



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

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第二教室

多田 晋也

緒言

現在の口腔癌に対する標準治療は手術，化学療法，放射線治療を主体としたものである．原発巣の制御において進歩はみられているが，口腔癌の約 50%で領域リンパ節転移があり，その制御が予後を大きく左右するとされている¹⁾．さらに，標準治療で対応できない進展例，原発巣の再発，繰り返す二次性の原発癌，放射線治療後の頸部再発に対する治療が大きな課題となっている．最近では，腫瘍ワクチンや抗体などによる免疫療法²⁾，遺伝子療法³⁾，陽子線や炭素線を用いた粒子線治療⁴⁾，ホウ素中性子捕捉療法⁵⁾などの基礎的研究が進み，臨床への応用も行われているが，原発巣だけでなくリンパ節転移の両方に対して有効で，従来の治療とは作用メカニズムが異なり，しかも重篤な後遺症を残さず副作用の少ない新規の治療法が望まれている．病原性微生物であるウイルスを癌治療に用いる試みは古くから研究がされてきた．また，遺伝子治療の一環として癌抑制遺伝子を組み込んだウイルスを腫瘍に投与する臨床研究も行われたが，安全性を考え複製できないウイルスベクターを用いたため，生残した腫瘍細胞の増殖によって治療効果は失われることになった．これに対して，1991 年に Martuza ら⁶⁾は，遺伝子操作で弱毒化した複製可能型単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1: herpes simplex virus type1）を用いて実験的な脳腫瘍の治療を行い，腫瘍に感染したウイルスが複製して腫瘍を破壊する瘍融解性ウイルス療法の端緒を開いた．

この腫瘍融解性ウイルス療法（ウイルス療法）は，本質的にウイルス複製に

伴う細胞変性効果によって宿主である腫瘍細胞を破壊する治療法であるため、ウイルスは HSV-1 に限定されず、その後アデノウイルス、レオウイルス、ワクシニアウイルスなど少なくとも 12 種類のウイルスで基礎的研究が進み、多くで臨床研究の段階に進むこととなった⁷⁻¹¹⁾。HSV-1 は成人の大部分がすでに感染して免疫を獲得していること、遺伝子配列の大半が機能とともに明らかになり外来遺伝子を組み込める遺伝子サイズであること、ウイルスの thymidine kinase (TK) に特異的な抗ウイルス薬 aciclovir が開発されているためいつでもウイルス感染を中断できることなどから、ベクターとしての優位性が高い¹²⁻¹⁵⁾。臨床に使用される HSV-1 としては脳炎を引き起こす神経毒性遺伝子 $\gamma 34.5$ を欠失した変異型が主で、生命予後が極めて悪い悪性黒色腫を対象として phase III の臨床研究が行われ¹²⁾、最近、欧州の European Medicines Agency (EMA) ならびに米国の Food and Drug Administration (FDA) から悪性黒色腫を対象とした承認が得られている。メラノーマの予後が悪い要因のひとつは遠隔転移を生じることであり、HSV-1 を直接投与していない病巣や遠隔転移した臓器においても縮小効果がみられる¹⁶⁾ことから、腫瘍免疫を増強する効果も重視されている。また、頭頸部癌のリンパ節転移症例を対象として、標準治療に加えて転移リンパ節にウイルスを投与する方法で臨床研究が行われ、有効性が認められている¹³⁾。

本研究室では、HSV-1 野生株である F 株の神経毒性遺伝子 $\gamma 34.5$ を欠失させ、そこに LacZ 遺伝子が挿入された R849 株と、自然変異体で病原性が低下し

た HF 株との組換え体を開発し，RH2 と命名した．そして，RH2 の全塩基配列を決定し， γ 34.5 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を報告した¹⁷⁾．RH2 はヒト口腔扁平上皮癌（SCC: squamous cell carcinoma）に感染すると細胞融合を伴う細胞変性を示し，ヌードマウス腫瘍に投与すると同様の細胞変性効果を示し腫瘍増殖を抑制する．さらに，免疫機能が健全な近交系マウスに SCC を形成する実験モデルにおいて，腫瘍に RH2 を投与すると腫瘍増殖が抑制されるだけでなく，ウイルスを投与していない部位の腫瘍に対しても増殖抑制効果を発揮すること，すなわち CD8⁺T 細胞の関与する腫瘍免疫が増強することを明らかにされている¹⁸⁾．

このようなウイルス療法における腫瘍免疫の活性化は多くのウイルスや実験系でも確認されている^{19,20)}．腫瘍免疫増強のメカニズムとしては，樹状細胞を主とする抗原提示細胞の成熟化，抗原提示によるナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞への活性化，細胞傷害性 CD8⁺T 細胞の活性化といった過程²¹⁻²⁴⁾をへて発揮されると推察されるが，詳細な解析を行った報告は少ない．

ウイルス療法において腫瘍免疫が活性化されるためには，腫瘍でのウイルス感染によって腫瘍細胞が破壊され腫瘍抗原をはじめとする免疫賦活化物質が放出あるいは細胞表面に露出することが必要となる．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^{26,27)}が，最近 doxorubicin など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^{28,29)}．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ことで腫瘍免疫を増強するとされている³⁰⁻³²⁾．ウイルス感染における ICD の研究も散見される³³⁻³⁵⁾．

ウイルス療法は直接的な作用と腫瘍免疫による間接的な作用で効果を発揮するが，腫瘍免疫の誘導には DAMPs の研究で示されているように，感染細胞から放出される因子ならびに細胞表面に露出する因子が免疫細胞の遊走，活性化に働くと推察される．そのため，感染性ウイルスを用いない実験系で腫瘍免疫活性化能を検討する必要がある．本研究では，免疫賦活能を示すタンパク質の網羅的解析を念頭に置き，HSV-1 感染腫瘍細胞から放出される因子に着目して，感染細胞培養上清を用いて樹状細胞成熟，ナイーブ T 細胞の活性化，増殖，細胞傷害性 T 細胞の腫瘍内遊走，T 細胞の活性能を検討し，さらに含まれるタンパク質の詳細についてプロテオーム解析を行った．

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、natural killer 細胞に感受性が高いとされるマウスリンパ腫由来 Yac-1 細胞を用いた。Vero 細胞、Yac-1 細胞は理化学研究所 Cell Bank (Ibaraki) 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より分与された。Vero 細胞は Eagle の最小必須培地 minimum essential medium (MEM; Nissui, Tokyo) に 2 mM L-glutamine (Wako, Osaka), 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% CO₂ 存在下に 37°C 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。Yac-1 細胞は 10% の牛胎児血清 fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences) を添加した RPMI Medium 1640 (Gibco, Birmingham, MI, USA) に 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を加えたものを培養液とした。Vero 細胞、SCCVII 細胞は 0.1% trypsin (Nacalai Tesque, Kyoto) と 1% ethylenediaminetetraacetic 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。力価はブラック形成法にて測定した。すなわち、Vero 細胞を

24 well plate に 2×10^5 cells/well 播種して，2 日間培養し単層を形成させ，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，未吸着のウイルスを除去した後，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，細胞変性部位に一致して得られるブラック数を数え，希釈倍率から感染力価 plaque forming unit (PFU) を算出した³⁵⁾．

3. 培養上清濃縮液の調整

SCCVII 細胞に RH2 を multiplicity of infection (MOI) =10 で感染させ，無血清培養液にて培養した．12 時間後，24 時間後の培養上清それぞれ Med-12, Med-24 として，1,500 rpm，10 分間遠心して死細胞を除去し，培養上清を分離した．得られた培養上清を Amicon® Ultra-15 3K Centrifugal Filter Devices (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて 6,500 rpm，120 分間遠心分離し，タンパク質を 30 倍に濃縮した．濃縮液中のウイルスは 0.15 mW/cm^2 ，30 分間の紫外線照射により不活化し， $0.20 \mu\text{m}$ filter (ADVANTEC®) にて濾過滅菌した．対照として PBS を使用したものを Med-C とし，24 時間後に培養上清を回収して濃縮した．

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による TNF- α 測定

5 週齢メスの近交系マウス C3H/HeJJcl (Clea, Tokyo) の背部皮下に PBS(-) で調整した SCCVII 細胞 1×10^6 cells/100 μ l を, 27G 注射針にて接種し, 腫瘍を形成した. 腫瘍長径が 5 mm に達してから 2 週間後に脾臓細胞を FBS-free RPMI 1640 で懸濁し, CD11c MicroBeads mouse (Miltenyi Biotec) を細胞当たり 1×10^6 /100 μ l, 4°C で 15 分間反応させた後, auto MACS Rinsing Solution (Miltenyi Biotec) と MACS BSA Stock Solution (Miltenyi Biotec) を 9 ; 1 で混和した MACS buffer を用いて洗浄し, 再懸濁した. LS column (Miltenyi Biotec) を magnetic separator である MidiMACS (Miltenyi Biotec) に装着して, positive selection で CD11c⁺細胞である樹状細胞を回収した. 1,500 rpm, 5 分間遠心し上清除去後, 10%FBS 含有 RPMI 1640 に 500 units/ml penicillin, 500 μ g/ml streptomycin, 10 ng/ml granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), 10 ng/ml IL-4 を加えた培養液で再懸濁した^{22,36)}. 24 well plate に Med-12, Med-24, Med-C, 無血清 MEM, 1 μ g/ml Lipopolysaccharide (LPS; Wako) を 100 μ l/well 加え, 樹状細胞を 2×10^5 /well となるように播種し, 500 μ l/well となるように 10%FBS 含有 RPMI 1640 を加えて培養した. 48 時間後, 培養液を回収し 1,500 rpm, 10 分間遠心し, 死細胞を除去後, Quantikine® ELISA mouse TNF- α (R&D Systems) を用いて TNF- α を測定した^{22,37)}. すなわち, キット付属の抗体結合プレートに検体希釈液 50 μ l および得られた培養上清を 50 μ l を分注して 2 時間室温で反応させた後, 付

属の Wash Buffer で 5 回洗浄し，標識抗体液を 100 μ l 加えて 2 時間反応させた．Wash Buffer で再度 5 回洗浄してから発色試薬を 100 μ l 加え 30 分間後に，反応停止液を 100 μ l 加えて，マイクロプレートリーダー（Benchmark Plus; Bio-Rad）にて 450 nm の吸光度を測定した．TNF- α 希釈標準液より検量線を作成し吸光度から TNF- α 濃度を算出した．

5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による樹状細胞と T 細胞の共培養により放出される IFN- γ 測定

RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清で反応した樹状細胞がリンパ球を活性化させるか検討するため，SCCVII 腫瘍担癌マウスの腫瘍形成 2 週間後に脾臓より樹状細胞，リンパ球を回収した．24 well plate に無血清 MEM，Med-24 あるいは Med-C を 300 μ l 加え， 1×10^6 /ml に調整した樹状細胞懸濁液を 200 μ l 混和し，20 分おきに震盪しながら 3 時間，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 存在下で培養し，この 3 時間刺激した樹状細胞を pulsed dendritic cell (pDC) と表現する^{22,38}).

リンパ球は脾臓細胞懸濁液を Lympholyte®-M (CEDARLANE, Burlington, ON, Canada) に重層するように加え，3,500 rpm，20 分間遠心して，境界に分離されたリンパ球層を回収し，10%FBS 含有 RPMI 1640 に懸濁後，2,600 rpm，10 分間の遠心を 2 回繰り返し調整した．さらに CD4⁺T 細胞を調整するため，リンパ球を MACS Buffer 90 μ l に懸濁し，CD4 (L3T4) MicroBeads (Miltenyi Biotec) を 10^7 細胞あたり 10 μ l 加えて 15 分間，4 $^{\circ}$ C で反応させた．洗浄後，

LS column を MidiMACS に装着して, positive selection で CD4⁺T 細胞を回収し, 1×10^5 /ml に調整した³⁹⁾. 同様に CD8⁺T 細胞を調整するため, CD8a⁺ T cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を使用した⁴⁰⁾. 簡単に説明すると, リンパ球懸濁液を 40 μ l の MACS buffer に懸濁し, Biotin-Antibody Cocktail を 10^7 細胞あたり 10 μ l 加えて 10 分間, 4°C で反応させた. MACS buffer を 30 μ l, Anti-Biotin MicroBeads を 20 μ l 加えて 15 分間, 4°C で反応させた. 洗浄後, LS column, MidiMACS を用いて depletion selection で, CD8⁺T 細胞を回収し, 1×10^5 /ml に調整した. 24 well plate に各 T 細胞を 450 μ l と, 各 pDC を 50 μ l ずつ加えて, 9;1 比で培養し, 48 時間後培養液を回収して 1,500 rpm, 10 分間遠心して死細胞を除去した. Quantikine® ELISA mouse IFN- γ (R&D Systems) を用いて培養液中の IFN- γ を測定した^{22,41)}. すなわち, キット付属の抗体結合プレートに検体希釈液 50 μ l および得られた培養上清を 50 μ l を分注し, 2 時間室温で反応させた後, 付属の Wash Buffer で 5 回洗浄し, 標識抗体液を 100 μ l 加えて 2 時間反応させた. Wash Buffer で再度 5 回洗浄してから発色試薬を 100 μ l 加え 30 分間後に, 反応停止液を 100 μ l 加えて, マイクロプレートリーダーにて 450 nm の吸光度を測定した. IFN- γ 希釈標準液より検量線を作成し吸光度から IFN- γ 濃度を算出した.

