

# 1. 不活化センダイウイルス粒子を用いた抗腫瘍免疫療法の展開

黒岡 正之, 金田 安史

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

紫外線により不活化され、複製能力をなくしたセンダイウイルス粒子[hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E)]は安全な遺伝子治療用ベクターとして開発されてきた。最近、我々の研究でこのHVJ-E そのものが強い抗腫瘍効果をもつことが明らかとなった。HVJ-E をマウスの腫瘍内に注射すると、60% から80% の腫瘍が完全に消失し、残りの腫瘍も著しく増殖を抑制された。重度免疫不全(Scid)マウスに同腫瘍を移植した実験では、この効果はほぼなくなったため、宿主の抗腫瘍免疫の賦活化が主な機序であると推測された。*In vitro* では、HVJ-E は生きたHVJ(live HVJ)と同程度にマウスやヒトの樹状細胞を成熟化させた。またHVJ-E 刺激により樹状細胞から分泌されるサイトカインの多くは、live HVJ による刺激に較べて有意に減弱したが、IL-6 だけは同程度の分泌量を保持し、特徴的であった。定量的RT-PCR や免疫組織染色の結果より、HVJ-E の腫瘍内投与により樹状細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞の著明な腫瘍内浸潤を認め、さらに腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導が確認された。またHVJ-E はFoxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 制御性T細胞(Treg)を抑制する作用を有することがわかり、樹状細胞から分泌されるIL-6 がこの作用の中心であることもわかった。HVJ-E による樹状細胞からのIL-6 分泌やTreg の抑制はマウス生体内でも確認され、IL-6 シグナルの阻害によりHVJ-E の抗腫瘍効果も有意に減弱した。以上よりHVJ-E は獲得免疫系のエフェクター細胞を賦活化すると同時にTreg による免疫寛容状態の成立を阻止する強力な免疫療法剤であることがわかった。また、対象とするがんの種類によっては、HVJ-E によるがん細胞直接傷害作用やNK 細胞活性化による抗腫瘍効果も期待できることがわかってきており、今後、新しいがん免疫療法剤として大いに期待できると考えられる。

## はじめに

昨今、がんの治療成績は、既存の外科治療、化学療法および放射線治療の進歩により、飛躍的に向上した。しかしながら、悪性度の高い組織型、進行癌や転移癌などの予後は未だ低く、新たながん治療法の開発、確立が必要である。がん免疫療法は、その選択肢の一つとしてたいへん有望であり、現在まで多くの基礎研究や臨床研究がなされている。このなかで、宿主の抗腫瘍免疫反応を強力に賦活化させる方法が多く開発されてきたが、これらの方法のみでは満足

な治療成績は得られないことがわかり<sup>1-5)</sup>、より有効ながんの免疫療法の開発には、がんに対する免疫寛容状態の解除がもう一つの重要な要素であることが認識されている<sup>6)</sup>。

HVJ-E は、紫外線照射によりゲノムRNA を破壊し複製能力を失わせた不活化センダイウイルス粒子であり、今まで安全かつ高効率な遺伝子治療用ベクターとして開発されてきた<sup>7,8)</sup>。最近ではDNA のみならず、RNA、蛋白、薬物などを封入し、*in vitro* でも *in vivo* においても効率的に目的の細胞内に導入できることがわかり、新しいドラッグデリバリーシステムとして体系的に研究されている<sup>9,10)</sup>。HVJ-E のがん治療への応用としては、がんワクチンの試みや<sup>11,12)</sup>、薬剤耐性遺伝子のsiRNA やアドリマイシンなどの抗癌剤を封入し、これらを癌細胞に効率よく運び込み優れた治療効果を示すことが報告されている<sup>13)</sup>。

最近我々は、このHVJ-E 自体が、がん免疫療法剤として強い効力をもつことを発見した<sup>14)</sup>。ウイルスベクターを利用したがんの免疫治療の試みは、ポックスウイルス、アルファウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルスなど

## 連絡先

〒565-0871 吹田市山田丘2-2  
 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学  
 TEL : 06-6879-3901  
 FAX : 06-6879-3909  
 E-mail : kurooka@gts.med.osaka-u.ac.jp

