

## 腫瘍融解ウイルスによる細胞死であるオンコライシスは細胞内に danger signal を発生させ、プロテアソームアクチベーター（PA28）発現を増強することで細胞障害性Tリンパ球による免疫応答を活性化する

遠藤芳克\*, 酒井 亮, 大内正明, 鬼松秀樹, 日置勝義, 香川俊輔,  
宇野 太, 渡邊雄一, 浦田泰生, 田中紀章, 藤原俊義

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科学

キーワード：adenovirus, telomerase, dendritic cell, uric acid, danger signal

### Virus-mediated oncolysis induces danger signals and stimulates cytotoxic T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation

Yoshikatsu Endo\*, Ryo Sakai, Masaaki Ouchi, Hideki Onimatsu, Masayoshi Hioki, Shunsuke Kagawa,  
Futoshi Uno, Yuichi Watanabe, Yasuo Urata, Noriaki Tanaka, Toshiyoshi Fujiwara

Department of Gastroenterological Surgery, Transplant, and Surgical Oncology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

#### はじめに

樹状細胞は生体内で最も強力な抗原提示細胞であり、腫瘍免疫においても重要な役割を担っている。成熟した樹状細胞は MHC class I 分子や class II, CD80 や 86 などの共刺激分子を高度に発現し IL-12 や IFN- $\gamma$  などの Th1 タイプのサイトカインを分泌する。樹状細胞は死滅していく細胞から細胞由来抗原の捕捉と同時に danger signal も受け取っている<sup>1)</sup>。Danger signal がなければ樹状細胞は成熟せず、むしろ捕捉した抗原に対する免疫寛容を誘導する<sup>2,3)</sup>。細胞質内に増加する

uric acid こそが danger signal として作用する内因性分子であることが報告されており<sup>4,5)</sup>、ダメージを受けた細胞内に生成された uric acid は樹状細胞を活性化し免疫応答を惹起する。

我々は以前より hTERT プロモーターによって E1A と E1B を駆動するアデノウイルスベクター（telomelysin, OBP-301）について報告してきたが<sup>6-9)</sup>、OBP-301 はヒト腫瘍細胞のみを殺し、正常ヒト線維芽細胞内では増殖できず殺細胞効果を示さない。OBP-301 による細胞死は oncolysis と呼ばれそのメカニズムには不明な点もあるが、形態上は apoptosis と necrosis とも異なっている。細胞死の形態により免疫系に及ぼす影響は異なっており<sup>10)</sup>、我々は OBP-301 による細胞死 oncolysis が樹状細胞を刺激し腫瘍細胞に対する免疫応答を増強しうるかどうかを調べた。

平成20年8月受理

\*〒670-8607 兵庫県姫路市下手野1丁目12-1  
姫路赤十字病院  
電話：079-294-2251 FAX：079-296-4050  
E-mail：endy777@hotmail.com

#### プロフィール



遠藤芳克

昭和48年8月9日生

平成10年3月 岡山大学医学部卒業

平成10年5月 岡山大学医学部附属病院 医員（研修医）

平成10年7月 楠本病院 医師

平成12年4月 岡山大学医学部外科学第一講座 研究生

平成12年11月 国立福山病院 医師

平成14年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科入学

平成14年12月 大井田病院 医師

平成17年11月 姫路赤十字病院 医師

現在に至る

## OBP-301の殺細胞効果と細胞死の形態

OBP-301感染後の cell viability を XTT assay で調べてみると OBP-301のヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 (HLA-A32/A24) 及びヒト大腸癌細胞株 SW620

(HLA-A02/A24) に対する殺細胞効果は容量依存性に増強していた (図 1). 細胞死の形態は cell cycle analysis や Hoechst 染色により docetaxel によって誘導される apoptosis とは明らかに異なっていた (図 2).

