




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 719 号	氏 名	白 坂 美 哲
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	上田 貴威 (印)
		副査氏名	田仲 和典 (印)
		副査氏名	松本 重清 (印)
<p>論文題目                  Cytocidal effect of irradiation on gastric cancer cells infected with a recombinant mammalian orthoreovirus expressing a membrane-targeted KillerRed                  (細胞膜結合型 KillerRed を発現する組換え哺乳類オルソレオウイルス感染による胃癌細胞株に対する光線照射による殺細胞効果)                  論文掲載雑誌名                  Pharmaceuticals</p> <p>論文要旨                  【緒言】切除不能胃癌は化学療法を行っても1年生存率が50%と予後不良であり、新たな治療法の開発が望まれている。本研究の目的は、光照射により細胞毒性活性酸素種を生成する光感受性蛍光蛋白質で細胞膜に局在する KillerRed (KR-mem) を発現する組換え MRV (T3D 型) を作成し、その評価を行い、新規治療法の開発を行うことである。                  【研究対象および方法】MRV の 2 遺伝子の 3' 末端に KR-mem 遺伝子を 2A ペプチドで融合させた組換え S2 分節ゲノムプラスミドを構築し、他 9 本の遺伝子ゲノムプラスミドとともに BHK/T7-9 細胞株に co-transfection させた。作成した組換えおよび野生型 MRV をそれぞれ BHK/T7-9 細胞に感染させ、24、48、72、96 時間後に培養上清を回収して力価測定を行い、増殖曲線を作製した。組換え MRV を 3 種類の胃癌細胞株(MKN7、MKN45P、NUGC-4)に多重感染度 2,000(BHK/T7-9 細胞における力価を用いて実施)で接種し、感染の有無を調べた。さらに MKN45P 細胞において組換え MRV を多重感染度 100 (BHK/T7-9 細胞に対してのおける力価を用いて実施)感染させたのちに光照射(598nm、560mW、5min、168J/cm<sup>2</sup>)を行い、アポトーシスとネクローシスを経時的に測定した。                  【結果】ゲノムプラスミドの BHK/T7-9 細胞への co-transfection 後、その培養液を回収して新たな BHK/T7-9 細胞に接種し、目的の組換え MRV の作成が確認された。免疫蛍光染色により組換え MRV 感染では λ 2 タンパク蛋白質の発現細胞と KRmem 蛍光発現細胞が一致した。ウエスタンブロット法により組換え MRV 感染細胞において 2A ペプチドの作用により KRmem が σ 2 蛋白質とは切り離されて発現していることが確認された。組換え MRV は BHK/T7-9 細胞において野生型とほぼ同等の増殖能を示した。組換え MRV は、最も高い感受性を示した MKN45P 細胞では株組換え MRV において光照射による殺細胞効果(ネクローシス)の増強が確認された。                  【考察】今回、KRmem を発現する組換え MRV の作成に成功した。S2 分節 3' 末端側への KRmem 遺伝子の挿入は MRV の増殖性を阻害しないことが分かった。組み換え MRV が感染した MKN45P 細胞では光線照射後にネクローシスによる細胞死が有意に強く誘導された。組み換え MRV 感染により発現した KRmem が、光照射により活性酸素が細胞膜近くで生成されることにより直下で活性酸素種を産生し、その結果、細胞膜が破壊されやすくなり、ネクローシスに至ったと考えられた。                  【結語】KR-mem を発現する組換え MRV を用いた光線力学療法は、今後、細胞への感染性を改良することにより切除不能胃癌に対して新規の治療法となりえる。                  本研究は、筆者らが作成した KRmem 発現組換え MRV を用いることにより、優れた抗腫瘍効果が期待できる新しい光線力学療法の開発に繋がるものであると考える。                  このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第 719号	氏名	白坂美哲
審査委員会委員	主査氏名	上田 貴威 	
	副査氏名	田仲 和宏 	
	副査氏名	松本 重清 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 哺乳類オルソレオウイルス (MRV) のライフサイクルと二本鎖RNAウイルスゲノム生成</li> <li>2. MRVを用いる方法の他の腫瘍融解ウイルス療法と比較した優位性</li> <li>3. MRVの腫瘍特異性のメカニズム</li> <li>4. MRV分節ゲノム発現プラスミド構築の方法論</li> <li>5. MRV感染細胞における細胞死のメカニズム</li> <li>6. MRV感染効率とその向上の方法論</li> <li>7. 光線力学療法との組合せによる相乗効果の評価法の妥当性</li> <li>8. 光照射のエネルギー量の妥当性</li> <li>9. 臨床応用に向けた光線到達深度および照射範囲の拡大の方法論</li> <li>10. 腫瘍溶解性ウイルス療法と光線力学的療法を組み合わせようと考えた経緯</li> <li>11. 光照射のタイミングにより、腫瘍溶解性ウイルス療法でのアポトーシス誘導と光線力学的療法での壊死の誘導による双方の強い相乗効果が得られる可能性の検討</li> <li>12. 光感受性蛍光タンパク質として、KillerRedを選択した理由</li> <li>13. KillerRed以外の光感受性蛍光タンパク質への光照射による癌細胞壊死誘導の可能性</li> <li>14. KillerRedへの光照射による細胞膜傷害の機序</li> <li>15. ROSの作用を打ち消す抗酸化物質の前投与による効果への影響</li> <li>16. Orange laserよりエネルギー密度の低いレーザー照射の検討</li> <li>17. BHK/T7-9細胞使用の理由</li> <li>18. Orange Laser使用の根拠</li> <li>19. Multiplicity (MOI) について</li> <li>20. 早期胃癌に対する治療応用の可能性</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 白坂 美哲

