

ニューカッスル病ウイルス感染  
腫瘍ワクチンによる抗腫瘍応答の誘導

高村 摩衣

ニューカッスル病ウイルス感染  
腫瘍ワクチンによる抗腫瘍応答の誘導

酪農学園大学大学院  
獣医学研究科  
獣医学専攻博士課程

高村 摩衣

獣医ウイルス学ユニット  
指導教員 教授 萩原克郎

2017 年度

## 目次

緒論	1
第 I 章 ニューカッスル病ウイルス(NDV)による免疫誘導性	
1. 序文	3
2. 材料・方法	4
3. 結果	8
4. 考察	11
5. 小括	12
第 II 章 NDV-TV 誘導性腫瘍排除に寄与するリンパ球の特定	
1. 序文	13
2. 材料・方法	14
3. 結果	19
4. 考察	28
5. 小括	29
第 III 章 腫瘍細胞株における rNDV 感染性の違いと改善	
1. 序文	30
2. 材料・方法	30
3. 結果	35
4. 考察	43
5. 小括	45
第 IV 章 Ruxolitinib 処置 NDV-TV (NDV-TV-Rux)による免疫応答誘導	
1. 序文	46
2. 材料・方法	46
3. 結果	50
4. 考察	53
5. 小括	54
総括	55
謝辞	57
参考文献	58

## 緒論

がん研究振興財団から発行された *Cancer statistics in Japan 2016* ([http://ganjoho.jp/data/reg\\_stat/statistics/brochure/2016/cancer\\_statistics\\_2016.pdf](http://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/brochure/2016/cancer_statistics_2016.pdf))によると、悪性新生物は日本において1981年から死因の第一位を占め、2015年には総死亡の約3割を占める。また、World Health Organization (WHO) の2017年の悪性腫瘍に関するファクトシート (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>)によると、悪性腫瘍は世界で2番目に多い死因であり、2015年には880万人の死亡原因となっており、世界的には、6人に1人の死亡者ががんに起因している。また、イヌにおいても年齢とともに腫瘍の発生は増加し、その発生率も年々増加している[24]。

ヒトおよび伴侶動物において、腫瘍の治療法は現在、局所療法である外科療法、放射線療法および全身療法である化学療法が主軸である。これらの治療法は腫瘍種やその悪性度、進行度などによって使い分けられるが、転移性や局所再発率の高い腫瘍では外科療法と合わせて放射線療法、化学療法が多く併用される。従って、局所再発や遠隔転移を抑制するためには外科療法と合わせた効果的な補助療法が重要であるが、腫瘍細胞による放射線および化学療法感受性の差や化学療法耐性[44]、治療の副作用[7]が問題となっている。そして現在、第4の治療法として腫瘍免疫療法が期待されている。

腫瘍免疫療法の1つに自己の腫瘍細胞を用いた腫瘍ワクチンがある。腫瘍ワクチンは外科手術等で摘出した自己腫瘍細胞を免疫原として用いることで術後の転移や再発を抑制することが期待されている[28]。自己腫瘍細胞を用いるため、腫瘍関連抗原の特定を必要とせず、現行の治療法と比較し重大な副作用を引き起こさないことが利点である[33]。しかし、腫瘍細胞は生体の免疫機構を逃れるため、その免疫原性は低い[9, 16]。さらに不活化腫瘍細胞を免疫した場合、CD28を介した副刺激の欠損により、T細胞不応答を引き起こすという報告[38]もある。従って、腫瘍ワクチン療法において、有効なアジュバントは必要不可欠である。

Newcastle disease virus (NDV)はモノネガウイルス目パラミクソウイルス科アヴュラウイルス属のマイナスイオン鎖RNAウイルス[14]で、鳥類に重篤な呼吸器、消化器および神経徴候を引き起こす[22]。しかし、NDVは腫瘍細胞選択的

にウイルス複製するという特徴があり[11]、感染した腫瘍細胞を殺す腫瘍溶解性ウイルスの1種であることが知られており、マウスによる研究やヒトにける臨床試験も行われている[6, 39]。一方、腫瘍溶解性による直接的な腫瘍傷害以外に、NDV 感染腫瘍細胞から産生される Type I interferon (IFN)による樹状細胞の成熟[13]や抗原特異的 T 細胞の活性化[23]や感染細胞表面に発現した HN タンパクによる NK 細胞の活性化[18]、MHC class I 発現の増加[41]などの免疫賦活作用が報告されている。そして現在、腫瘍特異的感染や免疫賦活作用を利用し、NDV を腫瘍ワクチンのアジュバントとして用いる NDV 感染腫瘍ワクチン (NDV-TV)が研究されており、NDV-TV はヒトにおいて乳腺癌、卵巣癌[1]、大腸癌[26]、頭頸部扁平上皮癌[19]、多形膠芽腫[36]などで臨床試験が行われ、良好な成績が報告されている。しかし、NDV-TV による腫瘍排除誘導に重要な要因や機序、または NDV-TV では十分に排除出来ない腫瘍に対する対応など検討すべき点は未だ多い。

本論文では、NDV による免疫誘導性を明らかにするため、NDV-TV 免疫マウスの脾細胞を用いて腫瘍細胞に対する細胞傷害活性および NDV 感染前後における腫瘍細胞表面上の MHC class I 発現を調べた (第 I 章)。次に NDV-TV による抗腫瘍応答誘導において重要な各リンパ球の役割について検討するため、NDV-TV で免疫した BALB/c マウスから分離した各リンパ球を T 細胞、B 細胞を持たない C.B.17 *scid/scid* マウスへ移入した後、腫瘍細胞を接種し、腫瘍排除および生存の延長を確認した(第 II 章)。また、腫瘍細胞株における NDV 感染性の違いが NDV-TV による抗腫瘍応答誘導に影響を与える可能性を踏まえ、各種腫瘍細胞株における NDV 感染性の違いについて検討した(第 III 章)。最後に、NDV 感染性を改善させ、作成した NDV-TV による抗腫瘍応答誘導について検討した(第 IV 章)。本研究はヒトおよび伴侶動物における、数多くの腫瘍種に対する NDV-TV の適応を可能にするため、以上 4 章に渡り、NDV-TV による腫瘍排除誘導とそれを担うリンパ球の解明および NDV 低感染性腫瘍に対する NDV-TV の応用の検討を目的とし研究を展開した。

## 第 I 章 ニューカッスル病ウイルス(NDV)による免疫誘導性

### 1. 序文

腫瘍の治療は外科療法、放射線療法および化学療法が主軸であるが、第 4 の治療法として腫瘍免疫療法が注目されている。現在、腫瘍免疫療法の 1 つとして NDV をアジュバントとして用いた腫瘍ワクチン(NDV-TV)が研究され、ヒトでは頭頸部扁平上皮癌や乳癌、卵巣癌などの臨床試験で良好な成績を示している[1, 19]。

本研究では犬の口腔内悪性腫瘍において発生の多いメラノーマ、扁平上皮癌、線維肉腫に着目した。口腔内悪性腫瘍は犬では全腫瘍の 6~7%を占め、4 番目に発生の多い腫瘍である[5, 17]。これらの悪性腫瘍の治療において第一選択は外科的切除であるが、転移率が約 80%となるメラノーマ[4, 21]や局所浸潤の強い扁平上皮癌、線維肉腫においては術後の転移や局所再発が問題となる。そのため、外科的切除と併用する効果的な補助療法が必要である。そこで我々は NDV-TV の補助療法としての有効性を検討するため、マウス由来メラノーマ細胞及び線維肉腫細胞、扁平上皮癌細胞の難治性腫瘍細胞株を用いて NDV-TV 及び UV 不活化腫瘍ワクチン(UV-TV)を作成し、NDV による抗腫瘍応答誘導性を評価した。

## 2. 材料と方法

### 1) 共試動物

BALB/c 系および C57BL/6 系、C3H/HeN 系の 8 週齢マウス(日本クレア株式会社、東京、日本)を使用した。動物実験は酪農学園大学の動物実験委員会の審査、承認を受けて行った(承認番号 VH14A4)。

### 2) 腫瘍細胞の培養とウイルス調製

BALB/c マウス由来線維肉腫細胞(WEHI164)、乳腺癌細胞(BALB-MC)、C57BL/6 マウス由来メラノーマ細胞(B16)、ルイス肺がん細胞(3LL)および C3H/HeN マウス由来扁平上皮癌細胞(SCC VII)、膀胱がん細胞(MBT-2)を使用した。WEHI164 および 3LL は RPMI-1640 培地(RPMI1640; Sigma、セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国)、B16 は DMEM 培地(DMEM; Sigma、セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国)、その他は MEM 培地(MEM; Gibco、ウォルサム、マサチューセッツ州、アメリカ合衆国)を使用し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。各培地には 10%牛胎子血清(FBS; Gibco、ウォルサム、マサチューセッツ州、アメリカ合衆国)および 200 U/mL ペニシリン(明治、東京、日本)、200 μg/mL ストレプトマイシン(明治、東京、日本)を添加した。

緑色蛍光タンパク(GFP)発現 recombinant NDV(rNDV; Hitchiner B1 株)は既報[15]に基づき作成した。試験に用いたウイルスは、発育鶏卵内で増殖させ尿膜液を回収・濾過精製した後、マウスメラノーマ細胞(B16)を用いた focus-forming units (FFUs)により感染価を測定した。

### 3) NDV 感染腫瘍ワクチン(NDV-TV)の作成

WEHI164 および B16、SCC VII を 6 ウェルプレートに 10<sup>5</sup>/well となるように調製し、5%FCS 加 RPMI1640 を維持液として 3ml/well 加え、24 時間 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、rNDV を multiplicity of infection (MOI) 2 に調製し各細胞に感染させた。ウイルス吸着は 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で 60 分間とし、その後 5%FCS 加 RPMI1640 を 3ml/well 加え、37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。24 時間後に EDTA(5mM)加 PBS(EDTA-PBS)で細胞を浮遊させ、HL-2000 Hybri Linker (BM 機器株式会社、東京、日本)を用いて UV 照射(400mJ/cm<sup>2</sup>)によりウ

ウイルス及び腫瘍細胞を不活化し細胞浮遊液を作成した。一方で、各腫瘍細胞を UV 照射( $400\text{mJ}/\text{cm}^2$ )し作成した UV 不活化腫瘍ワクチン(UV-TV)も準備した (Fig. 1)。

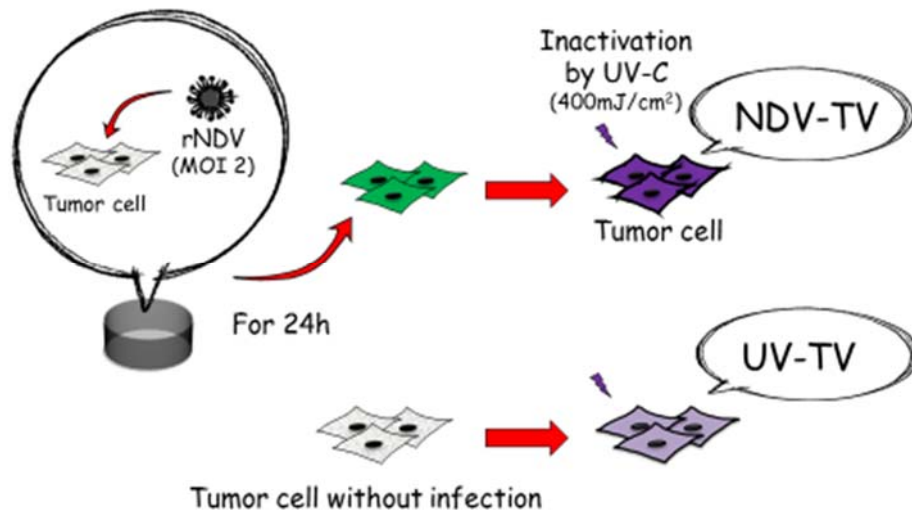


Fig. 1 腫瘍ワクチンの作成概要図

腫瘍細胞に rNDV を MOI 2 で感染させ、24 時間後に UV-C で不活化し、(上) NDV 感染腫瘍ワクチン(NDV-TV)を作成した。腫瘍細胞を UV-C で不活化し、(下) UV 不活化腫瘍ワクチン(UV-TV)を作成した。

#### 4) ワクチネーションプロトコール

NDV-TV または UV-TV をマウス 1 頭当たり  $10^5$  個腹腔内接種 (i.p.) (各群  $n = 3$ )し、1 週間隔で 4 回接種した。また、対照群(control)として培地  $200\mu\text{L}$  のみを同様に 1 週間隔で 4 回接種した( $n = 2$ )。

#### 5) 脾細胞の採取

最終ワクチン接種 1 週後、マウスにペントバルビタールナトリウムを  $50\text{mg}/\text{kg}$  腹腔内投与し、全身麻酔下で全採血により安楽殺を施した。その後、脾臓を採材し、メッシュを通して単一細胞を回収した。得られた細胞を EDTA-PBS で洗浄し、塩化アンモニウム  $14\text{mL}$  を用いて溶血処理した後、EDTA-PBS で洗浄を行い以下の実験に用いた。



## 6) 細胞傷害活性測定

各群のマウスから得られた脾細胞を、UV(400 mJ/cm<sup>2</sup>)で不活化した腫瘍細胞(各マウスに免疫原として接種した腫瘍細胞株)と effector-target 比 (E:T 比) 4:1 で 5 日間共培養した。その後、Ficoll-Conray 比重液( $d = 1.088$ )を用いて、エフェクター細胞として脾細胞単核球(SMC)を回収した。SMC をリン酸緩衝液(PBS)にて洗浄し、ターゲット細胞である腫瘍細胞と E:T 比 20:1 で共培養した。24 時間後、エフェクター細胞による細胞傷害活性を Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH) (Roche Diagnostics、バーゼル、スイス)を用いて測定した。細胞傷害率は以下の計算式より算出した。

Cytotoxicity (%) = (Experimental LDH – Effector spontaneous LDH - Target spontaneous LDH)/(Target maximum LDH - Target spontaneous LDH) × 100

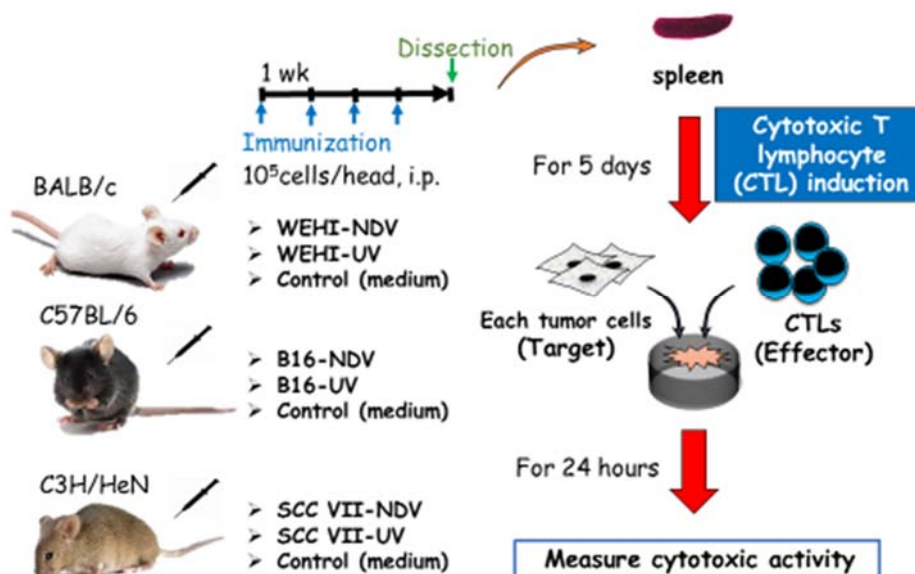


Fig. 2 ワクチネーションおよび細胞傷害活性測定の概要図

WEHI164 を用いた NDV-TV(WEHI-NDV)および UV-TV(WEHI164-UV)、B16 を用いた NDV-TV(B16-NDV)および UV-TV(B16-UV)、SCC VII を用いた NDV-TV(SCC VII-NDV)および UV-TV(SCC VII-UV)を各マウスに免疫した。また、control として各マウスに培地を接種した。免疫後、採取した脾細胞を細胞傷害性 T リンパ球(CTL)誘導処置し、回収した CTL (Effector)と各腫瘍細胞(Target)を共培養し、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を測定した。

#### 7) MHC class I 分子発現測定

6 well プレートに各腫瘍細胞を  $5 \times 10^5$  cells/well となるように調製し、各腫瘍細胞に対応した 5%FBS 加培地を 3ml/well 加え、24 時間 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、rNDV を MOI 2 に調製し各細胞に感染させた。ウイルス吸着は 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 60 分間とし、その後 5%FCS 加培地を 3ml/well 加え、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。24 時間後、Trypsin-EDTA solution (Sigma、セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国)を用いて腫瘍細胞を回収し、PBS で洗浄後、細胞沈渣を PBS で再浮遊した。マウス MHC class I 分子の発現は PE anti-mouse H-2 (Bio legend、サンディエゴ、カリフォルニア州、アメリカ合衆国)の抗体と室温 30 分間反応させ Coulter Epics XL (Beckman Coulter、ブレア、カリフォルニア州、アメリカ合衆国)で解析した。

#### 8) 統計学解析

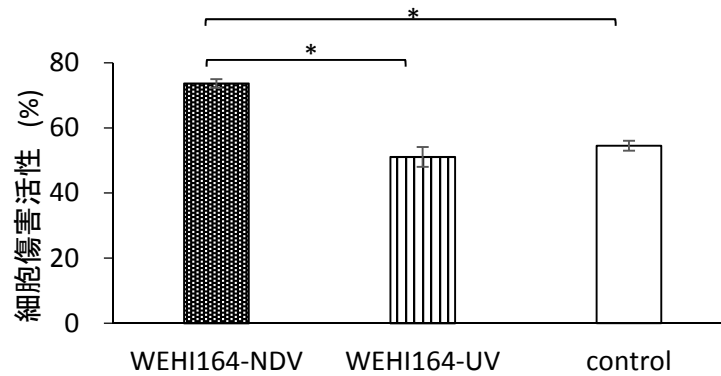
統計学的解析は R studio version 1.0.143 を用いて行った。得られたデータは Tukey-Kramer multiple comparison method または student t-test で解析を行った。

