

学位論文の要旨

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 運動器外科学・腫瘍集学治療学分野	氏 名	渥 美 覚
主論文の題名			
Oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas using live attenuated poliovirus			
主論文の要旨			
<p>【背景】近年の骨軟部肉腫に対する集学的治療法の進歩は目覚ましいが、依然として治療に難渋する症例が存在し、これらに対する有効かつ安全な治療法の開発が強く望まれている。ポリオウイルスレセプター(CD155)の発現は神経芽細胞腫などの腫瘍で報告されており、CD155 を発現した神経芽細胞腫に対する弱毒ポリオ生ワクチン(LAPV : live attenuated poliovirus)による抗腫瘍効果が報告されている。我々は骨軟部肉腫での CD155 の発現と LAPV の抗腫瘍効果について検証した。</p> <p>【方法】①ヒト肉腫細胞株 12 株(ヒト軟部肉腫細胞株 : 線維肉腫細胞株 HT1080、悪性線維性組織球腫細胞株 MFH-ino、悪性末梢神経鞘腫細胞株 HS-PSS など 6 株、ヒト骨肉腫細胞株 : HuO9、Saos-2、HOS など 6 株)における CD155 の発現を real-time PCR、Western blotting、蛍光免疫染色にて検討した。②HT1080 細胞株に <i>in vitro</i> で LAPV を感染させ、経時的な形態変化を光学顕微鏡で評価し、さらに肉腫細胞株 7 株(ヒト軟部肉腫 : HT1080、MFH-ino、HS-PSS、ヒト骨肉腫細胞株 : HuO9、Saos-2、HOS、マウス骨肉腫細胞株 LM-8)に <i>in vitro</i> で LAPV を感染させ、経時的な抗腫瘍効果を MTS assay で検証した。③LAPV 感染後の HT1080 細胞株の細胞死を TUNEL 法にて評価し、さらに経時的なカスパーゼ活性を ApoTox-Glo Triplex Assay で測定した。④<i>in vitro</i> で HT1080 細胞株に LAPV を感染させ、経時的なウイルス力価を測定した。⑤ヌードマウスに HT1080 細胞を皮下移植し、腫瘍形成後、LAPV(n=14)または vehicle(n=15)の 3 日連続で腫瘍内注射を行った。腫瘍径を経時的に測定し、<i>in vivo</i> での抗腫瘍効果を検証した。⑥ヌードマウスに皮下移植した HT1080 肉腫に LAPV を腫瘍内注射した後、腫瘍組織を経時的に採取し、PV 感染後のヌードマウス皮下移植 HT1080 肉腫のアポトーシスを経時的に TUNEL 染色で評価しさらに経時的なウイルス力価測定を行った。</p> <p>【結果】①全てのヒト肉腫細胞株で、mRNA レベル、タンパクレベルでの CD155 の発現を認めた。②<i>in vitro</i> では HT1080 細胞に LAPV 暴露後 48 時間以内に円形化・浮遊細胞化などの形態変化を認めた。MTS assay にてヒト肉腫細胞株 6 株すべてで時間</p>			

依存・用量依存的な抗腫瘍効果を認めたが、マウス骨肉腫細胞株 LM8 では抗腫瘍効果を認めなかった。③HT1080 細胞株に LAPV 暴露後 6 時間で形態変化だけでなく TUNEL 陽性細胞を認めた。LAPV 暴露後の HT1080 細胞のカスパーゼ 3/7 活性は用量・時間依存に増加を認めた。④HT1080 細胞株に LAPV 暴露後のウイルス力価は経時的に指数関数的な増殖を認めた。⑤ *in vivo* では PV 群では vehicle 群に比べて有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$)。⑥皮下移植した HT1080 肉腫組織の TUNEL 陽性細胞は LAPV 投与後 1 日目から認め、3 日後にはさらに増加していた。また、皮下移植 HT1080 肉腫内のウイルス力価は LAPV 投与後 3 日目で最大値を示しその後も腫瘍内に LAPV を認めた。

【考察】CD155 の発現はポリオウイルスの感染に必須であり、LAPV が抗腫瘍効果を発揮する為には腫瘍細胞におけるヒト型 CD155 の発現が不可欠とされている。今回我々は使用したヒト骨軟部肉腫細胞株 12 株すべてで mRNA、タンパクレベルでのヒト型 CD155 の発現を証明した。

in vitro での LAPV による抗腫瘍効果の検証では、マウス骨肉腫細胞ではヒト型 CD155 の発現はなく抗腫瘍効果を示さなかったが、ヒト型 CD155 の発現を示したヒト骨軟部肉腫細胞株では容量・時間依存的な抗腫瘍効果を認めた。これにより骨軟部肉腫細胞株の LAPV 感受性はヒト型 CD155 の発現に依存することが示唆された。さらに LAPV 感染によりウイルス力価の指数関数的な増大を認め、LAPV はヒト骨軟部肉腫細胞株に感染し増殖・拡散していることが明らかとなった。これらにより LAPV 投与に感染した一部の肉腫細胞で増殖した LAPV が拡散し周囲の肉腫細胞に感染することで容量・時間依存的な抗腫瘍効果を発揮していることが示唆された。

これまでに神経芽細胞腫ではポリオウイルス感染によってアポトーシスが誘導されると報告されており、我々は TUNEL 法と ApoTox-Glo Triplex Assay を用いて骨軟部肉腫における細胞死を検証したところ、LAPV 暴露により軟部肉腫細胞株で TUNEL 陽性細胞を暴露後 6 時間で認め、カスパーゼ活性は容量・時間依存的に増加することを示した。これにより、LAPV 暴露による骨軟部肉腫の細胞死にアポトーシスが関与していることが示唆された。

さらに我々は、ヌードマウスに皮下移植した肉腫に LAPV を腫瘍内注射することで腫瘍増殖抑制を認め、その移植腫瘍内にポリオウイルスが存在し、LAPV 投与により移植腫瘍内に TUNEL 陽性細胞を多く認めることが明らかとした。このように骨軟部肉腫に対し LAPV が *in vivo*、*in vitro* で抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなり、LAPV はすでに経口弱毒生ポワクチンとして日常臨床的に応用されており安全性が確立されていることから、骨軟部肉腫への oncolytic virotherapy としての臨床応用に期待を持つことができると考えている。

【結論】骨軟部肉腫では CD155 の発現を認め、骨軟部肉腫に対し LAPV は抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。