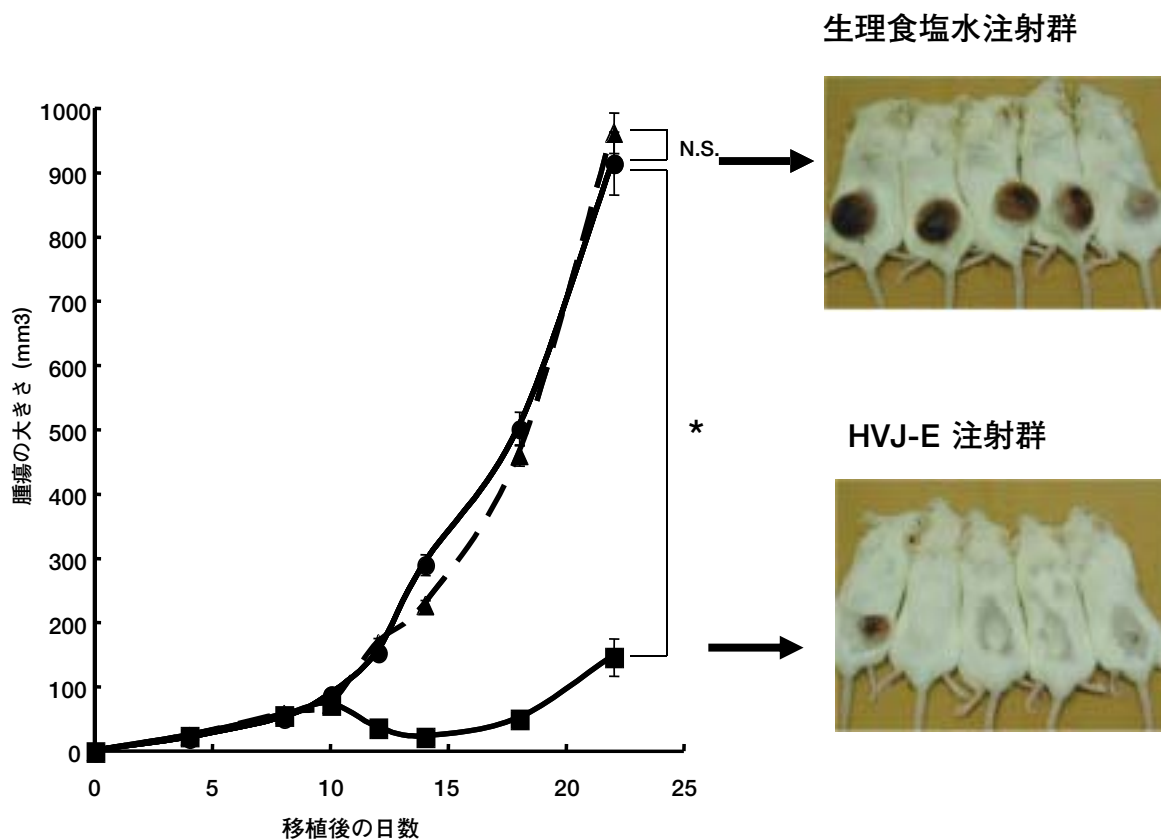


図1 HVJ-Eの腫瘍内投与による腫瘍の退縮と消失

CT26細胞を同系のBalb/cマウスの背中皮内に注射し、HVJ-Eまたは複製不能アデノウイルス(粒子数 $1.5 \times 10^{10}$ )を4日おきに3回、腫瘍内注射した(day 4, 8 and 12)。HVJ-Eを注射された腫瘍は完全に消失または著しく増殖を阻害され、アデノウイルスや生理食塩水を注射した群ではその効果は認められなかった。\* $p < 0.001$ 。■=HVJ-E, ▲=アデノウイルス, ●=生理食塩水。右側は腫瘍移植後3週間目のHVJ-E治療群と生理食塩水治療群の写真。HVJ-E治療群では5匹中3匹のマウスの腫瘍が完全消失している。

を用いた研究がなされているが、これらはウイルスベクターにB7.1などの副刺激因子やIL-2, GM-CSFなどのサイトカイン遺伝子を発現させて免疫刺激性を高める工夫をしたり<sup>15-19)</sup>、あるいは、腫瘍内でのみ選択的に複製する能力をもつ腫瘍溶解性のウイルスベクターを構築し、これに化学療法などの既存の治療法と組み合わせたりするものである<sup>20)</sup>。HVJ-Eのような複製能力を完全に失い、まったく外来遺伝子が組み込まれていないウイルス粒子そのものの抗がん効果について詳細に検討された研究は見当たらない。今回の我々の研究で、HVJ-Eが他の併用療法の助けを借りることもなく、単独で強力に腫瘍特異的な免疫反応を賦活し腫瘍を消失させる能力を持つことがわかった。しかも、その作用機序はユニークで、ただ単に獲得免疫系のエフェクター細胞を賦活させるだけでなく、制御性T細胞(Treg)による免疫抑制状態を解除させることにより抗腫瘍免疫反応をより強力に誘導させるという興味深い結果を得た。本稿では、このHVJ-Eによる抗腫瘍効果とその機序について紹介

し、今後のがん免疫療法剤としての展望を考察する。

### 1. HVJ-Eをマウス大腸癌に注射すると、獲得免疫系が活性化され、腫瘍が消失する。

マウス大腸癌細胞(CT26)を同系のBalb/cマウスに皮内移植し、腫瘍形成が確認された後、粒子数 $1.5 \times 10^{10}$ のHVJ-Eを4日おきに3回、腫瘍塊中に注射すると60%から80%の腫瘍が完全に消失し、残りの腫瘍も著しく増殖を抑制された。しかしこの効果は同粒子数の複製能力を欠損したアデノウイルスには認められなかった(図1)。このHVJ-Eによる抗腫瘍効果は、重度複合免疫不全(Scid)マウスに同腫瘍を移植して行くとほとんど認められなくなり<sup>14)</sup>、獲得免疫系の活性化により腫瘍が消失したものと推測された。すなわち、少なくともこの実験系では、HVJ-Eによる直接的な細胞傷害性や、NK細胞やマクロファージなどの自然免疫系による抗腫瘍効果が主力ではないことがわかった。さらに、HVJ-Eの腫瘍内注射により対側に皮内移植し

