



Intravenous injection of irradiated tumor cell vaccine carrying oncolytic adenovirus suppressed the growth of multiple lung tumors in a mouse squamous cell carcinoma model

Saito, Aya

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-07-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3223号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003223>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Intravenous injection of irradiated tumor cell vaccine carrying oncolytic adenovirus suppressed the growth of multiple lung tumors in a mouse squamous cell carcinoma model

腫瘍融解性アデノウイルス含有キャリア細胞の静脈内投与による
マウス多発肺扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻感染制御学 川端真人教授)

斎藤 彩

【背景】

腫瘍細胞内で特異的に増殖可能なウイルスを腫瘍細胞に感染させ破壊させるウイルス療法は、現在の主流である化学療法や放射線療法に代わる新たな治療法として注目されている。しかし一方で、ウイルスの感染効率が低く十分な効果が発揮されないという欠点や、ウイルスに対する免疫反応により重篤な副作用が生じるリスクが少なからず存在するため、その利用は十分には進んでいない。

もうひとつの新しい抗腫瘍療法として、免疫療法が近年大きな注目を浴びている。これは腫瘍細胞自体あるいはその特異的な抗原を体内に投与することで腫瘍細胞に対する免疫を惹起するという方法であり、持続的かつ強い抗腫瘍作用を付与することができるものと期待される。しかし一方で、自己でもある腫瘍細胞に対する免疫寛容によって攻撃対象として認識されない、あるいは腫瘍細胞による免疫抑制作用によりその効果発現が妨げられてしまう、といったことも少なくない。これらの問題点を克服するため、腫瘍細胞による免疫惹起を強化するアジュバントとなる物質を投与する研究も行われている。抗原とともに投与されたアジュバントが免疫発現を促進することで腫瘍細胞の免疫寛容あるいは免疫抑制状態を打破し、抗原単独では不十分であった抗腫瘍効果を増強することが示されている。これらアジュバントとなる物質の多くは自然免疫を担う Toll-like receptor (TLR) のアゴニストであることから、アジュバントによる自然免疫の惹起を起点として腫瘍免疫が活性化されることが示唆されている。

本研究では不活性化したヒト肺癌細胞株 A549 細胞に制限増殖型アデノウイルスである Ad-IAI.3B を感染させた細胞 (CBOVS) を作成した。A549 細胞を腫瘍免疫を刺激する抗原および Ad-IAI.3B を運ぶキャリア細胞として、Ad-IAI.3B を腫瘍細胞内で特異的に増殖するウイルスおよび自然免疫から腫瘍免疫を活性化するアジュバントとして用いることで、ウイルス療法と免疫療法双方の特徴をとりいれた新しい抗腫瘍療法を検討した。

【実験】

- ① 抗アデノウイルス抗体存在下での腫瘍細胞へのアデノウイルス感染効率
アデノウイルスを静脈内投与する際に問題となるのがウイルス中和抗体の存在である。ウイルスをキャリア細胞で包むことで中和抗体存在下でも CBOVS の腫瘍細胞への感染効率が保たれることを示すため、*in vitro* にて実験を行った。抗ウイルス抗体を添加した培地を用い、扁平上皮癌細胞 KLN205 に Ad-IAI.3B あるいは CBOVS を加えて培養した。6 時間後に KLN205 細胞を回収し、DNA を抽出して Real-Time PCR 法によりアデノウイルス DNA 量を定量した。結果、Ad-IAI.3B 単体では抗ウイルス抗体により感染率が大きく低下したのに対し、CBOVS では抗体存在下でもアデノウイルスの感染効率は低下しなかった。
- ② Ad-IAI.3B 投与と CBOVS 投与におけるアデノウイルスの生体内分布
CBOVS による腫瘍病変へのウイルス運搬効率を確認するため、*in vivo* にて実験を行った。DBA マウスに扁平上皮癌細胞 KLN205 を静脈内投与して肺癌病変を作成し、14 日後に Ad-IAI.3B あるいは CBOVS を静脈内投与した。12 時間後に肺、肝臓、脾臓、腎臓を採材して DNA を抽出し、Real-Time PCR によりアデノウイルス DNA 量を定量した。結果、Ad-IAI.3B 単体投与と比較して、CBOVS 投与群では癌病巣を多数有する肺への高

いアデノウイルス感染が認められた。他の臓器では有意差はなかったものの、Ad-IAI.3B 単体投与群では、病変のない肺以外の臓器にも非特異的に感染する傾向が認められた。

