



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1616号
学位記番号	第1151号
氏名	稲垣 佑祐
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	Anti-tumor efficacy of oncolytic reovirus against gastrointestinal stromal tumor cells Oncotarget. 2017; 8:115632-115646
論文審査担当者	主査： 瀧口 修司 副査： 田中 靖人, 城 卓志

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

自然界に存在し、人体に対してほぼ無害であるレオウイルスは様々な癌種に対して有効性が示されており現在世界で臨床試験も行われている。また切除不能な消化管間質腫瘍(GIST)の治療には分子標的薬のイマチニブが第一選択となり有効性が示されているが、薬剤に対する一次耐性、二次耐性といった治療への抵抗性が臨床上問題となっている。さらにセカンドライン以降に用いられる薬には副作用も多く、GISTに対する新しい治療法が望まれている。今回我々はGISTに対するレオウイルスの有効性を検証し、新たな治療法としての可能性を検討した。

【方法】

1. ヒト GIST 細胞由来でイマチニブに対して感受性のある細胞 GIST-T1 を使用した。また GIST-T1 をイマチニブが加えられた培養液で半年間培養することによりイマチニブ耐性 GIST 細胞 (GIST-IR) を作製した。作製した GIST-IR の Character を調べるため、まず IC50 を計測してイマチニブに対する耐性を比較した。耐性株に遺伝子変異が起きたかを調べるために KIT の exon13, 14, 17, 18、PDGFRA の exon18 の変異の有無を DNA sequence で解析を行った。さらにイマチニブ投与によるチロシンキナーゼレセプターとその下流シグナルの活性化を RTK phosphorylation array とウエスタンブロットで検討した。
2. レオウイルスの GIST 細胞に対する細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果を調べるため、WST-8 assay と Caspase3/7 活性の計測により検討を行った。
3. レオウイルスによって誘導されるアポトーシスの分子メカニズムを調べるため、レオウイルス治療前後に発現するアポトーシス関連遺伝子 84 種を網羅的に解析しウエスタンブロットでも確認した。
4. GIST に対する TRAIL と Fas の影響を調べるために、GIST-T1 と GIST-IR に対して TRAIL と Fas のリガンドである FasL の単独治療と、TRAIL, FasL にレオウイルスを加えた併用治療の効果を WST-8 assay と Caspase3/7 活性の計測により検討した。
5. BALB/c nu/nu マウスを用いて GIST-T1 と GIST-IR の皮下腫瘍 Xenograft モデルを作製した。vivo においても GIST-IR がイマチニブに耐性を示すことを確認するためイマチニブを 40mg/kg/day の量で 4 週間経口投与し、腫瘍の大きさをコントロール群と比較した。次に同様の Xenograft モデルを用いて 1×10^8 pfu の量のレオウイルスを週に 1 回腫瘍内に局注して 4 週後に腫瘍の大きさをコントロール群と比較した。4 週間の治療後にマウスを屠殺して取り出した腫瘍を Fas, Ki67, Cleaved caspase-3 の免疫染色を行い発現の違いを検討した。

【結果】

1. 作製した GIST-IR はコントロールと比較して IC50 は約 12 倍 (230 ± 40 nM vs 2800 ± 470 nM) の値を示した。耐性株に遺伝子の変異を認めなかった。GIST-IR においては c-KIT,

Tie2, VEGFR などのチロシンキナーゼレセプターやその下流シグナルの AKT や ERK などでは GIST-T1 と比較してイマチニブに曝しても活性があまり落ちなかった。

2. GIST-T1, GIST-IR ともレオウイルスの投与量依存性に細胞増殖を抑制し、Caspase 3/7 活性値も量依存性に高くなった。

3. GIST-T1 細胞においてレオウイルス投与により様々なアポトーシス関連遺伝子の増加を確認した。10 倍以上に増えたものの中から TRAIL と Fas に注目し、タンパクレベルでも増加することをウェスタンブロットで確認した。

4. TRAIL は GIST 細胞にアポトーシスを誘導しなかったが、FasL は GIST-T1, GIST-IR においてアポトーシスを誘導した。同様に TRAIL は細胞生存率に影響を与えなかったが FasL は GIST の細胞生存率を有意に下げた。またレオウイルスだけよりも FasL を加えることにより相乗効果を示した。

5. GIST-T1 の Xenograft モデルにおいてはイマチニブの経口投与により有意に腫瘍増大を抑えたのに対し GIST-IR の Xenograft モデルにおいては腫瘍増大に差を認めなかった。レオウイルス治療では GIST-T1, GIST-IR 両方において有意差を持って腫瘍の増大を抑制した。取り出した腫瘍の免疫染色ではレオウイルス投与群で有意に Fas 発現の増加と、Ki67 陽性細胞の減少を認めた。