### 3. 結果

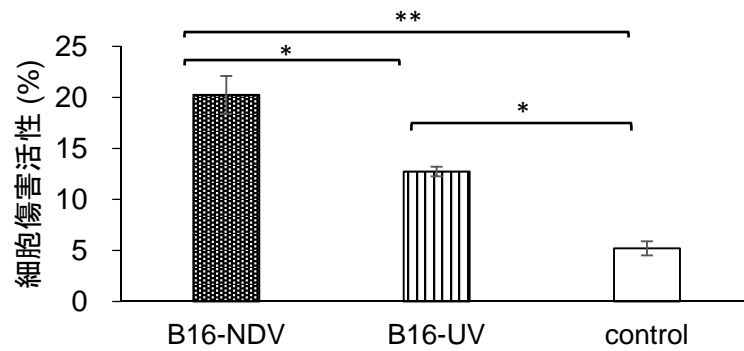
#### 1) NDV-TV による抗腫瘍応答誘導

NDV-TV、UV-TV および培地による抗腫瘍応答誘導について検討するため、免疫 SMC における腫瘍細胞特異的な細胞傷害活性を測定した。WEHI164 に対する細胞傷害率は Fig. 3A に示すように、WEHI-NDV 免疫マウスにおいて平均 73.6%であり、WEHI164-UV 免疫マウスの 51.1%および control マウスの 54.5%と比較し、有意に細胞傷害が誘導された(それぞれ  $p = 0.01$ 、 $p = 0.02$ )。また、B16 に対する細胞傷害率は Fig. 3B に示すように、B16-NDV 免疫マウスにおいて平均 20.3%であり、B16-UV 免疫マウスの 12.7%および control マウスの 5.2%と比較し、有意に高い細胞傷害性が誘導された(それぞれ  $p = 0.04$ 、 $p = 0.005$ )。さらに B16-UV 免疫マウスも control マウスと比較して有意に細胞傷害を誘導した( $p = 0.04$ )。SCC VII に対する細胞傷害率は Fig. 3C に示すように、SCC VII-NDV 免疫マウスにおいて平均 8.1%、SCC VII-UV 免疫マウスにおいて平均 5.3%であり、control マウスと比較して有意に細胞傷害を誘導した(それぞれ  $p = 0.001$ 、 $p = 0.03$ )。しかし SCC VII-NDV 免疫マウスと SCC VII-UV 免疫マウスとでは有意な差は認められなかった( $p = 0.06$ )。

A



B



C

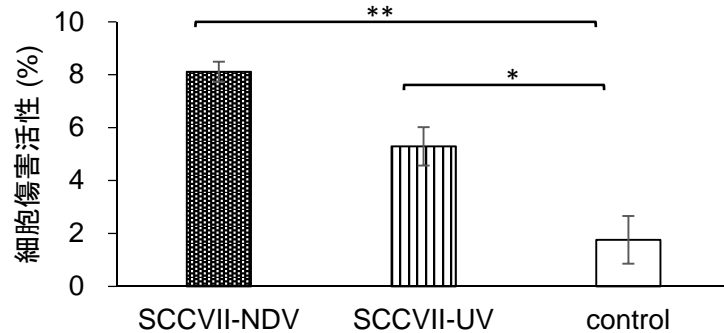


Fig. 3 NDV-TV による抗腫瘍応答誘導

3 種の腫瘍細胞株について NDV-TV による細胞傷害活性誘導を検討した。NDV-TV、UV-TV または培地をマウス(各群 n=3、control n=2)に免疫後、各マウスから摘出した脾臓由来の単核球(SMC)における腫瘍特異的な細胞傷害率(E : T = 20 : 1)を調べた(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )。A) WEHI164、B) B16、C) SCC VII を用いて NDV-TV および UV-TV を作成し、control には培地を接種した。

## 2) rNDV 感染による腫瘍細胞表面上の MHC class I 分子発現の変化

rNDV 感染による腫瘍細胞表面上の MHC class I 分子発現への影響を検討するため、rNDV (MOI 2)感染前後における 1 細胞あたりの MHC class I 発現量として抗マウス MHC class I-PE 抗体を用いて平均蛍光強度をフローサイトメトリー解析した。感染前(mock)における平均蛍光強度は MBT-2 (210.2)および SCC VII (101.2)で他の細胞より高く、WEHI164 (41.5)は中程度であり、B16 (22.5)、BALB-MC (17.0)、3LL (14.2)は比較的弱かった。それらの細胞が rNDV 感染すると WEHI164 以外の細胞で有意に蛍光強度の増加が認められた (Table 1)。

Table 1. rNDV 感染前後の腫瘍細胞表面における MHC class I 抗体の蛍光強度

	Mean Fluorescence Intensity			
	mock		NDV	
	Ave.	SE	Ave.	SE
B16	22.5	4.1	51.2**	4.2
WEHI164	41.5	2.7	51.0	9.5
3LL	14.0	2.8	35.3**	4.3
SCCVII	101.2	9.7	346.1**	14.6
MBT-2	210.2	54.3	428.4*	32.1
BALB-MC	17.0	2.6	123.4**	9.6

rNDV 感染前(mock)および感染後(NDV)における各腫瘍細胞株の MHC class I 分子発現を平均蛍光強度で評価した。平均(Ave.)および標準誤差(SE)を算出し、mock に対する rNDV 感染後の発現変化について有意差を検定した(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )。

#### 4. 考察

本研究で NDV-TV によって効果的な腫瘍に対する細胞傷害が誘導されることが示された。腫瘍細胞は免疫原性が低いことが知られており、これは生体の免疫機構からの回避を許す要因の 1 つである。それゆえ、腫瘍ワクチンの効果を高めるには免疫原性を増強するための効果的なアジュバントが必要不可欠である。NDV は腫瘍細胞特異的に複製し[12, 20, 43]、腫瘍細胞表面上の MHC class I の発現を上昇させるとともに、感染細胞からの Type I IFN 産生を介して免疫活性を増強する[41]。この特徴に着目して、我々は NDV による抗腫瘍免疫応答を調べるため、NDV-TV または UV-TV を免疫したマウスの SMC における腫瘍特異的な細胞傷害性を評価した。

本研究ではマウスへのワクチン接種は腹腔内に NDV-TV ( $10^5$  cells/head)を 1 週間隔で計 4 回接種した。過去に行われたヒトの結腸がんに対する臨床試験では NDV-TV ( $10^7$  cells/patient)を皮内に 2 週間隔で計 5 回接種し、さらに 3 ヶ月後に 6 回目を接種するワクチンプロトコールで行っていた[34]。また、マウスにおいては過去の報告では  $5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^7$  cells/head の NDV-TV を皮下または筋肉に 1~2 回接種し、抗腫瘍応答が検討されていた[29, 40, 48]。予備試験において、最小有効接種量(NDV-TV  $10^5$  cells)を 4 回接種が確認できたことから、以後 4 回の接種に統一した条件で試験した。

今回用いた 3 種の腫瘍細胞株のうち、WEHI164 および B16 では NDV-TV (WEHI164-TV、B16-TV)接種群は UV-TV (WEHI164-UV、B16-UV)接種群および control 群と比較し有意な細胞傷害を示した(Fig. 3A, 3B)。一方、SCC VII では SCC VII-NDV 接種群は control 群より有意に細胞傷害を示したが、SCC VII-UV 接種群とは有意差は認められなかった(Fig. 3C)。以上の結果より NDV-TV は抗腫瘍応答を効果的に誘導することが示された。しかし、SCC VII-NDV 接種群と SCC VII-UV 接種群の細胞傷害活性には有意差が認められなかった点から、腫瘍細胞株によっては NDV による十分な細胞傷害を誘導することが困難な場合があると考えられた。また、NDV-TV による細胞傷害誘導の程度は腫瘍細胞株によって異なることが明らかとなった。NDV は腫瘍細胞表面上の MHC class I の発現上昇、感染細胞からの Type I IFN 産生、ケモカインを介して免疫活性を増強する[41]ことより、各腫瘍細胞株における細胞傷害活性の差は、各腫瘍細胞

胞における rNDV 感染性や rNDV 感染によって生じる細胞表面上の MHC class I の発現、Type I IFN 産生等の差が関与している可能性が示唆された。そのため、腫瘍細胞株間における NDV-TV の腫瘍傷害誘導の差の要因に MHC class I の発現が関係するのかを調べた。フローサイトメトリー解析から、1 細胞あたりの MHC class I 発現量を平均蛍光強度で評価した結果、感染前後のその発現量は各腫瘍細胞で異なった。その発現量は、WEHI164 以外の細胞株で、rNDV 感染によって有意に増加した。WEHI164 細胞は、感染前から中程度の発現であり、感染による増加傾向はあったが、有意差は認められなかった (Table 1)。これらの結果より、rNDV 感染により MHC class I 発現量増加が誘導されることが明らかとなった。しかし、NDV-TV による細胞傷害誘導を検討した腫瘍細胞 3 株のうち、細胞傷害率(WEHI164 > B16 > SCC VII)と MHC class I 発現量(SCC VII > WEHI164 > B16)が必ずしも一致しないことから、NDV-TV による細胞傷害誘導は MHC class I 発現以外の要因も関与していることが示唆された。従って、各腫瘍細胞株における細胞傷害活性の差に関しては、各腫瘍細胞株における rNDV 感染性や Type I IFN 産生等のさらなる検討が必要と考えられた。

## 5. 小括

本章において以下のことが明らかとなった。

- 1) NDV は腫瘍ワクチンによる細胞傷害活性誘導を有意に増強した。
- 2) NDV-TV による抗腫瘍応答誘導は用いる腫瘍細胞株によってその効果が異なる。
- 3) NDV-TV による細胞傷害誘導は MHC class I 発現以外の要因も関与している可能性がある。

## 第 II 章 NDV-TV 誘導性腫瘍排除に寄与するリンパ球の特定

### 1. 序文

ヒトにおいて、軟部組織肉腫は希少悪性腫瘍の 1 つで発生は全腫瘍の 1%程度と言われている[35]。線維肉腫は世界保健機関(WHO)によって分類される 50 種以上ある軟部組織肉腫組織サブタイプの 1 つである。線維肉腫の患者の 50%は局所再発や転移によって死亡する(追跡期間中央値 1 年; range 1~8 年)[3]。高率で発生する局所再発の予防には術後の局所コントロールが重要だが[27]、放射線療法では不十分な事例も存在する[45]。そして、軟部組織肉腫の患者の予後は過去 20 年間改善していない[42]。これらの事実は近年使用されている治療は腫瘍排除に効果的ではなく、術後の再発を防ぐために新たな治療法が必要であるということを示している。そこで筆者は、現在 NDV-TV による線維肉腫に対する抗腫瘍効果については検討されていない点、第 I 章で線維肉腫細胞である WEHI164 を用いた NDV-TV によって、最も高い細胞傷害活性が誘導された点を踏まえ、第 II 章の研究では線維肉腫細胞に着目し、WEHI164 を使用した。

第 I 章でも述べたとおり、NDV-TV はいくつかの悪性腫瘍の臨床試験において良好な成績を示しており、現在、NDV-TV による作用としては以下の報告がある。NDV に感染した腫瘍細胞から産生された type I IFN は樹状細胞の成熟を促し、自然免疫だけではなく獲得免疫も活性化する [13, 23]。また、NDV 感染細胞は IL-2 産生を誘導し、ヘルパー T (Th)細胞の増殖を促し、さらに CD28 を介した共刺激によって T 細胞不応答を防ぐと報告されている[38]。また、*ex vivo* において、NDV-TV による免疫 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞が腫瘍細胞に対する細胞傷害に寄与していることが報告されている[40]。また、NDV 感染した腫瘍細胞表面上の hemagglutinin neuraminidase (HN) protein は NK 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  の産生を促進すると報告されている[18]が、Natural killer T (NKT)細胞や NK 細胞などの CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞以外のリンパ球サブセットの関与は不明な点がある。従って、本研究では WEHI164 細胞を用いて NDV-TV によって誘導される腫瘍排除において中心的な役割を担うリンパ球を特定することを目的とした。



## 2. 材料と方法

### 1) 共試動物

BALB/c 系の 8 週齢マウスおよび C.B.17*scid/scid*(*scid*) の 10 週齢マウス(日本クレア株式会社、東京、日本)を使用した。動物実験は酪農学園大学の動物実験委員会の審査、承認を受けて行った(承認番号 VH14A4)。

### 2) 腫瘍細胞の培養とウイルス調製

第 I 章と同様に BALB/c マウス由来線維肉腫細胞(WEHI164)を使用した。WEHI164 は 5%牛胎子血清(FCS; Biological Industries、クロムウェル、コネチカット州、アメリカ合衆国)および 200 U/mL ペニシリン、200  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

GFP 発現 rNDV は萩原らの報告[15]に基づき作成した。

### 3) WEHI164 を用いた NDV-TV(WEHI-NDV)の作成

WEHI164 を 6 well プレートに 10<sup>5</sup>/well となるように 5%FCS 加 RPMI1640 で調製し 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養した。その後、rNDV を MOI 2 で細胞に感染させた。ウイルスは 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 60 分間吸着し、その後 5%FCS 加 RPMI1640 培地を 3ml/well 加え、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。24 時間後に EDTA-PBS で細胞を浮遊させ、HL-2000 Hybri Linker (BM 機器株式会社、東京、日本)を用いて UV 照射(400mJ/cm<sup>2</sup>)によりウイルス及び腫瘍細胞を不活化し、RPMI1640 培地で細胞浮遊液を作成した。

### 4) ワクチネーションプロトコール

WEHI-NDV を BALB/c マウス 1 頭当たり 10<sup>5</sup>個腹腔内接種(i.p.)し、1 週間隔で 4 回接種することを接種プログラムとし、免疫 BALB/c マウスを作成した。また、RPMI1640 培地 200  $\mu$ L のみを同様に 1 週間隔で 4 回接種した未免疫 BALB/c マウスを作成した(各群 n = 9)。

## 5) リンパ球の選択分離

最終ワクチン接種 1 週後、マウスにペントバルビタールナトリウムを 50mg/kg 腹腔内投与し、全身麻酔下で全採血により安楽殺を施した。その後、第 I 章と同様の手順に従って脾臓から脾細胞を分離した。脾細胞を MACS バッファー(2mM EDTA、0.5%BSA 加 PBS)で浮遊させ、 $10^7$  個の脾細胞に対し 20 倍希釈になるように CD4 (L3T4)または CD8、CD49b Micro Beads 抗体(Milteny Biotec、ベルギッシュ・グラートバッハ、ドイツ)を添加し、4℃ 15 分間インキュベートした。MACS バッファーを加え、 $300\times g$  4℃ 10 分間遠心分離した。細胞沈渣は 1ml の MACS バッファーで浮遊させ、Auto MACS (Milteny Biotec、ベルギッシュ・グラートバッハ、ドイツ)を用いてプロトコールに従って標的細胞を選択的に分離した。

CD3<sup>+</sup>細胞の分離では、MACS バッファーで浮遊させた  $10^7$  個の脾細胞に対し 20 倍希釈になるように CD3  $\epsilon$  biotin 付抗体(Milteny Biotec、ベルギッシュ・グラートバッハ、ドイツ)を添加し、4℃ 10 分間インキュベートした。MACS バッファーを加え、 $300\times g$  4℃ 10 分間遠心分離し、細胞沈渣を MACS バッファーで浮遊させ、抗 Biotin Micro Beads 抗体を添加し、4℃ 15 分間インキュベートした。反応後 MACS バッファーで洗浄し、細胞を 1ml の MACS バッファーで浮遊させ、Auto MACS (Milteny Biotec、ベルギッシュ・グラートバッハ、ドイツ)で標的細胞を選択的に分離した。

CD8<sup>+</sup>細胞は CD4<sup>+</sup>細胞分離後の CD4<sup>-</sup>細胞分画から分離し、CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞は CD49b<sup>+</sup>細胞分離後の CD49b<sup>-</sup>細胞分画から CD3<sup>+</sup>細胞を分離することで採取した。

## 5) リンパ球移入と腫瘍細胞接種

分離された CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD49b<sup>+</sup>細胞を RPMI1640 培地に浮遊させ、様々な組み合わせのリンパ球を全体で  $3\sim 4\times 10^7$  cells/mouse (0.2 mL)となるように、scid マウスの腹腔内へ移入した。また、非移入群のマウスには RPMI1640 培地を 0.2 mL 腹腔内投与した。リンパ球移入 2 日後、 $5\times 10^5$  cells/mouse の WEHI164 を scid マウスに腹腔内接種した。そして 4 週間の観察後、ペントバルビタールナトリウムを 50mg/kg 腹腔内投与し、全身麻酔下で全採血により安

楽殺を施し、腹腔内の観察を行った。観察期間内に死亡またはエンドポイントに達したマウスも同様に腹腔内の観察を行った。

#### 6)末梢血リンパ球サブセットの解析

腫瘍接種後のマウスから採血した末梢血を塩化アンモニウムで溶血処置した後、PBS で洗浄し、細胞沈渣を PBS 再浮遊した。リンパ球サブセットの測定は、Anti-MouseCD4-FITC Monoclonal Antibody と Rat Anti-MouseCD8a/Lyt-2-PE または Hamster Anti-MouseCD3 $\epsilon$ -PE (Beckman Coulter、ブレア、カリフォルニア州、アメリカ合衆国)と CD49b/Pan-NK Cells FITC (BD Pharmingen™、フランクリンレイクス、ニュージャージー州、アメリカ合衆国)の抗体と室温 30 分間反応させ Coulter Epics XL (Beckman Coulter、ブレア、アメリカ合衆国)で解析した。

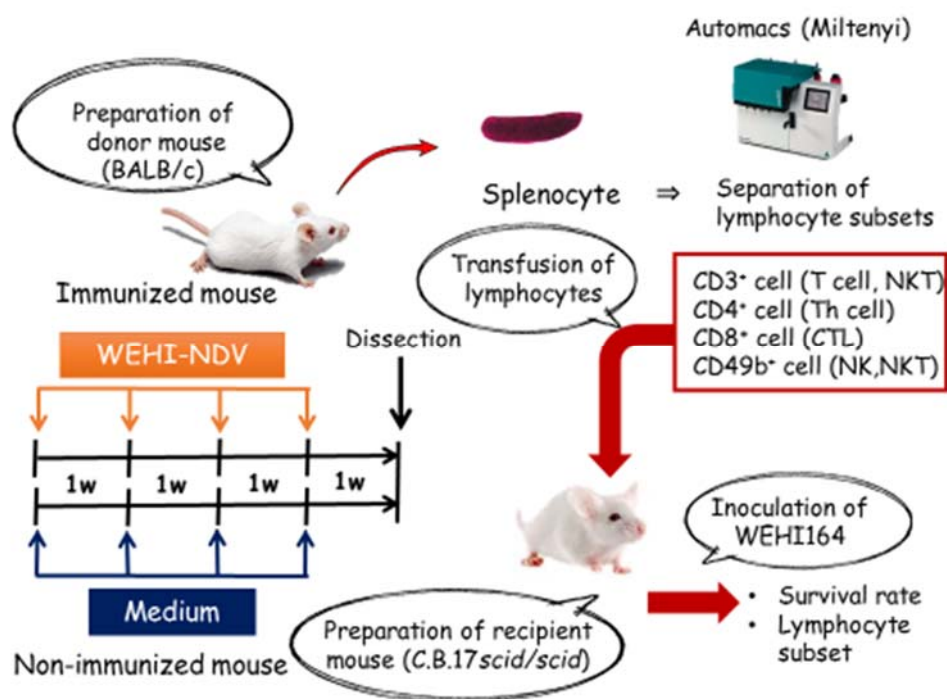


Fig. 4 C.B.17scid/scid マウスへのリンパ球移入実験の概要図

免疫または未免疫 BALB/c マウスの脾細胞から T 細胞、NKT 細胞を含む CD3<sup>+</sup>細胞、ヘルパー T 細胞(Th cell)である CD4<sup>+</sup>細胞、細胞傷害性 T 細胞(CTL)である CD8<sup>+</sup>細胞、NK および NKT 細胞を含む CD49b<sup>+</sup>細胞を分離し、各種組み合わせで scid マウスに移入した後、WEHI164 を接種した。