図 2a

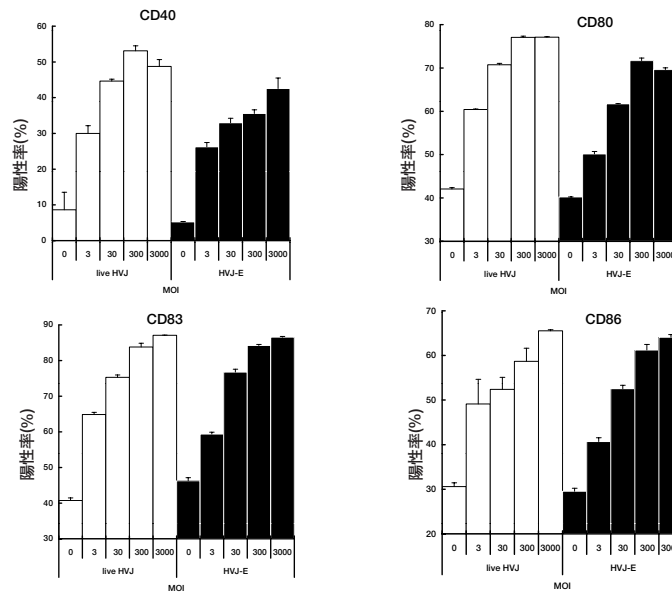


図 2b

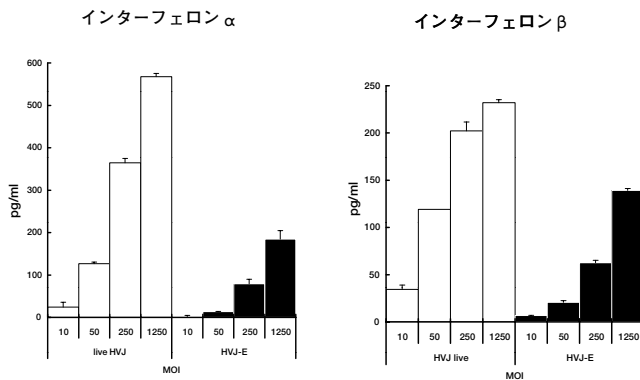


図 2c

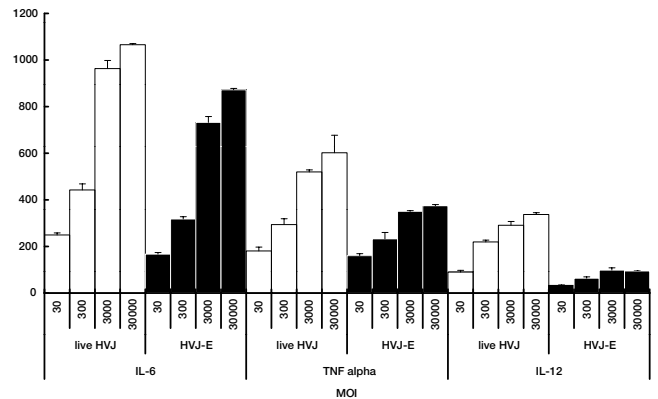


図 2 HVJ-E による樹状細胞の活性化様式

(a) HVJ-E または live HVJ による樹状細胞の成熟化. マウス骨髄由来の樹状細胞では, HVJ-E の刺激により live HVJ と同程度に CD40, CD80, CD83, CD86 などの成熟化マーカーの発現が上昇し, HVJ-E は live HVJ の樹状細胞成熟化能力を保持していることが確認された. (b,c) HVJ-E または live HVJ の刺激による樹状細胞からの代表的サイトカインの分泌. I 型インターフェロン (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) (b) や炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12) (c) の分泌は全体的に live HVJ に比べ HVJ-E 刺激で低いが, このなかで IL-6 分泌の減少程度は最小限であり, live HVJ と同程度に分泌させる能力を保持していると考えられた.

た同種の癌細胞の腫瘍形成性も 80% から 20% と有意に低下したことも, 免疫系を介した作用であることを裏付けるものであった<sup>14)</sup>.

## 2. HVJ-E は生きた HVJ (live HVJ) の樹状細胞を成熟化させる能力と IL-6 を分泌させる能力を保持する.

宿主がウイルスなどの病原体を認識し, 自然免疫や獲得免疫などの免疫反応を立ち上げる際に, 樹状細胞を代表とする抗原提示細胞による病原体の認識が極めて重要な最初のステップとなる<sup>21,22)</sup>. そこで, 我々は樹状細胞の活性化の指標である成熟化を示す細胞表面マーカーとサイトカイン

分泌が HVJ-E の刺激によりどのような変化をするかについて, 複製能力を持つ live HVJ と比較しながら検討した. HVJ-E あるいは live HVJ をマウス骨髄由来の樹状細胞の培養液に添加すると樹状細胞の CD40 や CD80 などの成熟化のマーカーの発現は, HVJ-E と live HVJ の用量依存的にはほぼ同等に上昇した (図 2a). これは, HVJ-E は live HVJ の樹状細胞成熟化能力を保持していることを意味する. 一方, HVJ-E 刺激による樹状細胞からのサイトカイン分泌を検討すると, 成熟化マーカーの動態とは異なり I 型インターフェロンや代表的な炎症性サイトカインのすべてにおいて live HVJ による刺激に比べ有意に減少した. これは,

