS One.*, 6, e16145, 2011.

[58] S. L. Fink and B. T. Cookson, “Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages.,” *Cell Microbiol.*, 8, 1812–25, 2006.

[59] G. Colunga, J. M. Laing, and L. Aurelian, “The HSV-2 mutant DeltaPK induces melanoma oncolysis through nonredundant death programs and associated with autophagy and pyroptosis proteins.,” *Gene Ther.*, 17, 315–27, 2010.

脚注

大阪大学大学院歯学研究科　口腔外科第二教室

主任：由良義明 教授

本論文の要旨の一部は，第 59 回日本口腔外科学会(2014 年，千葉)，第 62 回日本ウイルス学会(2014 年，神奈川)，第 51 回日本口腔組織培養学会(2014 年，福岡)において発表した．

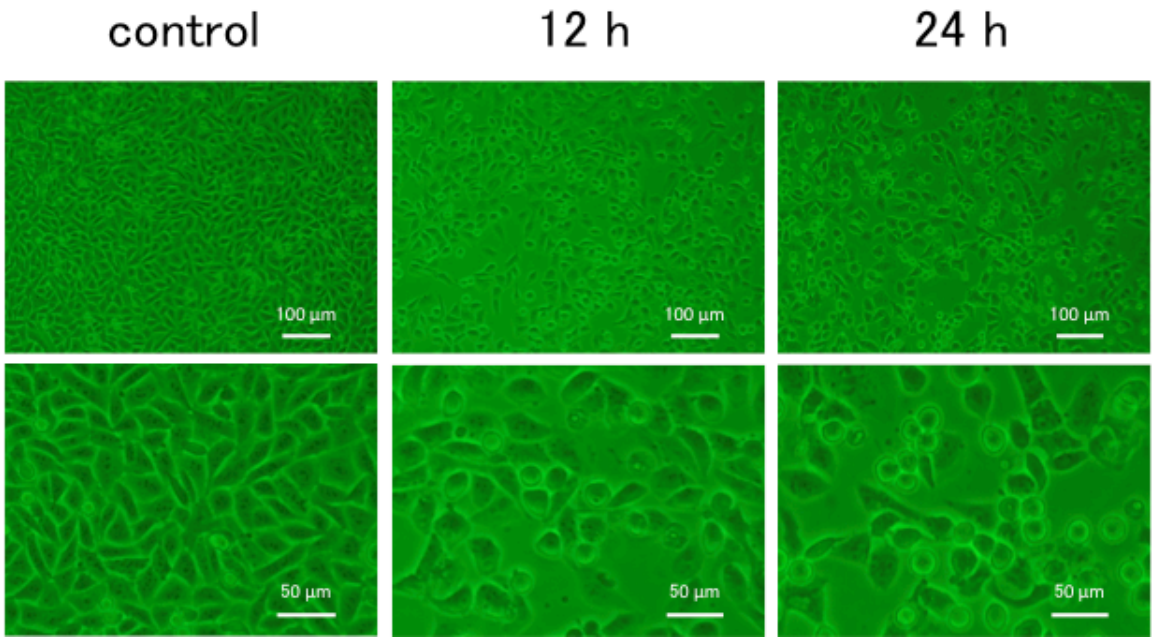


図 1　RH2 感染 SCCVII 細胞の細胞形態

SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で接種し, 12, 24 時間後に位相差顕微鏡像で観察した. 下段は上段の拡大像で, 感染 12 時間後には円形化した細胞が出現し, 感染 24 時間後には細胞の浮遊像がみられた.