## 7) IFN- $\gamma$ 遺伝子発現の測定

免疫 BALB/c マウスと未免疫 BALB/c マウスの脾臓から分離した脾細胞をエフェクター細胞とし、WEHI164 をターゲット細胞として用いた。12 ウェルプレートにエフェクター細胞とターゲット細胞を 2% FCS 加 RPMI1640 培地で浮遊させ調製し、細胞比 20:1 で 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 6 時間共培養した。培養後、細胞を 0.5 mL の TRIzol (Invitrogen corporation、カールスバッド、カリフォルニア州、アメリカ合衆国)を用いて溶解し、定法に従って RNA を抽出した。TRIzol 細胞溶解液に 0.1 mL の chloroform を加え、室温 5 分間静置した後、16,440 × g、4°C、10 分間遠心分離した。その後、無色の RNA 層を新しいチューブに移し、0.25mL の isopropanol を加え 10 分間の静置した後、16,440 × g、4°C、10 分間遠心分離した。上清を取り除き、RNA pellet を 1 mL の 75% ethanol で懸濁し、16,440 × g、4°C、10 分間遠心分離した。再度、上清を取り除き、RNA pellet を乾燥させ、0.025 mL の RNase-free water で懸濁した。cDNA 合成は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics、バーゼル、スイス)を用いた。添付書に従い、1  $\mu$ g の total RNA を oligo(dT) プライマーを用いて cDNA を合成した。

## 8) 定量 PCR 法

作成した cDNA を用いて、IFN- $\gamma$  mRNA と housekeeping gene として GAPDH mRNA の発現量を QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen、ハイデン、ドイツ)を用いた定量 PCR 法を Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostic、バーゼル、スイス)で解析した。反応条件は、GAPDH については熱変性ステップ 94°C 15 秒、アニーリングステップ 60°C 30 秒、伸長ステップ 72°C 15 秒を 1 サイクルとして反応させ、45 サイクルとした。また、IFN- $\gamma$  についてはアニーリングを 58°C として測定を行った。プライマーは以下の配列を使用した。IFN- $\gamma$  forward primer, 5'-TGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAAC-3' and reverse primer, 5'-GTTGTTGCTGATGGCCTGAT-3'; GAPDH forward primer, 5'-CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA-3' and reverse primer, 5'-AACGGATTTGGCCGTATTG-3'各サンプルの GAPDH の遺伝子発現量を基準

に、各遺伝子発現量の相対量を算出した。

#### 6) 統計学解析

統計学的解析は R studio version 1.0.143 を用いて行った。相関解析は Spearman's rank correlation を用いた。また、有意差検定は student t-test を用いた。

### 3. 結果

#### 1) WEHI164 接種 scid マウスにおける生存率

まず始めに、WEHI164 接種による scid および BALB/c マウスの生存率を調べた。各マウスに WEHI164 ( $10^5$  cells/head)を腹腔内接種し、生存率を比較した結果、scid マウスでは腫瘍接種後、平均 14.7 日で全個体死亡した。一方、BALB/c マウスでは腫瘍接種 60 日後においても 100%生存率で、腹腔内での腫瘍は認められなかった (Fig. 5)。

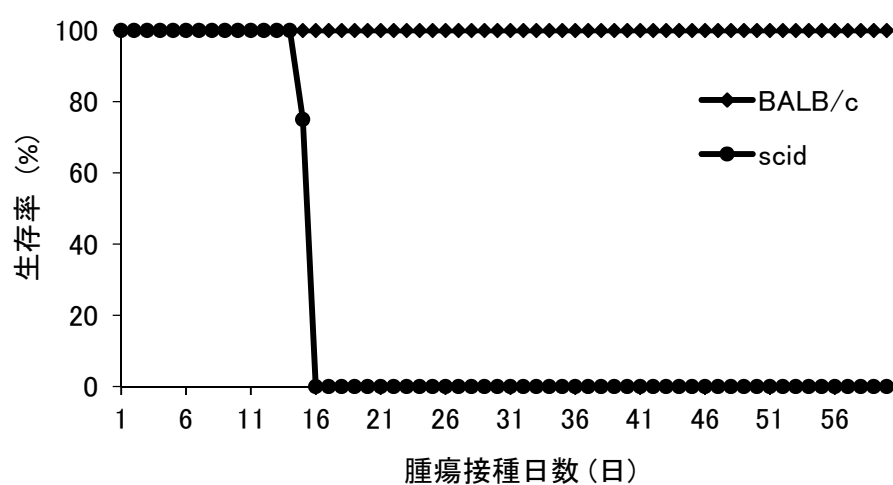


Fig. 5 BALB/c マウスと scid マウスにおける腫瘍接種に対する生存率

BALB/c マウスと scid マウスに WEHI164 ( $5 \times 10^5$  cells/head)を腹腔内接種し 60 日間観察した(各群  $n = 6$ )。

## 2) SMC 移入による抗腫瘍応答

腫瘍抗原感作を受けたリンパ球による抗腫瘍応答を評価するために、Fig. 5 で WEHI164 接種(免疫)後の BALB/c 由来 SMC を scid マウスに移入し、その後腫瘍細胞(WEHI164)を腹腔内に接種した。これら BALB/c 由来 SMC を移入した scid マウスの生存率は、腫瘍接種 4 週後において生存率 60%を示した。一方で WEHI164 未感作 BALB/c 由来の SMC を移入した scid マウスは全個体死亡し、その平均生存日数は 18.3 日だった(data not shown)。

そして、WEHI-NDV または RPMI1640 培地を接種した BALB/c マウスから採取した SMC を scid マウスに移入し、WEHI164 を接種した。腫瘍接種 30 日後における生存率は免疫 SMC 移入群では 71.4%だったが、未免疫 SMC 移入群では 0% (平均生存日数 12.0 日)だった(Fig. 6)。

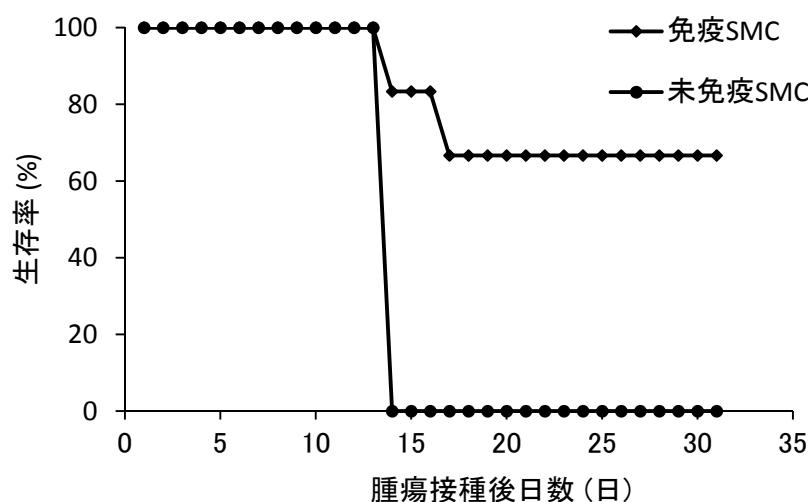


Fig. 6 SMC 移入処置 scid マウスの腫瘍接種後の生存曲線

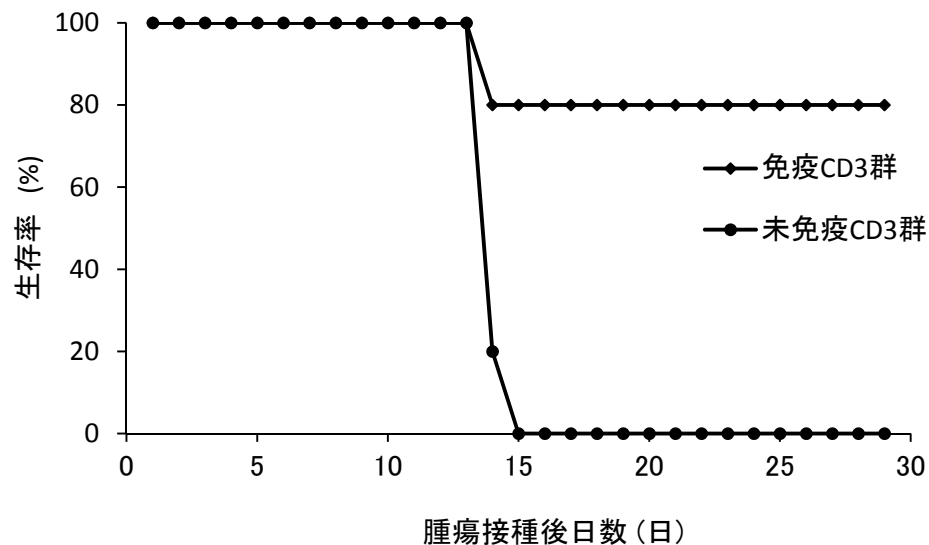
ワクチン免疫した BALB/c マウスまたは未免疫の BALB/c マウスの SMC を移入した scid マウスにおける腫瘍接種後の生存率を示した(各群 n = 6)。

## 3) CD3<sup>+</sup>細胞移入による抗腫瘍応答

NDV-TV 免疫個体由来の SMC 中 CD3<sup>+</sup>細胞の腫瘍排除効果を調べた。WEHI-NDV または対照として RPMI1640 培地を免疫した BALB/c マウスから分離した免疫または未免疫個体由来 CD3<sup>+</sup>細胞( $3 \times 10^7$  cells/head)を scid マウスに移入

した。その後、WEHI164 を腹腔内に接種した。免疫 CD3<sup>+</sup>移入群では腫瘍接種 28 日後の生存率 80%を示した。一方、未免疫 CD3<sup>+</sup>移入群は全頭死亡し、平均生存日数は 14.2 日であった(Fig. 7A)。生存した免疫 CD3<sup>+</sup>移入群では腹腔内における腫瘍は認められなかったが、死亡個体では腫瘍の腹腔内播種および血様の腹水が認められた(Fig. 7B)。

A



B

(i) 免疫 CD3 群

(ii) 未免疫 CD3 群

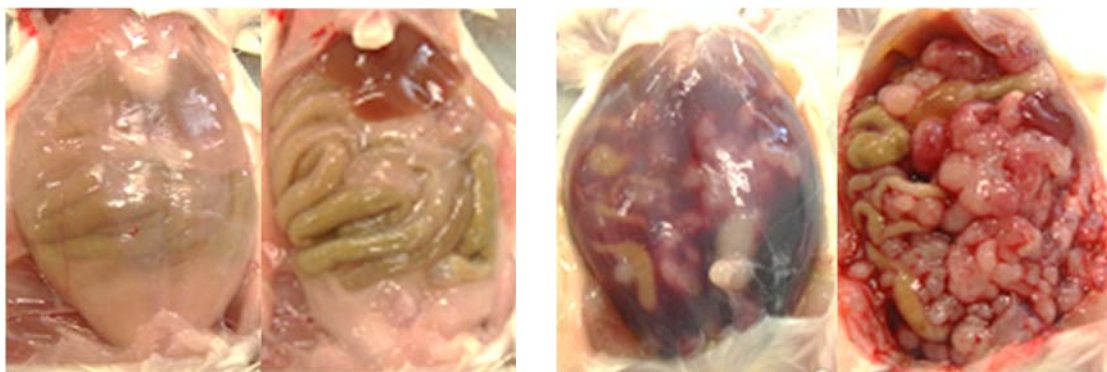


Fig. 7 CD3<sup>+</sup>細胞移入 scid マウスにおける腫瘍接種後の生存曲線

(A)免疫あるいは未免疫 BALB/c マウス由来 CD3<sup>+</sup>細胞を移入した scid マウスにおける腫瘍接種後の生存率を示した(各群 n = 5)。 (B)(i)免疫 CD3 群における WEHI164 接種 28 日後、および(ii)未免疫 CD3 群における死亡時の腹腔内所見を示した。



#### 4) CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞移入による抗腫瘍応答

CD3<sup>+</sup>細胞中の CD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞と CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞は、抗原特異的な獲得免疫応答を示す。そこで、NDV-TV によって誘導される CD8<sup>+</sup>および CD4<sup>+</sup>細胞の腫瘍排除を検討した。WEHI-NDV で免疫した BALB/c マウス(免疫)または未免疫 control として RPMI1640 培地を接種した BALB/c マウス(未免疫)から CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞を分離した後、様々な組み合わせで scid マウスに移入(CD4<sup>+</sup>:  $2.4 \times 10^7$  cells/head, CD8<sup>+</sup>:  $9.4 \times 10^6$  cells/head)し、A~D 群および非移入群の 5 群を作成した(Table 2)。腫瘍接種 28 日後の生存率は免疫 CD4<sup>+</sup>と未免疫 CD8<sup>+</sup>を移入した A 群および未免疫 CD4<sup>+</sup>と免疫 CD8<sup>+</sup>を移入した B 群で 16.7%、免疫 CD4<sup>+</sup>と免疫 CD8<sup>+</sup>を移入した C 群で 50%、非移入群および未免疫 CD4<sup>+</sup>と未免疫 CD8<sup>+</sup>を移入した D 群では 0%であった。また、非移入群および D 群の平均生存日数はそれぞれ 15 日、18.3 日であった(Fig. 8)。腫瘍接種 28 日後における生存率に差が認められなかった A 群および B 群では、生存個体は両群ともに腫瘍増殖が認められたが、B 群で認められた腹水は A 群では認めなかった。さらに、腹腔内の腫瘍増殖が認められなかった免疫 CD3<sup>+</sup>移入群の生存個体とは異なり、C 群の生存個体では腫瘍増殖が認められた。

Table 2. CD4<sup>+</sup>と CD8<sup>+</sup>細胞のマウス移入組み合わせ

	免疫		未免疫	
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
A 群	+	—	—	+
B 群	—	+	+	—
C 群	+	+	—	—
D 群	—	—	+	+
非移入	—	—	—	—

WEHI-NDV で免疫した BALB/c マウス(免疫)または RPMI1640 培地を接種した BALB/c マウス(未免疫)の脾細胞から CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞を分離した。各群の scid マウスに移入した細胞を+で示した。

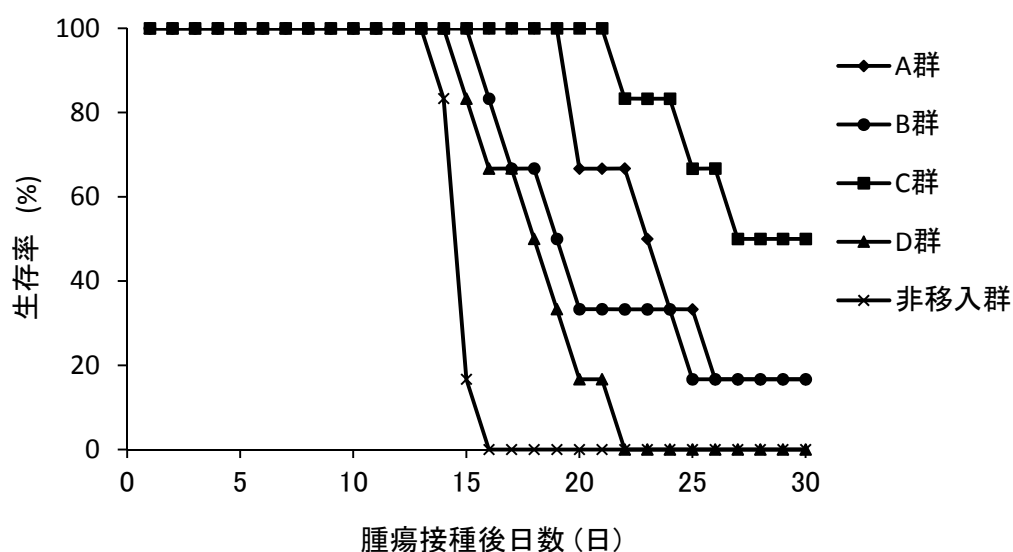


Fig. 8 CD4<sup>+</sup>細胞及び CD8<sup>+</sup>細胞移入 scid マウスにおける腫瘍接種後の生存曲線  
免疫あるいは未免疫 BALB/c マウス由来 CD4<sup>+</sup>細胞と CD8<sup>+</sup>細胞を様々な組合せで scid マウスに移入した際の生存率を示した。免疫 CD4<sup>+</sup>細胞+未免疫 CD8<sup>+</sup>細胞群 (A 群)、未免疫 CD4<sup>+</sup>細胞+免疫 CD8<sup>+</sup>細胞群 (B 群)、免疫 CD4<sup>+</sup>細胞+免疫 CD8<sup>+</sup>細胞群 (C 群)、未免疫 CD4<sup>+</sup>細胞+未免疫 CD8<sup>+</sup>細胞群 (D 群)、移入なし群 (非移入群) の 5 群を作成し、腫瘍接種後 30 日間観察を行った(各群 n = 6)。