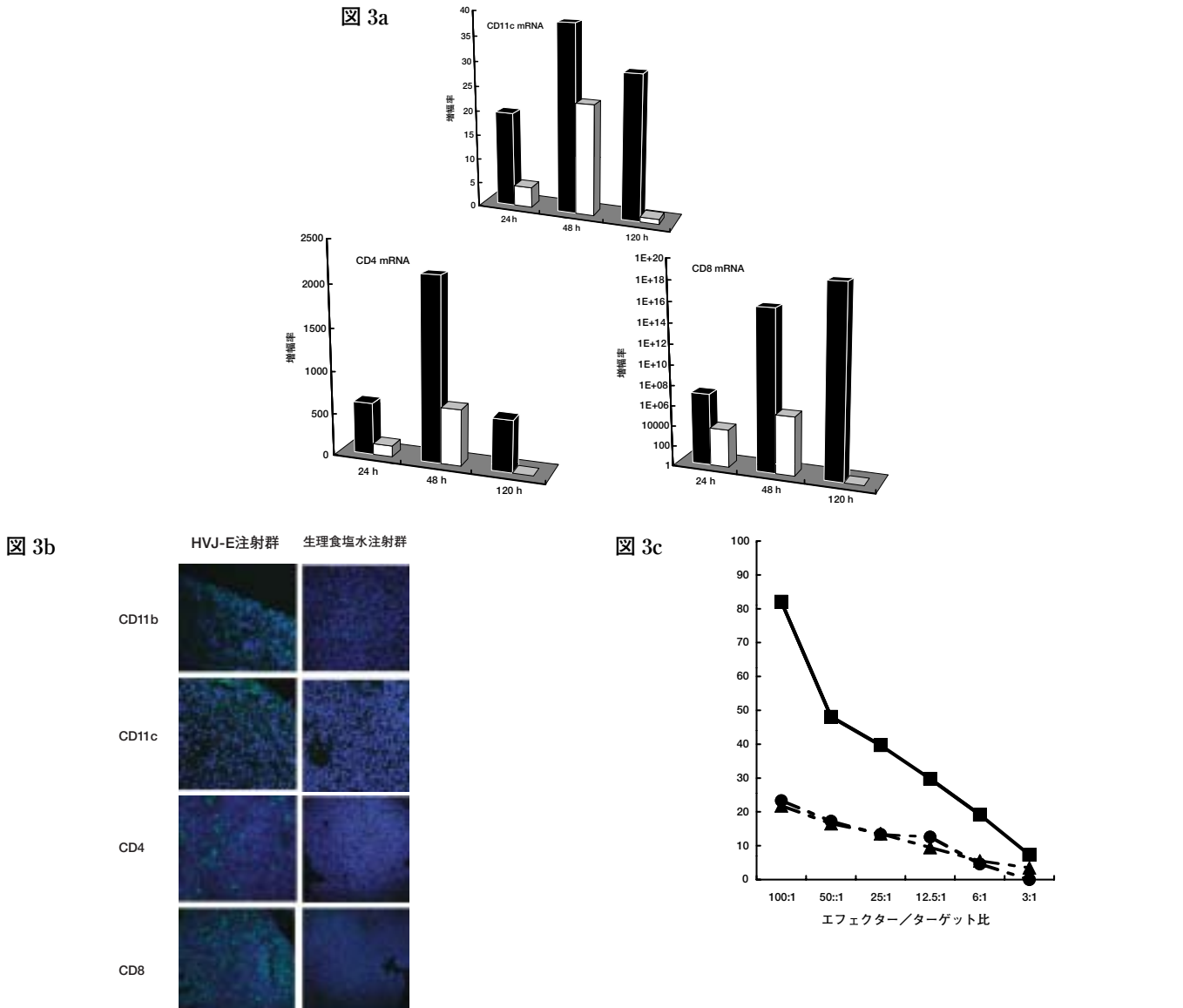


図 3 HVJ-E の腫瘍内注射は樹状細胞やエフェクター T 細胞の腫瘍内浸潤を促進し、腫瘍特異的 CTL を誘導する。(a) Real-Time PCR 法により定量された HVJ-E 注射 24,48,120 時間後の腫瘍内 mRNA 発現量。CD11c, CD4, CD8 はすべての時間において HVJ-E 治療群で有意に高かった。また、CD11c と CD4 では 48 時間後にピークを迎えるが、CD8 は 120 時間後もなお上昇を認めた。■ =HVJ-E, □ = 生理食塩水 (b) 腫瘍の免疫組織染色。HVJ-E 治療群と生理食塩水による対照群の CD11b, CD11c, CD4,CD8 陽性細胞の腫瘍内浸潤は HVJ-E 群で有意に高かった。(c)  $^{51}\text{Cr}$  遊離試験による CT26 を標的細胞とした CTL アッセイの結果にて、CT26 特異的な細胞傷害性が HVJ-E 治療群で確認された。■ =HVJ-E, ● = 生理食塩水, ▲ = ナイーブマウス。

成熟化とサイトカイン分泌の誘導経路の違いを示すものであるが、その中で、IL-6 に関しては、その減少程度が最も小さく、live HVJ と同程度の分泌量を維持していた (図 2b,c)。以上から、HVJ-E は、紫外線による不活化を受けても、樹状細胞を成熟化させることと IL-6 を分泌させる能力を保持していると考えられた。

### 3. HVJ-E は樹状細胞や T 細胞の腫瘍部位への遊走を促進し、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導する。

次に、生体内では、HVJ-E の投与によりどのように獲得免疫系が賦活されるかについて検討した。まず、樹状細胞のマーカーである CD11c, エフェクター T 細胞のマーカーの CD4, CD8 について、HVJ-E の注射後、腫瘍内での発現をリアルタイム RT-PCR 法により mRNA レベルを経時的

