

学 位 論 文 要 旨

氏名 Hwang Chung Chew

題 目 : Oncolytic potential of reovirus as a novel therapy in canine cancers
(犬の腫瘍性疾患に対するレオウイルスによる腫瘍溶解性ウイルス療法の検討)

論文要旨 :

Over the last decade, one of the most interesting therapies in oncology is oncolytic virotherapy. This therapy exploits the selective cytotoxic effects of virus in tumor cells while sparing the bystander normal cells. Reovirus, in particular the serotype 3 Dearing strain, has been one of the oncolytic viruses that have been studied extensively in a wide range of human cancers. Reovirus is a small non-enveloped icosahedral virus with 10 segments of double-stranded RNA that can be found ubiquitously. Reovirus seropositivity is high among adults even though they may be asymptomatic. The Ras activation status in tumor cells has been proven to enhance the efficacy of reovirus with the involvement of dsRNA-activated protein kinase, PKR. Despite its popularity in human cancers, the effects of reovirus have not been tested in any naturally occurring animal cancer so far. Therefore, I focused in exploring the potential of reovirus (serotype 3 Dearing strain) as a novel therapy in canine cancers during my PhD studies.

In Chapter 1, canine mast cell tumor (MCT) cell lines, primary MCT cells and normal mast cells were found to be susceptible to reovirus. Infection of these cells with reovirus was followed by a high production of viral progeny and apoptosis. The cytotoxic effects of reovirus were confirmed in MCT xenograft mouse models with a single intratumoral reovirus injection that induced marked tumor regression. However, the susceptibility of the cell lines towards reovirus did not have any correlation to the Ras activation status.

The following chapter focused on the screening of a panel of canine lymphoma cell lines infected with reovirus to assess the effects of reovirus in other canine cancers besides canine MCT. The susceptibility of canine lymphoma was not as high as expected, where only four out of ten cell lines underwent apoptosis and allowed replication of viral progeny after reovirus infection. Similar to the canine MCT cell lines, there was no correlation between the Ras activation status and reoviral susceptibility among the canine lymphoma cell lines. The effects of reovirus was also assessed in other canine cancer cells lines such as mammary

gland tumor, melanoma and osteosarcoma but the results were not included in this thesis.

Due to inadequate information, we were determined to understand how reovirus utilizes different signaling pathways to exert its cytotoxic effects. Therefore, in Chapter 3, we showed that reovirus infection dysregulates the Ras/Raf/MEK/ERK pathway and degrades c-Kit as a common mean to induce apoptotic cell death. However, the difference of the susceptibility towards reovirus relies on its ability to downregulate the PI3K/Akt pathway. At this point, only these two major pathways were focused in our study. As cell signaling pathways are often complex, we were unable to rule out the involvement of other signaling pathways in reovirus oncolysis.

Chapter 4 highlighted the seroepidemiological studies of reovirus in six prefectures in Japan. The distribution of reovirus serotype 1, 2 and 3 is ubiquitous regardless of prefectures and area. Approximately 50% of the investigated canine population has antibodies against each of the reovirus serotypes due to natural infections. As concurrent infection of the three reovirus serotypes is possible, the existence of antibody against one serotype of reovirus does not automatically provide immunity against the other. This piece of information was invaluable in which the usage of the reovirus serotype 3 Dearing strain as an oncolytic therapy will not be hampered by the antibodies of other serotypes of reovirus.

Knowing that reovirus can induce tumor cell death in a range of canine cancers *in vitro*, clinical results involving reovirus were eagerly awaited. The final chapter entails the results of the experimental infection of reovirus in healthy dogs, followed by the preliminary study of reovirus in canine cancer patients. We concluded that the administration of 1.4×10^8 TCID₅₀ of reovirus in healthy dogs does not induce toxicities and viral shedding but stimulates a healthy neutralizing anti-reoviral antibody response. Among the five canine cancer patients, reovirus administration of a maximum of 5×10^9 TCID₅₀ for five consecutive days, either intratumorally or intravenously, was well-tolerated and adverse events were mild. Viral shedding was short-lived and all patients developed marked anti-viral immunity after reovirus therapy. This chapter has provided critical information on the actual usage of reovirus in a clinical setting, which will be used as a basis for the design and set up of a phase I clinical trial in the future.

All in all, I have achieved most of the objectives of my PhD studies, which was the investigation of a novel therapy in canine cancers from bench to bedside. That being said, more work awaits especially in the search of the key factor that determines reoviral susceptibility and the application of reovirus in a clinical setting.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Hwang Chung Chew
審査委員	主査：山口大学 教授 水野 拓也
	副査：山口大学 教授 奥田 優
	副査：山口大学 教授 前田 健
	副査：鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副査：山口大学 准教授 大浜 剛
題目	Oncolytic potential of reovirus as a novel therapy in canine cancers 犬の腫瘍性疾患に対するレオウイルスによる腫瘍溶解性ウイルス療法の検討