#### 5) CD49b<sup>+</sup>および CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞移入による抗腫瘍応答

免疫 CD3<sup>+</sup>移入群と比較し、免疫 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞を移入した C 群において生存率の低下および生存個体における腫瘍増殖が認められたことより、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>細胞である NKT 細胞に着目した。そこで、WEHI-NDV で免疫した BALB/c マウス(免疫)または未免疫 control として RPMI1640 培地を接種した BALB/c マウス(未免疫)から NKT および NK 細胞を含む CD49b<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞を含む CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を分離した後、様々な組み合わせで scid マウスに移入(CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup> :  $4 \times 10^7$ cells/head, CD49b<sup>+</sup> :  $5.1 \times 10^6$ cells/head)し、E~H 群および非移入群の 5 群を作成した(Table 3)。腫瘍接種 28 日後の生存率は未免疫 CD49b<sup>+</sup>と免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を移入した F 群および免疫 CD49b<sup>+</sup>と免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を移入した G 群で 100%、免疫 CD49b<sup>+</sup>と未免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を移入した E 群で 16.7%、非移入群および未免疫 CD49b<sup>+</sup>と未免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を移入した H 群では 0%であった。非移入群および H 群における平均生存日数はそれぞれ 15 日、14.7 日であった(Fig. 9)。免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を移入した F および G 群ともに腹腔内における腫瘍増殖は認められなかった。さらに、末梢血中 NKT(CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>)細胞率は全ての群で H 群と比較して有意な差は認められなかった(Fig. 10A)。一方、腫瘍接種 14 日後における末梢血中 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞率は H 群と比較して F 群(CD4<sup>+</sup> (%),  $p = 0.0003$ ; CD8<sup>+</sup> (%),  $p = 0.0002$ )、G 群(CD4<sup>+</sup> (%),  $p = 0.007$ ; CD8<sup>+</sup>(%),  $p = 0.014$ )で有意に上昇した(Fig. 10B, 10C)。そして、生存日数と腫瘍接種 14 日後における末梢血 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞率の相関係数を Spearman's correlation coefficient ( $r_s$ )にて解析すると CD4<sup>+</sup> ( $r_s = 0.662$ ,  $p < 0.01$ )および CD8<sup>+</sup>細胞率( $r_s = 0.650$ ,  $p < 0.01$ )は生存日数と有意な正の相関が認められた。

Table 3. CD49b<sup>+</sup>細胞、CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞のマウスへの移入組み合わせ

	免疫		未免疫	
	CD49b <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD49b <sup>-</sup>	CD49b <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD49b <sup>-</sup>
E 群	+	-	-	+
F 群	-	+	+	-
G 群	+	+	-	-
H 群	-	-	+	+
非移入	-	-	-	-

WEHI-NDV で免疫した BALB/c マウス(免疫)または RPMI1640 培地を接種した BALB/c マウス(未免疫)の脾細胞から CD49b<sup>+</sup>および CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を分離した。scid マウスに移入した細胞を+で示した。

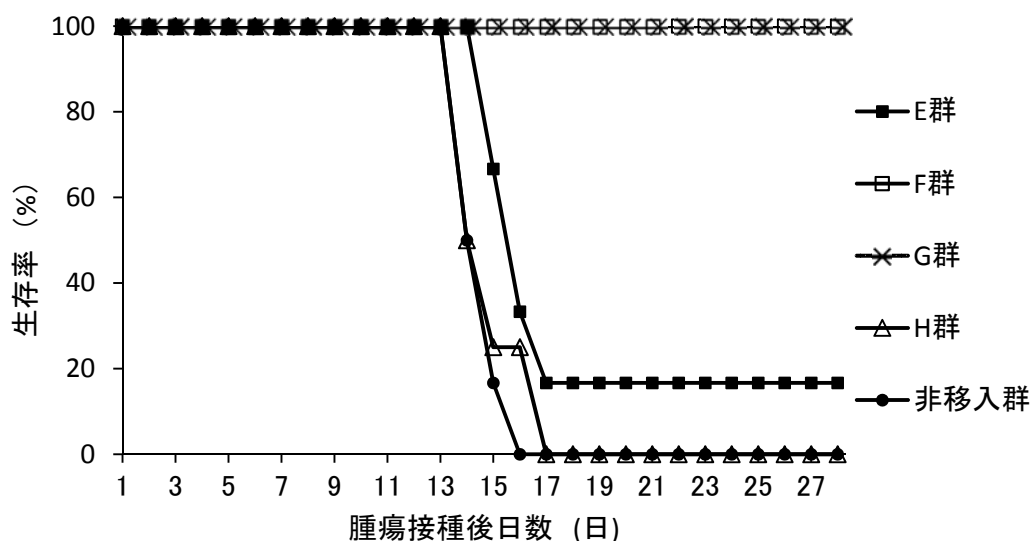
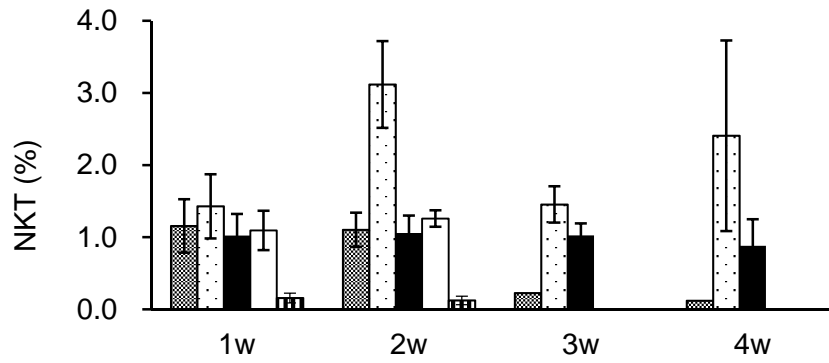


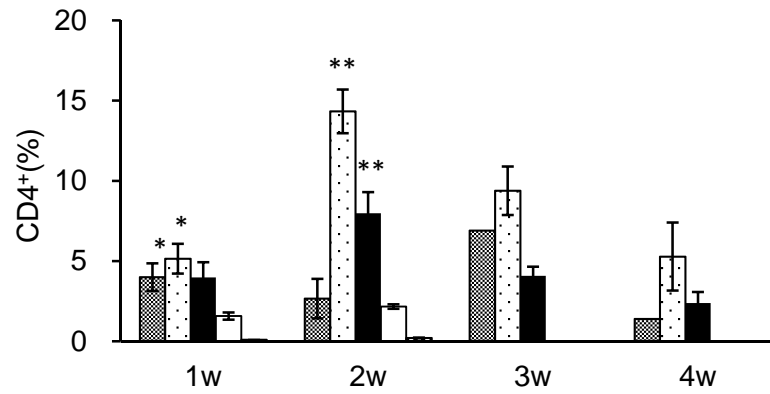
Fig. 9 CD49b<sup>+</sup>細胞、CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞移入マウスの腫瘍接種後生存曲線

免疫あるいは未免疫 BALB/c マウス由来の CD49b<sup>+</sup>細胞と CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を組合せて移入した scid マウスの腫瘍接種後の生存率を示した。作成した群は免疫 CD49b<sup>+</sup>細胞+未免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞群(E 群)、未免疫 CD49b<sup>+</sup>細胞+免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞群(F 群)、免疫 CD49b<sup>+</sup>細胞+免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞群(G 群)、未免疫 CD49b<sup>+</sup>細胞+未免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞群(H 群)、移入なし(非移入群)の 5 群で観察を行った(各群 n = 6)。

A



B



C

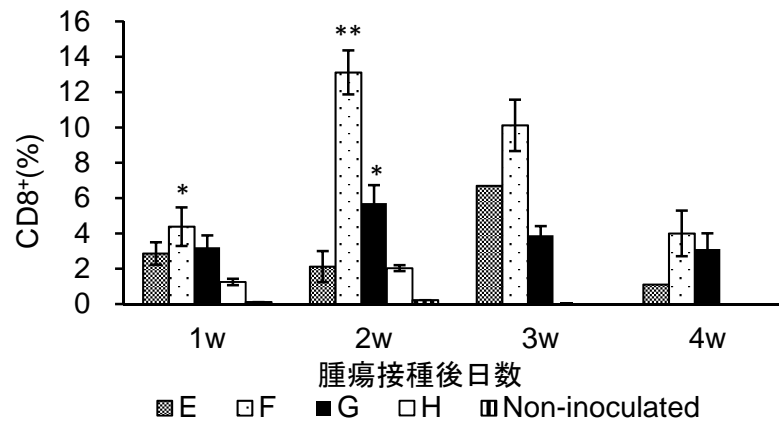


Fig.10 CD49b<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞移入マウスの末梢血リンパ球サブセット

CD49b<sup>+</sup>細胞、CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞移入マウスに WEHI164 を腹腔内接種した。その後、1 週間間隔で採血を行い、フローサイトメーターで NKT 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>)、CD4<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞の割合を測定した。有意差検定は H 群との比較を行った(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )。

#### 6) 免疫脾細胞における IFN- $\gamma$ 遺伝子発現

免疫脾細胞において IFN- $\gamma$  遺伝子発現が誘導されるかを検討するため、WEHI164 刺激時における免疫および未免疫脾細胞による IFN- $\gamma$  遺伝子発現を測定した。WEHI164 刺激 6 時間後における相対的 IFN- $\gamma$  mRNA 発現は、免疫群において 6.17、未免疫群において 4.35 であった(Fig. 11)。両群に有意差は認められなかったが( $p = 0.277$ )、免疫群は未免疫群より IFN- $\gamma$  遺伝子発現の誘導が高い傾向にあった。

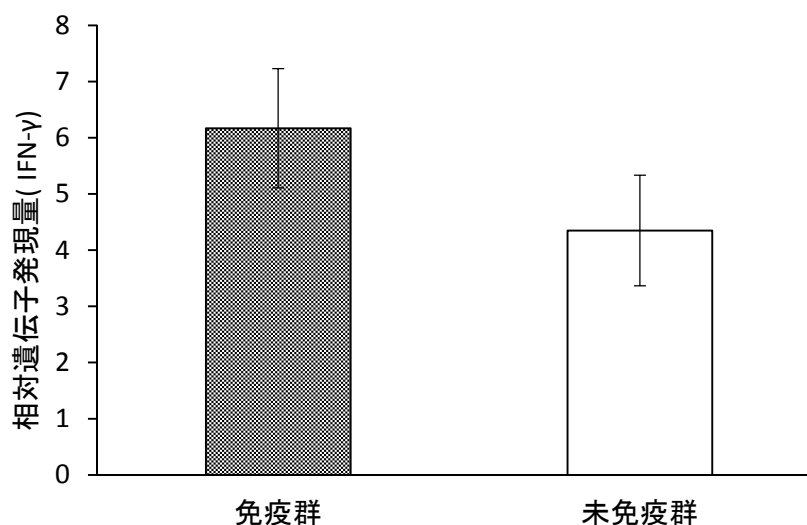


Fig.11 WEHI164 と共培養した免疫及び未免疫 BALB/c マウス脾細胞における IFN- $\gamma$  mRNA 発現の比較量

WEHI164 と共培養した免疫及び未免疫 BALB/c マウス由来脾細胞における IFN- $\gamma$  mRNA 発現量を quantitative PCR で測定した。結果は GAPDH mRNA 発現量を基に相対量を算出し、示した(各群  $n = 3$ )。

#### 4. 考察

本研究から NDV-TV 免疫で誘導される腫瘍排除を担うリンパ球サブセットが明らかとなった。WEHI164 接種に対して全ての BALB/c マウスは生存したが、T 細胞および B 細胞を欠く scid マウスでは腹腔内で腫瘍が増殖し、約 2 週間で全頭死亡した(Fig.5)。これらの結果より T 細胞、B 細胞が腫瘍排除に必要であることが示された。また、WEHI-NDV で免疫した SMC を移入した scid マウスでは未免疫 SMC を移入した scid マウスより生存率が上昇した(Fig. 6)。この結果は *in vivo* においても WEHI-NDV が抗原特異的抗腫瘍免疫応答を誘導していることを示している。また、未免疫 SMC を移入しても生存日数は延長しないことが明らかとなった。さらに T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、単球/マクロファージを含む SMC のうち、抗原特異的腫瘍排除を担う T 細胞に注目し、免疫または未免疫 CD3<sup>+</sup>細胞を分離し、scid マウスへ移入した。腫瘍接種 28 日後の生存率は免疫 CD3<sup>+</sup>群で 80%、未免疫 CD3<sup>+</sup>群で 0%(平均生存日数 14.2 日)であった(Fig. 7)。これらの結果より、WEHI-NDV によって誘導される腫瘍排除において、免疫 CD3<sup>+</sup>細胞が必要であると考えられた。

次に、CD3<sup>+</sup>細胞中の構成細胞である CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞に着目し、同様に免疫または未免疫 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞を分離し、scid マウスに移入した。免疫 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞を移入した C 群では腫瘍接種 28 日後における生存率が 50%であり、未免疫の CD4<sup>+</sup>または CD8<sup>+</sup>細胞を含む他群より高い生存率を示したが、腹腔内に腫瘍の増殖が認められた(Fig. 8)。また、免疫 CD4<sup>+</sup>細胞と未免疫 CD8<sup>+</sup>細胞を移入した A 群は未免疫 CD4<sup>+</sup>細胞と免疫 CD8<sup>+</sup>細胞を移入した B 群と腫瘍接種 4 週後の生存率に差はなかったが、生存個体において B 群で認められた腹水は A 群では認められなかった。これらの結果より、免疫 T 細胞は WEHI-NDV によって誘導される腫瘍排除に寄与しており、特に免疫 CD4<sup>+</sup>細胞は腫瘍の排除と生存期間の延長に必要であると考えられた。また、生存率および腹腔内における腫瘍細胞の排除は免疫 CD3<sup>+</sup>群と比較して免疫 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞を移入した C 群で減少した。この結果より CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>細胞である NKT 細胞が WEHI-NDV による抗腫瘍応答を増強することが示唆された。

次に、NK および NKT 細胞を含む CD49b<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>T 細胞を含む CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞を scid マウスに移入した。免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞およ

び免疫または未免疫 CD49b<sup>+</sup>細胞を移入した全ての scid マウスは腫瘍接種 28 日後まで生存し、腹腔内の腫瘍は認められなかった。さらに、未免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞および免疫または未免疫 CD49b<sup>+</sup>細胞を移入した scid マウスでは生存率はそれぞれ 0%、16.7%であり、生存個体においても腹腔内での腫瘍増殖も認められた(Fig. 9)。これらの結果より、NKT および NK 細胞は免疫 CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>-</sup>細胞存在下で抗腫瘍応答を示すと考えられた。

NKT 細胞は腫瘍排除を担うことが知られているが[25]、腫瘍細胞の認識機構を含め詳細は不明である。NKT 細胞は、IFN- $\gamma$  を産生して NK 細胞や CD8<sup>+</sup>細胞などのエフェクター細胞を活性化することが報告されている[8]。本研究においても、NKT 細胞は未免疫 T 細胞存在下では腫瘍細胞を排除することが出来なかったことより、NKT 細胞は NDV-TV 刺激を受けた T 細胞を活性化することで抗腫瘍応答を増強している可能性が示唆された。さらに、担がんマウスの生存日数と腫瘍接種 14 日後の末梢血 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞率との間に有意な正の相関が認められた。これらの結果は NDV-TV による腫瘍排除誘導における CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞の重要性を強固なものとした。

本研究の結果より、NDV-TV による腫瘍排除の誘導は免疫 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>T 細胞が中心的な役割を担い、NK、NKT 細胞は免疫 T 細胞を活性化することで腫瘍排除が増強されることが明らかとなった。

## 5. 小括

本章において以下のことが明らかとなった。

- 1) NDV-TV によって線維肉腫罹患マウスの生存を延長することが可能であった。
- 2) 未免疫の T 細胞を移入しても生存率は延長しなかった。
- 3) 免疫 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>T 細胞が WEHI-NDV による抗腫瘍応答誘導において中心的な役割を担い、NK、NKT 細胞は免疫 T 細胞を活性化することで腫瘍排除が増強された。



### 第 III 章 腫瘍細胞株における rNDV 感染性の違いと改善

#### 1. 序文

第 I 章において NDV-TV は腫瘍傷害誘導をすることが明らかとなったが、その程度は腫瘍細胞株によって異なっていた。この点について、NDV による MHC class I 分子の発現誘導以外の要因の存在が示唆された。そこで他の要因として、我々は腫瘍細胞における NDV 感染性に着目した。NDV は、正常細胞と比較して腫瘍細胞に感染しやすいと言われている[11]。このウイルスの両者間における感染性の違いは IFN- $\beta$  に対する応答性[43]、感染前の RIG-I、IRF-3、IRF-7 および IFN- $\beta$  の遺伝子発現[20]、感染前後における RIG-I 遺伝子発現および Type I IFN のレセプター[12]が要因であると報告されている。これらの特徴は NDV を腫瘍ウイルス療法として応用する際の腫瘍のウイルス感受性を示しているだけでなく、様々な腫瘍細胞で NDV-TV を作成する際の重要点である。しかし、腫瘍細胞株間における NDV 感染性に関する知見がないことから、本章では各種腫瘍細胞株における rNDV 感染性及びその制御因子について検討した。

#### 2. 材料と方法

##### 1) 腫瘍細胞の培養とウイルス調製

BALB/c マウス由来線維肉腫細胞(WEHI164)、乳腺癌細胞(BALB-MC)、C57BL/6 マウス由来メラノーマ細胞(B16)、ルイス肺がん細胞(3LL)および C3H/HeN マウス由来扁平上皮癌細胞(SCCV II)、膀胱がん細胞(MBT-2)を使用した。WEHI164 および 3LL は RPMI1640 培地、B16 は DMEM、その他は MEM 培地を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。各培地には 10% FBS および 200 U/mL ペニシリン、200  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを添加した。

GFP 発現 rNDV は既報[15]に基づき作成し、感染価を測定した。

##### 2) rNDV 感染率の測定

各腫瘍細胞を 6 well プレートに  $5 \times 10^5$  cells/well (2 well / tumor cell line) となるように調製し、各腫瘍細胞株に対応した 5%FBS 加培地を維持液として 2mL/well 加え、24 時間 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、各 well を MEM 培地で洗浄し、rNDV を MOI 2 に調製し、各腫瘍細胞に感染させた。ウイルス

吸着は 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で 60 分間とし、その後各細胞に対応した 5%FBS 加培地を 1.2 ml/well 加え、37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。24 時間後、蛍光顕微鏡(ZEISS、オーバーコッヘン、ドイツ)にて観察を行い、NDV 感染率は以下の式より算出した。実験は計 3 回を行い、その平均を感染率とした。 $\text{Infection rate (\%)} = \text{Tumor cells expressing GFP} / \text{Total tumor cells} \times 100$

### 3) 腫瘍細胞における Type I IFN 関連遺伝子発現測定の前準備

24 well プレートに各腫瘍細胞を 10<sup>5</sup> cells/well となるように調製して、24 時間 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、各 well を MEM 培地で洗浄し、rNDV を MOI 2 で各腫瘍細胞に感染させた。ウイルス吸着は 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で 60 分間とし、その後各細胞に対応した 5%FBS 加培地を加え、37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。8 時間後、培養上清を取り除き、PBS で洗浄後、350 μL の RLT buffer (Qiagen、ハイデン、ドイツ)を用いて細胞を溶解し RNA 抽出をした。

### 4) RNA 抽出と cDNA 合成

RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen、ハイデン、ドイツ)を用いて添付書に従って行った。350 μL の RLT buffer に溶解したサンプルを専用カラムに通した。回収したカラム膜上の RNA を 50 μL の RNase free water で抽出した。

cDNA 合成は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics、バーゼル、スイス)を用いた。添付書に従い、1 μg の total RNA を oligo(dT) プライマーを用いて cDNA を合成した。