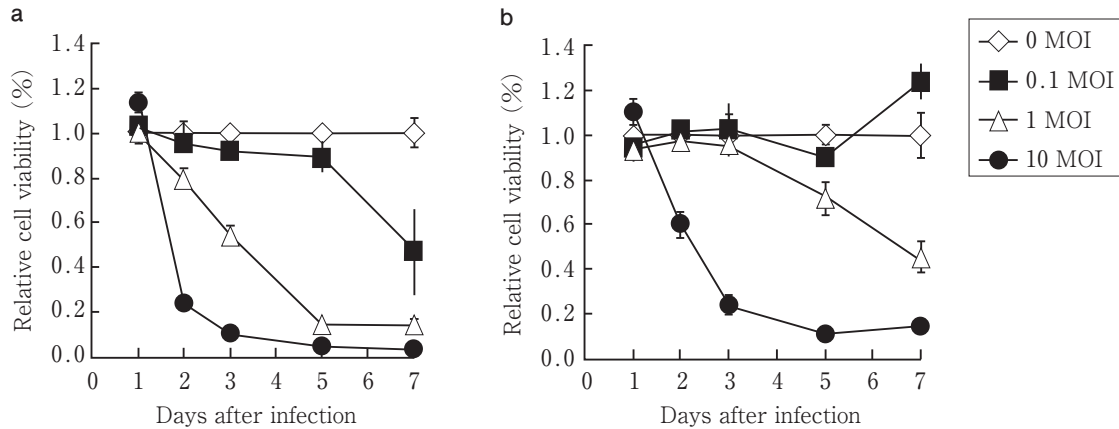


図 1 OBP-301による殺細胞効果

(a) ヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 (HLA-A32/A24) 及び (b) ヒト大腸癌細胞株, SW620 (HLA-A02/A24) に OBP-301を感染させ, XTT assay で cell viability を調べた.

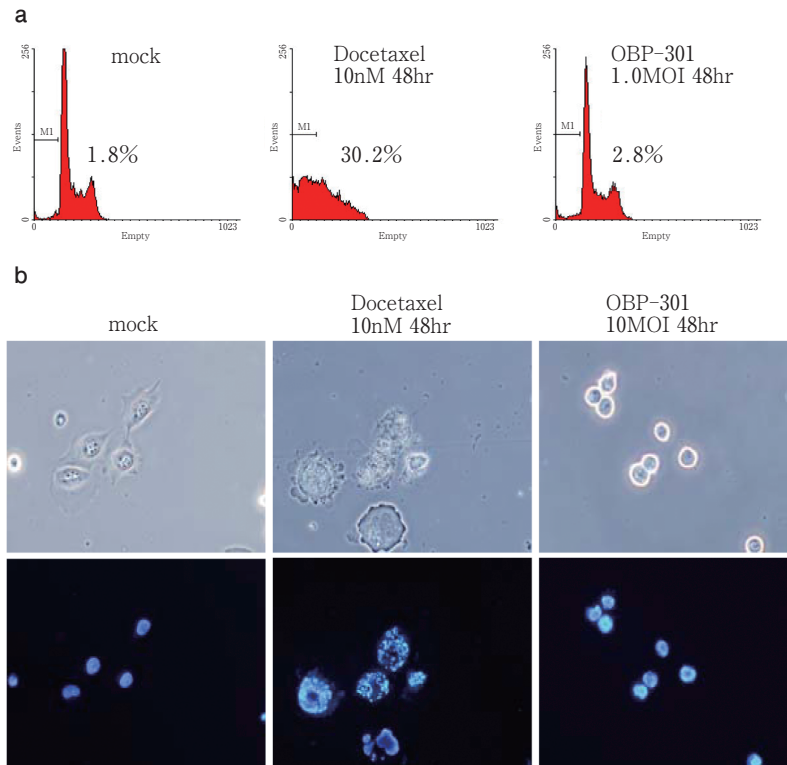


図 2 oncolysis と apoptosis の比較

(a) Flow cytometry による cell cycle analysis を行い apoptosis に特徴的な sub-diploid stage を検出. (b) Hoechst 染色により apoptotic cell の核の変形とクロマチンの凝集を検出.