6. 樹状細胞と共培養した T 細胞に対する BrdU incorporation assay

リンパ球の増殖能を評価するため, BrdU 取り込み法を用いた. 96 well plate

に 1×10^5 /ml の各 pDC を 10 μ l 加えて，そこに同濃度の CD4⁺T 細胞あるいは CD8⁺T 細胞を 90 μ l 加え 56 時間共培養した．測定には BrdU ラベリング & デテクションキットⅢ (Roche) を使用した^{42,43)}．付属の BrdU ラベリング溶液を 10 μ l 加えて 37℃ で 6 時間培養し，マイクロプレート用遠心分離機 (KN-70、KUBOTA) で 1,200 rpm，10 分間遠心してから上清を除去し 60℃，2 時間乾燥させた．あらかじめ冷やしておいた付属の固定液を 200 μ l 加え，-30℃ で 30 分間細胞を固定した．固定液除去後，培養液で 3 回洗浄し，抗体が BrdU 分子と接触しやすくするためにヌクレアーゼワーキング液を 100 μ l 加え 37℃，30 分反応させた後に除去して培養液で 3 回洗浄した．ペルオキシダーゼ (POD) 標識 BrdU 抗体ワーキング溶液を加え 37℃，30 分間培養後，付属の Wash Buffer で 3 回洗浄し，基質エンハンサーの入ったペルオキシダーゼ基質を発色試薬として 100 μ l 加えて，15 分後にマイクロプレートリーダーにて 405 nm の吸光度を測定した．

7. 腫瘍への Med-24 投与による腫瘍増殖抑制効果

近交系 C3H/HeJJcl マウス両側下肢基部に SCCVII 細胞を 1×10^6 個皮下に投与し，腫瘍長径が 5 mm に達した時点で，片側腫瘍にのみ 100 μ l の Med-24 あるいは Med-C を腫瘍に局所投与し，これを 3 日間隔で 3 回施行して腫瘍体積を下記の計算式で算定した⁴⁴⁾．

$$\text{体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times \{\text{短径 (mm)}\}^2 \times 1/2$$

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。

8. Med-24 投与マウスの腫瘍に対する病理組織学的観察

Med-C 投与 3 週間前後より、腫瘍増大に伴う衰弱で体重が減少するマウスが現れるため、以下の実験で使用するマウスの腫瘍および脾臓の回収時期は、初回 Med-24 投与 2 週間後に設定した。腫瘍内への Med の投与後、腫瘍組織に遊走するリンパ球を観察するために、切除した腫瘍組織は 10%ホルマリン液で 24 時間固定したのち、パラフィン包埋を行った。5 μ m 厚の切片を作成後、スライドガラス (Matsunami Glass) に貼付しヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施した。

9. 腫瘍内へ遊走した CD8⁺T 細胞と flow cytometry

Staining Buffer は、20 mg/ml BSA (Wako), 1 mg/ml Sodium Azide (Wako) を PBS に溶解して使用した。

Med-24 初回投与 2 週間後の腫瘍細胞に対する CD8⁺T 細胞の遊走している割合を測定するために、両側の切除した腫瘍組織を 70 μ m cell strainer (FALCON) を介しホモジナイズして 10 U/ml の IL-2 含有 RPMI 1640 に懸濁して 5 分、1,200 rpm で遠心し 3 回洗浄を繰り返したのち、Staining Buffer に再懸濁した。1 \times 10⁶ 細胞あたり 0.25 μ g の Anti-Mouse CD8a FITC (affymetrix) あるいは Rat IgG2a K Isotype Control FITC (affymetrix) を加え、遮光して 30 分

間，4℃で反応させた．Staining Buffer で 2 回洗浄後，FACS Calibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) , Cell Quest software を用いて解析した⁴⁵⁾．

10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるリンパ球と SCCVII 細胞の共培養で放出される IFN- γ 測定

リンパ球を回収する 24 時間前に SCCVII 細胞，Yac-1 細胞を 12 well plate へ 1×10^5 cells/well 播種した．

Med-24 初回腫瘍内投与 2 週間後，脾臓よりリンパ球を調整し，腫瘍細胞と 20 ; 1 の割合となるように 2×10^6 cells/well を加えて 37℃，48 時間培養した．培養上清を回収して，1,500 rpm，10 分間遠心分離し上清のみを回収した．先述と同様，Quantikine® ELISA mouse IFN- γ (R&D Systems) を用いて IFN- γ を測定した．

11. 脾臓リンパ球を用いた Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

リンパ球を回収する 24 時間前に SCCVII 細胞，Yac-1 細胞をそれぞれ 96 well plate へ 5×10^3 cells/well 播種した．

Med-24 の初回腫瘍内投与 2 週間後，脾臓よりリンパ球を調整し、腫瘍細胞との effector/target (以下 E/T) ratio を 5 ; 1, 20 ; 1, 50 ; 1 に変えて 37℃，24 時間共培養した．この際，同量のリンパ球も単独で培養した．PBS (-) を

100 μ l 加えて室温で 20 分間放置したのち，マイクロプレート用遠心分離機にて 1,500 rpm，10 分間遠心し，各ウェルの上層部より 50 μ l の上清を微量毒性試験用試薬 MTX “LDH” (Kyokuto, Tokyo) のキット付属の 96 well plate に移した．これに LDH 反応性の基質発光試薬を 50 μ l 加えて 37℃で 30 分間反応させたのち，反応停止液を 100 μ l 加えて混和し，マイクロプレートリーダー (Benchmark Plus) にて波長 560 nm で吸光度を測定した．ポジティブコントロールは，0.8% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 含有培養液を用いた．細胞傷害率はリンパ球の死細胞を考慮するため，腫瘍細胞とリンパ球を共培養した群の吸光度より，同量のリンパ球単独培養群の吸光度を引いた値により規定し，下記の計算式より腫瘍細胞の死細胞率を算出した^{18,34)}．

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

12. プロテオーム解析

Med-24, Med-C に含まれている因子を検索するため，Q-Exactive 質量分析計を用い，複数サンプル間でタンパク質の存在量を網羅的に比較することができる isobaric tag for relative and absolute quantification (iTRAQ) 法によるタンパク質解析を行った^{46,47)}．iTRAQ 法とは比較したいサンプルから精製したタンパク質を還元・アルキル化後にトリプシン処理し，分解されたペプチドに iTRAQ タグを結合させる．それらを混合し，1 段階目の MS ではペプチド

ごとに分離，2 段階目の MS/MS ではペプチド結合を開裂させ，ペプチドのアミノ酸配列を同定する．この際，質量情報には iTRAQ タグのレポーターグループが含まれており，それぞれのレポーター部分のスペクトル面積を比較することにより，元のサンプルに含まれていた当該ペプチドの相対比較定量を行うことができるもので Med-24，Med-C に含まれるタンパク質を網羅的に探索した．

1) iTRAQ reagents のラベリング

LC-MS/MS 分析のために，タンパク質をブラッドフォード法で定量化し，Med-24 および Med-C に含まれる 100 μ g あたりのタンパク質に iTRAQ reagents (Applied Biosystems, MA, USA) をラベリングした．具体的には Med-24，Med-C を濃縮後，50 mM Tris (Nacalai Tesque) -HCl (Wako) pH 8.0 に 2 wt% となるよう Sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich) を溶解した抽出液にてフィルターに付着したタンパク質も回収し，BSA をコントロールとした検量線を用いて，bradford protein quantification assay でタンパク質の定量化を行った．それぞれのサンプルについて 100 μ g あたりに 4 倍量の氷冷アセトンを加えて -20°C，overnight で反応させ，沈殿したタンパク質は 15,000 rpm，10 分間遠心分離して回収した．iTRAQ reagents をラベリングする前にタンパク質は乾燥させ，20 μ l の dissolution buffer (50 mM Tris-HCl pH 9.0 containing 6 M urea and 5% sodium deoxycholate) で再懸濁して変性させ，2 μ l の reduction buffer (10 mM dithiothreitol (Wako)) で 37°C，1 時間反応させて

還元した.次に 1 μ l の cysteine blocking buffer(55 mM iodoacetamide(Wako)) を加え 25°C, 30 分間暗室で反応させ cysteine をブロッキングしてアルキル化した.それぞれのサンプルを 50 mM Tris-HCl pH 9.0 を用いて 10 倍に希釈し, 0.25 μ g/ μ l の trypsin 20 μ l (trypsin-to-protein ratio of 1:20 (w/w)) を用いて 37°C, 16 時間で分解したのち, 同量の ethyl acetate を加え, 最終濃度 0.5% trifluoroacetic acid で酸性化した. 混和物は 1 分間震盪したのち, 2 分間, 14,000 rpm で遠心分離して水溶液相を回収した. 分解したサンプルは C18-Stage Tips (Thermo Fisher Scientific) で脱塩化し, ethanol 70 μ l で溶解した iTRAQ タグを Med-24, Med-C のそれぞれ 3 検体に対し iTRAQ 114 ~ 116 を常温で 1 時間反応させてラベリングした.

2) Nano LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析は Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) として Ultimate 3000 Nano LC systems (Thermo Fisher Scientific) を使用し, nano-electrospray ionization source を伴った Q-Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を接続した装置を用いた. ラベリングした 5 μ l のサンプルを UPLC に注入し, 4 μ l/min の flow rate で C18 reverse phase trap column (100 μ m I.D. x 5 mm length, Thermo Fisher Scientific) にて濃縮した. 続いて移動相条件は Solvent A: water containing 0.1% formic acid, Solvent B: acetonitrile containing 0.1% formic

acid に固定して, flow rate: 300 nl/min で C18 reverse phase column (75 μ m I.D. x 150 mm length, Nikkyo Technos Co. Ltd., Tokyo) を用いてサンプルを分離した. ペプチドは nano-electrospray ionization の positive mode, Capillary Voltage は 1.8 kV でイオン化した.

3) データ分析

Med-24, Med-C に含まれるタンパク質のデータは, 記録されたフラグメンテーションのスペクトルに基づいたピークリストを作成するために Mascot Distiller v2.4 (Matrix Science, London) を用いて実行, 分析した. タンパク質の同定は生物種を Mouse (NCBI Taxonomy ID: 10090) と Herpesviridae (ID: 10292) に絞った UniProt アミノ酸配列データベース (release 2015_03: March 4, 2015, <http://www.uniprot.org/>) を用いて行った. 同定されたタンパク質は UniProt-GOA database (ver.140, <http://www.ebi.ac.uk/GOA>) で照合し Gene Ontology のアノテーションを行った. タンパク質同定のクライテリアは偽検出率 1%未満とし, 質量誤差は Precursor Mass が 10 ppm, Fragment Mass が 0.01 Da として Mascot v2.4 (Matrix Science, London) によって解析して, 定性データ及び定量値を算出した.

13. 統計解析

実験結果は平均 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で表記した. 統計処理は Excel 2010

分析ツールを使用し，2 群間 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. SCCVII 担癌マウス脾臓樹状細胞の成熟化による TNF- α の放出

Med-12, Med-24 が不活化されていることは plaque assay で確認した. RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清による SCCVII 担癌マウス脾臓樹状細胞の成熟化について検討するため, MEM, 培養上清濃縮液, 1 μ g/ml LPS を 5 倍希釈して 48 時間培養後の上清に含まれる TNF- α を測定した結果, 各群の平均値は MEM : 301 pg/ml, Med-12 : 417 pg/ml, Med-24 : 434 pg/ml, Med-C : 349 pg/ml, LPS : 539 pg/ml であり Med-12, Med-24 群は, Med-C 群と比較し 1.2 倍, 1.3 倍に増加し, Med-24 群では有意差を認めた (図 1). MEM 培地で同時間培養した培養上清中の TNF- α と比較すると Med-12, Med-24 は有意に増加していたが, Med-C では有意差を認めなかった.

2. 樹状細胞と T 細胞の共培養により放出される IFN- γ

Med-24 と反応させた樹状細胞によるリンパ球の活性化について検討するため, 樹状細胞を 20 分置きに震盪しながら 3 時間 1.6 倍希釈の培養上清濃縮液と反応させた結果, 成熟化により TNF- α の放出が増加することが明らかとなった (図 2). この短時間反応させた樹状細胞を pDC として以下の共培養実験に用いた.

