

学 位 論 文 要 旨

氏名 伊賀瀬 雅也

題 目 : Oncolytic Virotherapy using Reovirus for Canine Tumors
(犬の腫瘍に対する腫瘍溶解性レオウイルス療法の検討)

犬の腫瘍は、人の腫瘍と同様に死亡原因の上位に位置する疾患であり、リンパ腫、乳腺腫瘍、メラノーマ、肥満細胞腫、骨肉腫、組織球性肉腫は、小動物診療の現場において、よく遭遇する腫瘍である。これらの腫瘍の悪性度は非常に高く、既存の治療法に対して抵抗性を示し、また高率で再発・再燃を生じるため、効果の高い新規の治療法の研究が肝要である。

医療においては、腫瘍に対する既存の治療法（3大療法）として、外科手術、放射線療法、化学療法が古くより用いられている。しかしこれら治療の効果は十分ではなく、それを補完する第4の治療法として、低分子化合物、抗体医薬、免疫細胞療法、腫瘍溶解性ウイルス療法などの新しいアプローチ法が検討され、臨床応用に至っている。最近では、獣医療においても、医療を参考にし、これらの新規治療法の検討がなされているが、臨床応用まで到達した治療法は少ない。私は、これらの新規治療法の中から、腫瘍溶解性ウイルス療法に注目し、犬の腫瘍へ応用することを目的とし、研究を行った。

腫瘍溶解性ウイルスは、その用いるウイルスが腫瘍に感染することにより、腫瘍細胞を特異的に死滅させることのできるウイルスである。腫瘍溶解性ウイルスには、病原性を低くしたり外来遺伝子を導入することにより腫瘍に対する効果を増強した遺伝子改変ウイルスを用いる場合と、自然界に存在する状態で腫瘍特異性および傷害性をもつウイルスを用いる場合がある。医療では、様々なウイルスを用いた臨床試験が実施されており、その有用性が証明されているが、獣医療においては、アデノウイルスやジステンパーウイルスなどを用いた実験室における検討のみである。また、獣医療では、遺伝子組換えウイルスを用いた検討がほとんどであり、実際に臨床応用する際には、その取り扱いを十分に注意する必要がある。そこで、私たちは、自然発生のウイルスをそのままの状態で行うことができるレオウイルスに注目した。

レオウイルスは、自然界に存在する病原性の低い2本鎖RNAウイルスであり、人の様々な腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。人の頭頸部癌に対しては第III相の臨床試験が実施されており、その他の腫瘍に対しても第II相の臨床試験が実施されている。私たちの研究室ではこれまでに、レオウイルスが犬の肥満細胞腫およびリンパ腫細胞株で一定の腫瘍抑制効果を示すことを報告した。そこで本研究では、さらに治療対象となる犬の腫瘍を評価するため、犬の乳腺腫瘍、メラノーマ、骨肉腫、組織球性肉腫細胞株を用いて、*in vitro* およびマウス移植モデルによるレオウイルスの細胞傷害の検討を実施した（第1, 2章）。その結果、レオウイルスは、骨肉腫を除く全ての腫瘍に対して著明な細胞傷害を示すことが明らかとなった。また、レオウイルスにより誘導される細胞死は、caspase-3の活性化を介したアポトーシスで生じていることがわかった。加えて、レオウイルスは、腫瘍細胞に感染し、細胞内

で増殖後、培養上清中に新しい娘ウイルスを放出することが明らかとなった。この現象は、放出されたウイルスが、隣接する別の腫瘍細胞に感染し、より強く細胞傷害を誘導できる可能性を示唆している。以上の結果から、レオウイルスは、人の腫瘍と同様に、犬の腫瘍に対しても幅広く抗腫瘍効果を示すことが証明された。

腫瘍溶解性レオウイルスを用いた人の腫瘍に対する臨床試験では、既存の治療法（放射線療法や化学療法）との併用療法が標準化されている。第 3 章では、臨床試験で併用されている化学療法剤（パクリタキセル、ゲムシタビン、カルボプラチン）と、獣医療において近年注目されている低分子化合物トセラニブを用いて、犬の乳腺腫瘍細胞株に対して、レオウイルスと併用した場合に相乗効果を示すのかを検討した。その結果、トセラニブ以外の化学療法剤は、レオウイルスと強い相乗的な細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。獣医療において、上記に示すような化学療法は、その副作用のため最大耐用量で長期的に使用することができないことが問題となっている。しかしながら、レオウイルスを併用することにより、低用量の化学療法剤で単剤使用以上の抗腫瘍効果を得ることができたことから、こうした併用療法を利用できる可能性が示唆された。