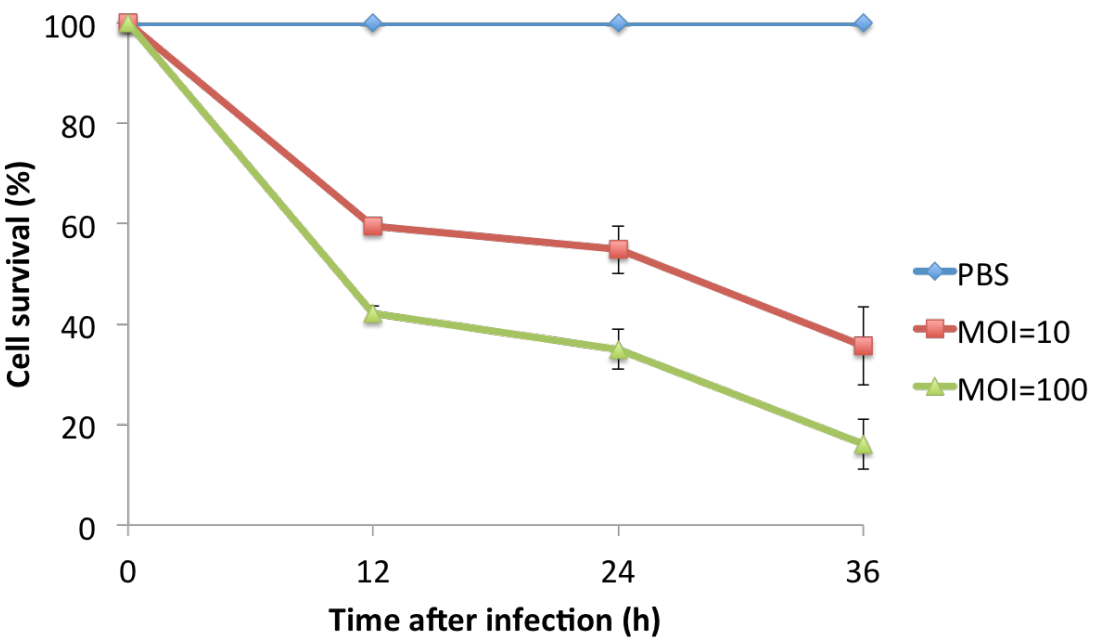


図 2　RH2 感染 SCCVII 細胞における生細胞率

SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10, 100 で接種し, 12, 24, 36 時間後に MTT assay を行い, 非感染対照と比較した生細胞率を求めた. いずれの MOI でもすべての実験時間で非感染対照との間に有意差 (P<0.05) を示した. 値は mean±SD を示す. n=5

