

УДК 571.27;61:578.7; 616:612.017.1; 616-006

Механизмы онколитического действия парамиксовируса Сендай

О. В. Матвеева^{1*}, Г. В. Кочнева², С. В. Нетесов³, С. Б. Оникиенко⁴, П. М. Чумаков⁵¹Biopolymer Design, 23, Nylander Way, Acton, Massachusetts, United States²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Россия, р.п. Кольцово Новосибирской обл.³Новосибирский государственный университет, 630090, Россия, Новосибирск, ул. Пирогова, 2⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, кафедра военно-полевой терапии, 194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Боткинская, 17⁵Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32

*E-mail: olga.matveeva@gmail.com

Поступила в редакцию 22.10.2014

После доработки 09.02.2015

РЕФЕРАТ Некоторые представители парамиксовирусов обладают онколитической активностью и могут использоваться в качестве противоопухолевых агентов. Такие парамиксовирусы включают непатогенные (аттенуированные) штаммы вирусов кори, вируса болезни Ньюкасла и вируса Сендай. Все эти вирусы и вирус Сендай, в частности, способны вызывать в большой степени специфическую гибель именно злокачественных, но не нормальных клеток. Гибель злокачественных клеток происходит за счет прямого цитолитического действия вируса, а также как следствие активации противоопухолевого иммунитета. Преимущественное взаимодействие парамиксовирусов со злокачественными клетками происходит за счет того, что эти клетки в избытке продуцируют некоторые гликопротеины, способные служить рецепторами для онколитических парамиксовирусов. Кроме того, частые генетические дефекты раковых клеток в системе интерферонного и апоптозного ответов создают благоприятные условия для репликации вируса именно в злокачественных клетках. Парамиксовирусы могут усиливать образование многоядерных клеточных конгломератов (синцитиев), что ускоряет вовлечение новых клеток в инфекционный процесс внутри опухоли и позволяет вирусу ускользать от нейтрализующего воздействия антител. Все эти факторы способствуют эффективному внутриопухолевому распространению вирусной инфекции и массовой гибели злокачественных клеток. Кроме того, онколитические парамиксовирусы способны вызывать иммуноопосредованную гибель злокачественных клеток. Они действуют как мощные индукторы интерферона и других цитокинов, стимулирующих противоопухолевую активность различных клеточных компонентов иммунного ответа, таких, как дендритные клетки, натуральные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты. Обнадёживающие результаты, полученные в различных исследованиях, проводимых с онколитическими парамиксовирусами, можно объяснить действием указанных механизмов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вакцинные штаммы вируса кори, вирус болезни Ньюкасла, вирус Сендай, онколитические парамиксовирусы, противоопухолевый механизм, противоопухолевый иммунитет, терапия рака.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВБН – вирус болезни Ньюкасла; ГКГС – главный комплекс гистосовместимости; ГН – гемагглютинин-нейраминидаза; ДК – дендритные клетки; ИФН – интерферон; ЛПКЧ – лейкоциты периферической крови человека; НА – нейраминидаза; НК – натуральные киллеры; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты; УФ – ультрафиолет.

ВВЕДЕНИЕ

Существующие методы терапии метастатического рака достаточно часто неэффективны, следовательно, необходима разработка новых противоопухолевых средств и новых методов уничтожения опухолевых клеток. Идея применения ви-

русов при злокачественных заболеваниях не нова. Ее возникновение относят к началу XX века, когда было замечено, что после вирусного заболевания или вакцинации живыми вирусами у некоторых пациентов происходит спонтанная регрессия опухоли. В 50-е годы появились первые обзорные работы, в которых

обсуждается эта проблема [1–3]. Позднее вирусы, способные специфично разрушать злокачественные клетки и оставлять невредимыми нормальные, стали называть онколитическими. Специфическое разрушение злокачественных клеток определяется избирательной репликацией вируса в этих клетках и активацией под действием вирусной инфекции противоопухолевого иммунитета.

Онколитические эффекты свойственны разнообразным вирусам, геномы которых представлены молекулами как ДНК, так и РНК. Геномная ДНК таких вирусов может быть одноцепочечной, например у парвовирусов [4], или двухцепочечной, как у онколитических аденовирусов [5] и поксвирусов [6]. Геномная РНК онколитических вирусов тоже может быть представлена разными формами: плюс-РНК-цепью у энтеровирусов [7], двумя цепями – у реовирусов [8], минус-РНК-цепью – у парамиксовирусов и рабовирусов [9].

В качестве потенциальных противоопухолевых агентов были изучены некоторые представители семейства Paramyxoviridae – ряд аттенуированных вакцинных штаммов вируса кори [10], различные непатогенные для человека вирусы животных, такие, как вирус болезни Ньюкасла [11–13] и вирус Сендай, которому посвящен этот обзор.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА СЕНДАЙ

Изучение вируса Сендай и его онколитических свойств

Противоопухолевые свойства вируса Сендай, также известного как вирус парагриппа мышей типа 1, или гемагглютинирующий японский вирус, изучают в основном на протяжении последних 10 лет. Этот парамиксовирус принадлежит к роду *Respirovirus* семейства Paramyxoviridae. На рис. 1 показано филогенетическое дерево семейства Paramyxoviridae (А), строение вириона (Б) и строение генома (В) вируса Сендай. Геном вируса Сендай представлен минус-РНК длиной 15,3 т.н. и содержит шесть генов, кодирующих белки. Из них два гена кодируют поверхностные гликопротеины HN и F, три – нуклеокапсидные белки NP, Р и L, один – негликозилированный внутренний матриксный белок М. Отличительное свойство парамиксовирусов – присутствие белка F, который способствует слиянию мембран при нейтральных значениях pH. Белок F синтезируется в виде неактивного предшественника, белка F0, впоследствии расщепляемого клеточными протеазами на две субъединицы, F1 и F2, которые остаются связанными друг с другом дисульфидными мостиками [14].

За созревание вируса в природных условиях ответственна, вероятно, аргининспецифичная сериновая протеаза Клара «Clara» [15–17]. Возможность процессинга белка F0 определяет тропизм парамиксовирусов к разным типам тканей [18]. Без протеолитической активации F0 образуются только неактивные вирусные частицы-предшественники [19]. При наработке вируса Сендай в культуре клеток, которые не вырабатывают нужную для активации протеазу, этот фермент (например, трипсин) необходимо специально добавлять во внеклеточную среду.

Вирус Сендай вызывает легко передающуюся инфекцию дыхательных путей у мышей, хомяков, морских свинок, крыс и иногда у свиней [20]. Вирус Сендай способен распространяться как воздушно-капельным путем, так и при непосредственном контакте. Его можно обнаружить в колониях мышей по всему миру, но считается, что он совершенно безопасен для людей [20]. В США вирус Сендай одобрен для проведения клинических испытаний, направленных на поиск способов иммунизации против заболеваний, вызываемых вирусом парагриппа типа 1, у детей. При проведении этой работы исходили из того, что вирус Сендай и вирус парагриппа 1 вызывают индукцию перекрестно реагирующих антител. Оказалось, что интраназальное введение вируса Сендай хорошо переносится и вызывает появление антител, способных нейтрализовать вирус парагриппа 1 [21]. Эта работа важна как доказательство безопасности вируса Сендай для людей.

