The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腫瘍融解性ウイルス感染にて扁平上皮癌細胞から放出される腫瘍免疫増強因子に関する研究
Author(s)	多田, 晋也
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56132
rights	This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
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　（　多田　晋也　）	
論文題名	腫瘍融解性ウイルス感染にて扁平上皮癌細胞から放出される腫瘍免疫増強因子に関する研究

論文内容の要旨

【背景】

腫瘍融解性ウイルス療法（ウイルス療法）は腫瘍細胞に弱毒化ウイルスを感染させ，細胞変性効果で腫瘍を破壊する方法で，腫瘍免疫を増強することも報告されている．当教室では単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）R849株と自然変異体であるHF株との組換え体であるHSV-1 RH2を開発し，近交系マウスの扁平上皮癌（SCC）に対する腫瘍内投与でその抗腫瘍効果を確認している．

従来から，致死的な傷害を受けた腫瘍細胞が腫瘍ワクチンとして働くことは知られていたが，最近doxorubicinなどで腫瘍免疫増強効果が判明し免疫原性細胞死（ICD：Immunogenic cell death）の概念が提唱されている．ICDをきたす過程では，damage-associated molecular patterns（DAMPs）と呼ばれる分子が細胞表面に発現あるいは細胞外に放出され，免疫細胞を動員するとされている．ウイルス療法におけるICDの研究はまだ十分に進んでいない．

われわれの系でもウイルスの腫瘍内投与で腫瘍免疫にかかわるDAMPsに相当する因子が産出されると推察される．本研究では，まず細胞外に放出される因子の関与を知るため，感染SCC細胞の培養上清から試料を調整し，樹状細胞（DC），$CD4^+$T細胞，$CD8^+$T細胞に対する活性化能の検討ならびにDAMPsとして働く因子についてのプロテオーム解析を行った．

【材料と方法】

1. C3H/HeJJc1近交系雌マウス，マウス扁平上皮癌由来SCCⅦ細胞，マウスリンパ腫由来Yac-1細胞を用いた．SCCⅦ細胞を両側の下肢基部皮下に接種して腫瘍を形成した．
2. SCCⅦにHSV-1 RH2を多重感染度（MOI：multiplicity of infection）10で接種しイーグル最小必須培地（MEM）で12時間，24時間培養した上清，対照としてリン酸緩衝液を用いた培養上清を回収して，30倍に濃縮し，UVを照射したそれぞれの試料をMed-12，Med-24，Med-Cと命名した．
3. マウス腫瘍に試料を3回腫瘍内投与し，腫瘍あるいは脾臓からリンパ球を調整した．DC，$CD4^+$T細胞，$CD8^+$T細胞は抗体結合ビーズを用いて分離した．
4. TNF-α，IFN-γの測定にはELISA法を用いた．免疫細胞のDNA合成能はBrdU incorporation assayにて測定した．
5. 腫瘍組織を単一腫瘍細胞に分散させ，FITC標識した抗CD8抗体を反応させたのち，flow cytometryで$CD8^+$T細胞を測定した．
6. 細胞傷害性は遊離LDH量測定法にて測定した．
7. 試料中のタンパク質はExactive質量分析計を用い，iTRAQ法にて解析した．

【結果】

1. SCCⅦ担癌マウスから調整したDCをMEM，Med-12，Med-24，Med-Cあるいはlipopolysaccharideと培養し，DCから産出されるTNF-αを測定したところ，Med-12，Med-24では，対照となるMed-Cと比較して，それぞれ1.2，1.3倍となった．
2. DCによるリンパ球の活性化を明らかにするため，Med-24処理したDCと担癌マウス脾臓から調整した$CD4^+$T細胞，$CD8^+$T細胞を1：9の割合で共培養し，産出されるIFN-γを測定した．その結果，$CD4^+$T細胞，$CD8^+$T細胞ともにIFN-γが対照の1.2倍となった．共培養後，$CD8^+$T細胞へのBrdU取り込みも増加した．
3. ウイルスと同様に腫瘍免疫活性化がみられるかを調べるために，Med-24をマウスの片側の腫瘍内に投与し，14日後に両側腫瘍を摘出して組織像を観察した．Med-24投与群では両側の腫瘍でリンパ球の遊走が多くみられた．遊走す