MEM, Med-24, Med-C で pulse した樹状細胞, すなわち MEMpDC, Med-24pDC, Med-CpDC と同一担癌マウス脾臓リンパ球を 48 時間共培養後, 培養

上清中に含まれる IFN- γ を測定した。その結果、CD4⁺T 細胞と共培養した各群の平均値は MEM : 172 pg/ml, Med-24 : 234 pg/ml, Med-C : 200 pg/ml であり、CD8⁺T 細胞と共培養した群では MEM : 109 pg/ml, Med-24 : 162 pg/ml, Med-C : 124 pg/ml であった。CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞ともに Med-24pDC と共培養した群は対照群と比較し 1.2 倍に増加し有意差を認めた (図 3)。

3. 成熟樹状細胞と共培養した T 細胞の BrdU 取り込み

樹状細胞による T 細胞の増殖能変化について検討するため、MEMpDC, Med-24pDC, Med-CpDC と同一担癌マウス脾臓リンパ球を 56 時間共培養、BrdU incorporation assay を行った結果、BrdU の取り込みが CD4⁺T 細胞では対照群の 1.2 倍に増加傾向を示したが有意差は認めなかった。CD8⁺T 細胞では、Med-24pDC と共培養した群が対照群と比較し、1.5 倍に増加し有意差を認めた (図 4)。

4. Med-24 投与マウスの腫瘍体積の変化

腫瘍長径が 5 mm に達した時点で、片側腫瘍にのみ 100 μ l の Med-24 を腫瘍に局所投与し、これを 3 日間隔で 3 回施行したところ、Med 初回投与 2 週間後、対照群と比較して投与側、反対側ともに腫瘍増殖抑制傾向を認めたが、有意差は認めなかった (図 5)。

5. Med-24 投与 2 週間後の腫瘍内へ遊走する免疫細胞

Med-24 による腫瘍増殖抑制傾向は，樹状細胞を介した CD4⁺T 細胞，CD8⁺T 細胞の活性化によるものかを確認するため，マウス腫瘍に Med-24 を投与し，免疫細胞の腫瘍内への遊走について検討した．

Med-24 初回投与 2 週間後に腫瘍組織を採取し，H-E 染色したところ投与側，反対側腫瘍ともに，Med-C 投与マウスと比較してリンパ球様細胞の遊走を多く認めた（図 6）．

同条件で Med-24 を投与したマウスの腫瘍組織をホモジナイズし，flow cytometry を行った．図 7 M1 領域において CD8⁺T 細胞よりコントロールを差し引いた値を腫瘍内に遊走した CD8⁺T 細胞の割合と設定した．CD8⁺T 細胞の腫瘍内遊走率を測定した結果，平均値が Med-24 投与群では投与側が 3.7%，反対側が 4.3%であるのに対して Med-C 投与群では投与側が 0.96%，反対側が 1.1%であり，投与側は 3.9 倍，反対側は 3.8 倍に増加し，反対側腫瘍においても投与側と同等の CD8⁺T 細胞の遊走を認めた（図 7）．

6. Med-24 投与マウス脾臓リンパ球と SCCVII 細胞の共培養により放出される IFN- γ

Med-24 の腫瘍内投与により，投与側だけでなく反対側腫瘍に遊走する CD8⁺T 細胞が増加したことから，全身性に SCCVII に対する免疫応答が生じていることについて検討するため，脾臓リンパ球と SCCVII を共培養して放出される

IFN- γ を測定した。

Med-24 投与マウス脾臓リンパ球と SCCVII 細胞を 20;1 の割合で共培養して、48 時間後の培養上清中に含まれる IFN- γ を測定した結果、平均値は 4671 pg/ml であり、Med-C 投与マウス脾臓リンパ球と SCCVII 細胞を共培養した培養上清中に含まれる IFN- γ は 1554 pg/ml であったことから Med-24 投与群は Med-C 投与群と比較して 3.0 倍に増加し有意差を認めた。これに対して、Med-24 投与マウス群脾臓リンパ球を Yac-1 細胞と共培養しても、IFN- γ は 96 pg/ml であり増加は認めなかった（図 8）。

7. Med-24 投与マウス脾臓リンパ球の SCCVII 細胞に対する傷害性

Med-24 の腫瘍内投与 2 週間後、マウス脾臓リンパ球の SCCVII 細胞に対する活性化することが認められたため、その細胞傷害性について検討した。

マウス脾臓リンパ球と SCCVII 細胞を 5;1, 20;1, 50;1 の E/T ratio で共培養し、24 時間後 LDH release assay を行った結果、5;1 では Med-24 投与マウス群脾臓リンパ球と Med-C 群のもので有意差を認めなかったが、20;1, 50;1 と E/T ratio の増加とともに、それぞれ 2.2 倍、4.1 倍と Med-24 投与マウス脾臓リンパ球の SCCVII 細胞に対する傷害性が有意に増大した（図 9）。

8. Med-24, Med-C のプロテオーム解析による比較

iTRAQ 法により Med-24, Med-C のプロテオーム解析を行なった結果、1756

種類のタンパク質が同定され、ウイルス由来のものは 29 個であった。Med-24 と Med-C を比較すると、有意差を認めたものは 440 個で、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。Med-24 から検出されたタンパク質の生物学的過程により分類すると、重複するタンパク質を含んで細胞過程、代謝過程、生体調整に関わるものが大半を占め、免疫系過程のものは 129 個検出された（図 10）。

DAMPs を介した ICD による免疫増強が報告されるようになり^{27,28)}、ATP, BCL-2, calreticulin (CRT), cyclophilin A, F-actin, heat shock protein (HSP) 70, HSP 90, HMGB 1 などが DAMPs として報告されている^{29-31,48-51)}。免疫を開始、維持する際に必要とされる DAMPs について検討したところ、39 個の関連タンパク質が検出された。有意差を認めたものは 9 個で、ATP synthase subunit alpha, ATP-citrate synthase, HSP 60, HSP 70 protein 4, HSP 90-beta, HSP 90 co-chaperone Cdc37, HSP 105 の 7 個は増加し、HSP 70 protein 13, histone H1.2 は減少した（図 11）。CRT, HMGB 1 については有意差を認めなかった。

考 察

ウイルス療法にともなう腫瘍免疫賦活化について、Nakamori ら⁵²⁾は、マウス乳がんの肺転移系において、胸部の腫瘍に細胞融合能が高い Synco-2D を投与したところ、胸部腫瘍だけでなく肺転移も抑制したとしている。抗 CD8 抗体を全身投与すると、その効果が見られなくなったことから、CD8⁺T 細胞が腫瘍免疫の主体としている。ウイルスを投与したマウスの脾臓細胞を培養すると IFN- γ の放出が顕著に亢進していた。Goshima ら⁵³⁾は、HF10 を用いたマウス卵巣がんの腹膜播種モデルで、HF10 と GM-CSF との併用で腫瘍形成を抑制し生存率を延長させ、これには CD4⁺T 細胞が関与するとしている。これまでに本研究室ではマウス SCC を用いた動物実験で 2 か所に腫瘍を形成して、1 か所のみ RH2 を投与すると、両側の腫瘍における増殖抑制効果が確認されている¹⁸⁾。ここでは担癌マウスの脾臓細胞から調整した CD8⁺T 細胞に強い細胞傷害性が見られた。このような感染性 HSV-1 を用いる研究と違い、本研究は SCC VII 細胞に RH2 を感染させ 12 時間と 24 時間後に培養上清を回収して、細胞成分を遠心で除去し、濃縮後に含まれる感染性ウイルスを紫外線にて不活化したものを Med-12、Med-24 として調整し、その腫瘍免疫誘導能につき検討を行った。

まず、Med-12、Med-24 の樹状細胞に対する作用につき検討した。近交系マウスに SCCVII 腫瘍を形成したのち、脾臓より樹状細胞を調整し、Med-12、Med-24 あるいは Med-C と反応させて樹状細胞から産生される培養液中の TNF- α を

測定した。TNF- α は、樹状細胞が成熟化する際に必要な danger signal のひとつ²³⁾で、成熟樹状細胞から産出され、周囲の樹状細胞を活性化するとともに多型核白血球、単球、NK 細胞などの自然免疫系を活性化させることが知られている⁵⁴⁾。実験の結果、Med-12, Med-24 群では培養液中への放出量が増加した。Med-24 群と Med-C 群との間で有意差を認め、ウイルス感染 SCCVII 細胞培養上清中には樹状細胞を成熟化させる danger signal がより多く含まれていると考えられた。MEM 群と Med-C 群で明らかな差はなく、ウイルス感染により放出される因子の増大が樹状細胞の成熟化に重要といえる。

抗原提示を受けたナイーブ CD4⁺T 細胞が活性化すると Th1 細胞あるいは Th2 細胞に分化し、それぞれ細胞性免疫、液性免疫に重要な役割を担う²¹⁾。Th1 細胞は活性化すると IFN- γ を産出し細胞傷害性 T 細胞やマクロファージなどを増強して、細胞内抗原の除去、自己免疫疾患の発症、抗腫瘍免疫に関与している⁵⁵⁾。また、外来性のウイルスタンパク質や腫瘍特異的なタンパク質が樹状細胞に取り込まれた場合、MHC class II 分子を介して CD4⁺T 細胞へ抗原提示を行うことになる⁵⁶⁾ が、樹状細胞は同時にナイーブ CD8⁺T 細胞にも MHC class I 分子を介して抗原提示し細胞性免疫反応を引き起こすことができる。この外来性抗原が MHC class I 分子を介して CD8⁺T 細胞を直接活性化するクロスプレゼンテーション⁵⁷⁾には、樹状細胞表面に共刺激分子 B7-1 (CD80) および B7-2 (CD86) の発現、T 細胞上に CD28 が発現していなければならない。CD28 が樹状細胞の B7 と結合すると T 細胞においてアポトーシスを抑制する

タンパク質や細胞増殖にかかわるサイトカインの産出が刺激され T 細胞の活性化と増殖が促進される⁵⁸⁾。

成熟樹状細胞によるリンパ球の活性化について検討するため、まず 1.6 倍希釈培養上清濃縮液で 3 時間反応させた pDC は、5 倍希釈で 48 時間反応させた際と同様に成熟化することを確認した。そして、この pDC を用いて同一マウスの脾臓細胞から調整した CD4⁺T 細胞あるいは CD8⁺T 細胞と共培養を行い、培養液中に放出された IFN- γ を測定したところ、いずれの T 細胞においても、IFN- γ が有意に増加した。BrdU の取り込みで細胞増殖能を測定した場合、いずれの T 細胞でも取り込みは増加したが、CD8⁺T 細胞では Med-C との間で有意差がみられた。したがって、成熟樹状細胞にて CD4⁺T 細胞ならびに CD8⁺T 細胞は活性化されると考えられた。CD4⁺T 細胞の活性化による IFN- γ の放出増加から Th1 細胞への分化の促進⁵⁹⁾、細胞性免疫の増強が示唆されている。

Med-24 による免疫細胞活性化の結果をもとに、Med-24 の in vivo での効果につき動物実験で検討を行った。両側下肢基部に SCCVII 細胞を接種して腫瘍を形成したのち、片側の腫瘍に Med-24 を 3 日間隔で 3 回投与して、経時的に腫瘍径を測定したところ、初回投与から 11 日までは、Med-24 と Med-C との間で差はなかったが、15 日後に Med-24 群で腫瘍体積増加に対する抑制傾向が見られた。ただ、Med-C 群との間で有意差はなかった。以前の同じ細胞を用いた実験で背部の両側に腫瘍を形成し、片方にのみ RH2 を投与した実験では、ウイルス投与側でより強い腫瘍抑制効果がみられており、腫瘍の制御には直接的な

ウイルスによる細胞変性効果，あるいはよりタンパク量を増やす必要があると思われる．一方，腫瘍への細胞遊走を観察すると Med-24 投与腫瘍では mock infection と比較して多数の細胞遊走を生じていることが分かった．そこで，Med-24 あるいは Med-C を投与した腫瘍と投与していない側の腫瘍を 2 週間後に切除して，腫瘍内に遊走した CD8⁺T 細胞の割合を flow cytometry で解析したところ，Med-24 を投与したマウスの腫瘍では両側ともに CD8⁺T 細胞の遊走が増加しており，ほぼ同等の遊走がみられた．したがって Med-24 による樹状細胞を介した活性化 CD8⁺T 細胞が非投与側の腫瘍を標的として遊走したと考えられた．局所投与された Med-24 と反応した樹状細胞が所属リンパ節へ遊走し T 細胞へ抗原提示を行うことで，SCCVII 抗原に対して反応する T 細胞がリンパや血流を介して全身性に拡散した，あるいは局所投与した Med-24 のタンパク質がリンパや血流を介して全身に運ばれ各二次リンパ組織で抗原提示細胞が貪食して T 細胞へ初回刺激を与えることで免疫細胞が SCCVII 抗原に対し活性を有したと考えられる．後者であれば，Med-24 の腹腔内投与や静脈内投与で，より効率的に全身性の腫瘍免疫細胞の活性化を誘導できる可能性がある．

