

Development of new therapy for canine mammary cancer with a recombinant measles virus

その他のタイトル	イヌ乳がんに対する組換え麻疹ウイルスを用いた新規治療法の開発
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00073940

論文の内容の要旨

論文題目 **Development of new therapy for canine mammary cancer with a recombinant measles virus**

(イヌ乳がんに対する組換え麻疹ウイルスを用いた新規治療法の開発)

庄司 紘一郎

イヌの乳腺腫瘍は雌犬で最も多く見られる腫瘍であり、その約半数は悪性の乳がんである。乳がんにおいては、手術を行った場合でも、その約半数は転移や再発により 1 年以内に死亡あるいは安楽死となる。特に、リンパ節あるいは肺への転移が認められた場合、その治療法は非常に限られ、多くの場合予後不良となる。このことから、イヌ乳がんに対する新たな治療法が必要であると考えられている。

近年、腫瘍溶解性ウイルスを用いたがんに対する新たな治療法が盛んに研究されており、ヒト医学領域では前臨床研究および臨床治験が積極的に行われている。一方で獣医学領域では、DNA ウイルスのアデノウイルス、ヘルペスウイルスおよびワクシニアウイルス、RNA ウイルスのレオウイルスおよびイヌジステンパーウイルス (CDV)において腫瘍溶解性ウイルスとしての有効性が報告されているが、これまで臨床現場で使用された例はごく限られている。CDV と共にパラミクソウイルス科・モルビリウイルス属に分類されている麻疹ウイルス(MV)は宿主ゲノムに組み込まれない事、細胞傷害性が強い事などからヒト医学領域において腫瘍溶解性ウイルスとしての有効性が期待されている。当研究室では、麻疹ウイルス野生株が、ヒト乳がん細胞に対して優れた抗腫瘍効果を持つ事を見出した。野生株 MV は、感染レセプターとして主に免疫系の細胞で発現している **Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM)** および一部の上皮系細胞やがん細胞で発現している **Poliovirus receptor-related protein 4 (PVRL4)** を利用する。MV の主な病原性は、ウイルスが **SLAM** を介して免疫細胞に感染することによる免疫抑制と、リンパ球を介して全身に伝播することにより発揮される。そこで当研究室では、**SLAM** に結合できなくなる変異を導入した組換えウイルス **rMV-SLAMblind** を作出し、このウイルスが生体内で免疫抑制を起こさず、さらに **PVRL4** を介した乳がん細胞への感染・傷害性を保持する事を明らかにした。**PVRL4** はイヌとヒト間で遺伝子の相同性が高く、MV の感染に重要なドメインは完全に保存されている。

そこで著者は、rMV-SLAMblind をイヌの乳がん治療に応用できるのではないかと考え、イヌ乳がんにおける PVRL4 の発現および rMV-SLAMblind のイヌ乳がんに対する抗腫瘍効果について検討を行った。

はじめに rMV-SLAMblind がイヌ PVRL4 を利用して細胞へ感染できるかを確認するために、HEK293 細胞にイヌ PVRL4 およびイヌ SLAM を発現させた安定発現細胞株を作製し、EGFP を組み込んだ rMV-EGFP-SLAMblind およびコントロールとして親株の rMV-EGFP を multiple of infection (MOI)=0.01 で感染させた。rMV-EGFP がイヌ SLAM 発現細胞に感染したのに対し、rMV-EGFP-SLAMblind ではその感染性は認められなかった。一方で、イヌ PVRL4 発現細胞に対する感染性についてはどちらのウイルスでも維持されていた。さらに抗 PVRL4 抗体でレセプターをブロックする事により感染が阻害されるかを観察したところ、コントロール IgG を加えた時と比較し、rMV-EGFP-SLAMblind の感染が明らかに阻害された。以上の事から、rMV-EGFP-SLAMblind はレセプターとしてイヌ SLAM ではなくイヌ PVRL4 を介して感染する事が示された。

イヌ乳がん細胞において PVRL4 が発現しているかを調べるために、イヌ乳がん細胞株 9 株を用いて、フローサイトメトリーで解析した。その結果、CF33 細胞、CHMm 細胞、CTBp 細胞および CTBm 細胞の 4 株で発現が認められた。CHMp 細胞と CHMm 細胞、CTBp 細胞と CTBm 細胞および CIPp 細胞と CIPm 細胞はそれぞれ同じ患者の原発巣あるいは転移巣より樹立された細胞株である。CHMm 細胞および CTBm 細胞においても発現が認められた事から、乳がんの原発巣だけではなく転移巣においてもイヌ PVRL4 が発現している事が示された。また、これらの 9 細胞株に対して、rMV-EGFP-SLAMblind を MOI = 2 で播種し、EGFP を指標として感染の有無を観察した。その結果、PVRL4 が発現している細胞に対してのみ効率良く感染した。イヌ乳がん細胞でのウイルスの増殖を評価するために、rMV-EGFP-SLAMblind の感染効率の高かった CF33 細胞に、MOI = 0.01 で感染させ、経時的に回収したウイルスの力価を測定する事により増殖曲線を作成した。培養上清中ウイルスおよび細胞中ウイルス共に感染 5 日目で最高のウイルス力価を示し、イヌ乳がん細胞において、rMV-EGFP-SLAMblind がよく増殖できることが確認された。

rMV-EGFP-SLAMblind の効率のよい感染が認められた 3 種のイヌ乳がん細胞株におけるウイルスの細胞傷害性を WST-1 assay により評価した。その結果、感染後 7 日で、CF33 細