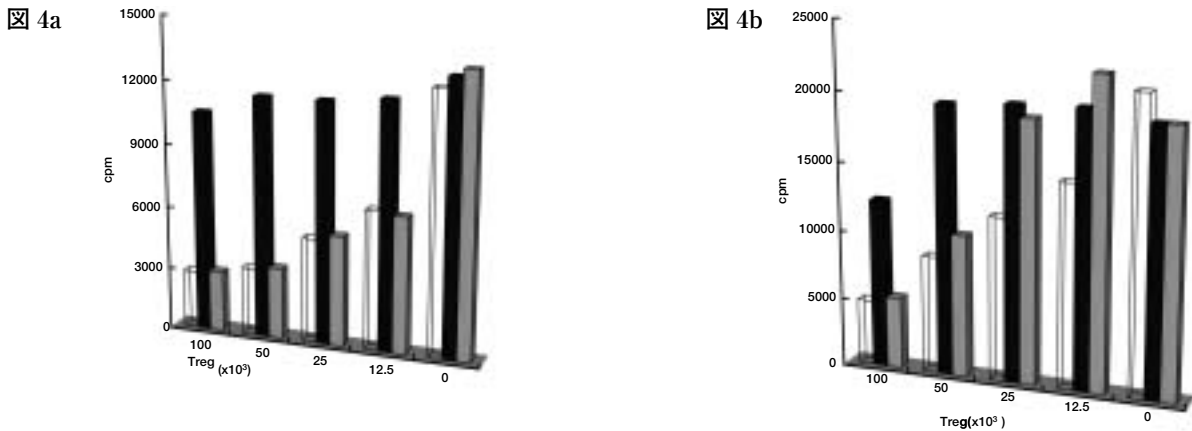


図 4 HVJ-E による制御性 T 細胞 (Treg) の抑制効果

(a) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> エフェクター T 細胞の増殖は Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg により抑制されるが(白色), リコンビナント IL-6 の添加によりこの Treg の抑制効果が解除される(黒色 = IL-6 添加). そして抗体により IL-6 を中和すると, この Treg 機能が回復する(灰色 = IL-6 + IL-6 中和抗体添加). (b) HVJ-E により刺激された樹状細胞の培養液(H-DCCM)は, 同様の Treg 抑制効果を有し, この効果は IL-6 中和抗体の添加により著しく減弱することから, H-DCCM 中の IL-6 が作用の中心であると考えられた. 白色 = H-DCCM 添加なし, 黒色 = H-DCCM 添加あり, 灰色 = H-DCCM+IL-6 中和抗体添加. Treg 数は 1x10<sup>5</sup> 個のエフェクター細胞と共培養した数を示す.

に定量し, これらの免疫細胞の腫瘍内浸潤程度を評価した. その結果, 対照群である生理食塩水投与群に比べ HVJ-E 投与群で, すべてのマーカーについて有意な発現の上昇を認めた. 経時的な変化では, CD11c と CD4 では, HVJ-E 投与後 48 時間でピークを示したが, CD8 は 120 時間を経ても増加傾向を示した (図 3a). さらに, 腫瘍組織の CD11b, CD11c, CD4, CD8 の免疫染色も行い, HVJ-E の注射によるこれらの免疫細胞の腫瘍内浸潤の促進が確認された (図 3b). 次に, この HVJ-E 治療により CT26 腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されたかについて検討した. 最後の HVJ-E 注射の 10 日後に脾細胞を回収し, 標的細胞と共培養の後, 標準的なクロム遊離試験により CTL の誘導を評価した. その結果, HVJ-E 治療群でのみ, CT26 細胞特異的な CTL が誘導されることが確認された (図 3c). さらに免疫学的に再構築した Scid マウスを用いた実験にて, Scid マウスに CD4<sup>+</sup> 細胞, CD8<sup>+</sup> 細胞の両方を移植した場合のみインターフェロン $\gamma$  を分泌する CD8<sup>+</sup> 細胞数の有意な増加を認め, この腫瘍特異的な CTL のエフェクター細胞は CD8<sup>+</sup> 細胞であり, その反応は CD4<sup>+</sup> 細胞依存的であることも確認された<sup>14)</sup>.

#### 4. HVJ-E は制御性 T 細胞のエフェクター T 細胞に対する抑制効果を解除する.

一方, 抗原提示細胞の成熟化だけが, エフェクター T 細胞の活性化に重要な機序ではなく, Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 制御性 T 細胞 (Treg) が, これを負に制御し免疫寛容状態に誘

導することがわかってきた<sup>23-26)</sup>. そして最近, 樹状細胞からの IL-6 分泌がこの Treg によるエフェクター T 細胞の抑制を解除させるのに重要であることが報告された<sup>27,28)</sup>. 上述のように HVJ-E は live HVJ の樹状細胞から IL-6 分泌を促す能力を保持していることがわかったので, HVJ-E が Treg による免疫反応の抑制を解除することができるか否かについて検討した. まず, *In vitro* にて, 樹状細胞と抗 CD3 抗体の存在下で Treg と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>のエフェクター T 細胞を種々の割合で混合培養すると, エフェクター T 細胞に対する Treg の比率が上がるに従って徐々に, エフェクター T 細胞の細胞分裂が阻害された. そして, この Treg による阻害作用は, リコンビナント IL-6 を培養液に加えることにより解除された. さらに IL-6 中和抗体を加えることにより, この IL-6 の作用は消失した (図 4a)<sup>27)</sup>. 次に我々は, HVJ-E によって刺激された樹状細胞の培養液 (H-DCCM) に Treg を抑制する作用があるか否かを確認するため, 同様の実験をリコンビナント IL-6 の代わりに H-DCCM を加えることによりおこなった. その結果, やはり, H-DCCM により, Treg による T 細胞分裂抑制作用が解除され, しかも IL-6 中和抗体を加えることにより, この H-DCCM の効果が消失した (図 4b). 以上の結果より H-DCCM 中の可溶性物質が Treg の作用を抑制する能力もち, IL-6 がその作用の中心であることがわかった. 次に, *In vivo* において HVJ-E 治療マウスの腫瘍中あるいは所属リンパ節中の樹状細胞から有意に IL-6 の分泌が亢進していることを確認し (図 5a), さらに, 所属リンパ節より採取した Treg と