### 5) 定量 PCR

作成した cDNA、QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen、ハイデン、ドイツ)および Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostic、バーゼル、スイス)を用い、housekeeping gene である GAPDH の遺伝子発現量を基準に、ターゲット遺伝子発現量の相対量を算出した。PCR ステップは熱変性ステップ 94℃ 15 秒、アニーリングステップ 60℃ 30 秒、伸長ステップ 72℃ 15 秒を 1 サイクルとして反応させ、45 サイクルとした。プライマーは以下の配列を使用した(Table 4)。

Table 4. Primer の塩基配列

遺伝子		Primer 配列	Tm( )
<i>GAPDH</i>	forward	5'-CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA-3'	58.6
	reverse	5'-AACGGATTTGGCCGTATTG-3'	53.9
<i>RIG-I</i>	forward	5'-GCCCTGTACCATGCAGGTAC-3'	60.4
	reverse	5'-AGTCCCAACTTTCGATGGCTT-3'	56.5
<i>TLR3</i>	forward	5'-TTGCGTTGCGAAGTGAAGAA-3'	54.3
	reverse	5'-ACTTGCCAATTGTCTGGAAACA-3'	54.8
<i>TLR7</i>	forward	5'-AATCCACAGGCTCACCCATA-3'	56.3
	reverse	5'-CAGGTACCAAGGGATGTCCT-3'	58.4
<i>IRF-3</i>	forward	5'-GTGCCTCTCCTGACACCAAT-3'	58.4
	reverse	5'-CCAAGATCAGGCCATCAAAT-3'	54.3
<i>IRF-7</i>	forward	5'-AAGCTGGAGCCATGGGTATG-3'	58.4
	reverse	5'-GACCCAGGTCCATGAGGAAG-3'	60.4
<i>IFN-α</i>	forward	5'-CTTCCACAGGATCACTGTGTACCT-3'	60.5
	reverse	5'-TTCTGCTCTGACCACCTCCC-3'	60.4
<i>IFN-β</i>	forward	5'-CTGGAGCAGCTGAATGGAAAG-3'	58.5
	reverse	5'-CTTCTCCGTCATCTCCATAGGG-3'	60.4
<i>Mx1</i>	forward	5'-CCAACCTGGAATCCTCCTGGAA-3'	58.5
	reverse	5'-GCCGCACCTTCTCCTCATAG-3'	60.4
<i>Mx2</i>	forward	5'-CGAGAATTGCCAGGGTTTGT-3'	56.3
	reverse	5'-GGCAGCTCGTACAATTTTCAGT-3'	56.5
<i>OAS1a</i>	forward	5'-GAAGAGGCTGATGTGTGGCT-3'	58.4
	reverse	5'-TGTCAGTTCTCTTCTACCTGC-3'	58.6
<i>OAS1b</i>	forward	5'-TTCTACGCCAATCTCATCAGTG-3'	56.7
	reverse	5'-GGTCCCCCAGCTTCTCCTTAC-3'	62.4
<i>OAS2</i>	forward	5'-AAACCTCACACCCAACGAAAA-3'	54.6
	reverse	5'-CCACCCTTAGCCACTTCCT-3'	58.2
<i>OAS3</i>	forward	5'-CCAACCCAAGTGCCAATAAAA-3'	54.6
	reverse	5'-AACATGACTTGAGATACTATCCAATGCT-3'	57.6
<i>OASL1</i>	forward	5'-TGGACCTTGGGCTCAGTAAC-3'	58.4
	reverse	5'-GCACAACGGTGACAGTGATG-3'	58.4
<i>OASL2</i>	forward	5'-CGATGCCTGGGAGAGAATCG-3'	60.4
	reverse	5'-TCGCCTGCTCTTCGAAACTG-3'	58.4

#### 6) 培養上清中の IFN- $\beta$ の定量

24 well プレートに各腫瘍細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well となるように調製して、24 時間 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、各 well を MEM 培地で洗浄し、rNDV を MOI 2 で各腫瘍細胞に感染させた。rNDV 非感染の well には MEM 培地のみを加えた。ウイルス吸着は 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 60 分間とし、その後各細胞に対応した 10%FBS 加培地を 0.2 ml/well 加え、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。12、24 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の IFN- $\beta$  タンパクは Verikine™ Mouse IFN Beta ELISA kit (PBL assay science、ピスカタウェイ、ニュージャージー州、アメリカ合衆国)を用いて添付書に従い、測定した。

#### 7) 腫瘍細胞に対する IFN- $\beta$ 刺激

24 well プレートに各腫瘍細胞を  $10^5$  cells/well となるように調製して、24 時間 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、各 well を対応する培地で洗浄し、0~100 U/mL に調製した Mouse IFN- $\beta$  (PBL assay science、ピスカタウェイ、ニュージャージー州、アメリカ合衆国)を添加し、4 時間 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。培養上清を取り除き、PBS で洗浄後、350  $\mu$  L の RLT buffer (Qiagen、ハイデーン、ドイツ)を用いて細胞を溶解 RNA 抽出した。

#### 8) Janus kinase (JAK)抑制処置

24 well プレートに各腫瘍細胞を  $10^5$  cells/well となるように調製して、24 時間 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、各 well を対応する培地で洗浄し、0~1.0  $\mu$  g/mL に調製した Ruxolitinib (Rux; Cayman chemical、アナーバー、ミシガン州、アメリカ合衆国)を添加し、20 時間 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。

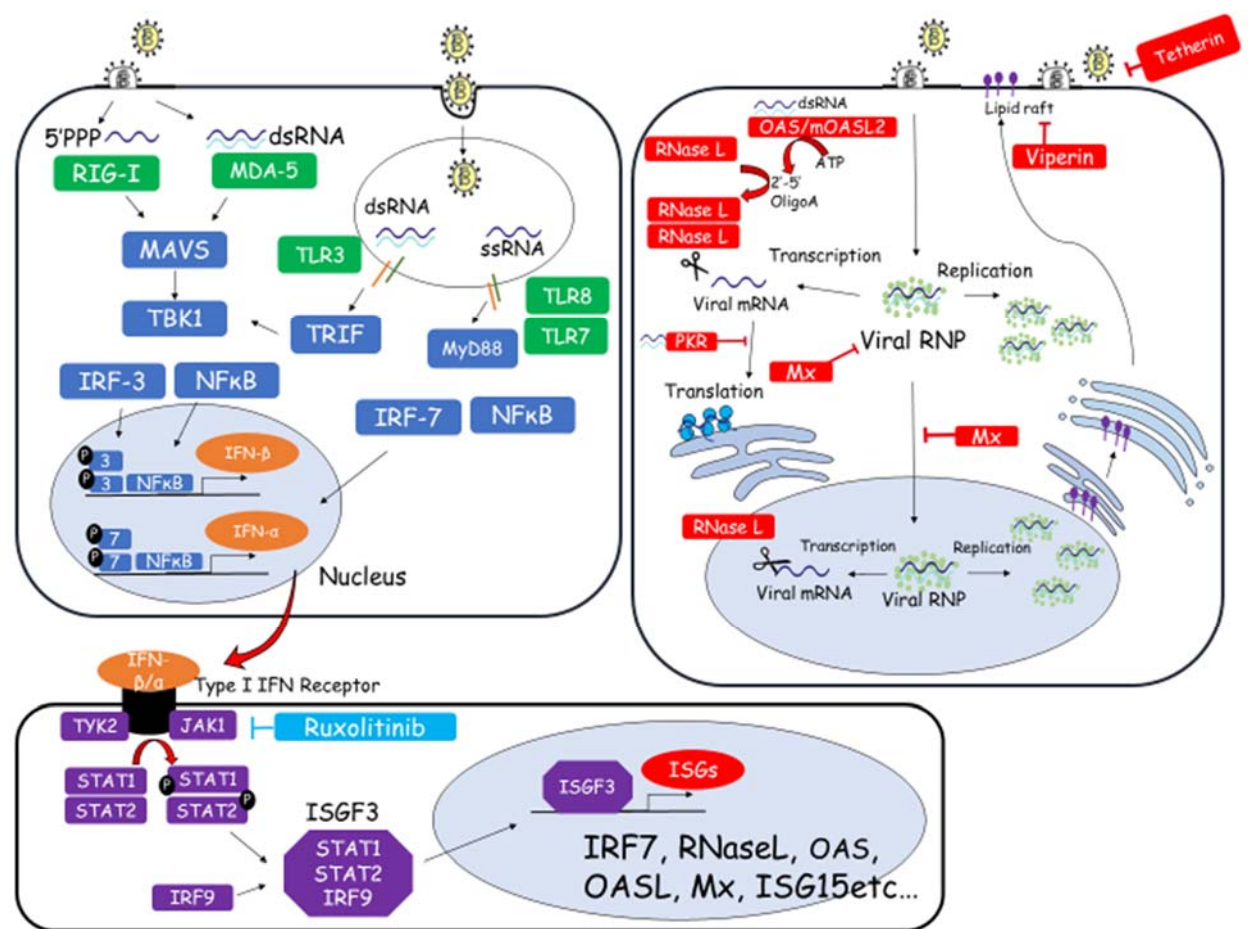


Fig. 12 Type I IFN 誘導性抗ウイルスメカニズムと Ruxolitinib の作用点

(緑) Pattern recognition receptor (PRR)によるウイルス認識、(青) Interferon regulatory factor (IRF)による Type I IFN の産生経路、(紫)Type I IFN receptor シグナリングと Interferon-stimulated genes (ISGs)発現、(赤)ISGs の一種である抗ウイルスエフェクタータンパクの作用点、(水色) Ruxolitinib の作用点を示した(David M. K and Peter M. H, 2013, Fields Virology 6<sup>th</sup> edition volume 1, Wolters Kluwer 改変)。

## 9) 統計解析

統計学的解析は R studio version 1.0.143 を用いて行った。相関解析は Spearman's rank correlation を用いた。また、2 標本間の有意差検定は student t-test を使い、多重比較解析は Tukey–Kramer multiple comparison method で解析を行った。

### 3. 結果

#### 1) 腫瘍細胞株における NDV 感染率

始めに、腫瘍細胞における NDV への感染性を検討するため、各腫瘍細胞株に rNDV を感染させ、GFP 発現細胞の割合から rNDV 感染率を求めた。用いた 6 種類の腫瘍細胞のうち、B16 および WEHI164、3LL、SCCV II、MBT-2、BALB-MC における NDV 感染率はそれぞれ平均 76.8%、83.0%、88.1%、37.4%、36.2%、13.1%であった (Fig. 13)。

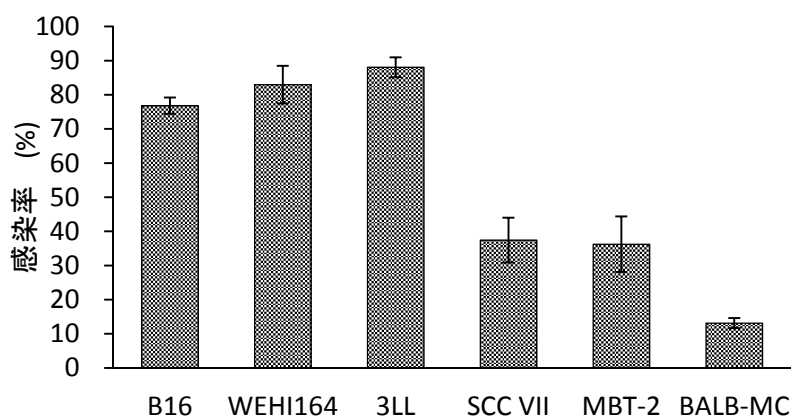


Fig. 13 マウス腫瘍細胞株における rNDV 感染率

各腫瘍細胞株 (n=4) に rNDV を MOI 2 で感染させ、24 時間後、感染率を蛍光顕微鏡により GFP 発現細胞率を算出した。

#### 2) 腫瘍細胞株における Type I IFN 関連遺伝子発現

次に、腫瘍細胞株における NDV 感染性の違いの要因を検討するため、ウイルス感染に伴い誘導される Type I IFN 関連遺伝子の発現を評価した。感染前の腫瘍細胞においては Pattern recognition receptor (PRR) の一種である RIG-I、TLR3、さらに Interferon regulatory factor である IRF-3、Interferon-stimulated genes (ISGs) のうち抗ウイルスエフェクターである Mx (1, 2)、OAS (1a, 1b, 2, 3)、OASL2 において発現が確認され、その程度は rNDV 感染率と有意な負の相関が認められた。一方、感染 8 時間後において rNDV 感染率と有意な負の相関が認められた遺伝子は、TLR3、IRF-7、OASL1 および OASL2 であった (Table 5)。

Table 5. rNDV 感染率と type I IFN 関連遺伝子発現における相関係数

	Pre-infection	Post-infection (8h)
<i>RIG-I</i>	-0.480*	-0.44
<i>TLR3</i>	-0.840**	-0.486*
<i>TLR7</i>	-0.342	-0.057
<i>IFN-<math>\beta</math></i>	-0.139	-0.352
<i>IFN-<math>\alpha</math></i>	0.161	-0.028
<i>IRF-3</i>	-0.579*	-0.347
<i>IRF-7</i>	-0.359	-0.594*
<i>Mx1</i>	-0.518*	-0.371
<i>Mx2</i>	-0.678**	-0.304
<i>OAS1a</i>	-0.574*	-0.373
<i>OAS1b</i>	-0.685**	-0.411
<i>OAS2</i>	-0.612**	-0.480
<i>OAS3</i>	-0.530*	-0.373
<i>OASL1</i>	-0.417	-0.724**
<i>OASL2</i>	-0.672**	-0.637**

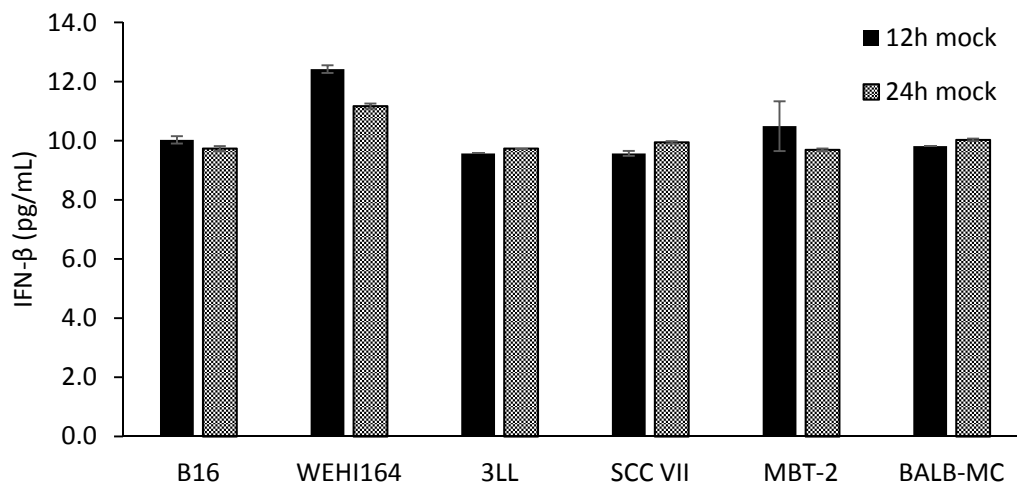
rNDV 感染率と type I IFN 関連遺伝子発現における相関分析は Spearman's rank correlation coefficient ( $r_s$ ) を用い、speaman 検定表(両側確率)を用いて有意差検定を行った(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )(各  $n=18$ )。

### 3) 腫瘍細胞株における IFN- $\beta$ 産生

Type I IFN によって誘導される ISGs 発現が rNDV 感染率と負の相関を示したことより、各腫瘍細胞株による IFN- $\beta$  産生の違いについて検討するため、rNDV 非感染および感染後における培養上清中の IFN- $\beta$  濃度を評価した。NDV 非感染時においては 6 種の腫瘍細胞株において培養上清中の IFN- $\beta$  濃度の差は

認められなかった(Fig.14A)。NDV 感染 12、24 時間後においては B16、SCC V II と MBT-2 では増加し 1200 pg/mL 以上であったが、それに比較して WEHI164、3LL と BALB-MC においては 600 pg/mL と低値であった(Fig. 14B)。また、NDV 感染 24 時間後における培養上清中 IFN- $\beta$  と rNDV 感染率との間には有意な相関関係は認められなかった( $r_s = -0.368$ ,  $p > 0.05$ )。

A



B

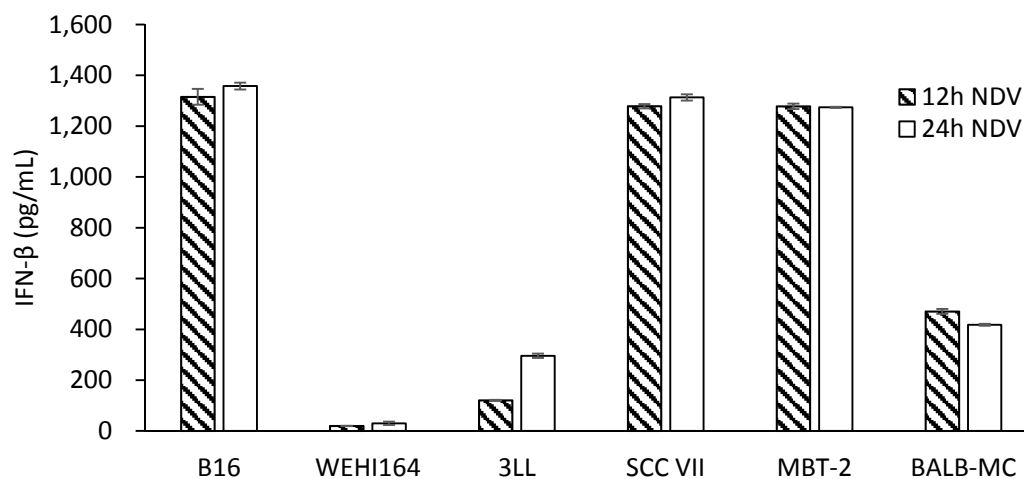


Fig. 14 培養上清中の IFN- $\beta$  濃度

(A)腫瘍細胞培養 12 時間、24 時間後における IFN- $\beta$  産生量及び(B) rNDV 感染(MOI 2)12 時間、24 時間後の腫瘍細胞における IFN- $\beta$  産生量を ELISA で測定した。試験は duplicate で行った。



#### 4) 腫瘍細胞株における IFN- $\beta$ に対する応答性

各種腫瘍細胞株における IFN- $\beta$  刺激に対する応答性を調べるため、Mouse IFN- $\beta$  存在下で腫瘍細胞を培養し、それに誘導される ISGs である OASL2 の遺伝子発現を比較した。各腫瘍細胞において IFN- $\beta$  濃度依存的に OASL2 遺伝子発現が認められた。さらに、rNDV 感染率の高かった B16、WEHI164 および 3LL では他の 3 種よりも OASL2 の遺伝子発現は低値を示した(Fig.15)。さらに Spearman's rank correlation にて相関解析を行うと、rNDV 感染率と IFN- $\beta$  刺激時の OASL2 遺伝子発現との間に有意な負の相関が認められた(Table 6)。