この腫瘍へ遊走するリンパ球が腫瘍細胞を攻撃するかを知るため，SCCVII 腫瘍内に Med-24 投与したマウスの脾臓からリンパ球を調整して SCCVII 細胞と共培養したところ，mock infection 群と比較してリンパ球が活性化し，細胞傷害性が増大していた．さらに，免疫活性の特異性につき，Med-24 投与群マウス脾臓リンパ球と Yac-1 細胞を共培養し，培養上清中に含まれる IFN- γ を測定した

が増加はなく，SCCVII 特異的に T 細胞の傷害性を増強させることが明らかとなった．

これまでの結果から，Med-24 には RH2 感染によって特異的腫瘍免疫を増殖する因子が存在すると考えられた．すなわち，ウイルス感染によって腫瘍細胞が細胞死に陥る過程で細胞外に放出される因子が腫瘍免疫の増強に働くといえる．このような物質として DAMPs が知られている．ICD は 2005 年に提唱された概念で，細胞を殺すための特異的な刺激能力に依拠しており，免疫原性シグナルを放出する²⁹⁾もので，シグナルは，保護的なストレス反応や細胞死の際に細胞膜外層に出現する，あるいは放出される DAMPs により伝えられて，その多くは免疫細胞によって発現している pattern recognition receptors (PRRs) に結合し強力な免疫賦活効果を発揮する³⁰⁻³²⁾とされている．最近ではウイルス療法による ICD の報告³³⁻³⁵⁾もみられるようになっている．DAMPs としては，細胞外に放出される ATP，HMGB 1，ならびに細胞表面で発現するようになる CRT がよく知られている．BCL-2，cyclophilin A，F-actin，HSP 70，HSP 90 などの DAMPs も腫瘍免疫に対する増強効果が報告されている^{30-32,50-53)}．

Med-24，Med-C についてプロテオーム解析で比較した結果，1756 種類のタンパク質が同定された．CRT，HMGB 1 ではウイルス感染による細胞外への放出量において差を認めなかった．ATP については合成に関わる 5 個のタンパク質が検出され，そのうち ATP synthase subunit alpha，ATP-citrate synthase

は Med-C と比較し Med-24 で有意に増加した。ATP 合成酵素サブユニットは他に O, beta, delta が検出されており，いずれも Med-24 で増加傾向を認めた。また ATP クエン酸合成酵素は ADP, リン酸, アセチル CoA, オキサロ酢酸を基質として ATP, クエン酸, 補酵素 A を生成する反応を触媒するもので，増加することにより ATP の生成が促進されることから，本実験では RH2 感染により細胞外へ放出された ATP を介した ICD が腫瘍免疫を増強した 1 つの要因であると考えられる。そのほかに DAMPs 関連タンパク質を検索すると，32 個が検出され，7 個で有意差を認め，HSP 60, HSP 70 protein 4, HSP 90-beta, HSP 90 co-chaperone Cdc37, HSP 105 は増加し，HSP 70 protein 13, histone H1.2 は減少していた。腫瘍由来の HSP 70 については，樹状細胞を介した CD8⁺T 細胞へのクロスプレゼンテーションにより強力な抗腫瘍効果を発揮することが報告されている⁶⁰⁾が HSP 70 protein4, HSP 70 protein13 の個々については報告されていない。HSP 105 については DAMPs に含まれていない報告³¹⁾もあるが，樹状細胞に反応させることで CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞による腫瘍免疫の誘導⁶¹⁾や，HSP 105 DNA ワクチンが細胞性免疫，液性免疫を活性化し腫瘍免疫を増強したとの報告⁶²⁾もあり，DAMPs 関連タンパク質に含めた。他のタンパク質については，直接腫瘍免疫に関与している報告は認めなかった。

Med-24 と Med-C で有意差を認める 440 種類のタンパク質について，これらはほとんどが既知のタンパク質である。免疫増強の観点から考えると，増加したものは免疫誘導，減少したものは免疫寛容に関与している可能性がある。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。

結 論

1. RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清は，SCCVII 担癌マウス脾臓樹状細胞を成熟化した．
2. RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清で成熟化した樹状細胞は，同一マウス脾臓 CD4⁺細胞，CD8⁺T 細胞を活性化し，CD8⁺T 細胞は細胞増殖能も増大した．
3. 両側下肢基部に腫瘍を形成したマウスの片側腫瘍に RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清を投与すると，CD8⁺T 細胞の腫瘍内への遊走が増加し，反対側腫瘍においても投与側と同等の遊走を認めた．
4. SCCVII 腫瘍担癌マウスの腫瘍に RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清を投与した 2 週間後，脾臓リンパ球の SCCVII 細胞に対する特異的な免疫活性が上昇し，細胞傷害性も増大した．
5. プロテオーム解析により，RH2 感染 SCCVII 細胞培養上清中には非感染細胞培養上清と比較して 291 種類のタンパク質が有意に増加しており，そのうち DAMPs に関連するタンパク質では，ATP synthase subunit alpha, ATP-citrate synthase, HSP 60, HSP 70 protein 4, HSP 90-beta, HSP 90 co-chaperone Cdc37, HSP 105 が増加した．

以上より，腫瘍融解性単純ヘルペスウイルス 1 型を用いたウイルス療法において，感染マウス扁平上皮癌細胞から腫瘍免疫増強因子の放出が増大すること，その中に DAMPs が含まれていることが示唆された．

文献

- 1) Kowalski LP, Sanabria A. (2007) : Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, **27(3)**, 113-7.
- 2) Schoppy DW, Sunwoo JB. (2015) : Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, **29(6)**, 1033-43.
- 3) Ajith TA. (2015) : Strategies used in the clinical trials of gene therapy for cancer. *J Exp Ther Oncol*, **11(1)**, 33-9.
- 4) Morimoto K, Demizu Y, Hashimoto N, Mima M, Terashima K, Fujii O, Otsuki N, Murakami M, Fuwa N, Nibu K. (2014) : Particle radiotherapy using protons or carbon ions for unresectable locally advanced head and neck cancers with skull base invasion. *Jpn J Clin Oncol*, **44(5)**, 428-34.
- 5) Lim D, Quah DS, Leech M, Marignol L. (2015) : Clinical potential of boron neutron capture therapy for locally recurrent inoperable previously irradiated head and neck cancer. *Appl Radiat Isot*, **106**, 237-41.
- 6) Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM. (1991) : Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*, **252(5007)**, 854-6.
- 7) Jiang H, Fueyo J. (2014) : Healing after death: antitumor immunity induced by oncolytic adenoviral therapy. *Oncoimmunology*, **3(7)**, e947872.

- 8) Thirukkumaran C, Morris DG. (2009) : Oncolytic viral therapy using reovirus. *Methods Mol Biol*, **542**, 607-34.
- 9) Park SH, Breitbach CJ, Lee J, Park JO, Lim HY, Kang WK, Moon A, Mun JH, Sommermann EM, Maruri Avidal L, Patt R, Pelusio A, Burke J, Hwang TH, Kirn D, Park YS. (2015) : Phase 1b Trial of Biweekly Intravenous Pexa-Vec (JX-594), an Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Virus in Colorectal Cancer. *Mol Ther*, **23(9)**, 1532-40.
- 10) Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQ, Nieva J, Hwang TH, Moon A, Patt R, Pelusio A, Le Boeuf F, Burns J, Evgin L, De Silva N, Cvancic S, Robertson T, Je JE, Lee YS, Parato K, Diallo JS, Fenster A, Daneshmand M, Bell JC, Kirn DH. (2011) : Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*, **477(7362)**, 99-102.
- 11) Garber K. (2006) : China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, **98(5)**, 298-300.
- 12) Kaufman HL, Bines SD. (2010) : OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol*, **6(6)**, 941-9.
- 13) Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, Hickey J, Bhide SA, Clarke PM, Renouf LC, Thway K, Sibtain A, McNeish IA, Newbold KL, Goldsweig H,

Coffin R, Nutting CM. (2010) : Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res*, **16(15)**, 4005-15.

14) Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, Daniels G, Gonzalez R, Glaspy J, Whitman E, Harrington K, Goldsweig H, Marshall T, Love C, Coffin R, Nemunaitis JJ. (2009) : Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, **27(34)**, 5763-71.

15) Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, Graham NJ, Groves N, Guest PJ, Harrington KJ, James ND, Love CA, McNeish I, Medley LC, Michael A, Nutting CM, Pandha HS, Shorrock CA, Simpson J, Steiner J, Steven NM, Wright D, Coombes RC. (2006) : A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res*, **12(22)**, 6737-47.

16) Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, McGrath Y, Thomas SK, Thornton M, Bullock P, Love CA, Coffin RS. (2003) : ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune

stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther*, **10(4)**, 292-303.

- 17) Takahashi G, Meshii N, Hamada M, Iwai S, Yura Y. (2013) : Sequence of a fusogenic herpes simplex virus, RH2, for oncolytic virotherapy. *J Gen Virol*, **94(Pt 4)**, 726-37.
- 18) Meshii N, Takahashi G, Okunaga S, Hamada M, Iwai S, Takasu A, Ogawa Y, Yura Y. (2013) : Enhancement of systemic tumor immunity for squamous cell carcinoma cells by an oncolytic herpes simplex virus. *Cancer Gene Ther.*, **20(9)**, 493-8.
- 19) Workenhe ST, Simmons G, Pol JG, Lichty BD, Halford WP, Mossman KL. (2014) : Immunogenic HSV-mediated oncolysis shapes the antitumor immune response and contributes to therapeutic efficacy. *Mol Ther*, **22(1)**, 123-31.
- 20) Bartlett DL, Liu Z, Sathiaiah M, Ravindranathan R, Guo Z, He Y, Guo ZS.(2013) : Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Mol Cancer*, **12(1)**, 103.
- 21) Schlecht G, Mouriès J, Poitrasson-Rivière M, Leclerc C, Dadaglio G. (2006) : Purification of splenic dendritic cells induces maturation and capacity to stimulate Th1 response in vivo. *Int Immunol*, **18(3)**, 445-52.
- 22) Li W, Mu D, Tian F, Hu Y, Jiang T, Han Y, Chen J, Han G, Li X. (2013) : Exosomes derived from Rab27a-overexpressing tumor cells elicit

- efficient induction of antitumor immunity. *Mol Med Rep*, **8(6)**, 1876-82.
- 23) Ma J, Han H, Ma L, Liu C, Xue X, Ma P, Li X, Tao H. (2014) : The immunostimulatory effects of retinoblastoma cell supernatant on dendritic cells. *Protein Cell*, **5(4)**, 307-16.
- 24) Kikuchi T, Uehara S, Ariga H, Tokunaga T, Kariyone A, Tamura T, Takatsu K. (2006) : Augmented induction of CD8+ cytotoxic T-cell response and antitumour resistance by T helper type 1-inducing peptide. *Immunology*, **117(1)**, 47-58.
- 25) Crawford ED, Petrylak DP, Higano CS, Kibel AS, Kantoff PW, Small EJ, Shore ND, Ferrari A. (2015) : Optimal timing of sipuleucel-T treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Can J Urol*, **22(6)**, 8048-55.
- 26) George DJ, Nabhan C, DeVries T, Whitmore JB, Gomella LG. Survival Outcomes of Sipuleucel-T Phase III Studies: Impact of Control-Arm Cross-Over to Salvage Immunotherapy. *Cancer Immunol Res*, **3(9)**, 1063-9.
- 27) Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, Apetoh L, Aranda F, Barnaba V, Bloy, Bracci L, Breckpot K, Brough D, Buqué A, Castro MG, Cirone M, Colombo MI, Cremer I, Demaria S, Dini L, Eliopoulos AG, Faggioni A, Formenti SC, Fučíková J, Gabriele L,

Gaipel US, Galon J, Garg A, Ghiringhelli F, Giese NA, Guo ZS, Hemminki A, Herrmann M, Hodge JW, Holdenrieder S, Honeychurch J, Hu HM, Huang X, Illidge TM, Kono K, Korbelik M, Krysko DV, Loi S, Lowenstein PR, Lugli E, Ma Y, Madeo F, Manfredi AA, Martins I, Mavilio D, Menger L, Merendino N, Michaud M, Mignot G, Mossman KL, Multhoff G, Oehler R, Palombo F, Panaretakis T, Pol J, Proietti E, Ricci JE, Riganti C, Rovere-Querini P, Rubartelli A, Sistigu A, Smyth MJ, Sonnemann J, Spisek R, Stagg J, Sukkurwala AQ, Tartour E, Thorburn A, Thorne SH, Vandenabeele P, Velotti F, Workenhe ST, Yang H, Zong WX, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. (2014) : Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *OncoImmunology*, **3:9**, e955691

28) Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Métivier D, Pichard E, Aucoeur P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L, Kroemer G. (2005) : Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med*, **202(12)**, 1691-701.