図 5a

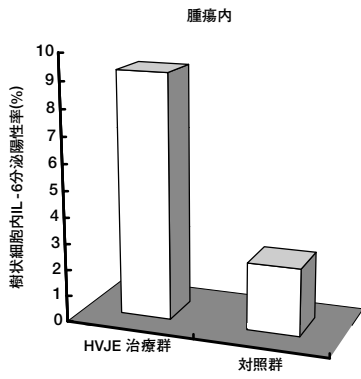


図 5b

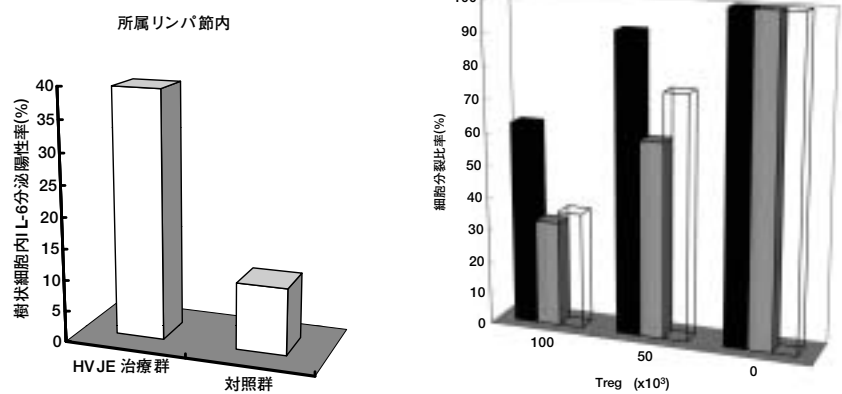


図 5 HVJ-E 投与により、生体内でも樹状細胞からの IL-6 分泌が促進され、Treg が抑制される。(a) HVJ-E の腫瘍内投与により、腫瘍内や所属リンパ節での IL-6 を分泌する樹状細胞の比率(%)が有意に上昇する。(b) HVJ-E の腫瘍内注射後、Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> エフェクター T 細胞を腫瘍所属リンパ節から分離して、*in vitro* と同様の試験を行った。その結果、*in vivo* においても HVJ-E 治療により Treg による免疫抑制効果は有意に減弱することが確認された。黒色 = HVJ-E 治療群、灰色 = 生理食塩水注射群、白色 = ナイーブマウス  
Treg 数は対エフェクター細胞 1x10<sup>5</sup> 個

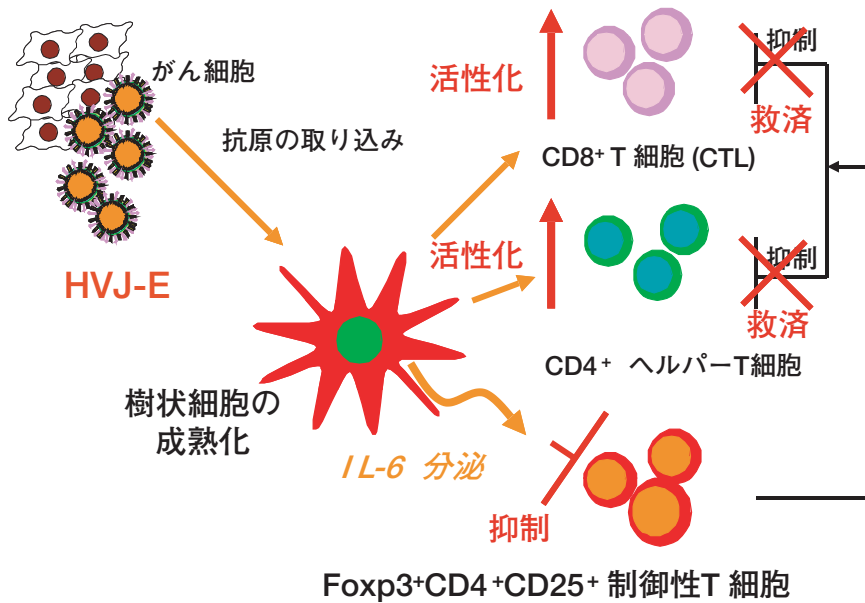


図 6 HVJ-E の獲得免疫系への作用機序

腫瘍内投与された HVJ-E は樹状細胞に働きかけ、その成熟化と IL-6 の分泌を特徴的に誘導し、CD4 陽性や CD8 陽性などのエフェクター T 細胞を活性化させると同時に Treg は抑制し、効率的に腫瘍特異的獲得免疫系を賦活化させる。

エフェクター T 細胞を上述の如く混合培養し、Treg のエフェクターに対する抑制効果を検証すると、HVJ-E 治療群において有意に Treg 作用の減弱が認められた(図 5b)。また、生体内における IL-6 の中和が HVJ-E の抗腫瘍効果を減弱させるか否かについて検討するため、IL-6 受容体抗体