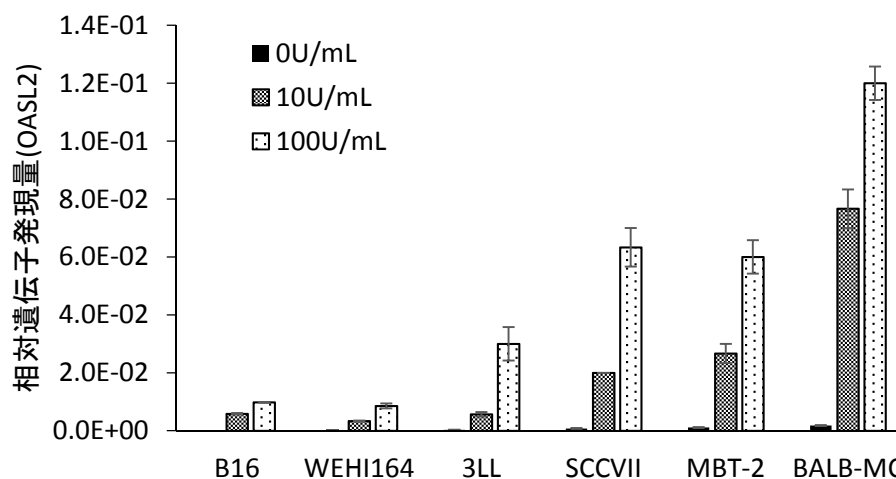


Fig. 15 IFN- $\beta$  刺激時における Type I IFN 関連遺伝子発現

各腫瘍細胞を IFN- $\beta$  (0~100U/mL)含培養液(各条件 n=3)で 4 時間培養後、OASL2 mRNA 遺伝子発現を定量 PCR 法で測定した。結果は GAPDH mRNA 発現量を基に相対量を算出した。

Table 6. rNDV 感染率と OASL2 遺伝子発現における相関係数

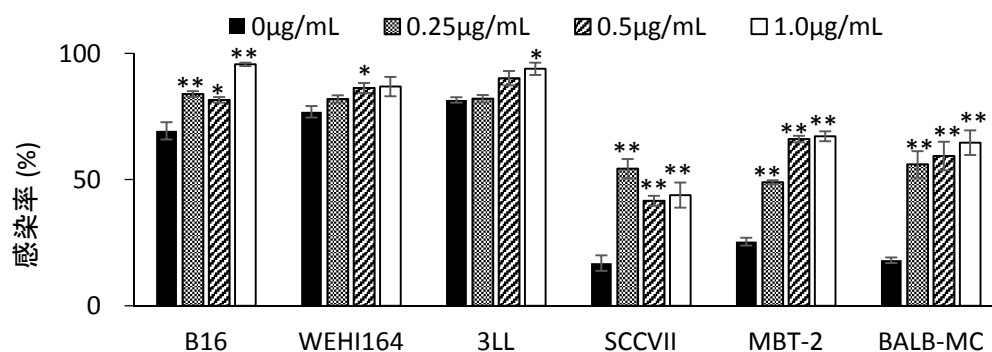
IFN- $\beta$	$r_s$
0 U/mL	-0.762**
10U/mL	-0.877**
100 U/mL	-0.767**

rNDV 感染率と IFN-  $\beta$  刺激後の OASL2 遺伝子発現における相関分析は Spearman's rank correlation coefficient ( $r_s$ ) を用い、speaman 検定表(両側確率)を用いて有意差検定を行った。(\*\*:  $p < 0.01$ )(各  $n=18$ )。

##### 5) Ruxolitinib (Rux)処置後の腫瘍細胞株における NDV 感染率

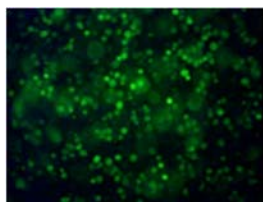
感染前の腫瘍細胞における ISGs 発現が NDV 感染と有意に負の相関を示したことより、JAK 阻害剤である Rux を rNDV 感染前の腫瘍細胞に処置し、各腫瘍細胞株における rNDV 感染率への影響を検討した。rNDV 感染率が低かった SCCV II、MBT-2 および BALB-MC は、Rux 処理により感染率は有意に上昇した。また、rNDV 感染率が高かった B16、WEHI164 および 3LL においても Rux 処置後にさらに有意な感染率上昇が示された(Fig. 16A, 16B)。Rux  $1.0 \mu\text{g/mL}$  処置により十分な rNDV 感染率の上昇が認められたため、以降の実験における Rux 濃度は  $1.0 \mu\text{g/mL}$  とした。

A

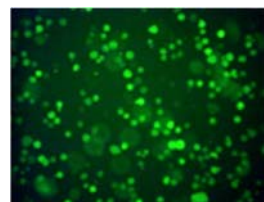
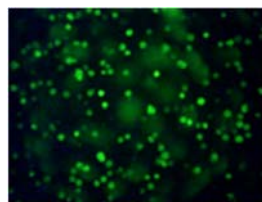
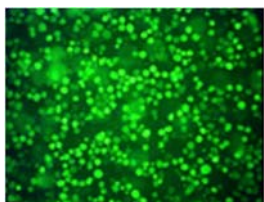


B

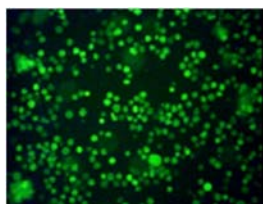
(i) B16



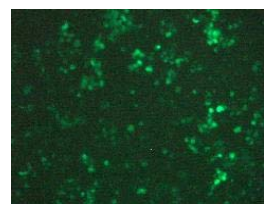
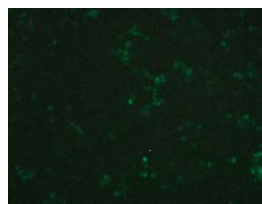
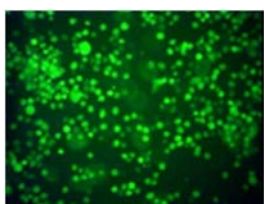
(ii) WEHI164



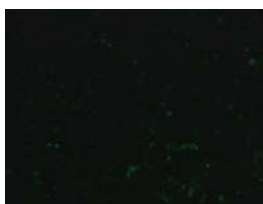
(iii) 3LL



(iv) SCCVII



(v) MBT-2



(vi) BALB-MC

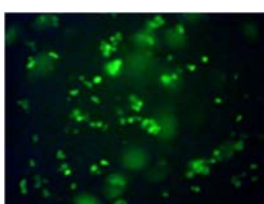
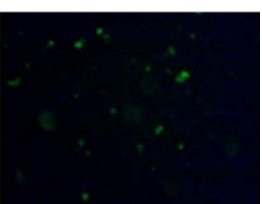
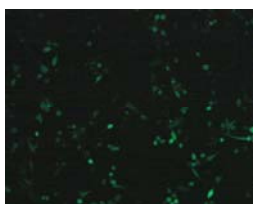


Fig. 16 Rux 処置後の腫瘍細胞における NDV 感染率

(A) Ruxolitinib ( $0 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.25 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.5 \mu\text{g/mL}$  or  $1.0 \mu\text{g/mL}$ ) 処置後、腫瘍細胞に NDV を MOI 2 で感染させ、24 時間後、感染率を蛍光顕微鏡により GFP 発現細胞率を算出した(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )(各条件  $n=4$ )。 (B) Ruxolitinib (左:  $0 \mu\text{g/mL}$ 、右:  $1.0 \mu\text{g/mL}$ ) 処置および rNDV 感染後の (i) B16、(ii) WEHI164、(iii) 3LL、(iv) SCCVII、(v) MBT-2、(vi) BALB-MC における GFP の発現を示した(倍率 $\times 100$ )。

## 6) Rux 処置による腫瘍細胞株の ISGs 発現比較

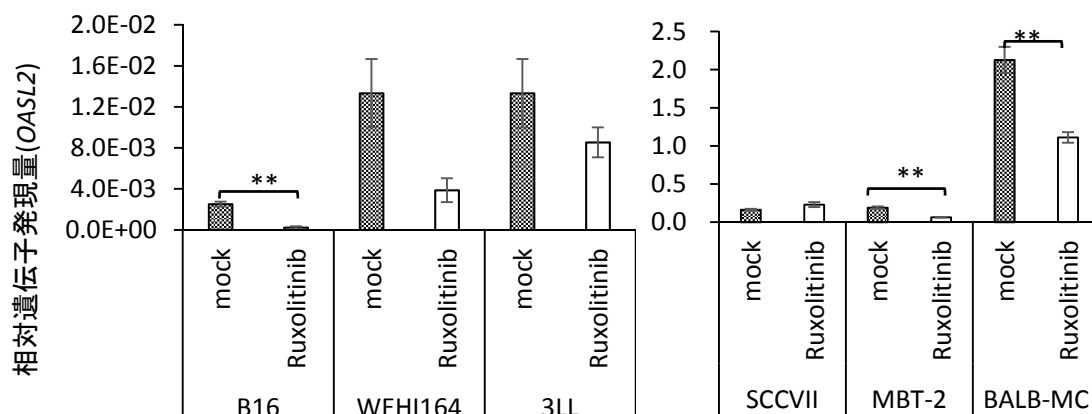
rNDV 感染性に影響を与えると考えられる腫瘍細胞株の OAS1b、OASL2 および Mx1 遺伝子発現が Rux 処置によって低下するかを検討した。OAS1b、OASL2 および Mx1 遺伝子発現は、Rux 処置により各細胞株 B16 ( $p = 0.001$ )、MBT-2 ( $p = 0.001$ ) および BALB-MC ( $p = 0.005$ ) において有意に低下した。また、WEHI164 ( $p = 0.055$ ) と 3LL ( $p = 0.258$ ) においても低下傾向が認められた (Fig. 17A)。同様に、OAS1b 遺伝子発現は MBT-2 ( $p = 0.040$ ) および BALB-MC ( $p = 0.005$ ) で、Mx1 遺伝子発現は BALB-MC ( $p = 0.023$ ) において有意な低下が認められた (Fig. 17B, 17C)。また、Rux 処置後の NDV 感染率と type I IFN 関連遺伝子の発現は OASL2 ( $r_s = -0.826$ )、OAS1b ( $r_s = -0.720$ ) および Mx1 ( $r_s = -0.543$ ) において有意な負の相関が認められた (Table 7)。

Table 7. Rux 処置細胞における感染率と IFN 関連遺伝子発現相関

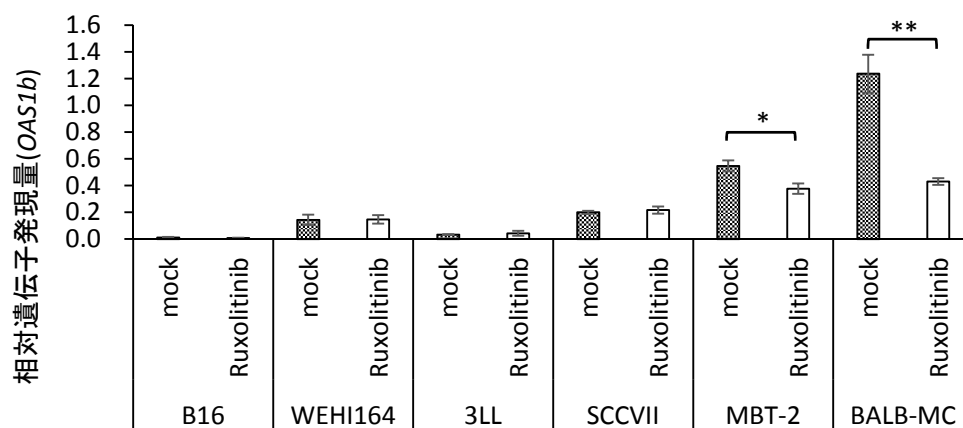
	$r_s$
<i>OASL2</i>	-0.826**
<i>OAS1b</i>	-0.720**
<i>Mx1</i>	-0.543**

Rux 処置後の rNDV 感染率と IFN 関連遺伝子発現における相関分析は Spearman's rank correlation coefficient ( $r_s$ ) を用い、speaman 検定表(両側確率)を用いて有意差検定を行った。(\*\*:  $p < 0.01$ )(各  $n=18$ )。

A



B



C

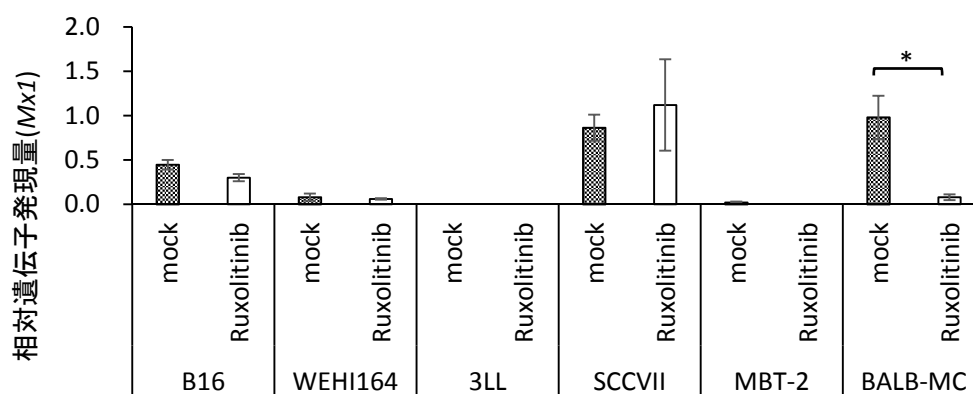


Fig. 17 Rux 処置前後の type I IFN 関連遺伝子発現量の比較

1.0  $\mu$ g/mL の Rux 存在下(Ruxolitinib)または非存在下(mock)20h 培養後における OASL2 (A)、OAS1b (B)、Mx1 (C) mRNA 発現量を定量 PCR 法で測定した。結果は GAPDH mRNA 発現量を基に相対量を算出した(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )(各条件 n=3)。

#### 4. 考察

本章により、腫瘍細胞における rNDV 感染性は腫瘍細胞株ごとに異なり、それが感染前の ISGs 発現により制御されていることを明らかにした。次に、JAK inhibitor の Rux で腫瘍細胞を処理することで ISGs 発現を抑制し、rNDV 感染率が上昇することが明らかとなった。

各腫瘍細胞株における rNDV 感染率は B16、WEHI164、3LL では 80%前後と高率であったが、SCC VII および MBT-2 で約 35%、BALB-MC で 13%と低率であった(Fig. 13A)。この結果より、腫瘍細胞株間において rNDV 感染性に差があることが示された。第 I 章で示したように、NDV-TV に誘導された細胞傷害活性が最も低値であった SCC VII は、MHC class I の発現量は高値だったが、rNDV 感染率は低値であった。また、細胞傷害活性が最も高く、NDV-TV と UV-TV 間で有意差が認められた WEHI164 は rNDV 感染率が高かった。さらに WEHI164 は、rNDV 感染前においても MHC class I 発現量および発現細胞率は高く、rNDV 感染後も有意な変化は認められなかった(Table 1)。これらの結果より、ウイルス吸着によって誘導された MHC class I の発現ではなく、rNDV 感染を伴った MHC class I 分子の発現が NDV-TV による免疫誘導ならびに腫瘍排除効果に影響すると考えられた。

次に、rNDV 感染性に影響を与える要因として Type I IFN 関連遺伝子発現について検討した。Type I IFN 関連遺伝子発現は感染後よりも感染前において多くの遺伝子が rNDV 感染率と有意な負の相関を示した (Table 5)。特に腫瘍細胞の OAS、OASL2 および Mx 発現は、ウイルス感染性に対して有意な負の相関を示すことから、ISGs 発現が rNDV 感染率に影響すると考えられた。また、感染後よりも感染前の腫瘍細胞における ISGs 発現が rNDV 感染に重要であった点に関しては、本研究で用いている rNDV は F protein のアミノ酸配列を変異させており [15]、感染性ウイルスが感染細胞から出芽することがない比較的安全性の高い株であることから、細胞への初感染時の効率がその後の rNDV 感染率に影響すると考えられる。

Type I IFN がそのレセプターである IFNAR を活性化し、Janus kinase - Signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT)経路を介して Interferon-stimulated genes (ISGs)の一種である抗ウイルスエフェクターの産

生が誘導される。Type I IFN の産生誘導は IRF-3 を介して産生された IFN- $\beta$  によって IRF-7 が誘導され、IFN- $\alpha$  および  $\beta$  が産生される[2, 16]。よってウイルス感染初期において IFN- $\beta$  がトリガーとなるため、本研究では Type I IFN のうち、IFN- $\beta$  について着目した。rNDV 非感染下においては各腫瘍細胞株間で IFN- $\beta$  産生に差は認められなかった(Fig. 14A)。また、rNDV 感染後においては IFN- $\beta$  産生に差が認められたが、rNDV 感染率とは有意な相関は認められなかった(Fig. 14B)。これは遺伝子発現の結果と一致していた(Table 5)。さらに、Mouse IFN- $\beta$  によって腫瘍細胞を刺激した際の OASL2 遺伝子発現は rNDV 感染率と有意な負の相関が認められた(Fig. 15, Table 6)。これらの結果より、腫瘍細胞株における rNDV 感染性の差は腫瘍細胞における IFN- $\beta$  産生ではなく、IFN- $\beta$  刺激に誘導される ISGs 関連因子が影響していることが示唆された(Fig. 14A, Fig.15, Table 6)。また、非感染下における低レベルの Type I IFN 産生が OAS を含む ISGs の恒常的発現を維持している[37]との報告があり、腫瘍細胞においては低レベルの Type I IFN に対する応答性の違いから恒常的な ISGs 発現に差が生まれていると考えられた。

そして、腫瘍細胞株の rNDV 感染性が恒常的な ISGs 発現と負の相関を示したことから、その上流の JAK-STAT 経路を抑制することで腫瘍細胞における rNDV 感染率が改善するかを検討した。rNDV 感染率は、JAK1 および 2 を抑制する Rux 処理により 6 種の腫瘍細胞株で有意に上昇した(Fig.16)。その時の腫瘍細胞における ISGs 発現は有意に低下し(Fig. 17A~17C)、rNDV 感染率と有意に負の相関を示した(Table 7)。この結果より、腫瘍細胞株における rNDV 感染率は、感染前の ISGs 発現の程度に起因しており、JAK 抑制により ISGs 発現が低下し、その感染率が上昇すると考えられた。さらに、恒常的な ISGs 発現と rNDV 感染率が負の相関を示すという知見は、摘出した腫瘍組織における ISGs 発現を調べ、事前に腫瘍細胞のウイルス感受性レベルを把握することで rNDV 感受性を予測でき、今後のウイルス療法の適応指標の一つとして役立つことと考えられた。