③ マウス肺扁平上皮癌モデルにおける CBOVS の抗腫瘍効果

DBA マウスにマウス肺扁平上皮癌細胞株 KLN205 を静脈内投与、肺癌モデルを作成した。5 日間隔で 3 回各群にそれぞれ CBOVS、AdE3、A549、PBS を静脈内投与し、それぞれの腫瘍抑制効果を検討した。

肉眼的および組織学的に A549 細胞投与群および CBOVS 投与群で腫瘍の結節数・大きさの減少がみられ、特に CBOVS 投与群ではその変化が顕著であった。さらに、CBOVS1 投与群では腫瘍結節周辺へのリンパ球の浸潤がみられ、腫瘍細胞に対する免疫系の活性化が示唆された。これらのことから、CBOVS のキャリア細胞が癌細胞ワクチンとして抗腫瘍免疫を活性化し、アデノウイルスの存在がその効果を増強するアジュバントとして作用している可能性が示された。

④ CBOVS による抗腫瘍免疫の活性化

肺扁平上皮癌細胞 KLN205 に対する免疫反応が CBOVS により引き起こされることを確認するため、肺扁平上皮癌細胞 KLN205 で肺癌病変を作成したマウスに PBS、Ad-IAI.3B、A549、CBOVS をそれぞれ 3 回静脈内投与し、脾臓からリンパ球を回収した。リンパ球を肺癌細胞 KLN205 で刺激し、24 時間後に産生されたサイトカイン (INF- γ 、IL-12) を ELISA にて定量した。INF- γ 、IL-12 とともに CBOVS 投与群では KLN205 での刺激により産生が増加し、CBOVS による抗腫瘍免疫の惹起が示された。また INF- γ ではキャリア細胞 A549 投与群でも産生増加がみられ、キャリア細胞によって腫瘍細胞に対する免疫反応が活性化されている可能性が示された。

【考察】

CBOVS を用いることでアデノウイルスが中和抗体により除去されることなく効果的に肺病変へと運搬されることが示された。同時に標的以外の臓器への感染を防ぐことで、アデノウイルス感染による副作用を軽減することができることも示唆された。また CBOVS を用いることで腫瘍細胞に対する免疫効果と、ウイルスの効率的な運搬という二つの作用によって強い抗腫瘍効果を得られることが示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2117号	氏 名	斉藤 彩
論文題目 Title of Dissertation	Intravenous injection of irradiated tumor cell vaccine carrying oncolytic adenovirus suppressed the growth of multiple lung tumors in a mouse squamous cell carcinoma model 腫瘍融解性アデノウイルス含有キャリア細胞の 静脈内投与によるマウス多発肺扁平上皮癌に対する 抗腫瘍効果		
審査委員 Examiner	主 査 伊藤 下衣子 Chief Examiner 副 査 林 祥剛 Vice-examiner 副 査 丹生 圭一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景】

腫瘍細胞内で特異的に増殖可能なウイルスを腫瘍細胞に感染させ破壊させるウイルス療法は、現在の主流である化学療法や放射線療法に代わる新たな治療法として注目されている。しかし一方で、ウイルスの感染効率が低く十分な効果が発揮されないという欠点や、ウイルスに対する免疫反応により重篤な副作用が生じるリスクが少なからず存在するため、その利用は十分には進んでいない。

もうひとつの新しい抗腫瘍療法として、免疫療法が近年大きな注目を浴びている。これは腫瘍細胞自体あるいはその特異的な抗原を体内に投与することで腫瘍細胞に対する免疫を惹起するという方法であり、持続的かつ強い抗腫瘍作用を付与することができるものと期待される。しかし一方で、自己でもある腫瘍細胞に対する免疫寛容によって攻撃対象として認識されない、あるいは腫瘍細胞による免疫抑制作用によりその効果発現が妨げられてしまう、といったことも少なくない。これらの問題点を克服するため、腫瘍細胞による免疫惹起を強化するアジュバントとなる物質を投与する研究も行われている。抗原とともに投与されたアジュバントが免疫発現を促進することで腫瘍細胞の免疫寛容あるいは免疫抑制状態を打破し、抗原単独では不十分であった抗腫瘍効果を増強することが示されている。これらアジュバントとなる物質の多くは自然免疫を担うToll-like receptor (TLR)のアゴニストであることから、アジュバントによる自然免疫の惹起を起点として腫瘍免疫が活性化されることが示唆されている。