【考察】

レオウイルスが GIST に対して抗腫瘍効果を有することを初めて示した。レオウイルスの殺腫瘍機序はまだはっきりとは分かっていないが、GIST 細胞においては Fas-FasL を介したアポトーシスが一部関与していることが示唆された。現在の GIST 治療薬であるチロシンキナーゼレセプターとは異なる機序であるため、薬剤の耐性に関わらず効果を示すことができると考えられる。しかし今回作製した耐性株は遺伝子変異を有するものではないため遺伝子変異を持った細胞でも確認する必要がある。レオウイルスは人体に対する有害事象も少ないという点においても新たな治療法としての利点があると思われる。

【結論】

腫瘍崩壊ウイルス、レオウイルスは GIST に対して抗腫瘍効果を示し、新たな治療選択の 1 つとなり得る。

論文審査の結果の要旨

現在遺伝子組み換え技術の進歩によりウイルス治療の研究が世界で進められている。腫瘍崩壊ウイルスの1つであり、人体に対してほぼ無害であるレオウイルスは様々な癌種に対して有効性が報告されている。また切除不能な消化管間質腫瘍（GIST）の治療には現在分子標的薬のイマチニブが第一選択となり有効性が示されているが、薬剤に対する一次耐性、二次耐性といった治療への抵抗性が臨床問題となっている。さらにセカンドライン以降に用いられる薬には副作用も多く、GIST に対する新しい治療法が望まれている。今回 GIST に対するレオウイルスの有効性を検証し、新たな治療法としての可能性を検討した。

【方法】

イマチニブを加えた培養液で GIST-T1 を半年間培養してイマチニブ耐性株 GIST-IR を作製した。GIST-IR の特徴を調べるため DNA シークエンス、チロシンキナーゼレセプターの活性の変化を検証した。レオウイルスによる GIST 細胞増殖抑制効果とカスパーゼ活性値の変化を検討した。レオウイルスによって誘導されるアポトーシス関連遺伝子を RT-PCR で網羅的に解析した。TRAIL と FasL による GIST 細胞への効果を検討した。ヌードマウスの Xenograft モデルを用いて *in vivo* におけるレオウイルスの効果を検討した。

【結果】

GIST-IR はイマチニブに耐性を示したが、GIST-T1 と比較して遺伝子の変異を認めなかった。GIST-IR はイマチニブを加えても Tie2 などのチロシンキナーゼレセプターや Akt などの下流シグナルの活性が落ちなかった。レオウイルスは GIST-T1, GIST-IR とともに細胞の増殖を抑え、カスパーゼ 3/7 活性値を上昇させた。レオウイルスにより TRAIL や Fas の発現が誘導された。TRAIL は GIST の細胞生存率に影響を与えなかったが、FasL は GIST の細胞生存率を有意に下げた。 *in vivo* においてもレオウイルスは腫瘍の増大を抑えた。

【考察】

レオウイルスの殺腫瘍機序はまだはっきりとは分かっていないが、GIST 細胞においては Fas-FasL を介したアポトーシスが関与していることが示唆された。現在の GIST 治療薬であるチロシンキナーゼレセプターとは異なる機序であるため、薬剤の耐性に関わらず効果を示すことができると考えられた。レオウイルスは人体に対する有害事象も少ないという点においても新たな治療法としての利点があると思われる。

【結語】

レオウイルスはイマチニブへの耐性にかかわらず GIST に対する新たな治療法になり得ると考えられる。

【審査の内容】

約 20 分間の論文内容プレゼンテーション後に、主査の瀧口教授からは、作製した耐性株の耐性の証明の問題や、ウイルス治療後に生き延びた組織を使ってアポトーシスを証明することの実験デザインについてなど 5 項目、第一副査の田中教授からは、イマチニブへの耐性化の機序、ウイルス治療と免疫の活性化についてなど 10 項目の質問がなされた。城教授からはヒトとヌードマウスの免疫系の違いによる効果について、GIST に対する最近の治療法や胃がんの化学療法について質問がなされた。一部返答に窮することもありましたがおおむね満足できる回答があり、学位論文の主旨を十分理解していると考えられた。本研究は GIST に対するレオウイルスの抗腫瘍効果を初めて報告し、今後の臨床応用が期待できる意義ある知見と考えられた。よって本論文の著者には博士（医学）の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 瀧口 修司 副査 田中 靖人 城 卓志