## OBP-301感染によるdanger signalの発生～細胞内 uric acid レベルの上昇～

OBP-301の感染により腫瘍細胞内に danger signal が発生するかどうかをみる為に uric acid C test (WAKO) を用いて uric acid 濃度を測定した。OBP-301感染後 uric acid 濃度は時間依存性に上昇していた (docetaxel 処理後も72時間後には uric acid 濃度の上昇を認めた) (図 3 a)。E1B 55kDa を欠損し p53欠損の腫瘍細胞でのみ選択的に増殖可能なアデノウイルスベクターである Onyx-015や wild-type のアデノウイルスなど増殖型アデノウイルスでは同様に感染細胞内の uric acid 濃度上昇を認め (図 3 b)、非増殖型アデノウイルスである dl312の腫瘍細胞への感染 (図 3 c) や、正常ヒト線維芽細胞 NHLFへの OBP-301感染 (図 3 d) でも uric acid 濃度の上昇は認めなかった。また OBP-301増殖を抑制するシドフォビル (CDV) 存在下では uric acid 濃度の上昇は抑制されていた

(図 3 c) ことから細胞内でのウイルス増殖が uric acid 濃度の上昇につながるということがわかった<sup>11)</sup>。キサンチン酵素還元酵素 (XOR) はモリブデンフラビン蛋白ファミリーの一つでキサンチンとヒポキサンチンからの uric acid 生成を触媒するが、感染細胞内での XOR mRNA を RT-PCR でみてみると OBP-301感染以後徐々に減少しており、これは感染細胞内の uric acid 濃度の上昇に伴い negative feedback が働いたと予測された。一方で docetaxel を加えた腫瘍細胞では安定した XOR mRNA の band が示された (図 3 e)。

## 細胞死の形態の違いによる免疫系細胞への影響

末梢血から Ficoll-Hyperque を用いて比重遠心分離法で末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) を採取し付着細胞を回収, GM-CSF 及び IL-4存在下で一週間培養して樹状細胞へと誘導した。Oncolytic tumor cell, apoptotic tumor cell, necrotic tumor cell と樹状細胞の共培養をそれぞれ行い, 上清