本研究では不活性化したヒト肺癌細胞株A549細胞に制限増殖型アデノウイルスであるAd-IAL3Bを感染させた細胞 (CBOVS) を作成した。A549細胞を腫瘍免疫を刺激する抗原およびAd-IAL3Bを運ぶキャリアー細胞として、Ad-IAL3Bを腫瘍細胞内で特異的に増殖するウイルスおよび自然免疫から腫瘍免疫を活性化させるアジュバントとして用いることで、ウイルス療法と免疫療法双方の特徴をとりいれた新しい抗腫瘍療法を検討した。

【実験】

① 抗アデノウイルス抗体存在下での腫瘍細胞へのアデノウイルス感染効率

アデノウイルスを静脈内投与する際に問題となるのがウイルス中和抗体の存在である。ウイルスをキャリアー細胞で包むことで中和抗体存在下でもCBOVSの腫瘍細胞への感染効率が保たれることを示すため、*in vitro*にて実験を行った。抗ウイルス抗体を添加した培地を用い、扁平上皮癌細胞KLN205にAd-IAL3BあるいはCBOVSを加えて培養した。6時間後にKLN205細胞を回収し、DNAを抽出してReal-Time PCR法によりアデノウイルスDNA量を定量した。結果、Ad-IAL3B単体では抗ウイルス抗体により感染率が大きく低下したのに対し、CBOVSでは抗体存在下でもアデノウイルスの感染効率は低下しなかった。

② Ad-IAL3B投与とCBOVS投与におけるアデノウイルスの生体内分布

CBOVSによる腫瘍病変へのウイルス運搬効率を確認するため、*in vivo*にて実験を行った。DBAマウスに扁平上皮癌細胞KLN205を静脈内投与して肺癌病変を作成し、14日後にAd-IAL3BあるいはCBOVSを静脈内投与した。12時間後に肺、肝臓、脾臓、腎臓を採材してDNAを抽出し、Real-Time PCRによりアデノウイルスDNA量を定量した。結果、Ad-IAL3B単体投与と比較して、CBOVS投与群では癌病巣を多数有する肺への高いアデノウイルス感染が認められた。他の臓器では有意差はなかったものの、Ad-IAL3B単体投与群では、病変のない肺以外の臓器にも非特異的に感染する傾向が認められた。

③ マウス肺扁平上皮癌モデルにおけるCBOVSの抗腫瘍効果

DBAマウスにマウス肺扁平上皮癌細胞株KLN205を静脈内投与、肺癌モデルを作成した。5日間隔で3回各群にそれぞれCBOVS、AdE3、A549、PBSを静脈内投与し、それぞれでの腫瘍抑制効果を検討した。肉眼的および組織学的にA549細胞投与群およびCBOVS投与群で腫瘍の結節数・大きさの減少がみられ、特にCBOVS投与群ではその変化が顕著であった。さらに、CBOVS1投与群では腫瘍結節周辺へのリンパ球の浸潤がみられ、腫瘍細胞に対する免疫系の活性化が示唆された。これらのことから、CBOVSのキャリア細胞が癌細胞ワクチンとして抗腫瘍免疫を活性化し、アデノウイルスの存在がその効果を増強するアジュバントとして作用している可能性が示された。

④ CBOVSによる抗腫瘍免疫の活性化

肺扁平上皮癌細胞KLN205に対する免疫反応がCBOVSにより引き起こされることを確認するため、肺扁平上皮癌細胞KLN205で肺癌病変を作成したマウスにPBS、Ad-IAL3B、A549、CBOVSをそれぞれ3回静脈内投与し、脾臓からリンパ球を回収した。リンパ球を肺癌細胞KLN205で刺激し、24時間後に産生されたサイトカイン（INF- γ 、IL-12）をELISAにて定量した。INF- γ 、IL-12ともにCBOVS投与群ではKLN205での刺激により産生が増加し、CBOVSによる抗腫瘍免疫の惹起が示された。またINF- γ ではキャリア細胞A549投与群でも産生増加がみられ、キャリア細胞によって腫瘍細胞に対する免疫反応が活性化されている可能性が示された。

【考察】

CBOVSを用いることでアデノウイルスが中和抗体により除去されることなく効果的に肺病変へと運搬されることが示された。同時に標的以外の臓器への感染を防ぐことで、アデノウイルス感染による副作用を軽減することも示唆された。またCBOVSを用いることで腫瘍細胞に対する免疫効果と、ウイルスの効率的な運搬という二つの作用によって強い抗腫瘍効果を得られることが示された。