を HVJ-E と同時に腫瘍内に注射し腫瘍の増殖曲線を比較した。その結果、IL-6 受容体抗体による生体内での IL-6 シグナルの阻害により、有意に HVJ-E の抗腫瘍効果が減弱した<sup>14)</sup>。以上の結果より、HVJ-E は Treg による抑制作用からエフェクター T 細胞を救済する能力をもつことが確認され、そ

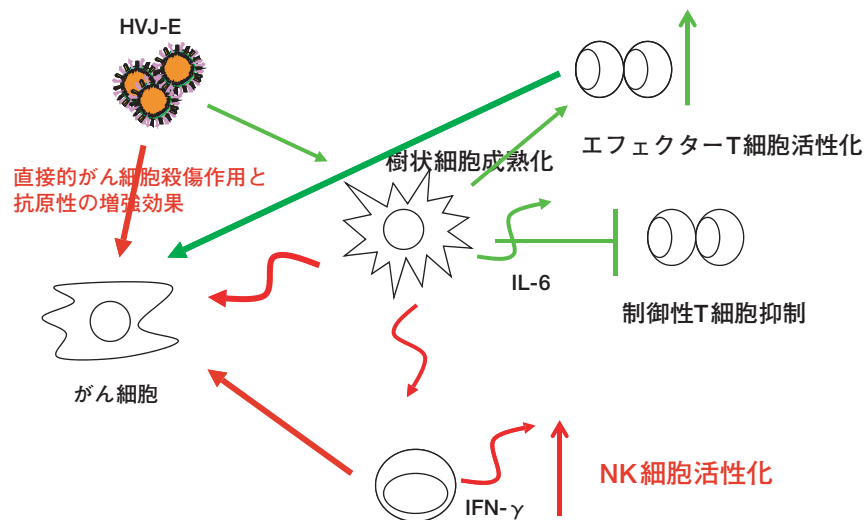


図7 HVJ-E の多岐にわたる抗腫瘍効果の可能性

上述の獲得免疫系への働きに加え、HVJ-E のがん細胞に対する直接的細胞傷害効果やNK細胞活性化などによる抗腫瘍効果も、がんの種類によっては有効に働く可能性があり、今後これらの作用機序に基づいた幅広い抗腫瘍効果が期待できる。

の機序としてHVJ-Eが腫瘍中や所属リンパ節中の樹状細胞より誘導したIL-6が大きな役割を担っていることがわかった。

### 考 察

HVJ-Eは紫外線照射によりゲノムRNAを破壊し、複製能力を失わせたセンダイウイルス粒子であり、安全で効率的な遺伝子治療用ベクターとして開発されてきたが<sup>7-13)</sup>、今回、我々はこのHVJ-Eのみを腫瘍に直接注射すると強力な腫瘍特異的獲得免疫が立ち上がり腫瘍を完全に消失させることを、HVJ-Eの新たな能力として発見した<sup>14)</sup>。限られた条件下のみでの比較であるが、同量の複製能力欠損アデノウイルスではこの抗腫瘍効果が認められなかったことより、センダイウイルス粒子に特徴的な性質である可能性が示唆される。そこでHVJ-Eの免疫学的な特徴を考察すると、たとえ紫外線によって不活化されても樹状細胞に対して生きたセンダイウイルスと同等の成熟化能力を有することと、さらに、サイトカイン分泌に関しては、他の代表的なサイトカインとは異なり、樹状細胞からIL-6を分泌させる能力を十分保持していることが挙げられる。前者の樹状細胞の成熟化能力の保持は、その後続く腫瘍特異的なCTLの誘導に非常に重要な能力である。しかし、最近このようなエフェクター細胞を誘導するのみでは、がんの免疫療法は有効に働かないことがわかってきている。HVJ-Eはさらに樹状細胞からIL-6を分泌させることにより、制御性T細胞の働きを抑制し、がんに対する免疫寛容の成立を阻

止すると考えられる。すなわち、抗腫瘍免疫の正方向の反応を促進し、負の方向を阻害することにより強力な効果を発揮する免疫療法剤であり、まさに理想的といえる(図6)。

今後は、このようなHVJ-Eの免疫学的な特徴をさらに詳しく分子レベルで解明することにも興味をもたれる。HVJ-Eはセンダイウイルスの粒子構造を完全に保持しており、F、HN、M蛋白などを含む粒子構造をとる<sup>8)</sup>。これらのどの部位がHVJ-Eの免疫刺激性に重要であるのか、またHVJ-Eの細胞融合能力と腫瘍特異的免疫反応の誘導がどのように関連するのかなどを解明していく必要がある。さらに、HVJ-Eの抗腫瘍効果の機序を考える際に、HVJ-Eによる直接的な癌細胞傷害効果やNK細胞など自然免疫系の活性化作用についても考えなければならない。今回の治療モデルに用いたマウス大腸癌(CT26)はHVJ-Eの直接作用に対して抵抗性であり<sup>13)</sup>、NK細胞にも低感受性であったが、がんの種類によっては、HVJ-Eによる直接効果にて高率に細胞死が誘導され、さらにHVJ-EによるNK細胞活性化で、NK感受性のがんに対して抗腫瘍効果を発揮することなどが、最近の我々のグループの研究でわかってきた。