るCD8^{+}T細胞をflow cytometryで測定すると，Med-24投与群では両側腫瘍で遊走CD8^{+}T細胞が増加した．

4. Med-24をSCCⅦ腫瘍内に投与したマウスから脾臓リンパ球を調整し，SCCⅦ細胞と共培養するとIFN-γが対照の3.0倍となった．細胞傷害性も増大した．Yac-1細胞と共培養した場合，IFN-γ産生増加はみられなかった．
5. Med-24，Med-Cに含まれる因子に対してタンパク質の網羅的解析を行った．HSV-1 RH2感染によって出現，増加，減少する1756個のタンパク質が検出された．Med-24とMed-Cとの間で有意差を認めたのは440種類で，そのうちMed-24で増加したのは291個，減少したのが149個であった．これらはほとんどが既知のタンパク質であった．DAMPs関連タンパク質ではheat shock protein（HSP）90，105やATP synthaseの増加がみられた．

【考察と結論】

SCCⅦ担癌マウスのDCをMed-24で処理すると成熟化し，このDCとリンパ球を共培養すると，IFN-γの産出量が上昇しCD4^{+}T細胞ならびにCD8^{+}T細胞の活性化も明らかとなった．ウイルスの代わりにMed-24をSCCⅦ腫瘍内へ投与した場合もCD8^{+}T細胞の腫瘍内遊走の増大，反対側腫瘍への同程度の細胞遊走がみられ，全身的に細胞傷害性CD8^{+}T細胞が誘導され腫瘍局所に動員されたものと考えられた．遊走リンパ球が腫瘍細胞を攻撃するか否かを知るため，Med-24投与マウスの脾臓リンパ球とSCCⅦ細胞を共培養したところ，IFN-γの産生が増加し，強い細胞傷害性を示した．一方，系統の違うYac-1細胞ではIFN-γ産生の増加はなく，SCCⅦ細胞に特異的な免疫が惹起されることも分かった．

培養上清のプロテオーム解析では，DAMPsに属するHSP，ATPに関連するHSP90，105，ATP synthaseなどの増加が明らかとなり，RH2感染によるこれらの因子の細胞外への放出増加がICDを介した腫瘍免疫を増強した1つの要因であると考えられる．Med-24で有意に増加した291種類のうち既知のDAMPs関連タンパク質はわずかに7種類であることから，他にDAMPsとして働く新規の因子が含まれていると考えられる．またDAMPsとして働く因子だけでなく腫瘍抗原として働く因子が含まれる可能性もある．

以上より，RH2感染SCCⅦ細胞培養上清ではATP，HSPなどの腫瘍免疫増強因子が増加しており，SCCⅦ腫瘍に対する特異的な免疫増強を誘導することが示唆された．今後，培養上清だけでなく，感染細胞表面に発現するタンパク質を解析することで、ウイルス療法にともなう腫瘍免疫増強機構の解明につながるものと考えられる．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　多田　晋也　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	由良　義明
	副 査	教授	川端　重忠
	副 査	准教授	大倉　正也
	副 査	講師	伊藤　祥作

論文審査の結果の要旨

本研究は、癌の腫瘍融解性ウイルス療法における腫瘍免疫の関与について単純ヘルペスウイルス 1 型 RH2 株を用いて検討したものである。その結果、RH2 が感染した扁平上皮癌細胞からは、樹状細胞の成熟を促進し、$CD4^{+}$T 細胞と $CD8^{+}$T 細胞を活性化する因子が放出されること、そのなかに免疫増強に働く damage-associated molecular patterns（DAMPs）が存在することを明らかにした。

以上は、腫瘍融解性ウイルス療法における放出腫瘍免疫増強因子の関与を示したものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。