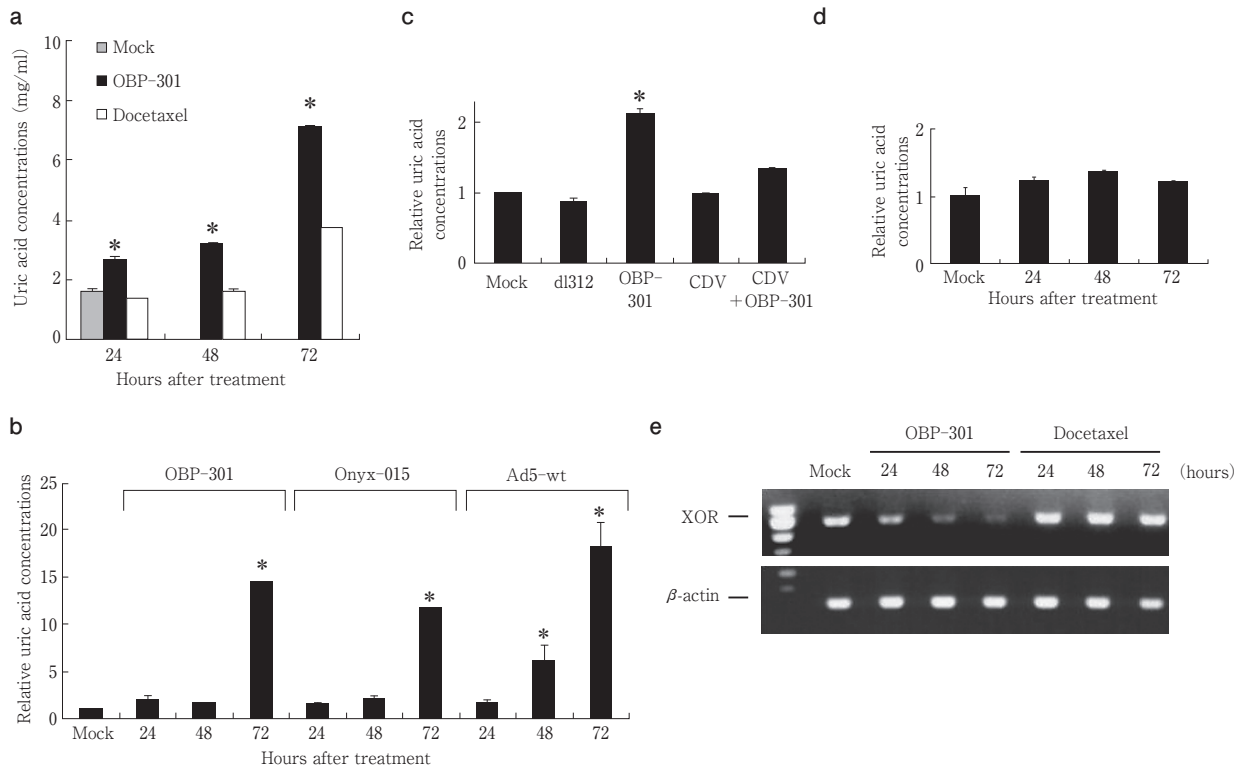


図 3 腫瘍細胞内の uric acid 濃度測定

(a) OBP-301感染後及び docetaxel 処理後の H1299細胞内の uric acid 濃度を uric acid C test で測定。(b) OBP-301, Onyx-015, Ad5-Wt 感染による H1299細胞内の uric acid 濃度の推移。(c) 制限増殖型アデノウイルスである OBP-301, 非増殖型の dl312, ウイルス増殖を抑制するシドフォビル (CDV) 存在下での OBP-301感染による H1299細胞内の uric acid 濃度 (感染後24hr)。(d) ヒト正常肺線維芽細胞への OBP-301感染による細胞内 uric acid 濃度の推移。(e) RT-PCR; OBP-301感染及び docetaxel 処理による H1299細胞内の XOR mRNA 検出。

中の IFN- $\gamma$  及び IL-12を ELISA kit (BioSource) で測定すると、いずれも oncolytic tumor cell と共培養した樹状細胞からの分泌が最も亢進していた。OBP-301のみを樹状細胞に加えても cytokine 分泌は亢進しないことから、oncolysis を起こした腫瘍細胞が樹状細胞を刺激していることがわかった (図 4 a)。次に 3 種類の細胞死の形態に誘導した腫瘍細胞をそれぞれ末梢血単核球 (PBMCs) と共培養 mixed lymphocyte tumor cell culture (MLTC) を行った。上清中の IFN- $\gamma$  及び IL-12濃度を測定すると IFN- $\gamma$ , IL-12のいずれも MLTC-oncolysis 群で他の 2 群よりも高度に分泌亢進が起っていた。また MLTC 後に回収した細胞を

effector 細胞として 6hr- $^{51}\text{Cr}$  release assay を行い CTL 活性を調べると MLTC-apoptosis 群及び MLTC-necrosis 群で誘導される CTL の H1299に対する cytotoxicity は lymphokine-activated killer cells (LAK) と同等であったが、MLTC-oncolysis のそれはより強力な活性を示した (図 5)。一方で SW620に対しては LAK 以外の 3 群はいずれも cytotoxicity は低かった。また HLA 適合していない非小細胞肺癌細胞株 A549 (HLA-A26/A30) に対しては細胞障害性を示さず、これらのことから今回の MLTC から回収した effector 細胞は MHC class I 拘束性に活性を示すことがわかった。