Ряд работ, проведенных в Японии, показал, что ослабленный генно-инженерными методами непатогенный для грызунов вирус может интенсивно распространяться в опухолевых клетках и уничтожать их, не затрагивая окружающие нормальные клетки. Такое действие вируса часто приводит к подавлению роста опухолей у мышей. Список протестированных ксенотрансплантационных моделей опухолей человека включает клетки фибросаркомы, панкреатической эпителиоидной карциномы и рака толстой кишки [22]. Применение рекомбинантного вируса Сендай приводило к существенному подавлению роста опухоли в мышечных моделях и даже полному рассасыванию сформировавшихся опухолей мозга [23]. Сходные результаты получены при ксенотрансплантации мышам клеток саркомы и рака предстательной железы человека [24, 25]. На крысиных ксенотрансплантационных моделях установлено, что рекомбинантный вирус Сендай с высокой эффективностью уничтожает меланому, гепатоцеллюлярный рак, нейробластому, плоскоклеточный рак и рак предстательной железы человека [26]. На сингенных мышках показано, что препараты вируса Сендай

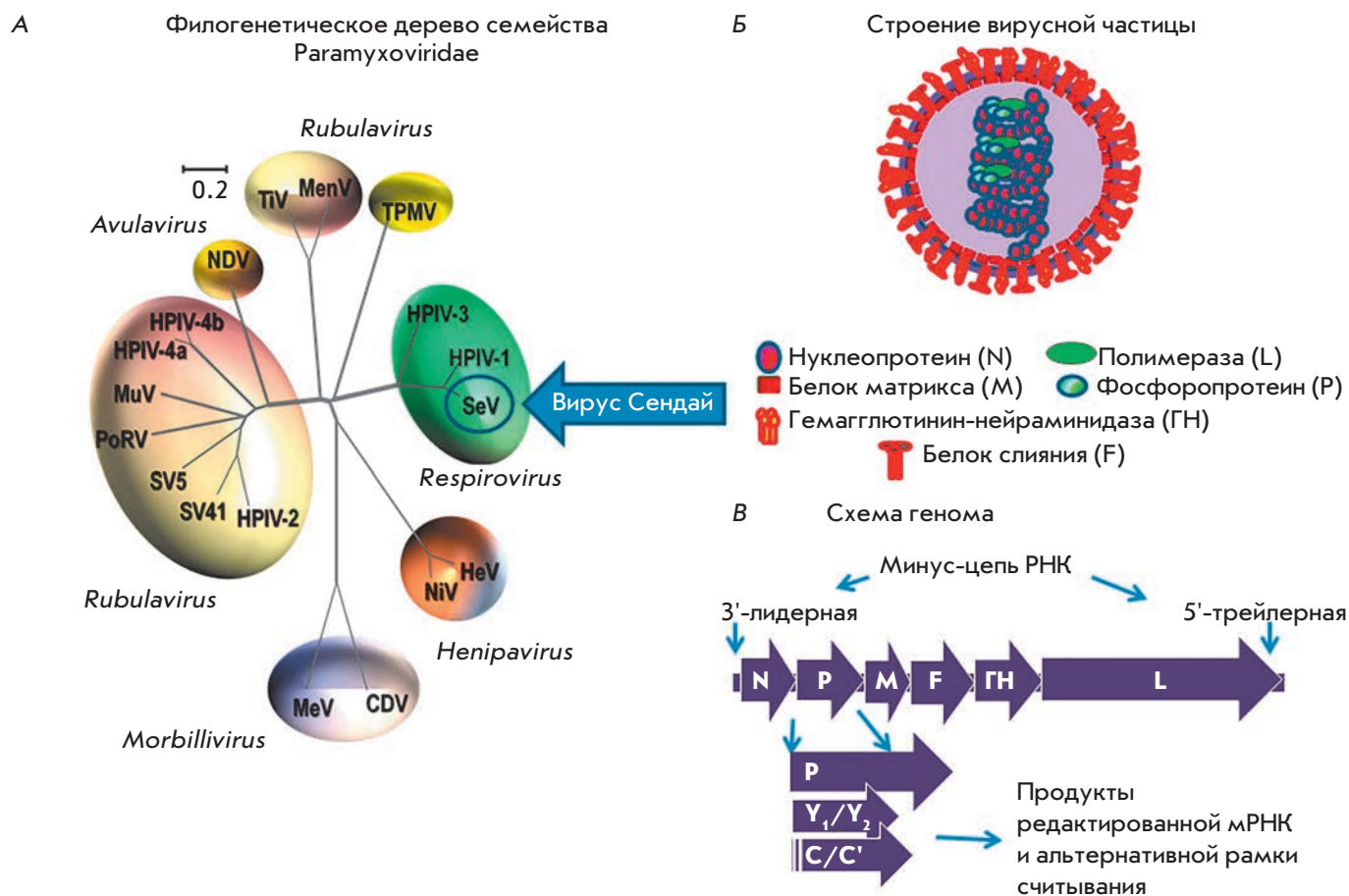


Рис. 1. Вирус Сендай: его филогенетическое дерево, схемы строения вирусной частицы и генома. А – расположение вируса Сендай на филогенетическом дереве семейства Paramyxoviridae. Дерево было построено на основе нуклеотидных последовательностей гемагглютинин-нейраминидазы с помощью множественного выравнивания программой Clustal W и метода попарного сравнительного соединения. Вирусы сгруппированы по родам и их названия сокращены следующим образом. Род *Morbillivirus*: MeV (вирус кори), CDV (вирус собачьей чумки (или чумы плотоядных)); род *Henipavirus*: HeV (вирус Хендра), NiV (вирус Нипах); род *Respirovirus*: SeV (вирус Сендай), HPIV-3 (вирус парагриппа человека типа 3), HPIV-1 (вирус парагриппа человека типа 1); род *Avulavirus*: NDV (вирус болезни Ньюкасла); род *Rubulavirus*: HPIV-2 (вирус парагриппа человека типа 2), HPIV-4a (вирус парагриппа человека типа 4a), HPIV-4b (вирус парагриппа человека типа 4b), MuV (вирус эпидемического паротита), PoRV (свиной рубуловироз), SV5 (вирус обезьян SV5), SV41 (вирус обезьян SV41); TiV (вирус Тиоман); MenV (вирус Менангле). Неклассифицированные вирусы: TPMV (парамиксовирус тупайи). Б – схема вирусной частицы; В – схема генома вируса Сендай

даже после их инактивации ультрафиолетом (УФ) эффективны против рака толстой кишки [27, 28], мочевого пузыря [29] и почки [30]. Эффективность УФ-инактивированного вируса Сендай показана также на мышинных ксенографтах рака предстательной железы человека [31]. Во всех этих исследованиях терапия с применением вируса Сендай приводила к полной регрессии опухолей или к серьезному подавлению их роста.

Кратковременная ремиссия после внутривенной инъекции живого вируса Сендай описана у больного острым лейкозом в США еще в 1964 году [32].

Изучение онколитических свойств вируса Сендай в России

В середине 50-х годов академик АМН В.М. Жданов получил из Японии штамм вируса Сендай, который в дальнейшем использовали в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского в качестве модельного. В конце 60-х годов из лаборатории В.М. Жданова этот штамм был передан В.М. Сенину (РОИЦ РАМН) и в дальнейшем прошел примерно 30 пассажей на куриных эмбрионах. Отсутствие патогенности вируса Сендай для человека делало его перспективным потенциальным терапевтическим средством, эффек-

тивным при злокачественных заболеваниях. В начале и середине 90-х под руководством В.М. Сенина этот штамм вируса Сендай испытывали в клиниках Москвы и Санкт-Петербурга на добровольцах – больных разнообразными злокачественными заболеваниями третьей и четвертой стадии. Хотя у части больных улучшение состояния было кратковременным или не наблюдалось вовсе, у другой части больных наблюдались длительные ремиссии, даже когда опухоли были признаны неоперабельными, и вирус использовали в качестве монотерапии. В этих случаях отмечено рассасывание первичных опухолей и метастазов, исчезали все объективные и субъективные признаки онкологического заболевания. Иногда признаки заболевания отсутствовали и спустя 5–10 и более лет после одного или двух курсов терапии вирусом Сендай. Краткие истории болезни этих больных приведены в тексте патента [33, 34]. В качестве побочных явлений отмечали лишь кратковременный подъем температуры в первые сутки после введения вируса.

Штамм вируса Сендай, использованный в этих испытаниях, был депонирован в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под номерами РТА-13024 и РТА-121432. Препарат под номером РТА-13024 содержит вирус в замороженной аллантоисной жидкости, а препарат под номером РТА-121432 содержит вирус в лиофилизированной форме. Первичная нуклеотидная последовательность этого вирусного штамма была депонирована в базу данных GenBank под номером KP717417.1.

МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПАРАМИКСОВИРУСОВ

Прямое уничтожение злокачественных клеток

Предпочтительная высокая аффинность парамиксовирусов в отношении злокачественных, а не нормальных клеток. Полимеры сиаловых кислот служат клеточными рецепторами для некоторых парамиксовирусов [35, 36]. Поскольку любой вирус связывается со своими рецепторами с высокой аффинностью, большое количество сиаловых кислот на поверхности опухолевых клеток способствует предпочтительной ассоциации вируса со злокачественной, а не с нормальной клеткой, что приводит к более высокой концентрации вирусов в опухолях и метастазах по сравнению с нормальными тканями. Рис. 2 иллюстрирует такое предпочтительное связывание вируса Сендай с раковыми клетками.

В настоящее время показано, что жизнеспособность клеток рака предстательной железы человека, РС3 и DU145, существенно подавляется УФ-

инактивированным вирусом Сендай. Апоптоз клеток РС3 наблюдается через 24 ч после обработки вирусом Сендай, при этом отсутствует подавление роста нормального эпителия предстательной железы [31]. Результаты этой работы, по мнению авторов, подтверждают, что чувствительность опухолевых клеток предстательной железы к вирусу Сендай в значительной степени обусловлена присутствием на поверхности этих клеток большого количества вирусных рецепторов, содержащих сиаловую кислоту, и, следовательно, его большей аффинностью к этим клеткам.

Инфицирование клеток вирусом Сендай может происходить по альтернативному пути без участия сиаловой кислоты [37]. Белок F в этом случае может прикрепляться к гепатоцитоспецифичному асиалогликопротеиновому рецептору (hepatocyte-specific asialoglycoprotein receptor, ASGR). Однако механизмы такого пути, а также их возможная взаимосвязь с онколитическим потенциалом вируса еще не изучены.

Повреждение интерфероновой и апоптозной систем клеток. Хорошо известно, что в опухолевых клетках по мере прогрессии накапливаются мутации и другие генетические изменения, способствующие повреждению интерфероновой системы [38, 39]. Кроме того, процесс малигнизации приводит к разбалансировке клеточной системы, ответственной за апоптоз [39, 40]. В результате опухолевые клетки теряют способность индуцировать синтез интерферона, приобретают невосприимчивость к вирусной инфекции и реагировать на антипролиферативное действие интерферона. Они также теряют способность переходить к апоптозу, несмотря на получаемые сигналы. Эти нарушения ведут к прогрессии опухоли и ее росту.

Те же самые нарушения, которые способствуют росту опухоли, вирусы могут использовать для собственной репликации, что приводит к более масштабной гибели злокачественных клеток по сравнению с нормальными клетками. Рис. 2 иллюстрирует различия между злокачественными и нормальными клетками, приводящие к тому, что инфекция злокачественных клеток становится более вероятной и эффективной, способной приводить к иммуногенной смерти злокачественных клеток и дальнейшему распространению вируса внутри опухоли.

Образование синцития из злокачественных клеток. Некоторые представители парамиксовирусов выработали механизм распространения инфекции, который включает слияние инфицированных и неинфицированных клеток. Такое слияние приводит к образованию синцития, представляющего собой круп-

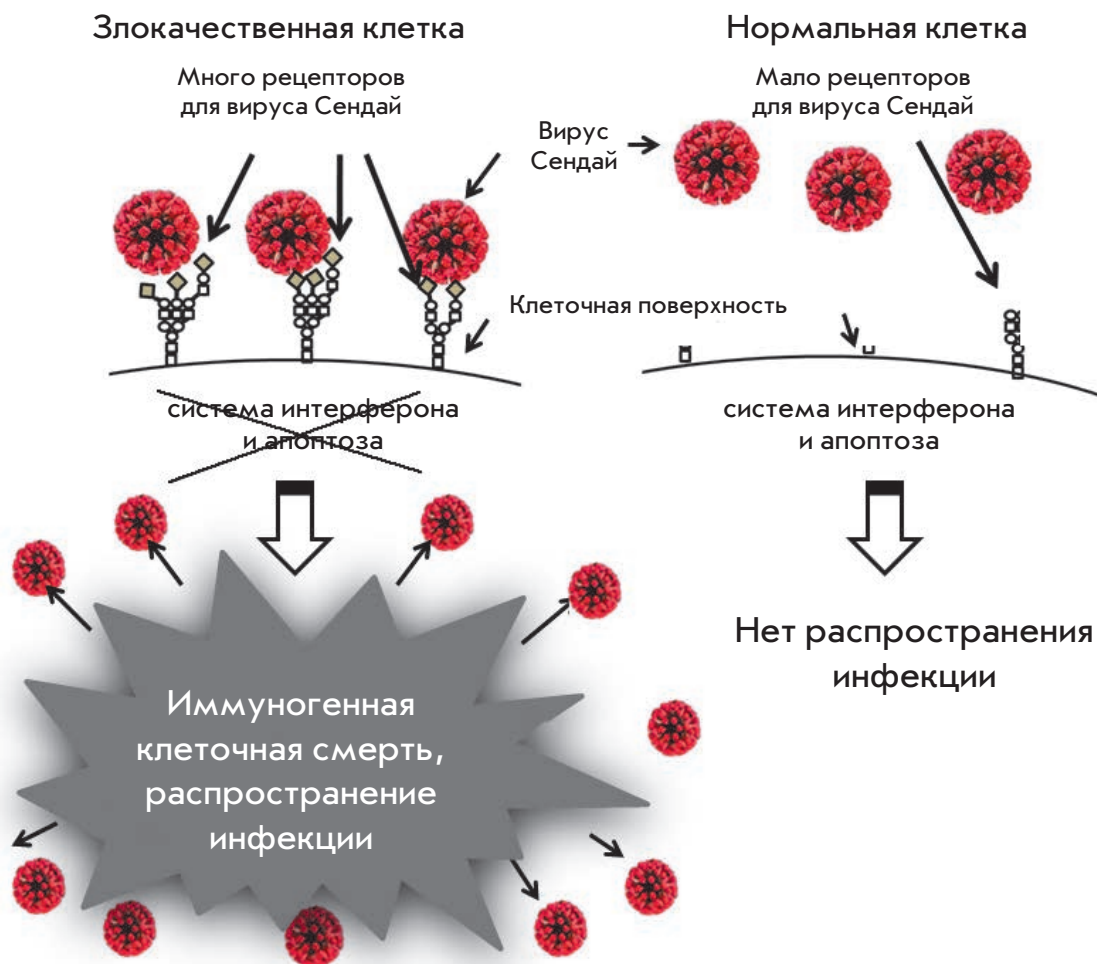


Рис. 2. Сравнение способности злокачественных и нормальных клеток взаимодействовать с вирусом Сендай и распространять инфекцию. Раковые клетки лучше взаимодействуют с вирусом, поскольку у них часто повышен уровень экспрессии сиалосодержащих гликопротеинов, которые могут служить рецепторами для вируса Сендай. Кроме того, во время процесса малигнизации раковая клетка накапливает множество генетических изменений. В такой клетке часто нарушается интерфероновый и апоптозный ответ на различные сигналы организма, в том числе и на вирусную инфекцию. Это нарушение делает возможным заражение раковых клеток вирусом, его репликацию, производство новых инфекционных частиц и распространение вирусной инфекции внутри опухоли

ную многоядерную структуру. Инфицированные клетки могут сливаться и образовывать синцитий с 50–100 соседними клетками [41]. Инфицирование новых клеток-хозяев путем их слияния делает возможным распространение вирусной инфекции без высвобождения вируса из клеток. Следовательно, способность образовывать синцитий представляет собой одну из используемых вирусом стратегий ускользания от воздействия нейтрализующих антител хозяина, которые могли бы его инактивировать. Рис. 3 иллюстрирует образование синцития, провоцируемое вирусом Сендай. В системе *in vivo* синцитий обычно существует не более 4–5 дней, после чего погибает.