## 小括

本章において以下のことが明らかとなった。

- 1) 各腫瘍細胞株間で rNDV 感染率が異なることが明らかとなった。
- 2) rNDV 感染率が低い腫瘍細胞は、NDV-TV による抗腫瘍免疫応答が低い。
- 3) 腫瘍細胞株に対する rNDV 感染率は、感染前の ISGs 発現と有意な負の相関性を示す。
- 4) rNDV 感染前に腫瘍細胞を Rux 処置する事により ISGs 発現が抑制され感染効率が改善した。



## 第 IV 章 Ruxolitinib 処置 NDV-TV (NDV-TV-Rux)による免疫応答誘導

### 1. 序文

NDV 感染した腫瘍細胞は細胞表面上に HN タンパクを発現し[32]、NK 細胞の活性化[18]のみならず、腫瘍細胞と T 細胞の相互作用や T 細胞の共刺激を誘導する[31, 38]。さらに NDV 感染細胞から産生される type I IFN は樹状細胞の成熟を促し、自然免疫だけではなく獲得免疫も活性化する [13, 23]。また、NDV 感染細胞は IL-2 産生を誘導し、ヘルパーT (Th)細胞の増殖を促すとされている [38]。このように、NDV が腫瘍細胞に感染し、腫瘍細胞表面の変化、サイトカインの産生が誘導されることで、抗腫瘍応答に関与する様々な細胞が影響を受けており、腫瘍細胞における NDV 感染性は NDV-TV における腫瘍排除誘導に重要と考えられる。

第 I 章および第 III 章の結果より、rNDV 感染性が NDV-TV による腫瘍排除誘導性に影響を与える事を示唆し、第 III 章では腫瘍細胞における rNDV 感染性に影響する要因を解明し、rNDV 感染率の改善を成功させた。本章では rNDV 感染性を Ruxolitinib (Rux)によって改善し、作成した NDV-TV (NDV-TV-Rux)の免疫応答性について評価を行った。

### 2. 材料と方法

#### 1) 共試動物

C3H/HeN 系の 24 週齢マウス(日本クレア株式会社、東京、日本)を使用した。動物実験は酪農学園大学の動物実験委員会の審査、承認を受けて行った(承認番号 VH15A27)。

#### 2) 腫瘍細胞の培養とウイルス調製

C3H/HeN マウス由来膀胱がん細胞(MBT-2)を使用した。MBT-2 は 10% FBS および 200 U/mL ペニシリン、200  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含む MEM 培地を用いて、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

GFP 発現 rNDV は報告[15]に基づき作成し、感染価を測定した。

### 3) MBT-2 を用いた NDV-TV (MBT-NDV)および NDV-TV-Rux (MBT-NDV-Rux)の作成

MBT-2 を 6 well プレートに  $10^5$ /well となるように調製し、5%FBS 加 MEM を維持液として 3ml/well 加え、24 時間 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、MBT-NDV-Rux 作成時は 1  $\mu$ g/mL の Ruxolitinib (Rux)存在下、MBT-NDV 作成時は Rux 非存在下で 20 時間培養した。rNDV を MOI 2 に調製し、各細胞に感染させた。ウイルス吸着は 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 60 分間とし、その後 5%FBS 加 MEM を 3ml/well 加え、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。24 時間後に EDTA-PBS で細胞を浮遊させ、HL-2000 Hybri Linker を用いて UV 照射(400mJ/cm<sup>2</sup>)によりウイルス及び腫瘍細胞を不活化し、MEM 培地で細胞浮遊液を作成した。

### 4) ワクチネーションプロトコール

MBT-NDV または MBT-NDV-Rux を C3H/HeN マウス 1 頭当たり  $10^5$  個腹腔内接種(i.p.)し、1 週間隔で 4 回接種することを接種プログラムとした。また、MEM 培地 200  $\mu$ L のみを同様に 1 週間隔で 4 回接種した control 群を作成した (各群 n = 5)。

### 5) 脾臓リンパ球サブセットの解析

最終ワクチン接種 7 日後、マウスにペントバルビタールナトリウムを 50mg/kg 腹腔内投与し、全身麻酔下で全採血により安楽殺を施した。その後、第 I 章と同様の手順に従って脾臓から脾細胞を分離した。リンパ球サブセットの測定は、FITC anti-mouse CD3 と PE anti-mouse CD19 (Bio Legend、クロムウェル、コネチカット州、アメリカ合衆国)、CD4-FITC mouse (Milteny Biotec、ベルギッシュ・グラートバッハ、ドイツ)と Rat Anti-MouseCD8a/Lyt-2-PE (Beckman Coulter、ブレア、カリフォルニア州、アメリカ合衆国)の抗体と室温 30 分間反応させ Coulter Epics XL (Beckman Coulter、ブレア、カリフォルニア州、アメリカ合衆国)で解析した。

### 6) IFN- $\gamma$ 遺伝子発現の測定

免疫および未免疫 C3H/HeN マウスの脾臓から分離した脾細胞をエフェクタ

一細胞とし、MBT-2 をターゲット細胞として用いた。12 well プレートにエフエクター細胞とターゲット細胞を 2% FBS 加 RPMI1640 培地で浮遊させ調製し、E:T 比 20:1 で 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 6 時間共培養した。培養後、細胞を 350  $\mu$  L の RLT buffer (Qiagen、ハイデン、ドイツ)を用いて細胞を溶解し RNA 抽出した。

#### 7) RNA 抽出と cDNA 合成

RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen、ハイデン、ドイツ)を用いて添付書に従っておこなった。350  $\mu$  L の RLT buffer に溶解したサンプルを専用カラムに通した。回収したカラム膜上の RNA を 50  $\mu$  L の RNase free water で抽出した。

cDNA 合成は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics、バーゼル、スイス)を用いた。添付書に従い、1  $\mu$  g の total RNA を oligo(dT) プライマーを用いて cDNA を合成した。

#### 8) 定量 PCR 法

作成した cDNA を用いて、IFN- $\gamma$  mRNA と housekeeping gene として GAPDH mRNA の発現量を QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen、ハイデン、ドイツ)を用いた定量 PCR 法を Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostic バーゼル、スイス)で解析した。反応条件は、GAPDH については熱変性ステップ 94°C 15 秒、アニーリングステップ 60°C 30 秒、伸長ステップ 72°C 15 秒を 1 サイクルとして反応させ、45 サイクルとした。また、IFN- $\gamma$  についてはアニーリングを 58°C として測定を行った。プライマーは以下の配列を使用した。IFN- $\gamma$  forward primer, 5'-TGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAAC-3' and reverse primer, 5'-GTTGTTGCTGATGGCCTGAT-3'; GAPDH forward primer, 5'-CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA-3' and reverse primer, 5'-AACGGATTTGGCCGTATTG-3'各サンプルの GAPDH の遺伝子発現量を基準に、各遺伝子発現量の相対量を算出した。

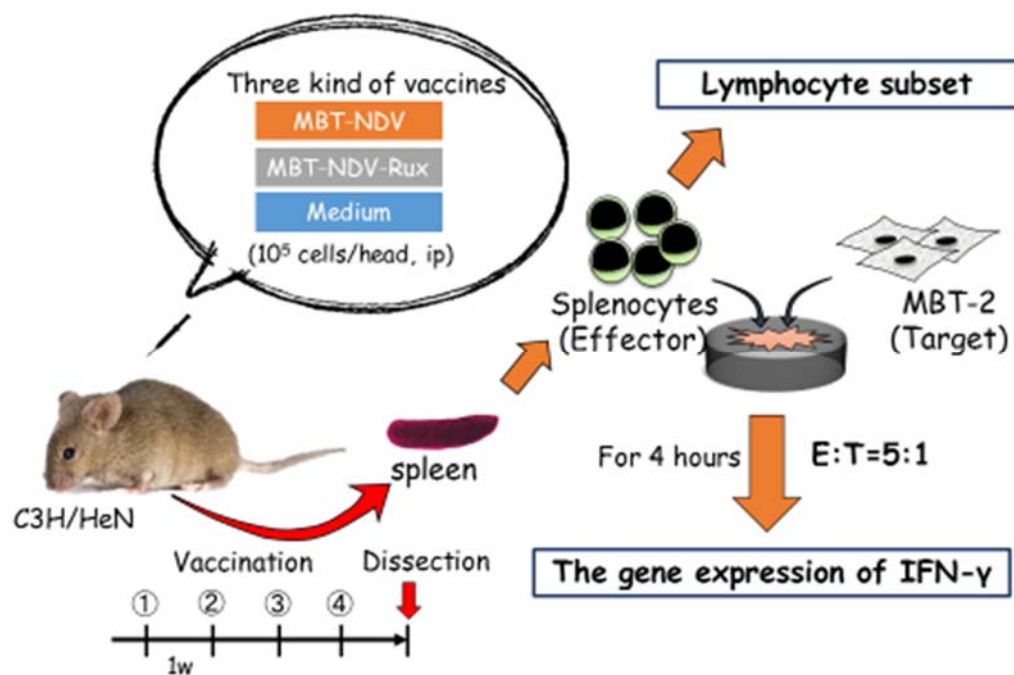


Fig. 18 Ruxolitinib 処置 NDV-TV (NDV-TV-Rux)による免疫応答誘導実験概要

MBT-2 を用いた NDV-TV (MBT-NDV)、NDV-TV-Rux (MBT-NDV-Rux)または培地で免疫したマウスから脾細胞を採取し、リンパ球サブセット比および MBT-2 と effector–target 比 (E:T 比) 5:1 で刺激した時の IFN- $\gamma$  遺伝子発現を調べた。

## 9) 統計学解析

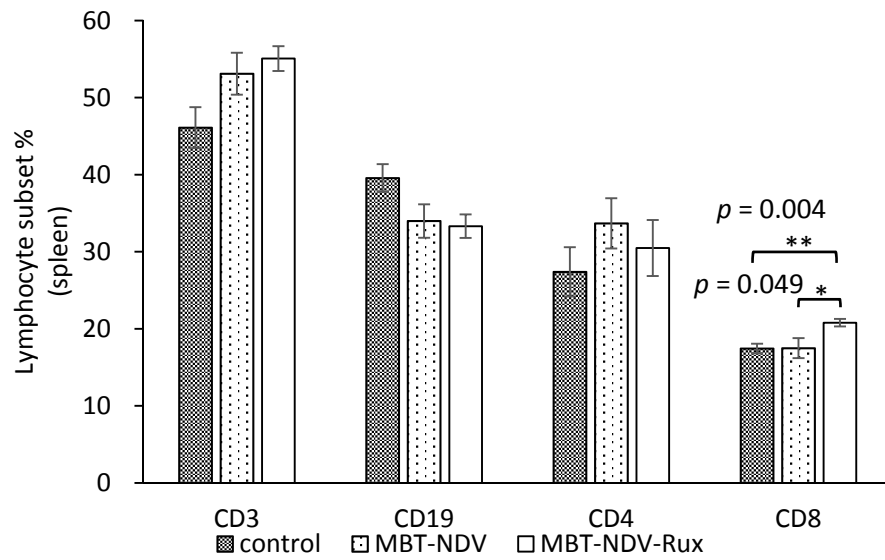
統計学的解析は R studio version 1.0.143 を用いた。データは Tukey–Kramer multiple comparison method で解析を行った。

### 3. 結果

#### 1) MBT-NDV および MBT-NDV-Rux 免疫マウス脾細胞におけるリンパ球サブセット

最終ワクチン 7 日後、免疫マウスから脾臓を採取し、SMC 中のリンパ球サブセット比およびリンパ球サブセット数を測定した。CD8<sup>+</sup>細胞率においては control 群および MBT-NDV 群と比較して MBT-NDV-Rux 群で有意に上昇が認められた(Fig. 19A)。また、各群の体重の平均について有意差は認められなかったが、得られた Total SMC 数は control 群( $4.65 \times 10^7$ )と比較して MBT-NDV-Rux 群( $7.22 \times 10^7$ ,  $p = 0.003$ )は有意に多かった。また、MBT-NDV 群( $5.31 \times 10^7$ )と比較しても MBT-NDV-Rux 群( $p = 0.021$ )は有意に多かった。この Total SMC 数に各リンパ球サブセット率を乗じて算出したリンパ球サブセット数においても CD3<sup>+</sup>細胞数は MBT-NDV-Rux 群で MBT-NDV および control 群より有意に上昇が認められた。CD8<sup>+</sup>細胞数においても MBT-NDV-Rux 群)で MBT-NDV および control 群より有意に上昇が認められた(Fig. 19B)。

A



B

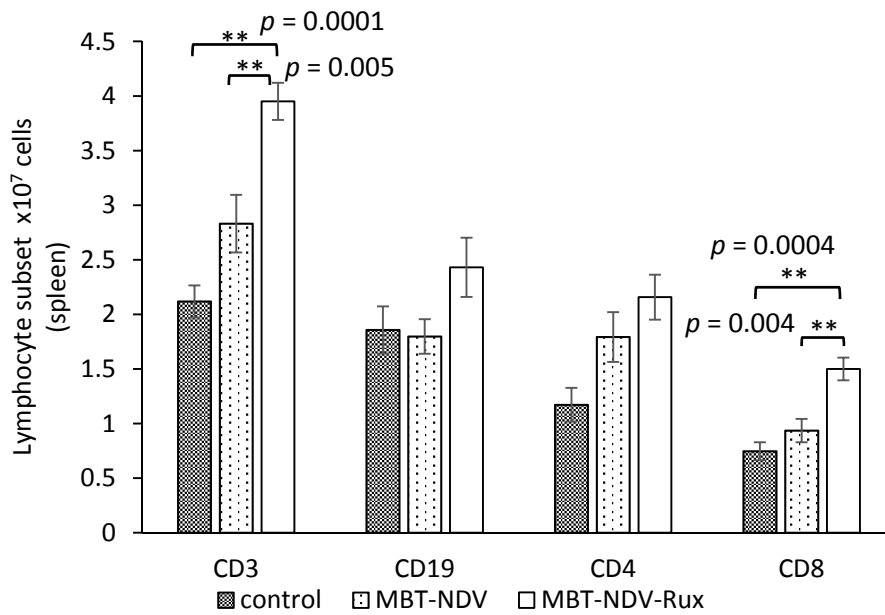


Fig. 19 ワクチン接種後の脾臓リンパ球サブセット比及び脾臓リンパ球数

培地(control)、MBT-NDV または MBT-NDV-Rux をマウスの腹腔内に接種し、最終ワクチン接種から 7 日後にマウスから脾細胞を採取した。(A)リンパ球サブセット比および(B)リンパ球数をフローサイトメーターにて測定した。有意差検定は Tukey-Kramer multiple comparison method を用いた(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )(各群  $n = 5$ )。

## 2) MBT-NDV および MBT-NDV-Rux 免疫マウス脾細胞における IFN- $\gamma$ 遺伝子発現

MBT-2 刺激時における免疫脾細胞における Th1 免疫応答性を評価するため、MBT-2 刺激時の IFN- $\gamma$  遺伝子発現を未刺激時の IFN- $\gamma$  遺伝子発現で除して、IFN- $\gamma$  遺伝子発現比を算出した。IFN- $\gamma$  遺伝子発現比は MBT-NDV-Rux 群において MBT-NDV および control 群より有意に上昇が認められた(Fig. 20)。

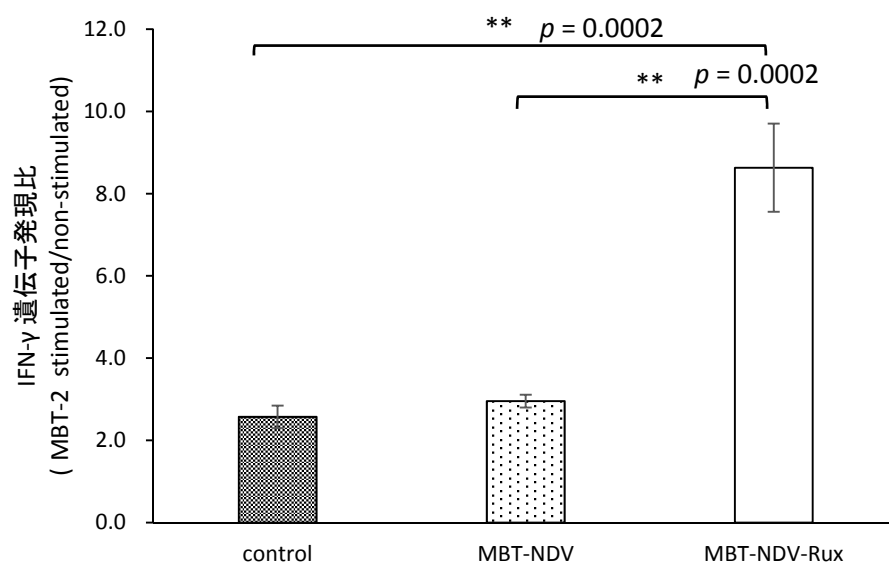


Fig. 20 MBT-2 刺激による IFN- $\gamma$  遺伝子発現比

最終ワクチン接種 7 日後に採取した脾臓リンパ球と MBT-2 を共培養し、4 時間後にリンパ球を回収し、IFN- $\gamma$  mRNA 遺伝子発現を定量 PCR 法で測定した。結果は GAPDH mRNA 発現量を基に相対量を算出し、遺伝子発現比 (MBT-2 刺激時 / 未刺激時)を示した。有意差検定は Tukey-Kramer multiple comparison method を用いた(\*\*:  $p < 0.01$ )(各群  $n = 5$ )。