29) Krysko O, Løve Aaes T, Bachert C, Vandenabeele P, Krysko DV. (2013) : Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis*, **4**, e631.

30) Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. (2012) : Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat*

Rev Cancer, **12(12)**, 860-75.

- 31) Fucikova J, Moserova I, Urbanova L, Bezu L, Kepp O, Cremer I, Salek C, Strnad P, Kroemer G, Galluzzi L, Spisek R. (2015) : Prognostic and Predictive Value of DAMPs and DAMP-Associated Processes in Cancer. *Front Immunol*, **6**, 402.
- 32) Angelova AL, Grekova SP, Heller A, Kuhlmann O, Soyka E, Giese T, Aprahamian M, Bour G, Rüffer S, Cziepluch C, Daeffler L, Rommelaere J, Werner J, Raykov Z, Giese NA. (2014) : Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Virol*, **88(10)**, 5263-76.
- 33) Li H, Dutuor A, Fu X, Zhang X. (2007) : Induction of strong antitumor immunity by an HSV-2-based oncolytic virus in a murine mammary tumor model. *J Gene Med*, **9(3)**, 161-9.
- 34) Guo ZS, Liu Z, Bartlett DL. (2014) : Oncolytic Immunotherapy: Dying the Right Way is a Key to Eliciting Potent Antitumor Immunity. *Front Oncol*, **4**, 74.
- 35) De Logu A, Loy G, Pellerano ML, Bonsignore L, Schivo ML. (2000) : Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by Santolina insularis essential oil. *Antiviral Res*, **48(3)**, 177-85.

- 36) Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM. (2006) : Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol*, **176**(1), 441-50.
- 37) Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. (2011) : IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*, **41**(6), 1675-86.
- 38) Cao X, Zhang W, He L, Xie Z, Ma S, Tao Q, Yu Y, Hamada H, Wang J. (1998) : Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. *J Immunol*, **161**(11), 6238-44.
- 39) Soroosh P, Ine S, Sugamura K, Ishii N. (2006) : OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *J Immunol*, **176**(10), 5975-87.
- 40) Simma O, Zebedin E, Neugebauer N, Schellack C, Pilz A, Chang-Rodriguez S, Lingnau K, Weisz E, Putz EM, Pickl WF, Felzmann T, Müller M, Decker T, Sexl V, Stoiber D. (2009) : Identification of an indispensable role for tyrosine kinase 2 in CTL-mediated tumor surveillance. *Cancer Res*, **69**(1), 203-11.
- 41) Sun J, Fu F, Gu W, Yan R, Zhang G, Shen Z, Zhou Y, Wang H, Shen B, Zhang X. (2011) : Origination of new immunological functions in the

costimulatory molecule B7-H3: the role of exon duplication in evolution of the immune system. *PLoS One*, **6(9)**, e24751.

42) Malsy M, Gebhardt K, Gruber M, Wiese C, Graf B, Bundscherer A. (2015) : Effects of ketamine, s-ketamine, and MK 801 on proliferation, apoptosis, and necrosis in pancreatic cancer cells. *BMC Anesthesiol*, **15**, 111.

43) Zhu N, Lin J, Wang K, Wei M, Chen Q, Wang Y. (2015) : Huperzine A protects neural stem cells against A β -induced apoptosis in a neural stem cells and microglia co-culture system. *Int J Clin Exp Pathol*, **8(6)**, 425-33.

44) Yamatomo N, Iwagami T, Kato I, Masunaga S, Sakurai Y, Iwai S, Nakazawa M, Ono K, Yura Y. (2013) : Sonoporation as an enhancing method for boron neutron capture therapy for squamous cell carcinomas. *Radiat Oncol*, **8**, 280.

45) Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, French BA, Linden J. (2006) : Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation*, **114(19)**, 2056-64.

46) Li J, Zhao WG, Shen ZF, Yuan T, Liu SN, Liu Q, Fu Y, Sun W. (2015) : Comparative proteome analysis of brown adipose tissue in obese

C57BL/6J mice using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *PLoS One*, **10(3)**, e0119350.

- 47) Cai XZ, Zeng WQ, Xiang Y, Liu Y, Zhang HM, Li H, She S, Yang M, Xia K, Peng SF. (2015) : iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of Nasopharyngeal Carcinoma. *J Cell Biochem*, **116(7)**, 1431-41.
- 48) Wang Y, McAlpine SR. (2015) : Regulating the cytoprotective response in cancer cells using simultaneous inhibition of Hsp90 and Hsp70. *Org Biomol Chem*, **13(7)**, 2108-16.
- 49) Chatterjee M, Andrulis M, Stühmer T, Müller E, Hofmann C, Steinbrunn T, Heimberger T, Schraud H, Kressmann S, Einsele H, Bargou RC. (2013) : The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica*, **98(7)**, 1132-41.
- 50) Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Fujioka Y, Ohba Y, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka A, Yagita H, Jinushi M. (2012) : Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol*, **13(9)**, 832-42.

- 51) Liu Z, Falo LD Jr, You Z. (2011) : Knockdown of HMGB1 in tumor cells attenuates their ability to induce regulatory T cells and uncovers naturally acquired CD8 T cell-dependent antitumor immunity. *J Immunol*, **187**(1), 118-25.
- 52) Nakamori M, Fu X, Rousseau R, Chen SY, Zhang X. (2004) : Destruction of nonimmunogenic mammary tumor cells by a fusogenic oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity. *Mol Ther*, **9**(5), 658-65.
- 53) Goshima F, Esaki S, Luo C, Kamakura M, Kimura H, Nishiyama Y. (2014) : Oncolytic viral therapy with a combination of HF10, a herpes simplex virus type 1 variant and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for murine ovarian cancer. *Int J Cancer*, **134**(12), 2865-77.
- 54) Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. (1999) : Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*, **5**(4), 405-11.
- 55) Romagnani S. (1991) : Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res*, **21**(2), 152-8.

- 56) Fleischer B, Schrezenmeier H, Wagner H. (1986) : Function of the CD4 and CD8 molecules on human cytotoxic T lymphocytes: regulation of T cell triggering. *J Immunol*, **136(5)**, 1625-8.
- 57) Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. (2012) : Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, **12(8)**, 557-69.
- 58) Zang X, Allison JP. (2007) : The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. *Clin Cancer Res*, **13(18 Pt 1)**, 5271-9.
- 59) Nicholson LB, Kuchroo VK. (1996) : Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, **8(6)**, 837-42.
- 60) Ueda G, Tamura Y, Hirai I, Kamiguchi K, Ichimiya S, Torigoe T, Hiratsuka H, Sunakawa H, Sato N. (2004) : Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and tumor immunity. *Cancer Sci*, **95(3)**, 248-53.
- 61) Yokomine K, Nakatsura T, Minohara M, Kira J, Kubo T, Sasaki Y, Nishimura Y. (2006) : Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **343(1)**, 269-78.
- 62) Miyazaki M, Nakatsura T, Yokomine K, Senju S, Monji M, Hosaka S, Komori H, Yoshitake Y, Motomura Y, Minohara M, Kubo T, Ishihara K, Hatayama T, Ogawa M, Nishimura Y. (2005) : DNA vaccination of HSP105

leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4 T cells and CD8 T cells. *Cancer Sci*, **96**(10), 695-705.

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．そして本研究の遂行にあたり，御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院医学系研究科附属最先端医療共同研究実習センター，高藤和輝 先生に心より感謝申し上げます．また本研究に際し特別の御考慮，御協力を頂きました口腔外科学第二教室の皆様に厚く御礼申し上げます．

脚 注

大阪大学大学院歯学研究科 口腔外科学第二教室

主任：由良義明 教授

本論文の要旨の一部は，第 60 回日本口腔外科学会（2015 年，名古屋），第 52 回日本口腔組織培養学会（2015 年，徳島）において発表した．

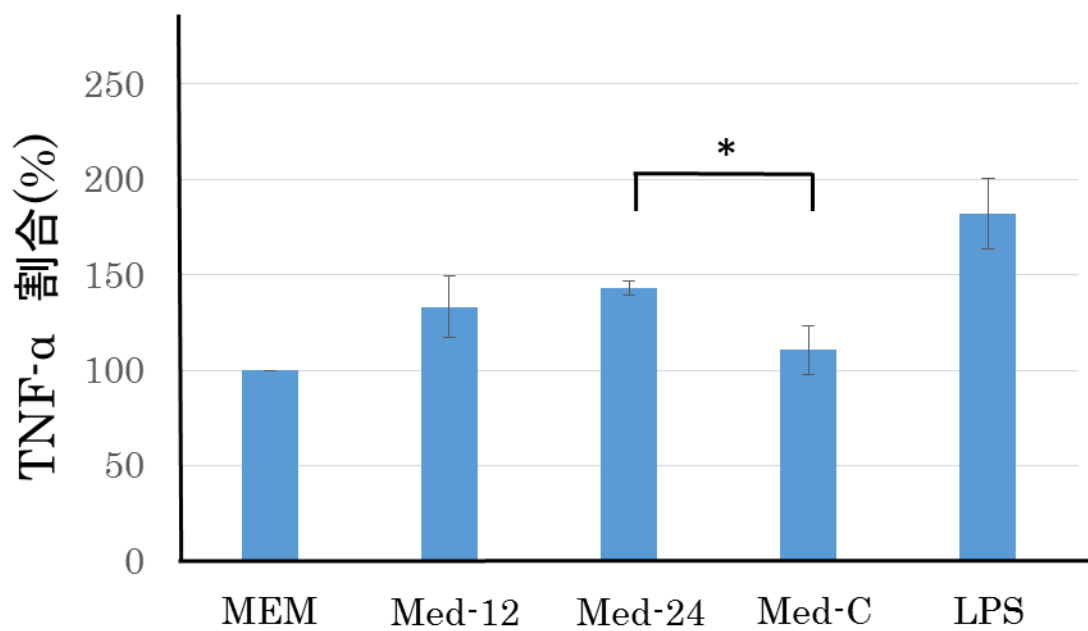


図 1 SCCVII 担癌マウス脾臓樹状細胞の培養上清への TNF- α の放出

近交系 C3H/HeJJcl マウスに SCCVII 腫瘍を形成した 2 週間後，脾臓樹状細胞を調整し，無血清 MEM，Med-12，Med-24，Med-C，LPS を加えた培養液で 48 時間培養後，培養上清に含まれる TNF- α を測定した．Med-12 群，Med-24 群は Med-C 群と比較し増加しており，Med-24 群では有意差（*： $P < 0.05$ ）を認めた．（ $n = 3$ ）