Существует предположение, что способность некоторых вирусов индуцировать образование синцития и их онколитический потенциал взаимосвязаны. В поддержку этой гипотезы свидетельствует тот факт, что с помощью генной инженерии гены, которые кодируют белки слияния, необходимые для образования синцития, можно перенести из вируса одного типа в другой. Показано, что такой перенос придает онколитический потенциал вирусам, которые до этого им не обладали [42, 43]. Этот потенциал можно дополнительно повысить с помощью аминокислотных замен, приводящих к созданию белков с увеличенной способностью вызывать слияние клеток [44, 45]. Вызывать существенную регрессию опу-

холей способны даже плазмиды [46–48], кодирующие мембранные гликопротеины со сходной функцией.

Уничтожение злокачественных клеток посредством специфического противоопухолевого иммунитета

Нейраминидаза (НА) парамиксовирусов удаляет сиаловые кислоты с поверхности злокачественных клеток. Известно, что повышенный уровень сиалирования клеточных мембран связан с процессом малигнизации: с инвазивным и метастатическим потенциалом клеток [49–54]. Установлено, что использование некоторых ингибиторов сиалирования позволяет снизить злокачественность раковых клеток [55–57].

Возможно, дополнительное сиалирование как механизм, способствующий избеганию злокачественными клетками иммунологического надзора организма хозяина, возникло путем модификации клеточной поверхности с образованием более толстой «оболочки», которая скрывает онкомаркеры. Десиалирование опухолевых клеток снижает их потенциал роста, делая их доступными для воздействия натуральных киллерных клеток (НК). Более того, обработанные сиалидазой опухолевые клетки лучше активируют секрецию интерферона- γ НК-клетками. Показано, что активность и цитотоксичность НК-клеток зависит от экспрессии сиаловых кислот, специфичных для поверхности опухолевых клеток [58].

Гемагглютинин-нейраминидаза (ГН) – это белок, способный вызывать гемагглютинацию и обладающий ферментативной активностью. Нейраминидаза (НА) – часть молекулы ГН – является ферментом (сиалидазой), который отщепляет сиаловые кислоты с поверхности клеток [35, 36]. НА кодируется и синтезируется некоторыми представителями онколитических парамиксовирусов: вирусом болезни Ньюкасла, вирусом Сендай и вирусом эпидемического паротита. НА распознает на поверхности клетки рецепторы – полимеры сиаловых кислот [36]. НА также способствует слиянию клеток, что помогает образующимся вирионам распространяться внутри ткани, избегая взаимодействия с антителами хозяина.

Удаление сиаловых кислот может приводить к существенному изменению способности клеток В-лимфомы стимулировать цитолитические Т-лимфоциты. В эксперименте с тремя различными типами сиалидаз, одна из которых НА вируса болезни Ньюкасла [59], установлено, что этот фермент может расщеплять 2,3-, 2,6- [60] и 2,8-связи между остатками сиаловой кислоты [61]. Показано также, что в системе *in vitro* отсутствуют суще-

ственные различия в специфичности по отношению к расщепляемому субстрату между вирусами болезни Ньюкасла, Сендай и эпидемического паротита [62]. Данные наблюдения позволяют предположить, что злокачественные клетки становятся десиалированными после обработки опухоли вирусом, и этот процесс вносит вклад в усиление противоопухолевого иммунного надзора. Рис. 4 иллюстрирует возможность удаления остатков сиаловой кислоты с поверхности злокачественной клетки сиалидазой вируса Сендай, что приводит к выявлению раковых антигенов, которые становятся доступными для распознавания цитотоксическими лимфоцитами.

Стимуляция продукции интерферонов (ИФН) типа I и II. В лейкоцитах периферической крови человека (ЛПКЧ) вирус Сендай действует как сильный стимулятор продукции интерферона α (ИФН- α) [63]. Вирус индуцирует секрецию по меньшей мере девяти различных видов ИФН- α : 1a, 2b, 4b, 7a, 8b, 10a, 14c, 17b и 21b. Основным среди них ИФН- α 1a, который составляет примерно 30% суммарного лейкоцитарного ИФН- α [64]. Вирус Сендай также способен стимулировать в ЛПКЧ продукцию ИФН- γ [65], поэтому он был выбран среди множества других вирусов для получения ИФН из лейкоцитов человека в промышленном масштабе [66].

УФ-инактивированный вирус Сендай может индуцировать секрецию ИФН- α и ИФН- β в некоторых линиях опухолевых клеток [31]. Инактивированный вирус индуцирует секрецию ИФН типа I дендритными клетками мыши. Эта индукция не зависит от слияния клеток, однако, по-видимому, за этот эффект отвечает белок слияния F [67].

В настоящее время известно, что стимуляция синтеза интерферонов способствует онколитическому иммунному надзору несколькими способами. Интерфероны типа I и ИФН- γ существенно повышают уровень представленности антигенов, зависящих от главного комплекса гистосовместимости типа I (ГКГС I). ИФН- γ значительно активирует ГКГС II-зависимое представление антигенов. Оба эти процесса повышают представленность специфичных для опухоли антигенов злокачественными и специальными антигенпредставляющими клетками, что ведет к стимулированию пролиферации и активности противоопухолевых цитотоксических Т-клеток. Интерфероны также способны подавлять ангиогенез, нивелируя ангиогенные стимулы, поступающие от опухолевых клеток, и подавляя размножение эндотелиальных клеток. Это подавление коррелирует с пониженной васкуляризацией опухоли и последующим замедлением ее роста (см. обзоры [68–70]).