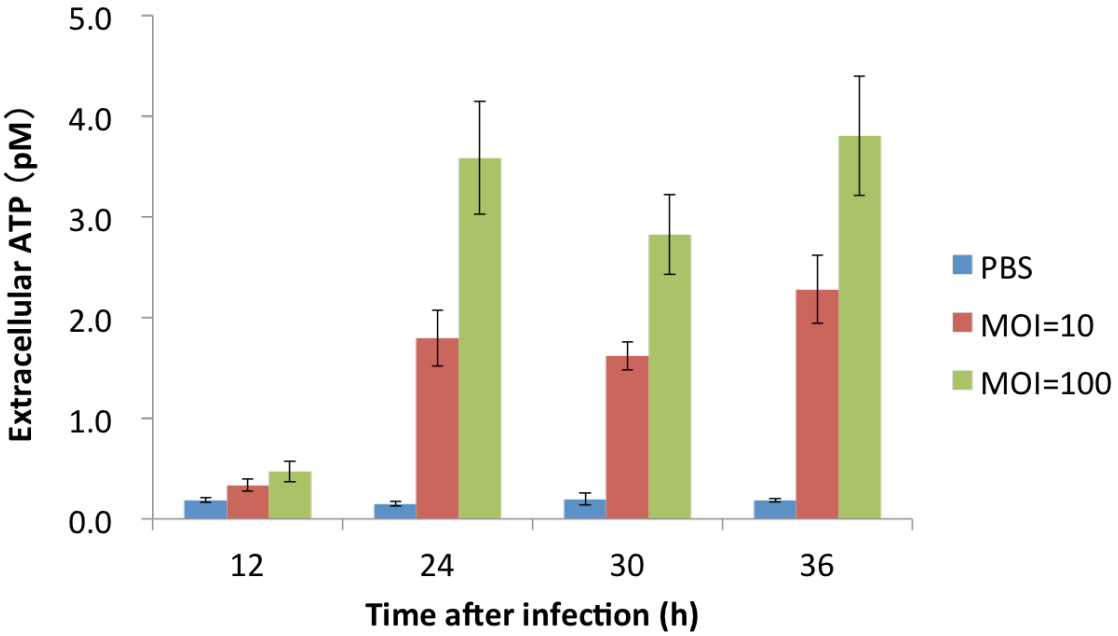


図 3　RH2 感染 SCCVII 細胞の細胞外 ATP 量

SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10, 100 で接種し, 12, 24, 30, 36 時間後の培養上清中の細胞外 ATP 量を測定した. いずれの MOI でも感染 12 時間後には非感染対照との間に有意差 (P<0.05) がみられた. n=4

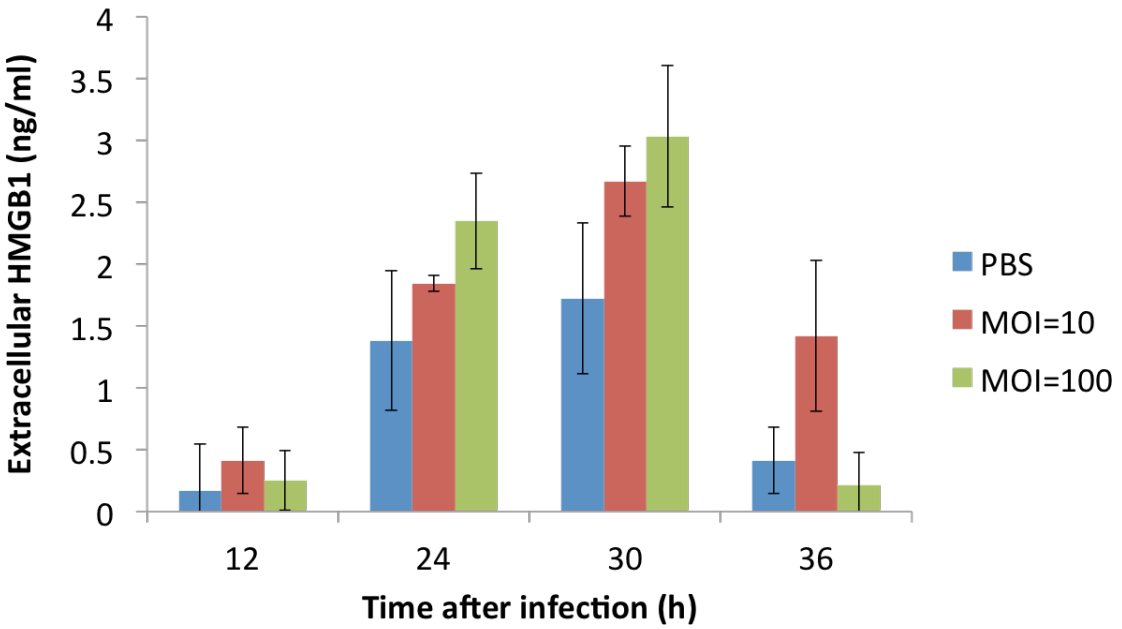


図 4　RH2 感染 SCCVII 細胞の細胞外 HMGB1 量

SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10, 100 で接種し, 12, 24, 30, 36 時間後の培養上清中の細胞外 HMGB1 量を測定した. MOI=10 で感染させた場合, 感染 30 時間後に非感染対照との間に有意差 (P<0.05) がみられた. MOI=100 で感染させた場合, 感染 24 時間後に非感染対照との間に有意差 (P<0.05) がみられた. n=4