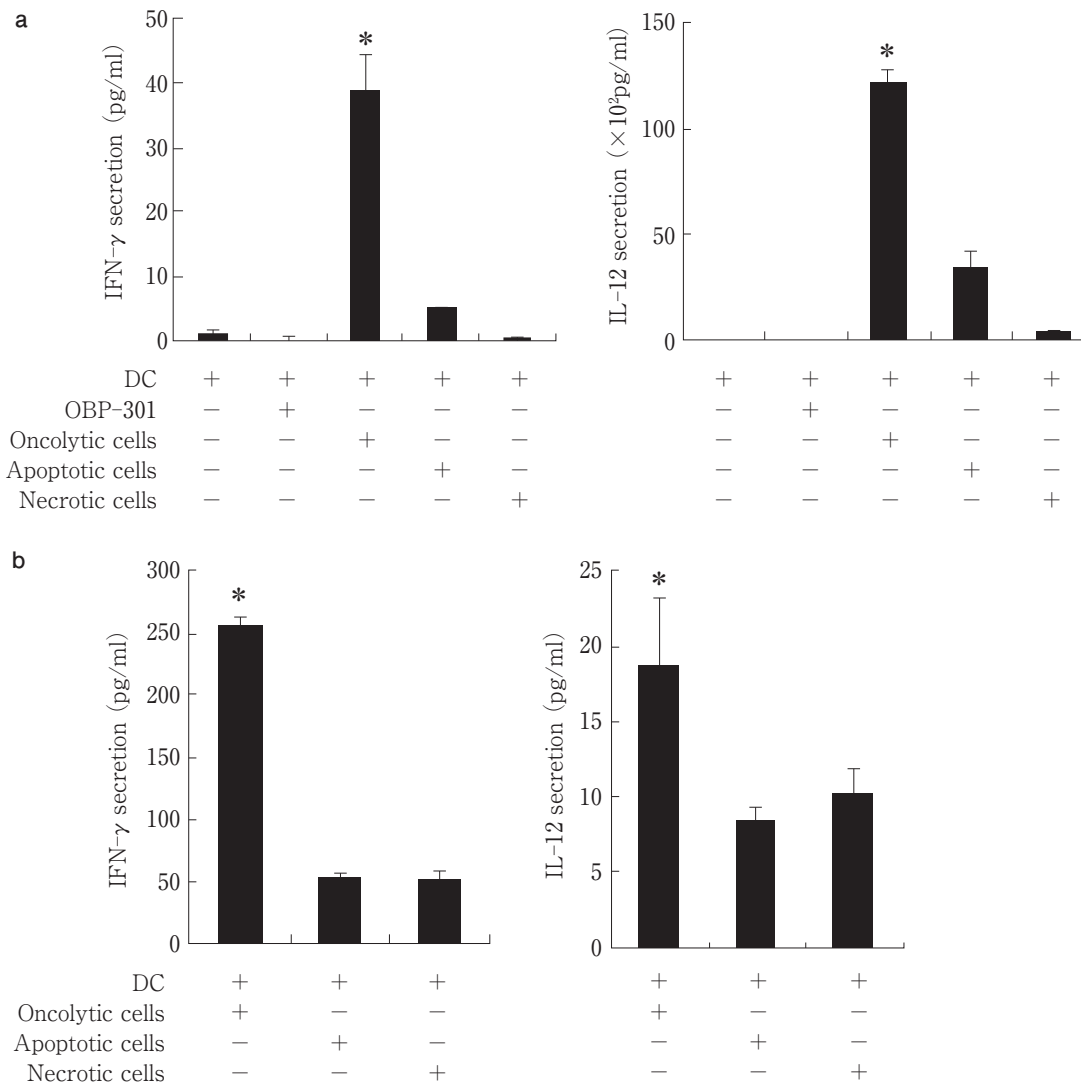


図 4 Th1 type cytokine 測定

(a) 樹状細胞と腫瘍細胞 (H1299) の共培養後 (48hrs) に上清中の Th1 cytokine (IFN- $\gamma$ , IL-12) を ELISA にて測定。(b) 末梢血単核球 (PBMCs) と腫瘍細胞 (H1299) の共培養後 (MLTC) (1w) に上清中の Th1 cytokine (IFN- $\gamma$ , IL-12) を ELISA にて測定。