## 論 文 題 目

Cytocidal effect of irradiation on gastric cancer cells infected with a recombinant mammalian orthoreovirus expressing a membrane-targeted KillerRed

(細胞膜結合型 KillerRed を発現する組換え哺乳類オルソレオウイルス感染による胃癌細胞株に対する光線照射による殺細胞効果)

## 要 旨

【緒言】切除不能胃癌は化学療法を行っても1年生存率が50%と予後不良であり、新たな治療法の開発が望まれている。腫瘍溶解性ウイルス療法や光線力学的療法は、臨床応用されてきており、新たな治療法として期待されている。哺乳類オルソレオウイルス(MRV)は、いくつかの癌に対して臨床試験が行われている腫瘍溶解性ウイルスである。本研究の目的は、光照射により細胞毒性活性酸素種を生成する光感受性蛍光蛋白質で細胞膜に局在する KillerRed (KRmem) を発現する組換え MRV (T3D 型) を作成し、その評価を行い、新規治療法の開発を行うことである。

【研究対象および方法】MRV の  $\sigma 2$  遺伝子の 3' 末端に KRmem 遺伝子を 2A ペプチドで融合させた組換え S2 分節ゲノムプラスミドを構築し、他 9 本の分節ゲノムプラスミドとともに BHK/T7-9 細胞株に co-tansfection させた。培養液の上澄みを回収し、新たな BHK/T7-9 細胞に継代し、蛍光発現を確認した。作成した組換え MRV の性状は RNA 電気泳動、ウエスタンブロット、免疫蛍光染色により確認した。野生型および組換え MRV をそれぞれ BHK/T7-9 細胞に感染させ、24、48、72、96 時間後に培養

上清を回収して力価測定を行い、増殖曲線を作製した。組換え MRV を 3 種類の胃癌細胞株(MKN7、MKN45P、NUGC-4)に多重感染度 2,000(BHK/T7-9 細胞における力価を用いて実施)で接種し、感染の有無を調べた。さらに MKN45P 細胞において組換え MRV を多重感染度 100 (BHK/T7-9 細胞における力価を用いて実施)感染させたのちに光照射(598nm、560mW、5min、168J/cm<sup>2</sup>)を行い、Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay kit を用いてアポトーシスとネクローシスを経時的に測定した。

【結果】 ゲノムプラスミドの BHK/T7-9 細胞への co-tansfection 後 6 日目に蛍光発現細胞が確認でき、9 日目にはその周囲への蛍光陽性細胞の拡がり確認された。その培養液を回収して新たな BHK/T7-9 細胞に接種し、接種後 3 日目に蛍光発現が確認でき、5 日目にはウェル全体に広がったことから目的の組換え MRV の作成が確認された。RNA 電気泳動により組換え S2 分節のバンドの M2 分節と M3 分節のバンドの間への移動が確認された。免疫蛍光染色により組換え MRV 感染では  $\lambda 2$  蛋白質の発現細胞と KRmem 蛍光発現細胞が一致した。ウェスタンブロット法により組換え MRV 感染細胞において 2A ペプチドの作用により KRmem が  $\sigma 2$  蛋白質とは切り離されて発現していることが確認された。組換え MRV は BHK/T7-9 細胞において野生型とほぼ同等の増殖能を示した。組換え MRV は 3 種類の胃癌細胞株(MKN7、MKN45P、NUGC-4)に対して感染性があり、最も高い感受性を示した MKN45P 細胞では組換え MRV 感染において光照射による殺細胞効果 (ネクローシス) の増強が確認された。

【考察】 今回、KRmem を発現する組換え MRV の作成に成功した。S2 分節 3'末端側への KRmem 遺伝子 (774 bp) の挿入は MRV の増殖性を阻害しないことが分かった。組み換え MRV が感染した MKN45P 細胞では光線照射後にネクローシスによる細胞死が有意に強く誘導された。通常、光線照射や MRV 感染ではアポトーシスが誘発されることが報告されているが、組換え MRV 感染により発現した KRmem (膜型 KillerRed) が光照射により細胞膜直下で活性酸素種を産生し、その結果、細胞膜が破壊されやすくなり、ネクローシスが強く誘導されたと考えられた。組換え MRV の胃癌細胞株への感染性は高くなかったが、S1 分節の改変により改善できる可能性がある。癌の光線力学療法において光増感剤の標的細胞への送達が課題となるが、今回の組換え MRV はその点を解決しうるものであり、さらに MRV 自体による抗腫瘍効果もあるため、光増感剤単独よりも優れた抗腫瘍効果が期待できる。

【結語】 KRmem 発現組換え MRV を用いた光線力学療法は、今後、細胞への感染性を改良することにより胃癌に対して新規の治療法となりえる。