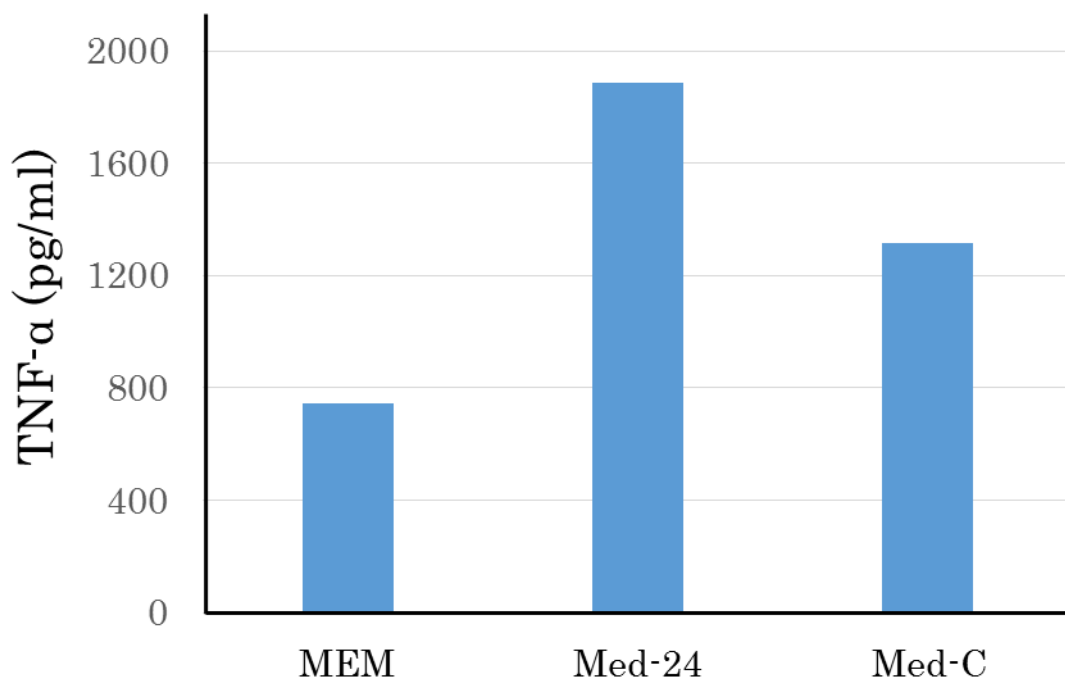
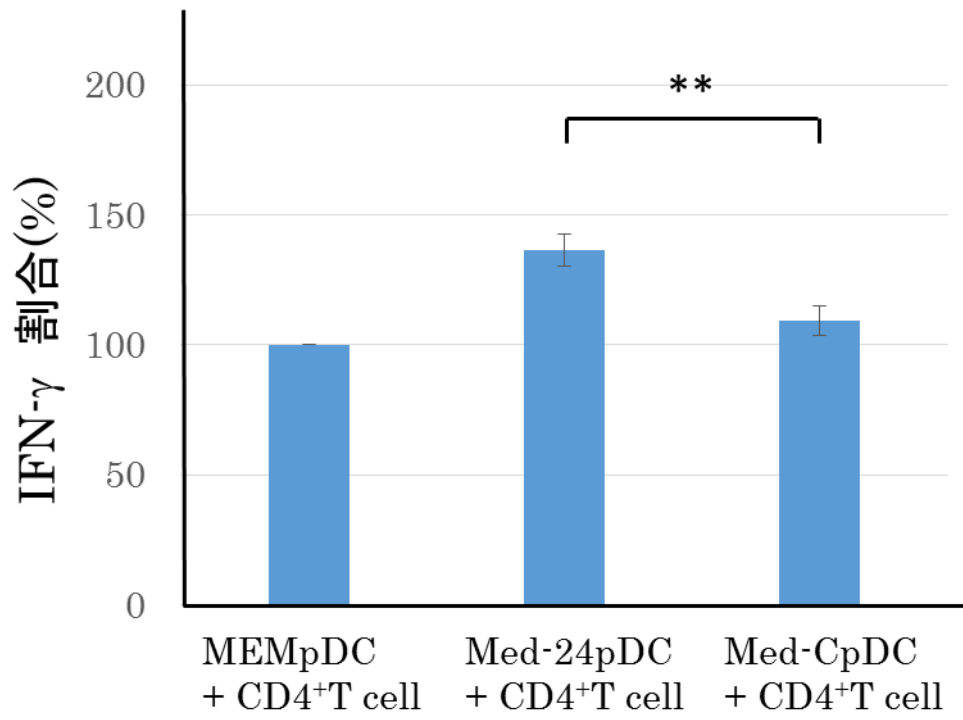


図 2 短時間 pulse した SCCVII 担癌マウス脾臓樹状細胞の培養上清への TNF- α の放出

SCCVII 担癌マウスの脾臓樹状細胞を調整し，無血清 MEM，Med-24，Med-C を加えて 3 時間培養後，培養上清に含まれる TNF- α を測定した．図 1 と同様に TNF- α 放出の増加を認めた．この pulsed dendritic cell (pDC) をそれぞれ MEMpDC，Med-24pDC，Med-CpDC と表現する．

A



B

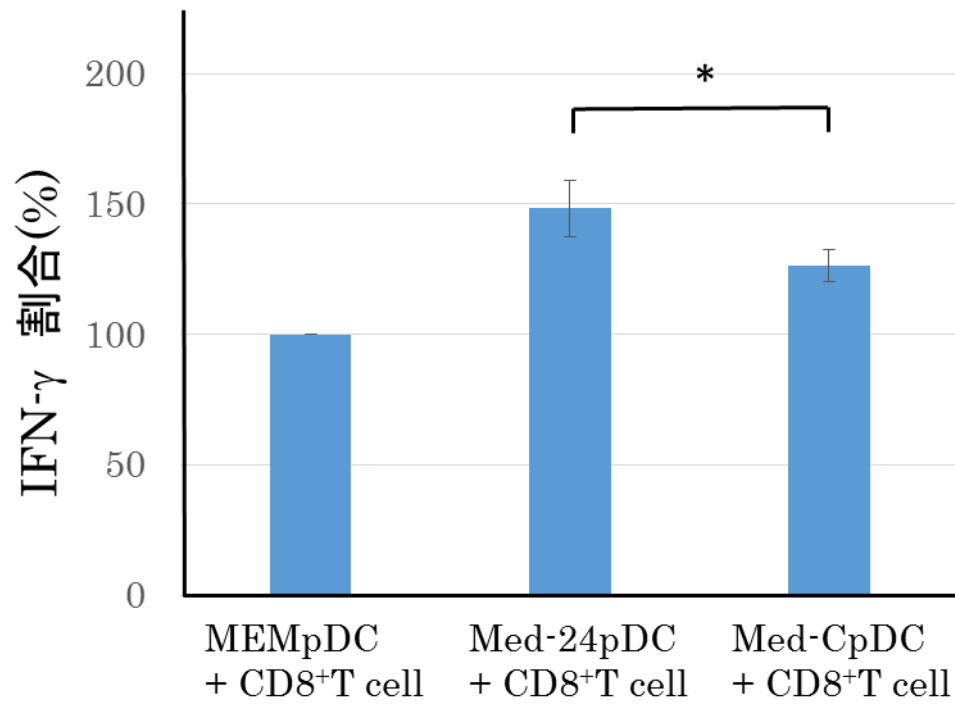
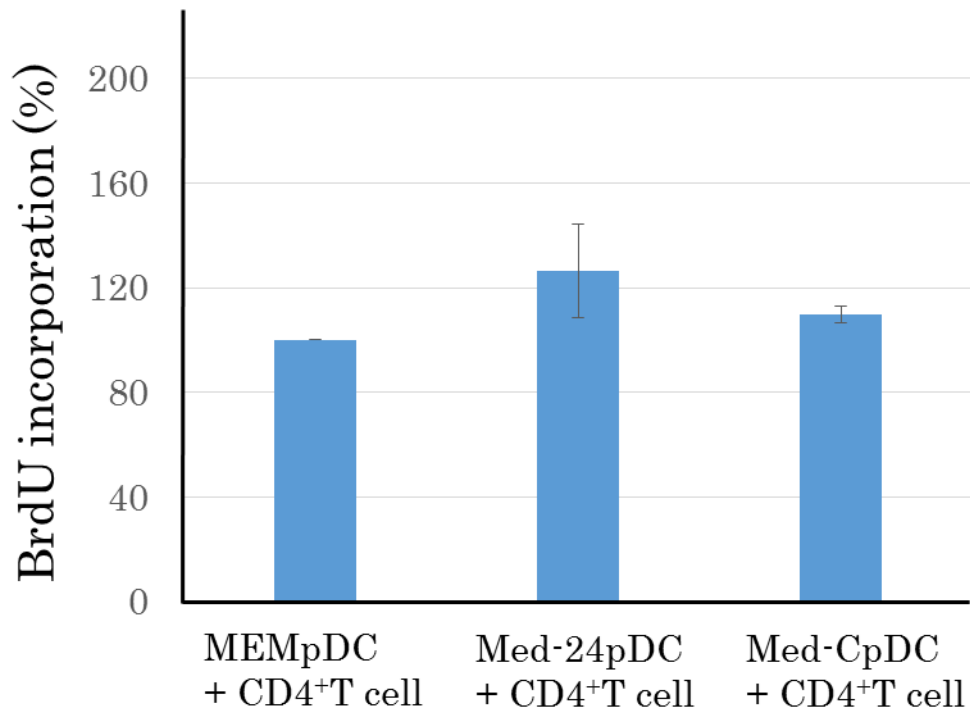


図 3 pDC と脾臓リンパ球との共培養による IFN- γ の放出

A) MEMpDC, Med-24pDC, Med-CpDC と CD4⁺T 細胞を 48 時間共培養後, 培養液に含まれる IFN- γ を測定した. Med-24pDC と共培養した群と, Med-CpDC を用いた群との間で有意差 (** : $P < 0.005$) を認めた. (n=3)

B) MEMpDC, Med-24pDC, Med-CpDC と CD8⁺T 細胞を 48 時間共培養後, 培養液に含まれる IFN- γ を測定した. Med-24pDC と共培養した群と, Med-CpDC を用いた群との間で有意差 (* : $P < 0.05$) を認めた. (n=3)

A



B

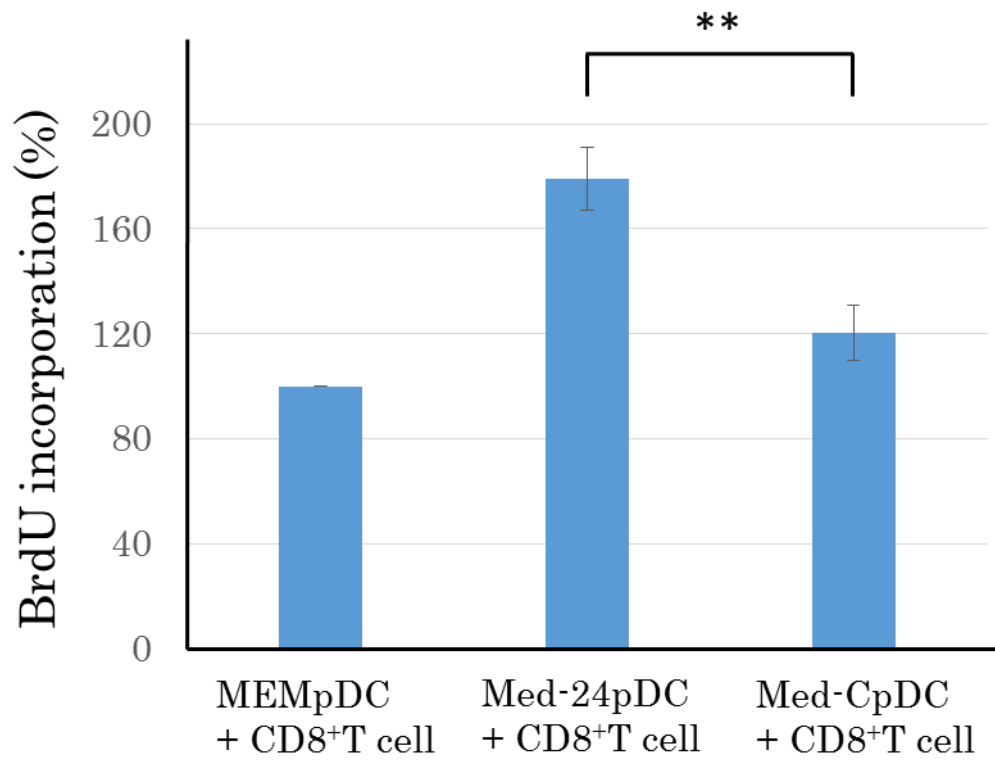
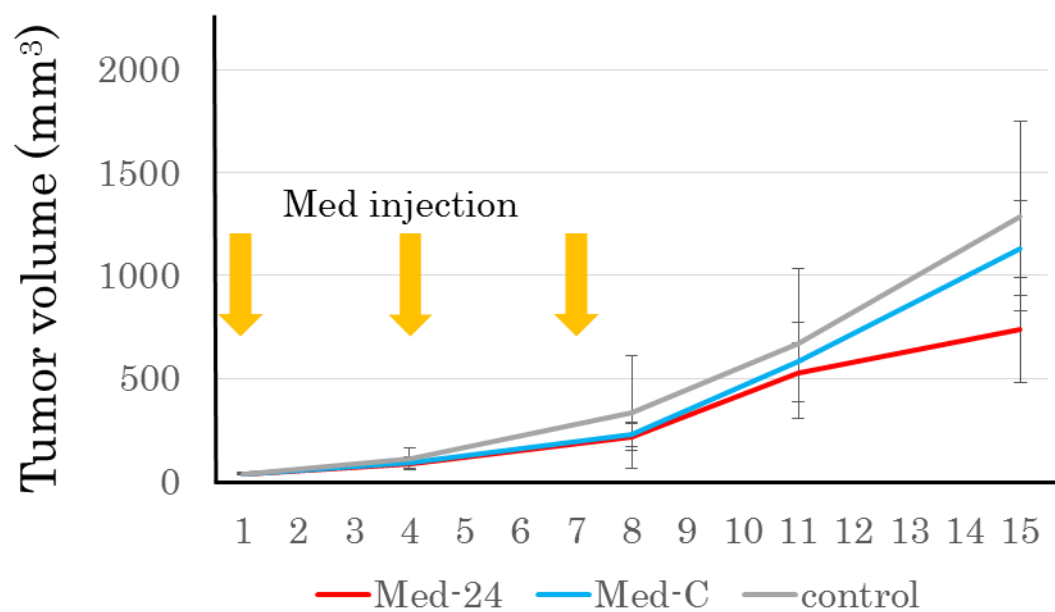