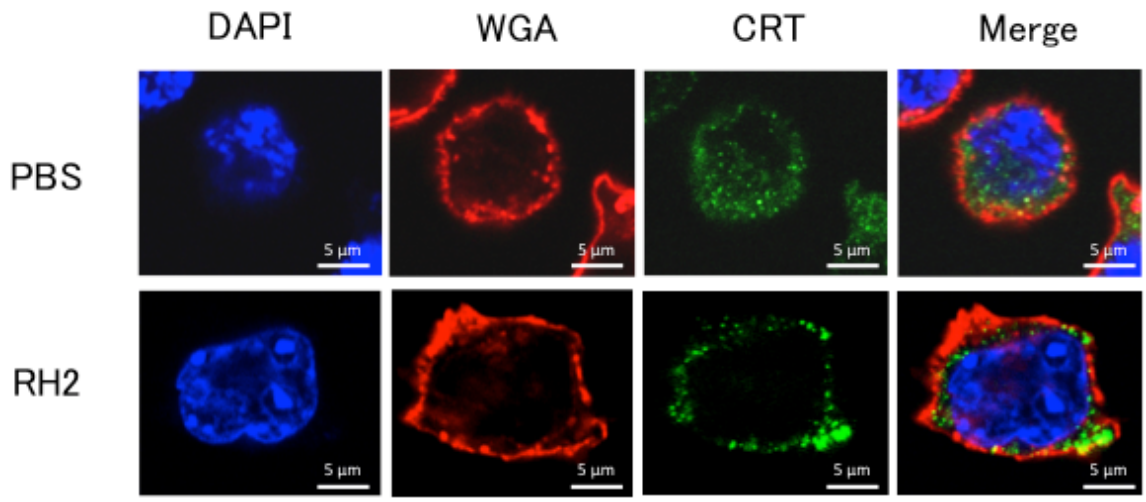


図 5　RH2 感染 SCCVII 細胞における CRT の細胞内局在

SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で接種し，感染 24 時間後に細胞の CRT を蛍光染色し，共焦点レーザー顕微鏡で観察した．青色は核を，赤色は細胞膜を，緑色は CRT を示す．上段の非感染対照では CRT は細胞質内にびまん性に観察されたのに対し，下段の感染細胞では CRT は細胞膜に集積した．

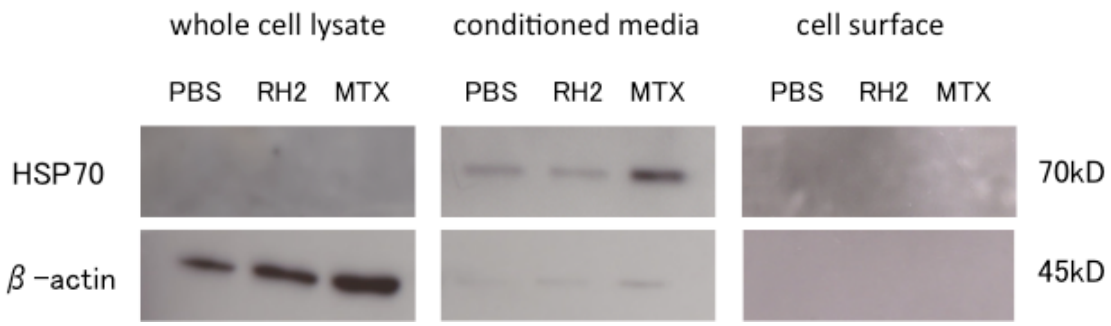


図 6　RH2 感染 SCCVII 細胞における HSP70 の発現

SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で接種し，感染 24 時間後の培養上清，全細胞タンパク質抽出液および細胞膜画分における HSP70 の発現をウエスタンブロットにて検出した．HSP70 は，陽性コントロールとした mitxantrone; MTX (2μM) で処理した細胞の培養上清中で増加したが，RH2 感染群では非感染対照と比較して変化はみられなかった．全細胞タンパク質抽出液ならびに細胞膜画分では HSP70 は検出されなかった．