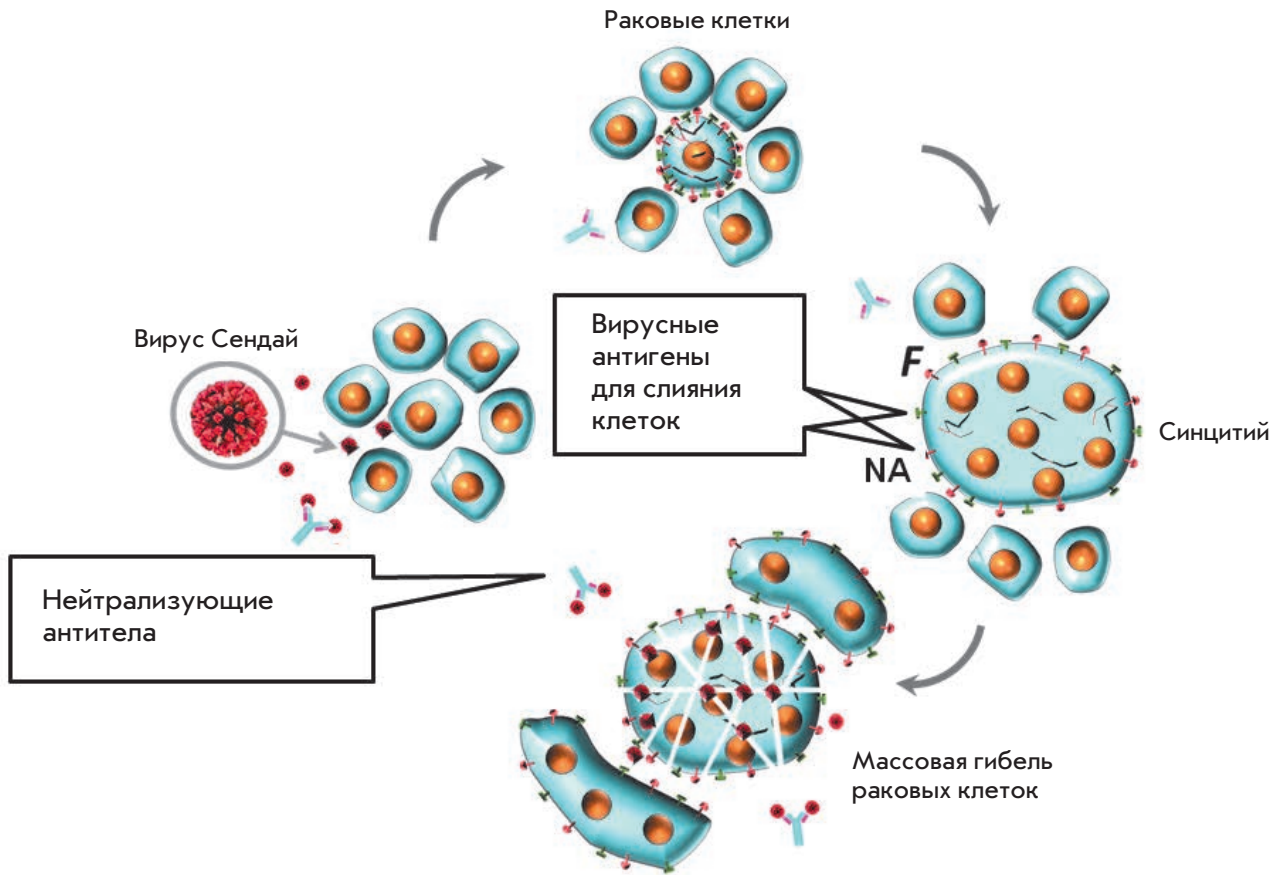


Рис. 3. Гипотеза об образовании синцития, приводящего к эффективной гибели раковых клеток в опухоли непосредственно от вирусной инфекции. У грызунов, природных хозяев вируса Сендай, инфицированные клетки экспрессируют вирусные белки слияния (F) и гемагглютинин-нейраминидазу. Белок F синтезируется в виде неактивного предшественника, белка F0, впоследствии расщепляемого клеточной протеазой на две субъединицы – F1 и F2, которые остаются связанными друг с другом дисульфидными мостиками [14]. Субъединица F1 транспортируется на клеточную поверхность и вместе с гемагглютинин-нейраминидазой катализирует слияние зараженных вирусом и окружающих незараженных клеток. При этом образуется многоядерная структура, называемая синцитий. Эта структура гибнет в течение нескольких дней после инфицирования. Образование синцития помогает распространению вирусной инфекции из зараженных клеток в незараженные при наличии нейтрализующих антител. Вирус Сендай с незрелым белком F0 не способен заражать клетки и образовывать синцитий. При заражении грызунов процессинг белка F0 происходит в бронхиолярных эпителиальных клетках, экспрессирующих протеазу Клара «Clara» [15–17]. Таким образом, эта протеаза ответственна за активацию вируса в дыхательных путях природных хозяев вируса

Парамиксовирусы стимулируют продукцию других цитокинов. Показано, что вирус Сендай способен стимулировать в ЛПКЧ продукцию интерлейкина-2 [65], макрофагальных воспалительных белков-1 α и - β и многих других цитокинов [63]. Введение вируса Сендай животным показало, что как живой, так и облученный УФ вирус стимулирует секрецию интерлейкина-6 [27]. Установлено, что за стимуляцию секреции интерлейкина-6 в дендритных клетках отвечает белок слияния (F) вируса Сендай [67]. Введение УФ-инактивированного вируса Сендай

в раковую опухоль почки вызывало экспрессию хемокина CXCL10 (также известного под названием белок 10, способный индуцироваться интерфероном γ) [30].

Парамиксовирусы способны стимулировать натуральные киллеры (НК). Активированные НК способны разрушать опухолевые клетки без предварительной стимуляции антигеном. Эти клетки являются частью важной ветви врожденной иммунной системы организма, действие которой

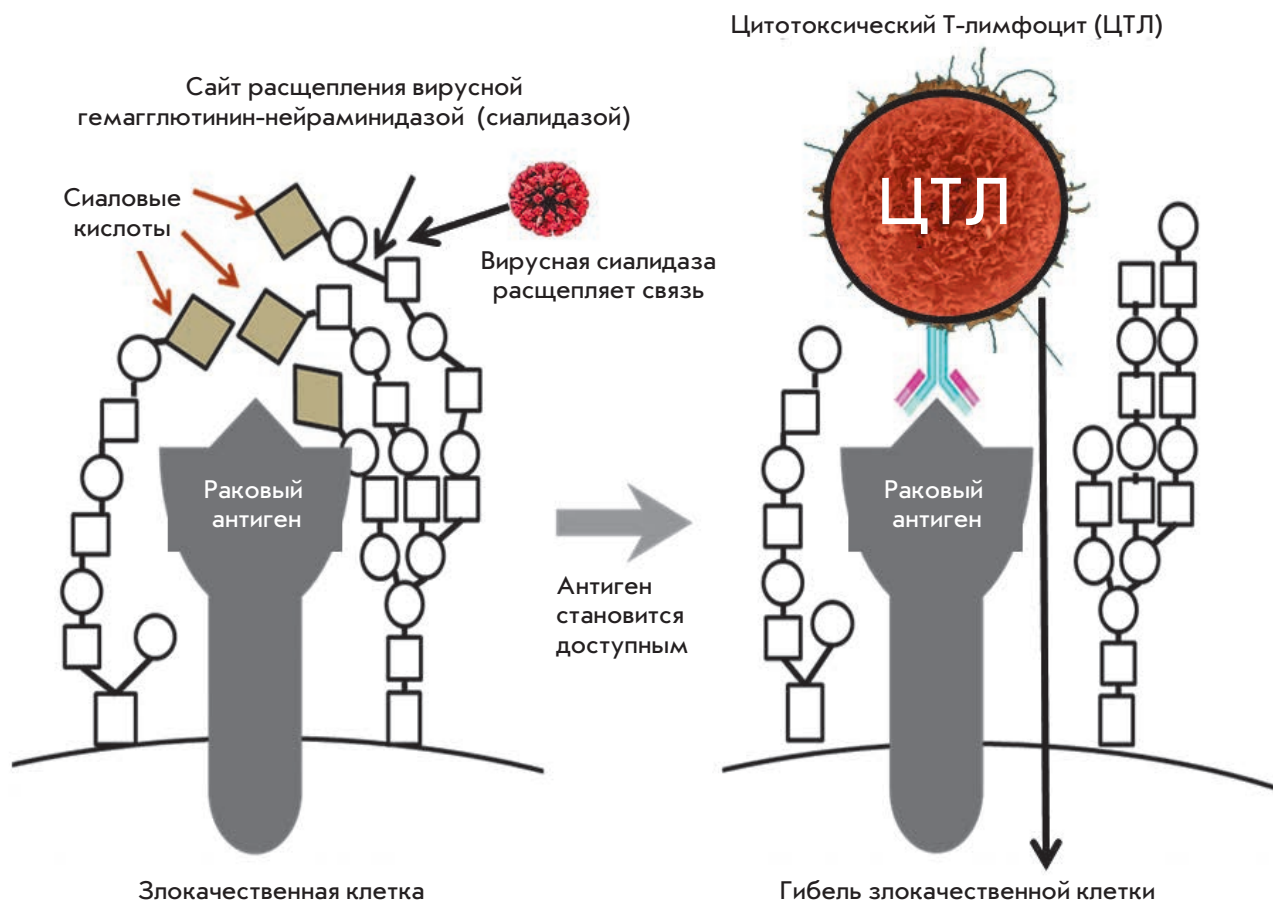


Рис. 4. Гибель злокачественной клетки за счет эффекта десиалирования и стимуляции иммунного надзора. Повышенный уровень сиаляции мембран клеток связан с процессом их малигнизации: с увеличением клеточного инвазивного и метастатического потенциала. Скорее всего, дополнительное сиамирование поверхностностей злокачественных клеток развилось как механизм, способствующий избеганию злокачественными клетками иммунологического надзора организма-хозяина путем модификации клеточной поверхности и образования «толстой шубы» из полимеров сиаловых кислот, которая скрывает онкомаркеры (антигены). Десиамирование снижает потенциал роста опухолевых клеток, делая их более доступными для натуральных клеток-киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Более того, обработанные сиалидазой опухолевые клетки лучше активируют секрецию интерферона- γ киллерными клетками. Показано, что активность и цитотоксичность киллерных клеток зависят от экспрессии сиаловых кислот, специфичных для поверхности опухолевых клеток. Экспериментальные данные указывают на то, что злокачественные клетки становятся десиалированными после обработки опухоли парамиксовирусом, и этот процесс вносит вклад в усиление противоопухолевого иммунного надзора

запускается сразу после обнаружения патогена и не включает развития иммунологической памяти на антиген. За активацию НК отвечают несколько рецепторов, в том числе два белка, названных белками натуральных киллеров – 46 (НКр46) и 44 (НКр44). Получено экспериментальное свидетельство того, что НК активируются всего одним белком парамиксовирусов, а именно ГН [71]. Предполагается, что активация НК УФ-инактивированным вирусом Сендай [30] связана с взаимодействием белка ГН с рецепторами НКр46

и/или НКр44. Эффективное связывание белка ГН с рецепторами НКр46 и/или НКр44 приводит к лизису клетки, имеющей на своей поверхности белок ГН или его фрагменты [72–74].