審査結果の要旨：

腫瘍は、人医学領域だけではなく、獣医療においても近年増加してきているのにも関わらず、既存の 3 大治療法（外科手術、放射線療法、化学療法）では十分な効果を発揮できていない。そのため第 4 の治療法として様々な治療法が開発されてきている。本論文にはレオウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法が犬の腫瘍に対して有効な治療法になるかについて、*in vitro* における基礎実験から *in vivo* における臨床応用の可能性の検討までの一連の研究が含まれている。

第 1 章では、4 種類のイヌの肥満細胞腫細胞株を用いてレオウイルス感染によってアポトーシスによる著しい細胞傷害が認められることを明らかにした。また細胞株を免疫不全マウスに移植した腫瘍モデルにおいてレオウイルスが抗腫瘍活性をもつことを明らかにした。一方、肥満細胞腫の犬から分離した肥満細胞腫の primary culture でも、細胞株と同様にレオウイルス感染により細胞傷害が認められた。このことから犬の肥満細胞腫に対してレオウイルスは有効な治療法になる可能性が示唆された。

第 2 章では、肥満細胞腫以外の犬の他の腫瘍に対してもレオウイルスによる治療が適応となるかを明らかにするために、10 種類の犬のリンパ腫細胞株を用いてレオウイルスによる細胞傷害感受性を検討した。その結果、10 種類の細胞株のうち 1 種類において著しい細胞傷害が認められ、3 種類においては中等度の細胞傷害が認められた。さらにこれら細胞死はアポトーシスによるものであることが明らかとなった。しかし残りの 6 種類は非感受性であったため、犬のリンパ腫については、レオウイルスによる治療が適応できるものとできないものが存在することが示唆された。

第 3 章では、第 1 章で認められたレオウイルスによる肥満細胞腫細胞株のアポトーシスの

メカニズムの一部を生化学的に明らかにした。レオウイルス感染後の肥満細胞では Ras 活性化の downregulation による MAPK 経路の活性の低下、それによるアポトーシス誘導蛋白 Bim の発現増強および抗アポトーシス蛋白 Bad、Mcl-1 の発現低下が認められることを明らかにした。さらに Ras 活性の downregulation に伴い、c-kit の発現低下が認められた。このことから肥満細胞におけるレオウイルス誘導性のアポトーシスは、ウイルス感染後に生じる c-kit の発現低下が原因であることが明らかとなった。

第 4 章では、レオウイルスによる臨床試験を開始するにあたり、日本国内の犬におけるレオウイルスの感染状況を把握する目的で、健常犬における血清ウイルス抗体価の検討を行なった。山口とそれ以外の全国主要 5 都市（札幌、東京、名古屋、大阪、福岡）において健康診断のために動物病院へ来院した犬約 10 頭ずつ合計 65 頭の血清を用いて、レオウイルスに対する中和抗体価を測定した。その結果、約 5 割の犬が陽性を示し、年齢とともに陽性率が増加すること、また室内飼育より室外へ出る犬の方が高い抗体陽性率をもつことを明らかにした。このことからレオウイルスは健常な犬でも環境中から感染し、一定の割合で不顕性感染していることが明らかとなった。

第 5 章では、第 1-4 章の結果をうけてレオウイルスを犬の腫瘍の治療に対して使用できるかについて検討した。まず健常ビーグル犬に対して 1.4×10^8 TCID₅₀ を 3 日間皮下投与し 30 日間観察したところ、副作用はとくに認められず、尿、唾液、糞便へのウイルスの排泄も認められなかった。次に本学動物医療センターに来院した担がん犬 5 頭（肥満細胞腫 2 頭、乳腺腫瘍 1 頭、食道癌 1 頭、膀胱移行上皮癌 1 頭）に対して、フェーズ 1 臨床試験を実施した。用いた投与量は最低 1×10^8 から開始し、最大投与量として 5×10^9 まで増量し 5 日間静脈内投与を行なった。その結果どの用量でもとくに大きな副作用は認めなかった。また投与期間を含め、唾液、尿、糞便におけるウイルスの排泄を検討したところ、realtime PCR ではウイルス RNA が検出されることがあったが、それらは感染性をもたないウイルスであることが明らかとなった。本フェーズ 1 試験で用いた担癌犬は、いずれも進行期の腫瘍であったため、レオウイルスによる抗腫瘍効果を適切には評価できなかったため、引き続き実施する予定のフェーズ 2 臨床試験でそれらを含め評価する必要がある。

本論文の結果から、レオウイルスが犬の腫瘍、とくに肥満細胞腫に対して強い細胞傷害活性をもつことが *in vitro* および *in vivo mouse xenograft model* で示された。また健常犬を用いた安全性試験、担癌犬を用いたフェーズ I 臨床試験の結果からレオウイルスによる治療は安全性の高い治療であることが明らかになった。一方、国内の犬には既にレオウイルスに感染している犬も多く認められることから、犬に投与したウイルスが万が一自然界に排泄されるようなことがあっても、比較的安全性が高いと考えられた。この一連の結果は、レオウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法が今後の犬の腫瘍の治療の一つの選択肢となる可能性を示唆しており、臨床獣医学に多大な貢献を示す研究成果である。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位に値するものと判定した。