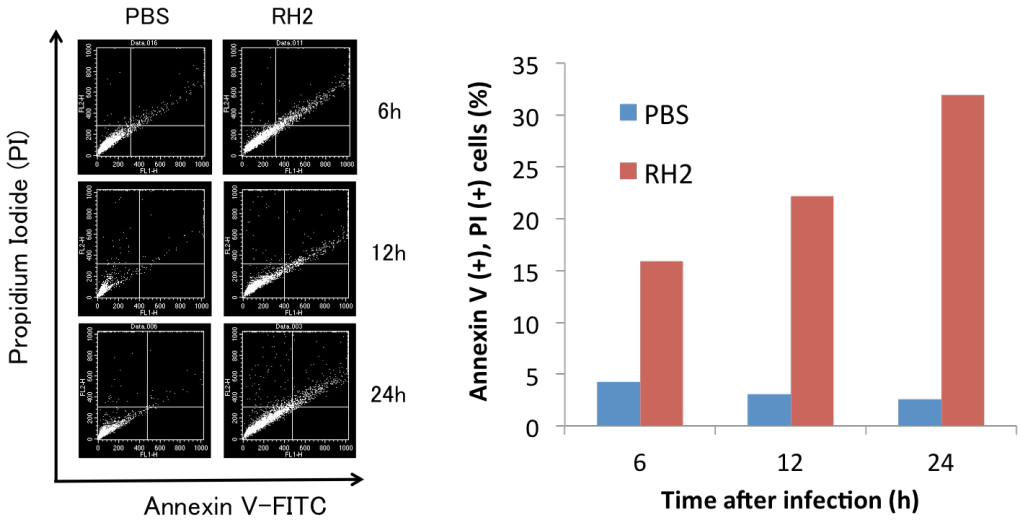
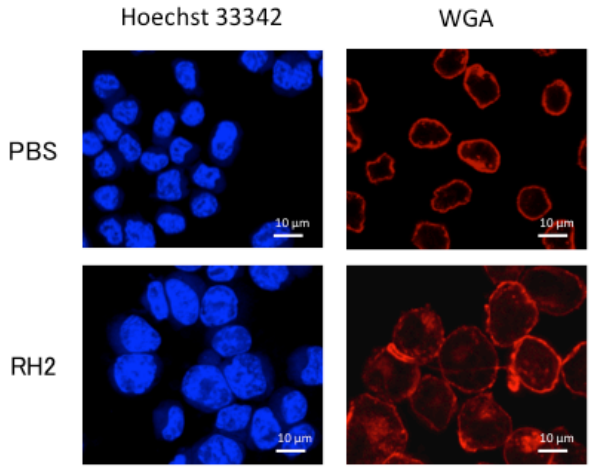


図 7　RH2 感染 SCCVII 細胞の annexin V および propidium iodide (PI) 染色性

SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で接種し, 6、12、24 時間後の annexin V および propidium iodide (PI) の染色性をフローサイトメトリーにて解析した. annexin V 染色陽性かつ PI 染色陽性細胞が増加し, その割合は感染 24 時間で 32%に達した. 値は 2 検体の平均を示す.

A



B

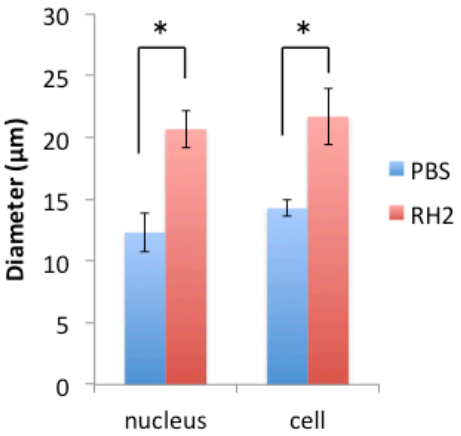


図 8

A)　RH2 感染 SCCVII 細胞の細胞および核の形態

SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で接種し，感染 24 時間後に細胞膜および核を蛍光染色し，共焦点レーザー顕微鏡で観察した．RH2 感染細胞では細胞および核の腫大がみられた．核の断片化はみられなかった．