Изучение УФ-инактивированного вируса Сендай показало, что НК играют важную роль в опосредованной вирусом регрессии роста опухоли. В мышинной модели рака почки противоопухолевое действие вируса снижалось при его совместной инъекции с антителом против ганглиозида GM1, которое снижает количество НК-клеток [30].

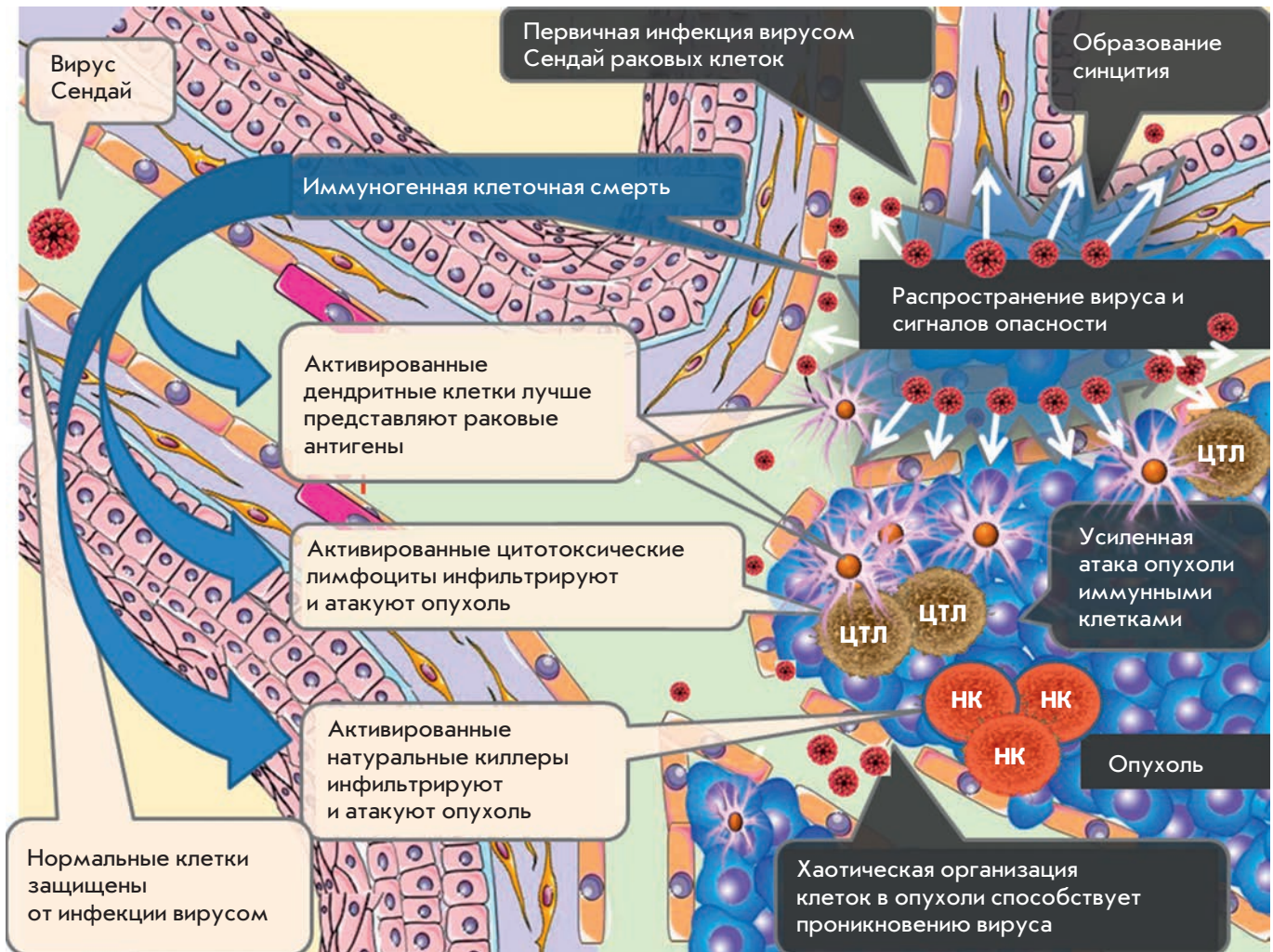


Рис. 5. Иммуноопосредованная гибель злокачественных клеток. Архитектура нормальных тканей – кровеносных сосудов, базальных мембран, структура межклеточных контактов и т.д., защищает клетки от проникновения вируса. Кроме того, нормальные клетки способны обеспечить защиту от вируса путем секреции интерферонов. В то же время раковые клетки, у которых система интерферонового ответа, как правило, нарушена, гораздо более доступны для вируса. Доступности дополнительно способствует хаотичная организация клеток внутри опухоли. Вирус Сендай способен вызывать образование синцития и массовую иммуногенную гибель опухолевых клеток. Подобная гибель приводит к распространению сигналов опасности, активации нативного и приобретенного противоопухолевого иммунного ответа. Антигенпредставляющие дендритные клетки активируются и мигрируют в опухоль, как и цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ), натуральные киллерные клетки (НК) и другие иммунные клетки. Все эти клетки обеспечивают иммуноопосредованную гибель злокачественных клеток, которая происходит наряду с гибелью злокачественных клеток от вирусной инфекции

Индукция противоопухолевой цитотоксической активности Т-лимфоцитов. Показано, что вирус болезни Ньюкасла (ВБН) усиливает опухолеспецифический цитотоксический ответ CD8 Т-клеток (ЦТЛ) и повышает активность Т-хелперных клеток CD4 в отсутствие противовирусного ответа Т-клеток [73]. УФ-инактивированный вирус, который не способен реплицироваться, так же активно стимулирует противоопухолевый ЦТЛ-ответ, как и интактный,

способный к репликации ВБН. По-видимому, влияние ВБН на ЦТЛ-ответ вызвано внедрением функциональных молекул вирусного белка ГН в мембраны опухолевых клеток, а также стимуляцией нейраминидазной активности [73] (рис. 4). Так как белки ГН вирусов Сендай и ВБН обладают высокой степенью гомологии, эти данные позволяют предположить, что белок ГН, независимо от его происхождения (вирус Сендай, ВБН или другие родственные парамик-

совирусы), активирует как НК, так и ответы, связанные с цитотоксическими лимфоцитами.

Стимуляция дендритных клеток. Дендритные клетки (ДК) – специализированные антигенпредставляющие клетки, способные эффективно усиливать как врожденный, так и приобретенный иммунный ответ против различных патогенов и опухолей. После обнаружения вируса или иного патогена в ДК запускается специальная программа дифференцировки, в результате чего они становятся способными активировать наивные Т-клетки.

Отметим, что даже УФ-инактивированный вирус Сендай вызывает интенсивную инфильтрацию опухоли дендритными клетками [27], при этом *ex vivo* инфекция ДК рекомбинантным вирусом Сендай индуцирует созревание и активацию ДК всего за 1 ч [74]. Введение активированных ДК, несущих различные варианты рекомбинантных вирусов Сендай, существенно повышает выживание животных, привитых клетками злокачественной меланомы [75, 76], рака толстой кишки [77], плоскоклеточного рака [78], рака печени, нейробластомы и рака предстательной железы [26]. Применение таких ДК перед подсадкой опухолевых клеток показало, что они способны эффективно предотвращать образование метастазов нейробластомы и аденокарциномы предстательной железы в легкие [79, 80]. Многие процессы, которые приводят к активации противоопухолевого иммунитета вирусом Сендай, представлены на рис. 5.