以上のように、HVJ-Eは、がんに対する免疫寛容状態の成立を阻止しながら腫瘍特異的な獲得免疫系を立ち上げることに加え、直接的ながん細胞傷害作用やNK細胞活性化作用など多くの能力を駆使して、より幅広いがんの種類に対して有効に作用する可能性を秘めている(図7)。現在、我々のベンチャー企業にて臨床グレードのHVJ-Eの製造が可能であり<sup>29)</sup>、早期の臨床応用を期待されている。

## 文 献

- 1) Steinman RM, Mellman I. Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. *Science* 2004; 305(5681): 197-200.
- 2) Blattaman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004; 305(5681): 200-5.
- 3) Pawelec G. Immunotherapy and immunoselection-tumor escape as the final hurdle. *FEBS Lett* 2004; 567(1): 63-6.
- 4) Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53(10): 844-54.
- 5) Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the cause of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(3): 1178-83
- 6) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10(9): 909-15
- 7) Kaneda Y, Yamamoto S, Nakajima T. Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy. *Adv Genet* 2005; 53PA: 307-32
- 8) Kaneda Y. New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles. *Curr Drug Targets* 2003; 4(8): 599-602.
- 9) Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, et al. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol Ther* 2002; 6(2): 219-26.
- 10) Ito M, Yamamoto S, Nimura K, Hiraoka K, Tamai K, Kaneda Y. Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *J Gene Med* 2005; 7(8): 1044-52.
- 11) Yamano T, Kaneda Y, Huang S, Hiramatsu SH, Hoon DS. Enhancement of immunity by a DNA melanoma vaccine against TRP2 with CCL21 as an adjuvant. *Mol Ther* 2006; 13(1): 194-202.
- 12) Hiraoka K, Yamamoto S, Otsuru S, et al. Enhanced tumor-specific long-term immunity of Hemagglutinating Virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG Oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2004; 173(7): 4297-307.
- 13) Mima H, Yamamoto S, Ito M, et al. Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(4): 1021-8.
- 14) Kurooka M and Kaneda Y. Inactivated Sendai Virus Particles Eradicate Tumors by Inducing Immune Responses through Blocking Regulatory T Cells. *Cancer Res* 2007; 67(1): 227-36.
- 15) Worgall S, Busch A, Rivara M, et al. Modification to Capsid of the Adenovirus vector that enhances dendritic cell infection and transgene-specific cellular immune responses. *J Virol* 2004; 78(5): 2572-80.
- 16) Kaufman HL, DeRaffele G, Mitcham J, et al. Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma. *J Clin Invest* 2005; 115(7): 1903-12.
- 17) Bristol JA, Zhu M, Ji H, et al. In vitro and in vivo activities of an oncolytic adenoviral vector designed to express GM-CSF. *Mol Ther* 2003; 7(6): 755-64.
- 18) Dasgupta S, Bhattacharya-Chatterjee M, O'Malley BW Jr, et al. Recombinant vaccinia virus expressing interleukin-2 invokes anti-tumor cellular immunity in an orthotopic murine model of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther* 2006; 13(1): 183-93.
- 19) Leitner WW, Hwang LN, deVeer MJ, et al. Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med* 2003; 9(1): 33-9.
- 20) Lu W, Zheng S, Li XF, Huang JJ, Zheng X, Li Z. Intratumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: A pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol* 2004; 10(24): 3634-38.
- 21) Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7): 499-511.
- 22) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-strand RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5(7): 730-7.
- 23) Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2(9): 816-22.
- 24) Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001; 167(3): 1137-40.
- 25) Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 345-52.
- 26) Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 423-49.
- 27) Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent Blockade of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299(5609): 1033-6.
- 28) Doganci A, Eigenbrod T, Krung N, et al. The IL-6R alpha chain controls lung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 2005; 115(5): 313-25.
- 29) Kaneda Y, Yamamoto S, Nakajima T. Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy. In: Huang L, Hung MC, Wagner E, editors. *Non-viral vectors for gene therapy*. London: Elsevier Academic Press; 2005. p.307-32.



# Anticancer Immunotherapy using Inactivated Sendai Virus Particles

Masayuki KUROOKA, Yasufumi KANEDA

Ultraviolet-inactivated, replication-defective Sendai virus particles (Hemagglutinating virus of Japan envelope, HVJ-E) injected into murine colon carcinoma (CT26) tumors growing in syngeneic Balb/c mice eradicated 60-80% of the tumors and obviously inhibited the growth of the remainder. Induced adaptive anti-tumor immune responses were dominant in the tumor eradication process because the effect was abrogated in severe combined immunodeficient (SCID) mice. Murine and human dendritic cells (DCs) underwent dose-dependent maturation by HVJ-E *in vitro*. Profiles of cytokines secreted by DCs after HVJ-E stimulation showed that the amount of IL-6 released was comparable to that elicited by live HVJ. Real-time RT-PCR and immunohistochemistry revealed that HVJ-E induced a remarkable infiltration of DCs, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells into tumors and CT26 specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) were induced. On the other hand, conditioned medium from DCs stimulated by HVJ-E (H-DCCM) rescued CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell proliferation from Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell (Treg) mediated suppression and IL-6 was presumably dominant for this phenomenon. We also confirmed such rescue in mice treated with HVJ-E *in vivo*. Moreover, anti-tumor effect of HVJ-E was significantly reduced by an *in vivo* blockade of IL-6 signaling. Depending on cancer cell types, it is also expected that HVJ-E eradicates tumor by its direct cytotoxicity against cancer cells or activating NK cells. Because it can enhance anti-tumor immunity and simultaneously remove Treg mediated suppression, HVJ-E shows promise as a novel therapeutic for cancer immunotherapy.