胞の 71%、CTBm 細胞の 56%および CHMm 細胞の 68%が傷害された。この結果から、*in vitro* において、rMV-EGFP-SLAMblind は PVRL4 発現イヌ乳がん細胞に対して強い細胞傷害性を有する事が示された。

In vivo での rMV-EGFP-SLAMblind の抗腫瘍効果を評価するために、SCID (severe combined immune deficient)マウスの皮下に CF33 細胞を移植した xenograftmodel を作製し、治療実験を行った。細胞接種後、腫瘍が約 100mm³ に達したところで、10⁶ TCID₅₀ の rMV-EGFP-SLAMblind を腫瘍内に接種した。7 日後にウイルスを再度投与し、経時的に腫瘍の体積を測定した。その結果、rMV-EGFP-SLAMblind 投与群では投与していない群に比べて顕著に腫瘍の増殖が抑制されていた。すべてのマウスを、ウイルス接種後 50 日で安楽殺し、腫瘍を摘出しそれらのサイズを比較したところ、明らかにウイルス投与群では小さくなっており、重量についても有意な差が認められた。また、腫瘍内細胞におけるウイルス感染の有無を確認するために、一部のマウスをウイルス投与 4 日後に安楽殺し、EGFP を指標として観察したところ、腫瘍細胞において感染が認められ、MV 感染による典型的な cytopathic effect である多核巨細胞の形成も認められた。これらの結果から rMV-EGFP-SLAMblind がイヌ乳がんに対して、*in vivo* においても抗腫瘍効果を示す事が示された。

臨床検体での PVRL4 の発現を調べるために、手術により摘出された 11 検体の乳腺腫瘍組織およびイヌ正常乳腺組織の凍結切片あるいはパラフィン切片を作製し、免疫組織化学染色 (IHC)を行った。その結果、正常組織においては乳腺上皮細胞および筋上皮細胞共にイヌ PVRL4 の発現は認められなかった。一方で、イヌ乳腺腫瘍組織では悪性腫瘍の 67%、良性腫瘍の 29%、全体で 45%の腫瘍で PVRL4 の発現が認められた。また、PVRL4 陽性の腫瘍組織から初代培養細胞を作製し、rMV-EGFP-SLAMblind の感染性を評価した。ウイルスを MOI=0.01 で感染させ、EGFP の蛍光を観察したところ、効率よく感染しているのが確認された。以上のことから、臨床検体において半数近い症例で PVRL4 が発現しており、発現の認められた細胞に対しては効率良く rMV-EGFP-SLAMblind が感染することが示された。

ウイルスのトロピズムと正常組織でのレセプター発現組織は密接に関係していることから、rMV-SLAMblind 療法の副作用を予測する為に、正常イヌ組織での PVRL4 の発現について、mRNA の発現および免疫染色により解析を行った。その結果、mRNA については舌・食道・胃・皮膚および膀胱において高発現が認められ、肺・腎・脾および子宮において低発現では

あるが認められた。mRNA が検出された組織についてタンパク質の発現を観察するために、免疫染色を行ったところ、重層扁平上皮により構成される舌・食道では、基底層および有棘層に局在して発現が認められた。一方で、移行上皮から構成される膀胱および腎盂では、上皮細胞全体に認められた。皮膚においては、表皮細胞において発現認められた他、毛包細胞において強いシグナルが認められた。肺では、気管支の上皮細胞においてのみ局在しているのが確認された。これまで、イヌにおいては、脳・肺・腸管・胃・腎および膀胱での発現が報告されていた。しかしながら、本研究では脳および腸管での発現は確認できなかった一方で、新たに舌・皮膚・食道で発現を認めたほか、PVRL4 の上皮細胞での局在についても明らかにした。

本研究では、組換え MV を用いたウイルス療法がイヌ乳がんに対する治療法となりうるかを検討した。その結果、rMV-EGFP-SLAMblind はイヌ PVRL4 発現細胞に対して、効率良く感染し、*in vitro* および *xenograft* モデルにおいて、顕著な抗腫瘍効果を示した。獣医学領域において、乳がんに対する治療法は外科的処置が第一選択ではあるが、転移により完全に除去できない場合には、副作用の強い抗がん剤による治療が中心となり、ヒトで有効性が確認されている分子標的薬については十分なエビデンスが報告されていない。興味深い事に、本研究では転移巣から樹立された細胞株である CHMm 細胞および CTBm 細胞にイヌ PVRL4 が発現しており、rMV-EGFP-SLAMblind がこれらの細胞株に傷害性を示した。特に CHMm 細胞については、同じ患畜の原発巣から樹立された CHMp 細胞ではイヌ PVRL4 の発現が認められなかったことから、イヌ PVRL4 が転移性乳がん、すなわちより悪性の乳がんを発現する可能性を示唆している。この事は、イヌ乳腺腫瘍組織の IHC においてイヌ PVRL4 が悪性乳がんにおいて発現頻度が高い傾向が認められた結果からも支持される。

PVRL4 は正常組織において、一部の上皮細胞において発現が認められた。しかしながら、我々のグループによって行った正常イヌに対する rMV-SLAMblind の安全性試験では、PVRL4 発現部位および血中、尿中および糞便中にウイルスの排出が認められない事を確認している。このことから、rMV-SLAMblind 療法はイヌに対して安全であると考えられた。

以上より、rMV-SLAMblind 療法は、従来の治療法では治癒困難な腫瘍に対する、有望な新規治療法になると期待される。