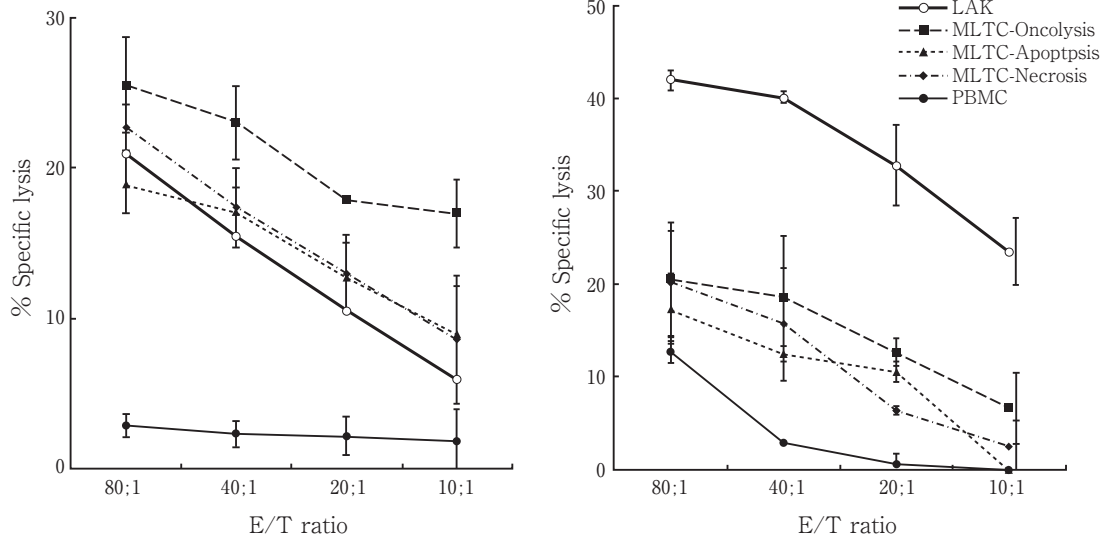


図5 CTL assay

MLTC後に回収した細胞をeffector cellとして6-h standard  $^{51}\text{Cr}$ -release assayを行った。positive controlとしてlymphokine-activated killer cell (LAK)を、negative controlとしてPBMCを用いた。(左)標的細胞；H1299(右)標的細胞；SW620

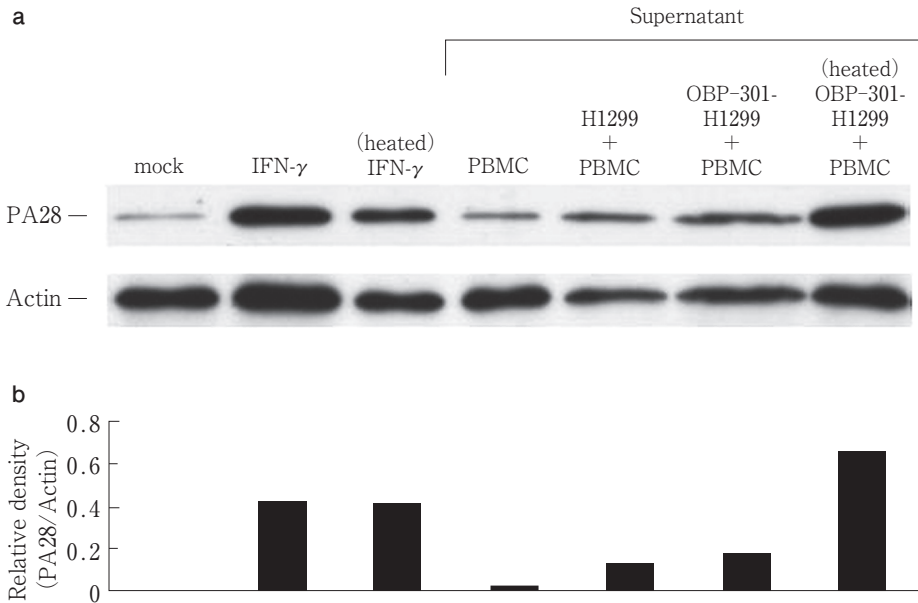


図6 H1299細胞内のPA28発現の検出

MLTC後の上清をH1299に加えることでPA28発現の増強の有無をWestern blotにて調べた。

### IFN- $\gamma$ によるProteasome Activator発現の増強

PA28はproteasome activatorであり、MHC class I分子にのせるligandのプロセッシングを促進する<sup>12,13</sup>。IFN- $\gamma$ による刺激で細胞内のPA28発現が増強するものがこれまでに報告されており、MLTC-oncolysis群

の上清をH1299細胞に加えることでH1299のPA28発現が増強するかどうかをWestern blotで調べた。MLTC-oncolysis群の上清で加熱によりOBP301を不活化したものが顕著にPA28発現を増強しており、これはIFN- $\gamma$ 単独をH1299に加えたpositive control群とほぼ同等であった(図6)。