B)　RH2 感染 SCCVII 細胞の核および細胞の直径

A)でみられた RH2 感染 SCCVII 細胞の核および細胞の直径を測定した．非感染対照と比較して両群間で有意差 (P<0.05) がみられた．n=3

A

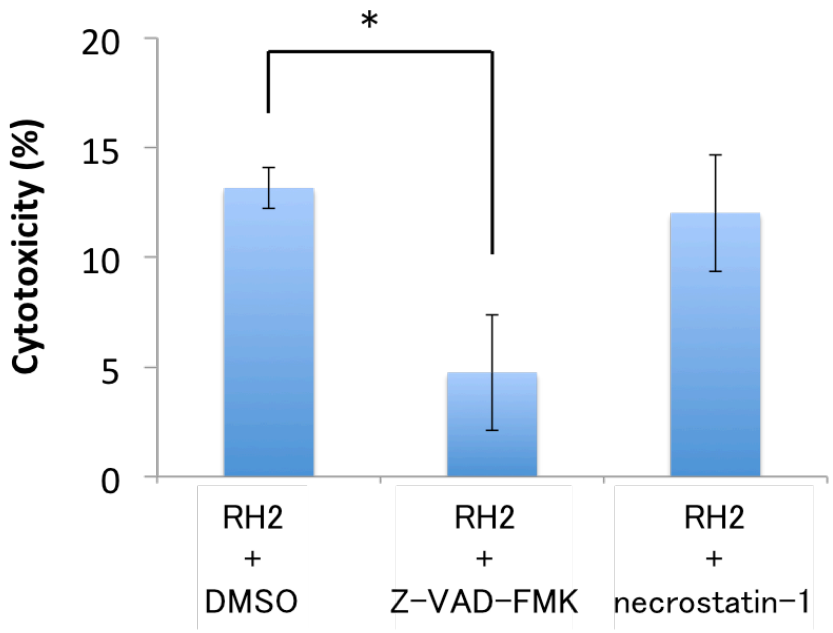
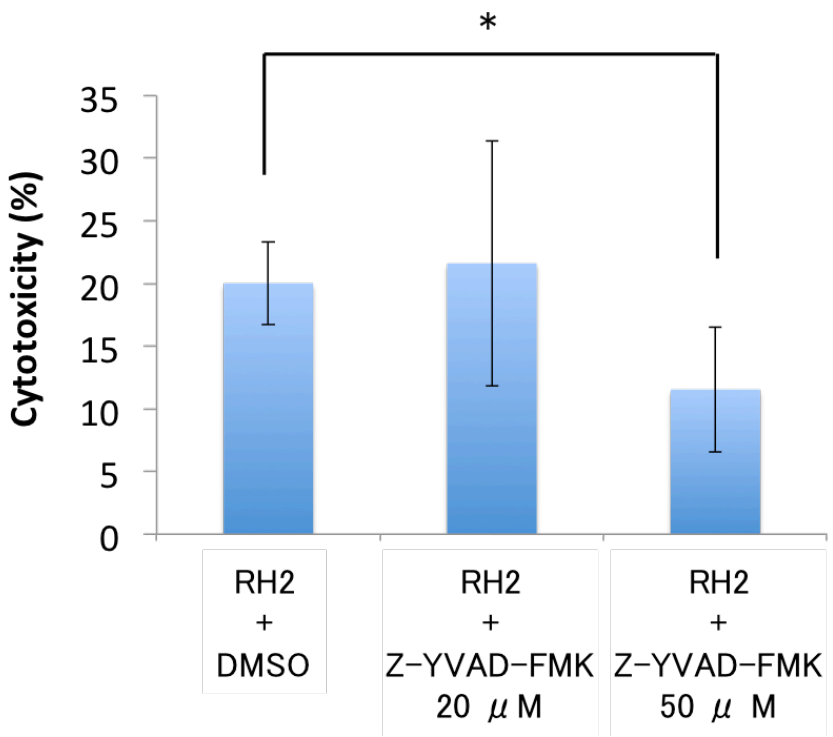