Подавление регуляторных клеток. Эксперименты на животных моделях показали, что некоторые штаммы вируса Сендай даже после УФ-инактивации способны подавлять опосредованную Т-клетками регуляторную иммуносупрессию посредством секреции интерлейкина-6 зрелыми ДК [27].

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клинические испытания вируса Сендай несомненно представляют интерес. В настоящий момент в Японии проходит первая фаза испытаний эффективности УФ-облученного вируса на больных меланомой [81]. Планируется улучшить системную доставку инактивированного вируса в опухоль и метастазы, связав его предварительно с тромбоцитами крови. Подобный подход был проверен на животных. Оказалось, что связывание с тромбоцитами значительно улучшает доставку вируса, вызывая подавление роста опухолей на мышинных моделях меланомы [82].

В Германии изучают модифицированный вирус Сендай с измененными методами генной инженерии спектром активирующих его протеаз [83]. Эксперименты на животных показали, что такой ви-

рус может легче активироваться в злокачественных клетках.

Интерес представляет также изучение других онколитических вирусов, совместное применение которых с вирусом Сендай будет оказывать положительный синергический терапевтический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящее время известен целый ряд механизмов, посредством которых может реализоваться онколитическое действие парамиксовирусов и, в частности, вируса Сендай. Степень онколитического действия и выбор механизма могут зависеть от ряда факторов. Парамиксовирусы могут непосредственно убивать злокачественные клетки, размножаясь в них и вызывая образование клеточного синцития. Клетки, слившиеся в синцитий, более не могут делиться и обречены на коллективную синхронную гибель. Кроме того, парамиксовирусы вызывают опосредованное иммунной системой уничтожение злокачественных клеток, происходящее за счет сильной противоопухолевой активации натуральных киллеров, а также благодаря усилению противоопухолевой цитотоксической активности Т-клеток, стимуляции антигенпредставляющих дендритных клеток и подавлению иммуносупрессорной активности Т-клеток. Содержащаяся в капсидной оболочке парамиксовирусов нейраминидаза способна отщеплять сиаловые кислоты с поверхности злокачественных клеток, демаскируя присутствующие на клеточной мембране опухолевые антигены. При этом раковые клетки становятся более заметными для иммунной системы. Кроме того, вирусная нейраминидаза может обеспечивать большое специфическое сродство вируса к полимерам сиаловых кислот, представленным в избытке на мембранах раковых клеток. За счет этого увеличивается специфичность вируса в отношении клеток первичных опухолей и метастазов, но не нормальных клеток. Возможно, эти механизмы обуславливают противоопухолевую активность вируса Сендай, обнаруженную на животных и людях. Таким образом, имеются объективные предпосылки к активной дальнейшей разработке противоопухолевых препаратов на основе парамиксовирусов и, в частности, на основе вируса Сендай. ●

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки (RFMEFI60714X0014), а также РФФ (грант № 14-15-01073).

Авторы благодарны С.А. Шабалиной (Национальный институт здоровья США) за построение филогенетического дерева парамиксовирусов, приведенного на рис. 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Svejda J. // *Lek. List.* 1950. V. 5. P. 688–689.
2. Arnesen K. // *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1951. V. 71. P. 232–235.
3. Higgins G.K., Pack G.T. // *Bull. Hosp. Joint Dis.* 1951. V. 12. P. 379–382.
4. Локтев В.Б., Иванькина Т.Ю., Нетесов С.В., Чумаков П.М. // *Вестник РАМН.* 2012. С. 42–47.
5. Святченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. // *Молекуляр. биология.* 2012. Т. 46. С. 556–569.
6. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Юдина К.В., Бабкин И.В., Чумаков П.М., Нетесов С.В. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.* 2012. № 1. С. 8–15.
7. Чумаков П.М., Морозова В.В., Бабкин И.В., Байков И.К., Нетесов С.В., Тикунова Н.В. // *Молекуляр. биология.* 2012. Т. 46. С. 712–725.
8. Kim M., Chung Y.H., Johnston R.N. // *J. Microbiol. (Seoul, Korea).* 2007. V. 45. P. 187–192.
9. Lech P.J., Russell S.J. // *Expert Rev. Vaccines.* 2010. V. 9. P. 1275–1302.
10. Russell S.J., Peng K.W. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009. V. 330. P. 213–241.
11. Schirrmacher V., Fournier P. // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 542. P. 565–605.
12. Кешелава В.В., Добровольская Н.Ю., Чазова Н.Л., Берщанская А.М., Подольская М.В., Гармарник Т.В., Мельникова Н.В. // *Вопросы онкологии.* 2009. Т. 55. С. 433–435.
13. Fournier P., Schirrmacher V. // *Biology.* 2013. V. 2. P. 936–975.
14. Iwata S., Schmidt A.C., Titani K., Suzuki M., Kido H., Gotoh B., Hamaguchi M., Nagai Y. // *J. Virol.* 1994. V. 68. P. 3200–3206.
15. Tashiro M., Yokogoshi Y., Tobita K., Seto J.T., Rott R., Kido H. // *J. Virol.* 1992. V. 66. P. 7211–7216.
16. Sakai K., Kohri T., Tashiro M., Kishino Y., Kido H. // *Europ. Resp. J.* 1994. V. 7. P. 686–692.
17. Sakai K., Kawaguchi Y., Kishino Y., Kido H. // *J. Histochem. Cytochem. Official J. Histochem. Soc.* 1993. V. 41. P. 89–93.
18. Nagai Y. // *Microbiol. Immunol.* 1995. V. 39. P. 1–9.
19. Scheid A., Choppin P.W. // *Virology.* 1974. V. 57. P. 475–490.
20. *Infectious diseases of mice and rats.* Washington, DC: Nat. Acad. Press, 1991.
21. Slobod K.S., Shenep J.L., Lujan-Zilbermann J., Allison K., Brown B., Scroggs R.A., Portner A., Coleclough C., Hurwitz J.L. // *Vaccine.* 2004. V. 22. P. 3182–3186.
22. Kinoh H., Inoue M., Washizawa K., Yamamoto T., Fujikawa S., Tokusumi Y., Iida A., Nagai Y., Hasegawa M. // *Gene Ther.* 2004. V. 11. P. 1137–1145.
23. Iwadata Y., Inoue M., Saegusa T., Tokusumi Y., Kinoh H., Hasegawa M., Tagawa M., Yamaura A., Shimada H. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 3821–3827.
24. Kinoh H., Inoue M. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 2327–2334.
25. Tatsuta K., Tanaka S., Tajiri T., Shibata S., Komaru A., Ueda Y., Inoue M., Hasegawa M., Suita S., Sueishi K., Taguchi T., Yonemitsu Y. // *Gene Ther.* 2009. V. 16. P. 240–251.
26. Yonemitsu Y., Ueda Y., Kinoh H., Hasegawa M. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 1892–1898.
27. Kurooka M., Kaneda Y. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 227–236.
28. Kawano H., Komaba S., Kanamori T., Kaneda Y. // *BMC Med.* 2007. V. 5. P. 28.
29. Kawano H., Komaba S., Yamasaki T., Maeda M., Kimura Y., Maeda A., Kaneda Y. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008. V. 61. P. 973–978.
30. Fujihara A., Kurooka M., Miki T., Kaneda Y. // *Cancer Immunol. Immunotherapy: CII.* 2008. V. 57. P. 73–84.
31. Kawaguchi Y., Miyamoto Y., Inoue T., Kaneda Y. // *Int. J. Cancer.* 2009. V. 124. P. 2478–2487.
32. Wheelock E.F., Dingle J.H. // *N. Engl. J. Med.* 1964. V. 271. P. 645–651.
33. Сенин В., Сенина А., Матвеева О. // Патент РФ RU2519763. 2014.
34. Senin V., Senina A., Matveeva O. // Patent application PCT/RU2013/001043, WO2014081346 A3. 2014.
35. Lamb R.A., Parks G.D. // *Fields Virology / Eds Knipe D.M., Howley P.M. Lippincott. Philadelphia: Williams & Wilkins,* 2007. P. 1449–1496.
36. Bossart K.N., Fusco D.L., Broder C.C. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. V. 790. P. 95–127.
37. Bitzer W., Lauer U., Baumann C., Spiegel M., Gregor M., Neubert W.J. // *J. Virol.* 1997. V. 71. P. 5481–5486.
38. Chawla-Sarkar M., Lindner D.J., Liu Y.F., Williams B.R., Sen G.C., Silverman R.H., Borden E.C. // *Apoptosis: Internat. J. Programmed Cell Death.* 2003. V. 8. P. 237–249.
39. Kotredes K.P., Gamero A.M. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2013. V. 33. P. 162–170.
40. Igney F.H., Krammer P.H. // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. V. 2. P. 277–288.
41. Rawling J., Cano O., Garcin D., Kolakofsky D., Melero J.A. // *J. Virol.* 2011. V. 85. P. 2771–2780.
42. Ebert O., Shinozaki K., Kournioti C., Park M.S., Garcia-Sastre A., Woo S.L. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 3265–3270.
43. Nakamori M., Fu X., Meng F., Jin A., Tao L., Bast R.C., Jr., Zhang X. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 2727–2733.
44. Gainey M.D., Manuse M.J., Parks G.D. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 9369–9380.
45. Altomonte J., Marozin S., Schmid R.M., Ebert O. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. P. 275–284.
46. Bateman A., Bullough F., Murphy S., Emiliusen L., Lavillette D., Cosset F.L., Cattaneo R., Russell S.J., Vile R.G. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 1492–1497.
47. Galanis E., Bateman A., Johnson K., Diaz R.M., James C.D., Vile R., Russell S.J. // *Hum. Gene Ther.* 2001. V. 12. P. 811–821.
48. Lin E.H., Salon C., Brambilla E., Lavillette D., Szecsi J., Cosset F.L., Coll J.L. // *Cancer Gene Ther.* 2010. V. 17. P. 256–265.
49. Pearlstein E., Salk P.L., Yogeewaran G., Karpatkin S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. P. 4336–4339.
50. Yogeewaran G., Salk P.L. // *Science.* 1981. V. 212. P. 1514–1516.
51. Benedetto A., Elia G., Sala A., Belardelli F. // *Int. J. Cancer.* 1989. V. 43. P. 126–133.
52. Collard J.G., Schijven J.F., Bikker A., La Riviere G., Bolscher J.G., Roos E. // *Cancer Res.* 1986. V. 46. P. 3521–3527.
53. Passaniti A., Hart G.W. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 7591–7603.
54. Bresalier R.S., Rockwell R.W., Dahiya R., Duh Q.Y., Kim Y.S. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. P. 1299–1307.
55. Hsu C.C., Lin T.W., Chang W.W., Wu C.Y., Lo W.H., Wang P.H., Tsai Y.C. // *Gynecol. Oncol.* 2005. V. 96. P. 415–422.
56. Chang W.W., Yu C.Y., Lin T.W., Wang P.H., Tsai Y.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 341. P. 614–619.
57. Chiang C.H., Wang C.H., Chang H.C., More S.V., Li W.S., Hung W.C. // *J. Cell. Physiol.* 2010. V. 223. P. 492–499.
58. Cohen M., Elkabets M., Perlmutter M., Porgador A., Voronov E., Apte R.N., Lichtenstein R.G. // *J. Immunol.* 2010. V. 185. P. 5869–5878.
59. Powell L.D., Whiteheart S.W., Hart G.W. // *J. Immunol.* 1987. V. 139. P. 262–270.