第 4 章では、医学領域においても明らかになっていないレオウイルスの効果を増強する新規の併用薬剤の探索を目的とし、標準阻害剤キット（化学療法基盤支援活動）を用いて、犬のメラノーマ細胞株に対するレオウイルスの効果を増強する薬剤のスクリーニングを行った。その結果、285 個のシグナル伝達阻害剤の中から、*ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)* 阻害剤が濃度依存性にレオウイルスの抗腫瘍効果を増強することが明らかとなった。さらに、増強効果のメカニズムを解析した結果、ATM 阻害剤は、細胞内侵入後のウイルス粒子の分解過程に働き、ウイルス増殖を促進させることで、腫瘍細胞に G2/M 期の細胞周期停止と caspase 経路依存性のアポトーシスを誘導していることがわかった。また、ATM ノックアウトメラノーマ細胞株において、親株と比較しレオウイルスへの感受性が増強したことから、認められた細胞傷害の増強は、ATM 特異的に生じていることを確認した。興味深いことに、ATM 阻害剤は、人の腫瘍細胞株に対しても、犬メラノーマ細胞と同様のメカニズムでレオウイルスの抗腫瘍効果を増強した。この結果から、本併用方法は、犬だけでなく人の悪性腫瘍の治療にも応用可能であることが示唆された。

最後に、第 5 章では、本学附属動物医療センターで実施した実際の担ガン症例犬に対するレオウイルスの臨床試験の結果を示した。本試験の目的は、レオウイルスの副作用や環境中へのウイルス排泄の確認およびウイルス投与方法の決定であった。本試験では、19 頭の担ガン症例犬に対して、レオウイルスの投与方法を行った。その結果、本治療は比較的安全性の高い治療法であることがわかり、また環境中へのウイルス排泄も認められなかった。投与方法は、静脈内投与と比較し、腫瘍内投与で一部有効性が認められたが、被験数が少ないため、さらなる検討が必要であった。

以上の研究結果から、レオウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法は、実験室における検討により犬の様々な腫瘍に対して抗腫瘍効果を示し、また実際の担ガン症例犬に対しても安全な治療法であることを証明できた。今後、犬の腫瘍に対する大規模臨床試験を実施することで、本治療法の正確な有効性を評価し、犬の腫瘍の第 4 の治療法としてレオウイルスが用いられている未来を期待している。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	伊賀瀬 雅也
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：鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副 査：山口大学 准教授 馬場 健司
	副 査：山口大学 准教授 大濱 剛
題 目	Oncolytic Virotherapy using Reovirus for Canine Tumors (犬の腫瘍に対する腫瘍溶解性レオウイルス療法の検討)

審査結果の要旨：

犬の腫瘍は、死亡原因の上位に位置する疾患であり、小動物診療の現場においてよく遭遇する疾患である。腫瘍に対する既存の治療法として、外科手術、放射線療法、化学療法が古くより用いられているが、これらの効果は十分ではなく、それを補完する第4の治療法として、低分子化合物、抗体医薬、免疫細胞療法、腫瘍溶解性ウイルス療法などの新しいアプローチ法が検討されている。しかし、臨床応用まで到達した治療法は少ない。腫瘍溶解性ウイルス療法は、腫瘍細胞特異的に感染し増殖することで、腫瘍細胞を特異的に死滅させることのできるウイルスを用いた治療法である。獣医療においては組換えウイルスを臨床症例に使用することのハードルが高いため、本研究では自然発生のウイルスをそのままの状態で行うことができるレオウイルスに注目した。これまでに、申請者の所属する研究室ではレオウイルスが犬の肥満細胞腫およびリンパ腫細胞株で一定の腫瘍抑制効果を示すことを報告してきた。

第1章および第2章では、犬の乳腺腫瘍、メラノーマ、骨肉腫、組織球性肉腫細胞株を用いて、*in vitro*およびマウス移植モデルによるレオウイルスの細胞傷害の検討を実施した。その結果、レオウイルスは、骨肉腫を除く全ての腫瘍に対して著明な細胞傷害を示すことが明らかとなった。また、レオウイルスにより誘導される細胞死は、caspase-3の活性化を介したアポトーシスで生じていることがわかった。加えて、レオウイルスは、腫瘍細胞に感染し、細胞内で増殖後、培養上清中に新しい娘ウイルスを放出することが明らかとなった。この現象は、放出されたウイルスが、隣接する別の腫瘍細胞に感染し、より強く細胞傷害を誘導できる可能性を示唆している。以上の結果から、レオウイルスは、人の腫瘍と同様に、犬の腫瘍に対しても幅広く抗腫瘍効果を示すことが証明された。

第3章では、臨床試験で併用されている化学療法剤（パクリタキセル、ゲムシタピン、カル