図 4 pDC と脾臓リンパ球との共培養による BrdU 取り込み

A) MEMpDC, Med-24pDC, Med-CpDC と CD4⁺T 細胞を 56 時間共培養後, BrdU incorporation assay で細胞増殖能を評価した. Med-24pDC と共培養した群で増加傾向を認めた. (n=3)

B) MEMpDC, Med-24pDC, Med-CpDC と CD8⁺T 細胞を 56 時間共培養後, BrdU incorporation assay で細胞増殖能を評価した. Med-24pDC と共培養した群は, Med-CpDC を用いた群との間で有意差 (**: P<0.005) を認めた. (n=3)

A



B

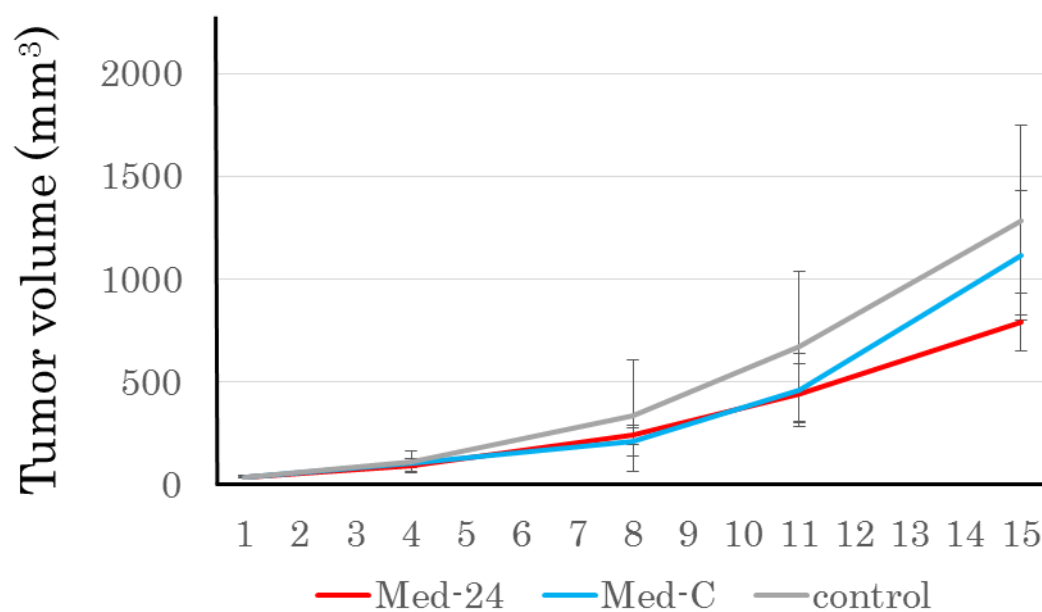


図 5 Med-24, Med-C 投与によるマウス腫瘍体積の変化

近交系 C3H/HeJJcl マウスの両側下肢基部で皮下に SCCVII 細胞を接種し腫瘍を形成した。腫瘍長径が 5 mm に達した時点で，片側腫瘍に Med-24 あるいは Med-C を 3 日間隔で 3 回投与し，経時的に投与腫瘍（A）と反対側腫瘍（B）の径を測定した。Med-24 群は Med-C 群と比較して，初回投与 2 週間後より投与側，反対側ともに腫瘍の増殖抑制傾向を示したが有意差は認めなかった。（n=3）

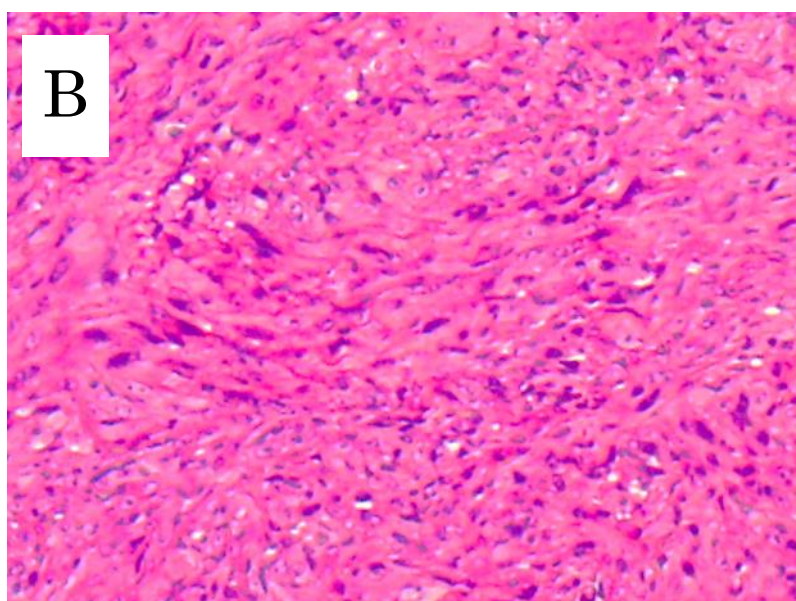
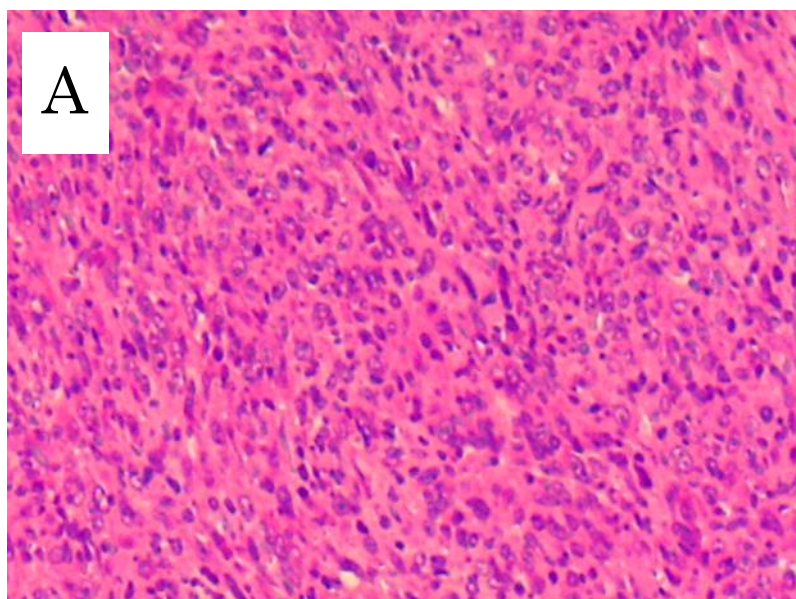


図 6 SCCVII 腫瘍への Med-24, Med-C 投与による腫瘍組織像の変化

図 5 と同様にして片側腫瘍へ Med-24 あるいは Med-C を投与し，初回投与から 2 週間後に Med-24 投与腫瘍（A），Med-C 投与マウスの反対側腫瘍（B）につき組織切片を作成し H-E 染色を施した．Med-24 投与腫瘍では，ヘマトキシリンで濃染色される円形の核を持ち細胞質の少ないリンパ球様細胞の遊走を多く認めた．

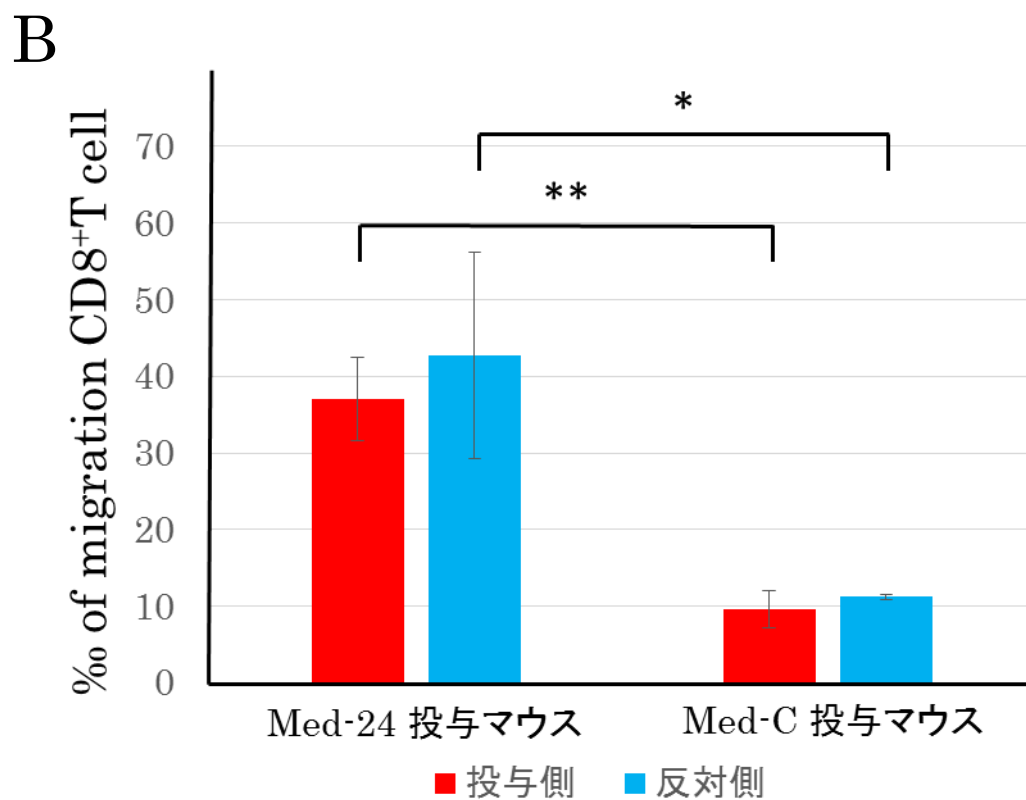
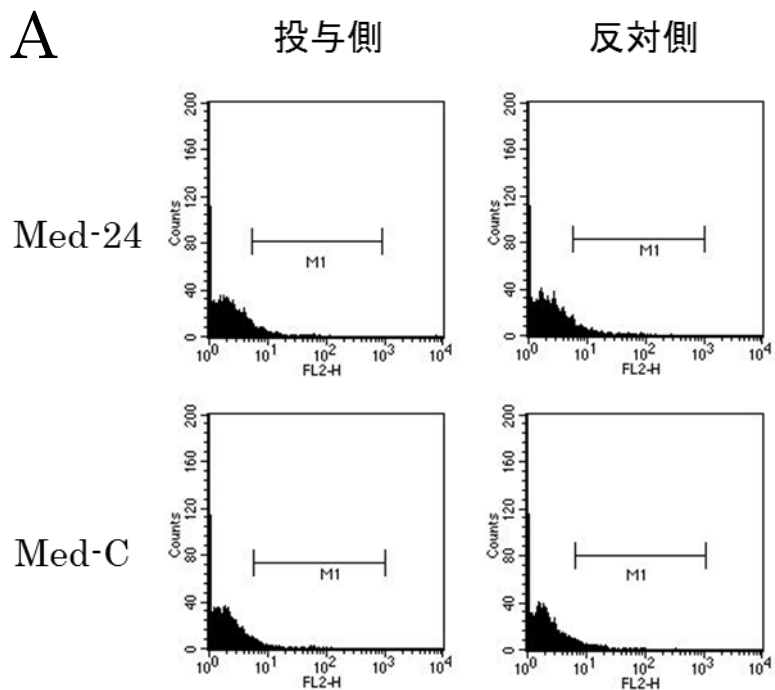


図 7 Med-24, Med-C 投与 SCCⅦ腫瘍における遊走 CD8⁺T 細胞の flow cytometry

図 5 と同様にして片側腫瘍へ Med-24 あるいは Med-C を投与し，初回投与から 2 週間後に腫瘍を摘出し，遊走 CD8⁺T 細胞を flow cytometry (A) で解析し遊走率 (B) を求めた．Med-24 群は Med-C 群と比較し，投与側 (** : $P < 0.005$)，反対側 (* : $P < 0.05$) とともに腫瘍内への CD8⁺T 細胞の遊走が有意に増加した．Med-24 群の投与側腫瘍と反対側腫瘍との間で有意差は認めなかった．(n=5)