#### 4. 考察

本研究結果より、Ruxolitinib によって rNDV 感染性を改善することで NDV-TV による Th1 型免疫応答誘導が増強することが明らかとなった。

MBT-2 細胞は、rNDV 感染率が低く (Fig. 13A)、Rux 処理による ISGs 発現の抑制 (Fig. 17) および感染率の改善 (Fig. 16) が認められたことから、その免疫誘導性について検証した。MBT-NDV-Rux 免疫マウスでは免疫 7 日後の脾細胞において control 群と比較して有意に CD8<sup>+</sup>細胞数が上昇し、これは MBT-NDV 処置よりも CD8<sup>+</sup>細胞数を増加させた (Fig. 19A、19B)。これらの結果より、MBT-NDV-Rux は MBT-NDV、control と比較して有意に CD8<sup>+</sup>細胞の増殖を誘導することが明らかとなった。第 II 章の研究において、NDV-TV によって誘導される腫瘍排除は、免疫 CD8<sup>+</sup>細胞の存在が必要であることが明らかとなっており、MBT-NDV-Rux による CD8<sup>+</sup>細胞増殖誘導は腫瘍排除においてもその効果が期待できると考えられた。また、MBT-2 刺激時における免疫脾細胞による IFN- $\gamma$  遺伝子発現においても、MBT-NDV-Rux 免疫マウスでは MBT-NDV および control 群と比較して有意に増加した (Fig. 20)。これらの結果より Rux によって rNDV 感染性を改善することで NDV-TV による Th1 型免疫応答誘導が増強されることが示唆された。NDV-TV による T 細胞刺激においては、NDV の細胞表面への吸着や Neuraminidase 活性が重要であり、腫瘍細胞における感染性、複製、fusion 活性は関与しないという報告がある [30]。この報告では、UV 不活化 NDV あるいは感染性 NDV を吸着させたリンパ腫 (ESb) 細胞をマウスリンパ球に刺激した場合、ESb 細胞に対する細胞傷害活性に差がないことが報告されているが、本結果とは異なる内容であった。これまでの報告では、感染性 NDV の方が不活化 NDV よりも多くの Type I IFN を産生されたと報告されている [46]。このように Type I IFN は、樹状細胞の成熟を促し、自然免疫だけではなく獲得免疫も活性化し [13, 23]、NDV-TV による腫瘍排除誘導において重要な要素の 1 つである。NDV 感染細胞表面に発現するウイルス由来の HN タンパクは、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による抗原特異的細胞傷害活性誘導 [10] や NK 細胞を活性化して IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  産生を誘導する [18]。また、NH タンパクは末梢血単核球からの IFN- $\alpha$  や TNF- $\alpha$  産生も誘導する [47]。さらに、第 I 章および第 III 章で示したように、ウイルス吸着ではな



く、NDV 感染に伴って発現する MHC class I が、腫瘍抗原提示と細胞傷害活性誘導に重要であることから、腫瘍細胞に対する感染率の上昇が免疫効果を上げる要因である。今回検討した NDV-TV-Rux による Th1 免疫応答誘導が MBT-2 で認められた事から、様々な腫瘍に適応可能かを評価していく必要がある。

本章では、腫瘍細胞における rNDV 感染性は NDV-TV による腫瘍免疫療法に影響することを明らかにした。また、JAK 抑制剤の Ruxolitinib を用いて腫瘍細胞の rNDV 感染性を改善させることで、感受性の低い腫瘍細胞に対しても NDV-TV による免疫効果が期待出来る事が示された。

## 5. 小括

本章において以下のことが明らかとなった。

- 1) NDV-TV-Rux によって CD8<sup>+</sup>細胞の増殖が誘導された。
- 2) Ruxolitinib によって rNDV 感染性を改善することで NDV-TV による Th1 型免疫応答誘導が増強することが示唆された。

## 総括

本研究は、NDV を感染させた腫瘍ワクチン(NDV-TV)を腫瘍免疫療法として応用した場合の有効性および NDV-TV の適応が困難な腫瘍への対応を検討することを目的とした。マウスを用いて NDV-TV による抗腫瘍応答の誘導性を評価する過程で、腫瘍細胞株間での NDV 感染性の違いが NDV-TV による抗腫瘍応答の誘導に影響を与える可能性を見出した。腫瘍細胞における type I IFN 関連遺伝子の発現に着目し、腫瘍細胞における NDV 感染性に影響を与える要因について検討した。そして、感染前の腫瘍細胞における ISGs 発現と NDV 感染率間で負の相関が認められたことより、JAK inhibitor である Ruxolitinib 処理により NDV 感染性が改善する事を明らかにした。さらに Ruxolitinib を用いて NDV 感染性を改善させた NDV-TV-Rux による抗腫瘍応答の誘導性を評価し、以下の結論を得た。

1. NDV-TV は様々な腫瘍に対し抗腫瘍応答を誘導した。
2. NDV-TV によって誘導される腫瘍特異的な細胞傷害誘導は免疫する腫瘍細胞株の NDV 感染性に依存している事を明らかにした。
3. 腫瘍細胞における NDV 感染性は感染前の ISGs の発現と逆相関していた。
4. NDV-TV による抗腫瘍応答誘導において免疫 T 細胞が中心的な役割を担うと共に NK、NKT 細胞の存在が腫瘍排除の促進に重要である事を示した。
5. JAK 阻害処理(Rux)によって IFN 関連遺伝子の発現を制御することで、NDV 感染性が高まり NDV-TV による Th1 型免疫応答誘導が増強することが示された。

以上の研究から、NDV-TV の腫瘍免疫療法としての有効性が期待でき、NDV 低感染性の腫瘍細胞においても NDV-TV-Rux を応用する事により効果的に抗腫瘍応答が誘導される事が示された。その抗腫瘍応答には、CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>細胞と共に NK、NKT が重要な役割を担う事が明らかとなった。さらに、NDV 感染性は感染前の ISGs 発現と逆相関することが明らかになった(Fig. 21)。この知見より、事前に腫瘍細胞のウイルス感受性レベルを把握することで感染効率を予測でき、NDV-TV-Rux の適応の指標だけではなく、ウイルス療法の適応拡大

に役立つことと考えられる。

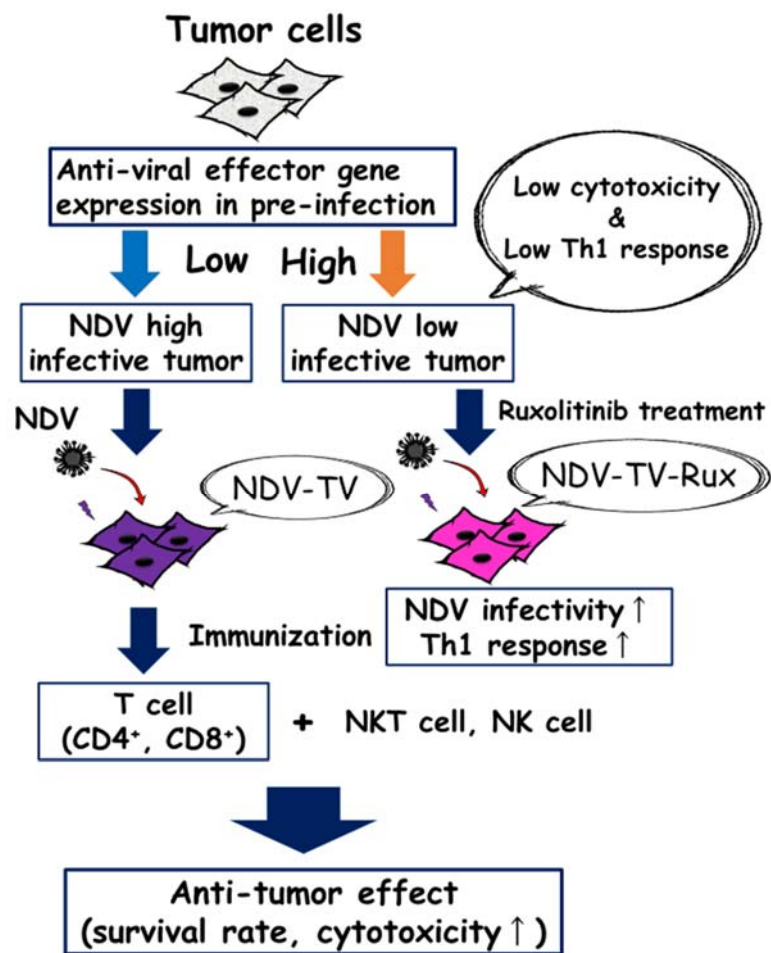


Fig. 21 本研究結果の概略図

## 謝辞

本論文の作成に当たり、本研究に対し終始御指導および御助言を賜りました本学獣医ウイルス学ユニット萩原克郎教授、伴侶動物医療学分野伴侶動物外科学 II ユニット廉澤剛教授、獣医生化学ユニット岩野英知教授、獣医免疫学ユニット岡本実准教授に心より感謝の意を表します。また、実験遂行にあたり多大なるご協力をいただきました、京都府立医科大学医学研究科感染病態学教室中屋隆明教授、北海道大学アイソトープ総合センター安井博宣准教授、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科森ゆうこ博士および獣医ウイルス学ユニットの皆様心よりお礼申し上げます。

## 参考文献

1. Ahlert, T., Sauerbrei, W., Bastert, G., Ruhland, S., Bartik, B., Simiantonaki, N., Schumacher, J., Hacker, B., Schumacher, M. and Schirrmacher, V. 1997. Tumor-cell number and viability as quality and efficacy parameters of autologous virus-modified cancer vaccines in patients with breast or ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **15**: 1354–1366 .
2. Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 499–511 .
3. Bahrami, A. and Folpe, A. L. 2010. Adult-type fibrosarcoma: A reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**: 1504–1513 .
4. Bostock, D. E. 1979. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet. Pathol.* **16**: 32–40 .
5. Brønden, L. B., Eriksen, T. and Kristensen, A. T. 2009. Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasms in Danish dogs - data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Vet. Scand.* **51**: 54 .
6. Cassel, W. A., Murray, D. R. and Phillips, H. S. 1983. A phase II study on the postsurgical management of Stage II malignant melanoma with a Newcastle disease virus oncolysate. *Cancer.* **52**: 856–60 .
7. Charles L. Shapiro, M.D., and Abram Recht, M. D. 2001. Side Effects of Adjuvant Treatment of Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **344**: 1997–2008 .
8. Crowe, N. Y., Smyth, M. J. and Godfrey, D. I. 2002. A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-induced Sarcomas. *J. Exp. Med.* **196**: 119–127 .
9. Drake, C. G., Jaffee, E. and Pardoll, D. M. 2006. Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. *Adv. Immunol.* **90**: 51–81 .
10. Ertel, C., Millar, N. S., Emmerson, P. T., Schirrmacher, V. and Von

- Hoegen, P. 1993. Viral hemagglutinin augments peptide-specific cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2592–2596 .
11. Fiola, C., Peeters, B., Fournier, P., Arnold, A., Bucur, M. and Schirmacher, V. 2006. Tumor selective replication of Newcastle Disease Virus: Association with defects of tumor cells in antiviral defence. *Int. J. Cancer.* **119**: 328–338 .
  12. Fournier, P., Wilden, H. and Schirmacher, V. 2012. Importance of retinoic acid-inducible gene I and of receptor for type I interferon for cellular resistance to infection by Newcastle disease virus. *Int. J. Oncol.* **40**: 287–298 .
  13. Fujita, M., Scheurer, M. E., Decker, S. A., McDonald, H. A., Kohanbash, G., Kastenhuber, E. R., Kato, H., Bondy, M. L., Ohlfest, J. R. and Okada, H. 2010. Role of type 1 IFNs in antiglioma immunosurveillance - Using mouse studies to guide examination of novel prognostic markers in humans. *Clin. Cancer Res.* **16**: 3409–3419 .
  14. Gogoi, P., Ganar, K. and Kumar, S. 2017. Avian Paramyxovirus: A Brief Review. **64**: 53–67 .
  15. Hagiwara, K., Kadosawa, T. and Nakaya, T. 2008. Tumoricidal Effect of Recombinant Newcastle Disease Virus. *Open Vet. Sci. J.* **2**: 11–15 .
  16. Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. and Taniguchi, T. 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature.* **434**: 772–777 .
  17. Hoyt, R. F. and Withrow, S. J. 1984. Oral malignancy in the dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* **20**: 83 .
  18. Jarahian, M., Watzl, C., Fournier, P., Arnold, A., Djandji, D., Zahedi, S., Cerwenka, A., Paschen, A., Schirmacher, V. and Momburg, F. 2009. Activation of Natural Killer Cells by Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase. *J. ViroL.* **83**: 8108–8121 .

19. Karcher, J., Dyckhoff, G., Beckhove, P., Reisser, C., Brysch, M., Ziouta, Y., Helmke, B. H., Weidauer, H., Schirrmacher, V. and Herold-Mende, C. 2004. Antitumor vaccination in patients with head and neck squamous cell carcinomas with autologous virus-modified tumor cells. *Cancer Res.* **64**: 8057–8061 .
20. Krishnamurthy, S., Takimoto, T., Scroggs, R. A. and Portner, A. 2006. Differentially regulated interferon response determines the outcome of Newcastle disease virus infection in normal and tumor cell lines. *J. Virol.* **80**: 5145–5155 .
21. Kudnig, S. T. and Ehrhart, N. 2003. Survival analysis of oral melanoma in dogs. *Vet. Cancer Soc. Proc.* **23**: 39–45 .
22. Lancaster, J. E. 1981. Newcastle Disease—Pathogenesis and Diagnosis. *Worlds. Poult. Sci. J.* **37**: 26–33 .
23. Le Bon, A. and Tough, D. F. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 432–436 .
24. Merlo, D. F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P. L., Sestito, V., Tanara, G. and Bocchini, V. 2008. C a n c e r I n c i d e n c e i n P e t D o g s : F i n d i n g s o f t h e A n i m a l T u m o r R e g i s t r y o f G e n o a , I t a l y . *J. Vet. Intern. Med.* **22**: 976–984 .
25. Motohashi, S., Nagato, K., Kunii, N., Yamamoto, H., Yamasaki, K., Okita, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Suzuki, M., Yoshino, I., Taniguchi, M., Fujisawa, T. and Nakayama, T. 2009. A Phase I-II Study of  $\alpha$ -Galactosylceramide-Pulsed IL-2/GM-CSF-Cultured Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Immunol.* **182**: 2492–2501 .
26. Ockert, D., Schirrmacher, V., Beck, N., Stoelben, E., Ahlert, T., Flechtenmacher, J., Hagmuller, E., Buchcik, R., Nagel, M. and Saeger, H. D. 1996. Newcastle disease virus infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected

- colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2**: 21–28 .
27. Ruiz-Tovar, J., Guarino, M. F., Callejas, M. E. R., Velardo, A. A., Bermejo, J. A. and Navarro, L. C. 2006. Dermatofibrosarcoma protuberans: Review of 20-years experience. *Clin. Transl. Oncol.* **8**: 606–610 .
  28. Schirmacher, V. 2005. Clinical trials of antitumor vaccination with an autologous tumor cell vaccine modified by virus infection: Improvement of patient survival based on improved antitumor immune memory. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**: 587–598 .
  29. Schirmacher, V. and Heicappell, R. 1987. Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virally modified autologous tumor cells. II. Establishment of specific systemic anti-tumor immunity. *Clin. Exp. Metastasis.* **5**: 147–156 .
  30. Schirmacher, V., Haas, C., Bonifer, R. and Ertel, C. 1997. Virus potentiation of tumor vaccine T-cell stimulatory capacity requires cell surface binding but not infection. *Clin. Cancer Res.* **3**: 1135–1148 .
  31. Schirmacher, V., Ahlert, T., Probstle, T., Steiner, H. H., Herold-Mende, C., Gerhards, R., Hagmuller, E. and Steiner, H. H. 1998. Immunization with virus-modified tumor cells. *Semin. Oncol.* **25**: 677–696 .
  32. Schirmacher, V., Haas, C., Bonifer, R., Ahlert, T., Gerhards, R. and Ertel, C. 1999. Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. *Gene Ther.* **6**: 63–73 .
  33. Schlag, P., Manasterski, M., Gerneth, T., Hohenberger, P., Dueck, M., Herfarth, C., Liebrich, W. and Schirmacher, V. 1992. Active specific immunotherapy with Newcastle-diseasevirus-modified autologous tumor cells following resection of liver metastases in colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **35**: 325–330 .



34. Schulze, T., Kemmner, W., Weitz, J., Wernecke, K. D., Schirmacher, V. and Schlag, P. M. 2009. Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: Results of a prospective randomized trial. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**: 61–69 .
35. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. and Jemal, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* **64**: 9–29 .
36. Steiner, H. H. 2004. Antitumor Vaccination of Patients With Glioblastoma Multiforme: A Pilot Study to Assess Feasibility, Safety, and Clinical Benefit. *J. Clin. Oncol.* **22**: 4272–4281 .
37. Taniguchi, T. and Takaoka, A. 2001. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 378–386 .
38. Termeer, C. C., Schirmacher, V., Bröcker, E.-B. and Becker, J. C. 2000. Newcastle disease virus infection induces B7-1/B7-2-independent T-cell costimulatory activity in human melanoma cells. *Cancer Gene Ther.* **7**: 316–323 .
39. Vigil, A., Park, M. S., Martinez, O., Chua, M. A., Xiao, S., Cros, J. F., Martínez-Sobrido, L., Woo, S. L. C. and García-Sastre, A. 2007. Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of newcastle disease virus. *Cancer Res.* **67**: 8285–8292 .
40. Von Hoegen, P., Weber, E. and Schirmacher, V. 1988. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. Augmentation of the tumor-specific T cell response in the absence of an anti-viral response. *Eur. J. Immunol.* **18**: 1159–1166 .
41. Washburn, B. and Schirmacher, V. 2002. Human tumor cell infection by Newcastle Disease Virus leads to upregulation of HLA and cell adhesion molecules and to induction of interferons, chemokines and finally apoptosis. *Int. J. Oncol.* **21**: 85–93 .

42. Weitz, J., Antonescu, C. R. and Brennan, M. F. 2003. Localized extremity soft tissue sarcoma: Improved knowledge with unchanged survival over time. *J. Clin. Oncol.* **21**: .
43. Wilden, H., Fournier, P., Zawatzky, R. and Schirrmacher, V. 2009. Expression of RIG-I, IRF3, IFN- $\beta$  and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus. *Int. J. Oncol.* **34**: 971–982 .
44. Willers, H., Azzoli, C. G., Santivasi, W. L. and Xia, F. 2013. Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. *Cancer J.* **19**: 200–7 .
45. Yang, J. C., Chang, A. E., Baker, A. R., Sindelar, W. F., Danforth, D. N., Topalian, S. L., DeLaney, T., Glatstein, E., Steinberg, S. M., Merino, M. J. and Rosenberg, S. A. 1998. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J. Clin. Oncol.* **16**: 197–203 .
46. Youngner, J. S., Scott, A. W., Hallum, J. V and Stinebring, W. R. 1966. Interferon production by inactivated Newcastle disease virus in cell cultures and in mice. *J. Bacteriol.* **92**: 862–868 .
47. Zeng, J., Fournier, P. and Schirrmacher, V. 2002. Induction of Interferon- $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Human Blood Mononuclear Cells by Hemagglutinin-Neuraminidase but Not F Protein of Newcastle Disease Virus. *Virology.* **297**: 19–30 .
48. Zhao, L., Mei, Y., Sun, Q., Guo, L., Wu, Y., Yu, X., Hu, B., Liu, X. and Liu, H. 2014. Autologous tumor vaccine modified with recombinant new castle disease virus expressing IL-7 promotes antitumor immune response. *J. Immunol.* **193**: 735–745 .