## おわりに

これまでにも apoptotic cell と necrotic cell とどちらが効果的に細胞由来抗原の cross presentation を行うことができるのか議論されてきた。樹状細胞は死滅していく細胞から細胞性抗原を捕捉するが、同時に danger signal も受け取ることで初めて免疫応答が惹起されるが、最近の研究で uric acid や bradykinin, heat shock protein (HSP90) などが内因性の danger signal として樹状細胞を刺激しうることが報告されている<sup>14,15)</sup>。今回の我々の研究では制限増殖型アデノウイルスである OBP-301の感染により細胞内の uric acid レベルは apoptosis や necrosis よりもはるかに高いことからウイルスの細胞内での増殖が腫瘍細胞の免疫原性を高めていることがわかった。しかも danger signal により刺激された免疫系細胞から分泌される IFN- $\gamma$  が PA28発現を増強して腫瘍関連抗原のプロセッシングを促進することで特異的な免疫応答を惹起していることも示された。OBP-301のみを樹状細胞に加えてもサイトカイン分泌は亢進せず、このことは OBP-301自体が樹状細胞に感染しないかまたは免疫担当細胞に対する刺激にはならないことを意味しているが、もともと OBP-301はヒト正常細胞内では増殖できず細胞障害性を有しないということとも合致する。これまでに他の制限増殖型ウイルスによる clinical trial で腫瘍免疫を惹起できたという報告はなく、更なる in vivo での研究が望まれる。今回の研究で OBP-301の抗腫瘍効果として腫瘍細胞内でのウイルス増殖による直接的な殺細胞効果とに加え、免疫系を介した全身性の間接的な効果の両方を兼ね備えている可能性が示唆された。

## 文献

- 1) Aliberti J, Viola JP, Vieira-de-Abreu A, Bozza PT, Sher A, Scharfstein J : Bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells : a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol* (2003) 170, 5349-5353.
- 2) Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, Lai JH : Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol* (2001) 166, 1499-1506.
- 3) Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K : The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* (2000) 191, 411-416.
- 4) Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA : Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des* (2005) 11, 4145-4151.
- 5) Shi Y, Evans JE, Rock KL : Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* (2003) 425, 516-521.
- 6) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N, Fujiwara T : Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* (2004) 10, 285-292.
- 7) Taki M, Kagawa S, Nishizaki M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kyo S, Nagai K, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD'). *Oncogene* (2005) 24, 3130-3140.
- 8) Umeoka T, Kawashima T, Kagawa S, Teraishi F, Taki M, Nishizaki M, Kyo S, Nagai K, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res* (2004) 64, 6259-6265.
- 9) Watanabe T, Hioki M, Fujiwara T, Nishizaki M, Kagawa S, Taki M, Kishimoto H, Endo Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-301 in human lung cancer cells. *Exp Cell Res* (2006) 312, 256-265.
- 10) Bartholomae WC, Rininsland FH, Eisenberg JC, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M : T cell immunity induced by live, necrotic, and apoptotic tumor cells. *J Immunol* (2004) 173, 1012-1022.
- 11) Lindenmann J, Klein PA : Viral oncolysis : increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *J Exp Med* (1967) 126, 93-108.
- 12) Sijts A, Sun Y, Janek K, Kral S, Paschen A, Schadendorf D, Kloetzel PM : The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol* (2002) 39, 165-169.
- 13) Sun Y, Sijts AJ, Song M, Janek K, Nussbaum AK, Kral S, Schirle M, Stevanovic S, Paschen A, Schild H, Kloetzel PM, Schadendorf D : Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res* (2002) 62, 2875-2882.
- 14) Hu DE, Moore AM, Thomsen LL, Brindle KM : Uric acid promotes tumor immune rejection. *Cancer Res* (2004) 64, 5059-5062.
- 15) Manjili MH, Park J, Facciponte JG, Subjeck JR : HSP110 induces "danger signals" upon interaction with antigen presenting cells and mouse mammary carcinoma. *Immunobiology* (2005) 210, 295-303.