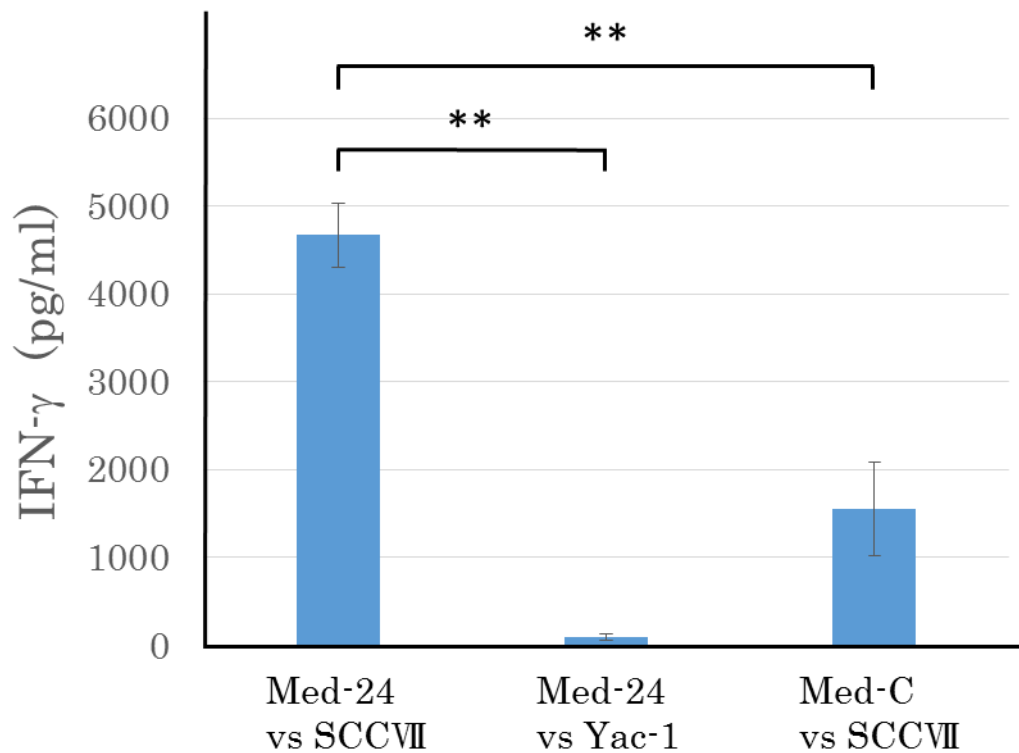


図 8 Med-24 と Med-C を腫瘍内投与したマウス脾臓リンパ球による IFN- γ の放出

図 5 と同様にして形成した SCCVII 腫瘍に Med-24 あるいは Med-C を投与したマウスから脾臓リンパ球を調整し，SCCVII 細胞あるいは Yac-1 細胞と共培養し，その培養上清中へ放出される IFN- γ を測定した．Med-24 群のリンパ球は，Yac-1 細胞と共培養しても IFN- γ は増加しなかったが，SCCVII 細胞に対しては Med-C 群の 3.0 倍となり，両群間で有意差（**：P<0.005）を認めた．（n=3）

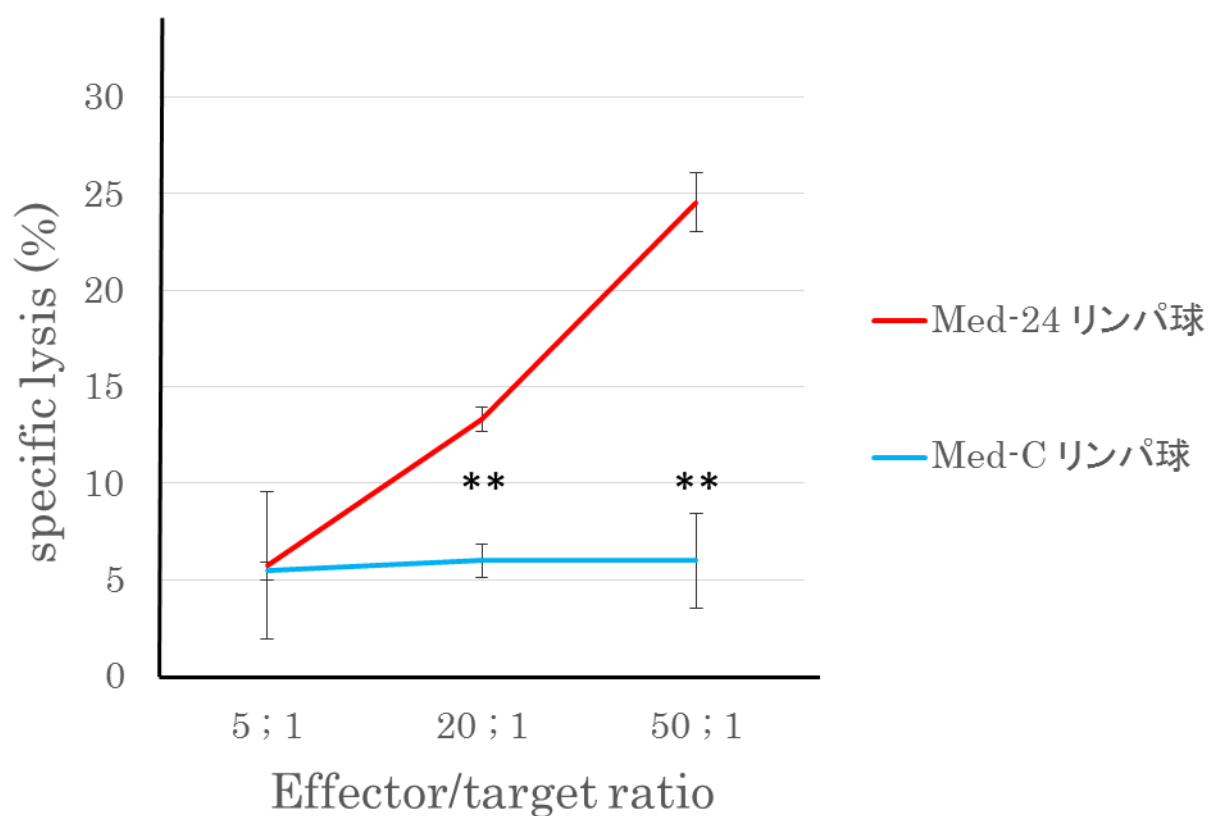


図 9 Med-24 あるいは Med-C を腫瘍内投与したマウス脾臓リンパ球の細胞傷害性

図 5 と同様にして形成した SCCVII 腫瘍に Med-24 あるいは Med-C を投与したマウスから脾臓リンパ球を調整し，SCCVII 細胞と共培養して，細胞傷害性を LDH release assay にて測定した．Med-24 群は Med-C 群と比較し，脾臓リンパ球の SCCVII に対する細胞傷害性が，20:1，50:1 のリンパ球/SCCVII 比では 2.2 倍，4.1 倍と有意 (**: $P < 0.005$) に増大した．(n=3)

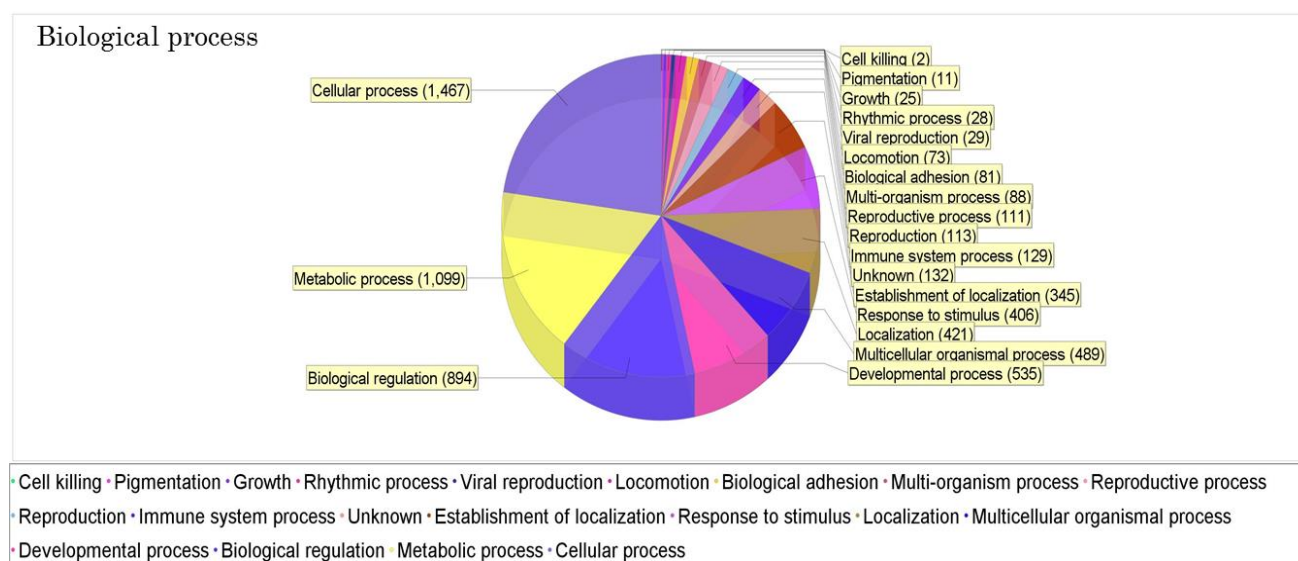


図 10 Med-24 と Med-C のプロテオーム解析による同定タンパク質の機能的分類

Med-24 と Med-C で同定されたタンパク質は 1756 個で，重複するタンパク質を含むが細胞過程，代謝過程，生体調整に関わるものが大半を占め，免疫系過程のタンパク質は 129 個検出された．

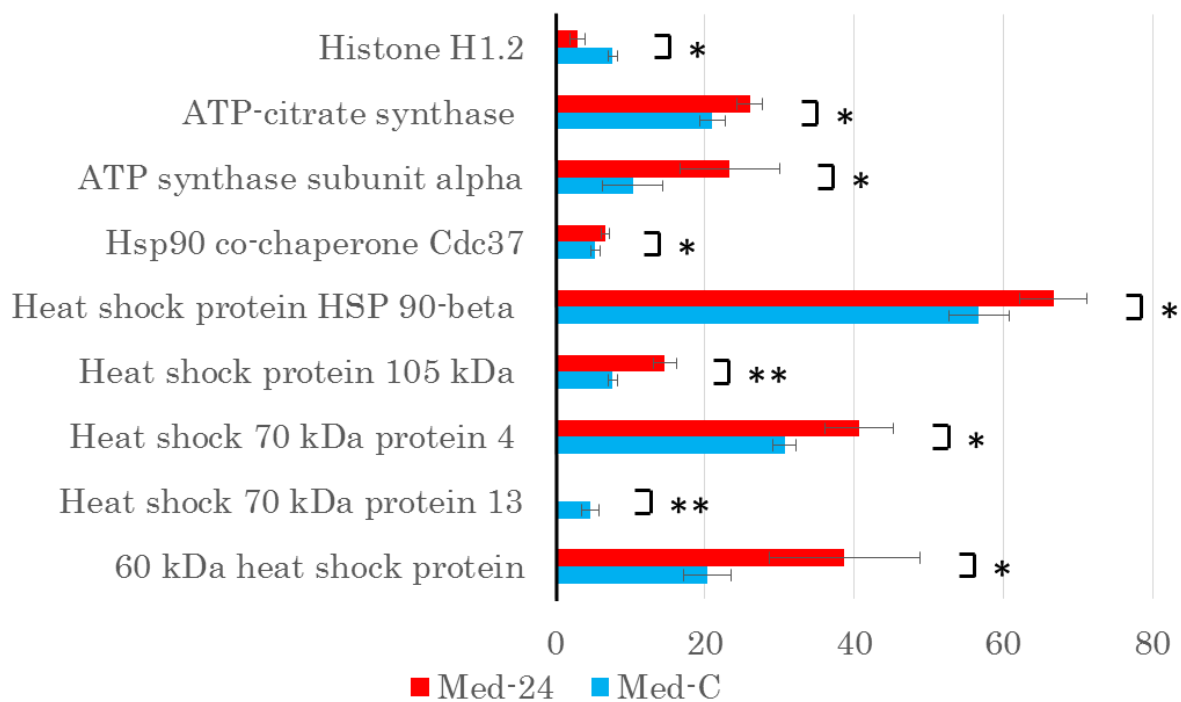


図 11 Med-24 と Med-C のプロテオーム解析による DAMPs の比較

DAMPs に関連するタンパク質のうち，Med-24 と Med-C で有意差（**： $P < 0.005$ ，*： $P < 0.05$ ）を認めたのは 9 個であり，そのうち 7 個は Med-24 で増加し，2 個は減少した．（ $n=3$ ）