60. Tyagarajan K., Forte J.G., Townsend R.R. // *Glycobiology*. 1996. V. 6. P. 83–93.
61. Drzeniek R., Gauhe A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970. V. 38. P. 651–656.
62. Brostrom M.A., Bruening G., Bankowski R.A. // *Virology*. 1971. V. 46. P. 856–865.
63. Hua J., Liao M.J., Rashidbaigi A. // *J. Leukoc. Biol.* 1996. V. 60. P. 125–128.
64. Nyman T.A., Tolo H., Parkkinen J., Kalkkinen N. // *Biochem. J.* 1998. V. 329. P. 295–302.
65. Costas M.A., Mella D., Criscuolo M., Diaz A., Finkielman S., Nahmod V.E., Arzt E. // *J. Interferon Res.* 1993. V. 13. P. 407–412.
66. Cantell K., Hirvonen S., Kauppinen H.L., Myllyla G. // *Methods Enzymol.* 1981. V. 78. P. 29–38.
67. Suzuki H., Kurooka M., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y., Kaneda Y. // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. P. 1325–1329.
68. Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002. V. 13. P. 95–109.
69. Dunn G.P., Bruce A.T., Sheehan K.C., Shankaran V., Uppaluri R., Bui J.D., Diamond M.S., Koebel C.M., Arthur C., White J.M., Schreiber R.D. // *Nat. Immunol.* 2005. V. 6. P. 722–729.
70. Borden E.C., Sen G.C., Uze G., Silverman R.H., Ransohoff R.M., Foster G.R., Stark G.R. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007. V. 6. P. 975–990.
71. Jarahian M., Watzl C., Fournier P., Arnold A., Djandji D., Zahedi S., Cerwenka A., Paschen A., Schirmmacher V., Momburg F. // *J. Virol.* 2009. V. 83. P. 8108–8121.
72. Arnon T.I., Lev M., Katz G., Chernobrov Y., Porgador A., Mandelboim O. // *Eur. J. Immunol.* 2001. V. 31. P. 2680–2689.
73. Schirmmacher V., Haas C., Bonifer R., Ertel C. // *Clin. Cancer Res.* 1997. V. 3. P. 1135–1148.
74. Harada Y., Yonemitsu Y. // *Front. Biosci.* 2011. V. 16. P. 2233–2242.
75. Shibata S., Okano S., Yonemitsu Y., Onimaru M., Sata S., Nagata-Takeshita H., Inoue M., Zhu T., Hasegawa M., Moroi Y., Furue M., Sueishi K. // *J. Immunol.* 2006. V. 177. P. 3564–3576.
76. Okano S., Yonemitsu Y., Shirabe K., Kakeji Y., Maehara Y., Harada M., Yoshikai Y., Inoue M., Hasegawa M., Sueishi K. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. P. 1828–1839.
77. Sugiyama M., Kakeji Y., Tsujitani S., Harada Y., Onimaru M., Yoshida K., Tanaka S., Emi Y., Morita M., Morodomi Y., et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2011. V. 10. P. 540–549.
78. Yoneyama Y., Ueda Y., Akutsu Y., Matsunaga A., Shimada H., Kato T., Kubota-Akizawa M., Okano S., Shibata S., Sueishi K., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 355. P. 129–135.
79. Komaru A., Ueda Y., Furuya A., Tanaka S., Yoshida K., Kato T., Kinoh H., Harada Y., Suzuki H., Inoue M., et al. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. P. 4211–4219.
80. Kato T., Ueda Y., Kinoh H., Yoneyama Y., Matsunaga A., Komaru A., Harada Y., Suzuki H., Komiya A., Shibata S., et al. // *Neoplasia*. 2010. V. 12. P. 906–914.
81. Tanemura A., Kiyohara E., Katayama I., Kaneda Y. // *Cancer Gene Ther.* 2013. V. 20. P. 599–605.
82. Nishikawa T., Tung L.Y., Kaneda Y. // *Mol. Ther.* 2014. V. 22. № 12. P. 2046–2055.
83. Zimmermann M., Armeanu-Ebinger S., Bossow S., Lampe J., Smirnow I., Schenk A., Lange S., Weiss T.S., Neubert W., Lauer U.M., Bitzer M. // *PLoS One*. 2014. V. 9. e90508.