図 9　細胞死阻害剤存在下における RH2 感染による SCCVII 細胞の細胞傷害率の変化

A)　SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で接種し，細胞死阻害剤存在下における感染 24 時間後の細胞傷害率を LDH release assay より算出した．阻害剤はアポトーシス阻害剤 Z-VAD-FMK (10μM)，ネクロプトーシス阻害剤 necrostatin-1 (20μM) を用いた．対照と Z-VAD-FMK との間で有意差 (P<0.05) がみられた．n=4

B



B)　SCCVII 細胞に RH2 を MOI=10 で接種し，パイロトーシス阻害剤 Z-YVAD-FMK (20μM, 50μM) 存在下における感染 24 時間後の細胞傷害率を LDH release assay より算出した．対照と Z-YVAD-FMK (50μM) との間で有意差 (P<0.05) がみられた．n=4

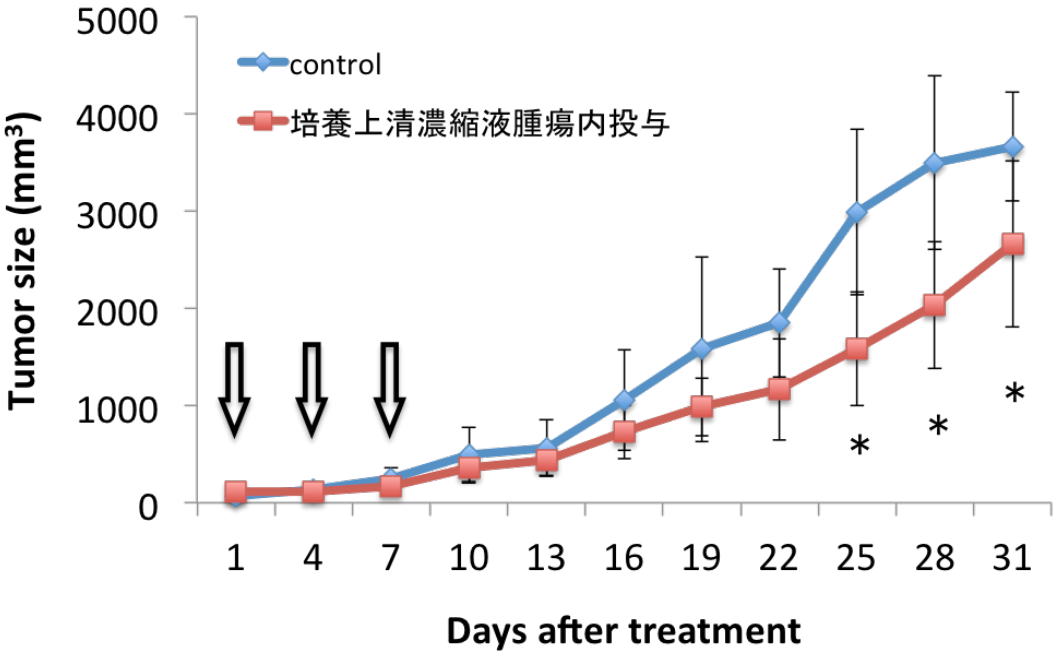


図 10　RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清濃縮液を投与した担癌近交系マウスにおける腫瘍体積の変化

C3H マウスの背部皮下に SCCVII 細胞を接種して形成した腫瘍に，RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清濃縮液を投与し，経時的に腫瘍体積を測定した．対照群には PBS(-)を投与した．25 日目以降に培養上清濃縮液を投与した群の腫瘍と非投与群の腫瘍との間で有意差 (P<0.05) がみられた．