HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腫瘍溶解ウイルスとシスプラチンとの併用効果の検討
Author(s)	稗田, 敏雄
Citation	北海道歯学雑誌, 36(2), 90-97
Issue Date	2016-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60944
Type	journal article
File Information	36-02_07_Hieda.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　36：90−97，2016.

原　著

腫瘍溶解ウイルスとシスプラチンとの併用効果の検討

稗田　敏雄

抄　録：

【背景】がんに対する治療法には，一般的に外科手術，化学療法，放射線療法がある．その中でも化学療法は，現在までにがんに対して優れた治療効果をもたらしてきたが，抵抗性を示す場合も報告されている．また，高濃度の抗がん剤は，様々な副作用を引き起こすため，現状よりも低濃度での使用が望まれている．そのため，高濃度の抗がん剤と同様の効果を示すには，他の補助療法が必要とされている．一方，腫瘍細胞で選択的に増殖する腫瘍溶解ウイルス（Oncolytic virus）によるがん治療は，高い治療効果と選択性が期待される．

口腔病理病態学教室では，アデノウイルスの複製に最も重要なE1A遺伝子にAU-rich element（ARE）を組み込んだ腫瘍溶解アデノウイルス（Ad-ARET）を作成した．本研究では，がん細胞に対するAd-ARETとシスプラチンとの併用療法の効果を検討した．

【材料と方法】ヒト腫瘍細胞HeLa，SAS，A549，もしくはシスプラチン耐性を持つSAS細胞を用いて，Ad-ARET単独，シスプラチン単独もしくは両者併用で細胞を処理した．これらの細胞の生細胞活性をMTSアッセイで検討することにより細胞死を検討し，また，ウイルスの増殖も解析した．さらに，シスプラチン処理により，ARE結合タンパクHuRの局在を検討することにより，ARE-mRNAの安定化およびウイルスの増殖を解析した．

【結果】いずれの細胞でも，Ad-ARETあるいはシスプラチン単独処理よりも，併用処理の方が，がん細胞死活性が高かった．また，シスプラチン存在下で，HuRの細胞質局在が認められ，ARE-mRNAの安定化によりAd-ARETの生産効率が上がることが解明された．

【結語】Ad-ARETはシスプラチンと併用することにより，より高い腫瘍細胞溶解効果を持つことが示された．これは，シスプラチン処理によって，HuRタンパクが細胞質に核外輸送され，ARE-mRNAが安定化されることにより，Ad-ARETがより増加したことによると考えられる．以上より，Ad-ARETとシスプラチンとの併用療法は有効な治療法になりうると思われる．

キーワード：Ad-ARET，シスプラチン，HuR，ARE-mRNA

緒　　言

現在，がんは，診断技術および治療法の進歩にもかかわらず，世界中において主な死因の一つである．一般的な治療法として外科手術，放射線療法，化学療法がある．外科手術は，ほとんどのがんに対し根治的な治療法であるが，形態的および機能的な観点を考慮すると，患者のQOLの低下が懸念される．一方，放射線療法および化学療法は，外科手術と比較すると根治的な治療結果を得ることは難しい．その上，放射線療法や化学療法に耐性を示すがんが存在し，特に進行がんに対しては外科手術と併用した補助療法であるという考え方が一般的である．また，用量依存的に良好な効果をもたらすが，放射線治療と化学療法は腫瘍細胞に特異的ではない．高濃度の抗がん剤は，正常臓器に不可逆的な損傷を引き起こすなど，様々な副作用を引き起こすため，低濃度での使用が臨床でのあらゆる状況で望まれている．そのため，他の新たな補助療法が必要とされる．

近年，がんに対する新たな治療法として腫瘍溶解ウイルス療法が注目されており，様々な遺伝子を組換えた種々のウイルスが報告されている[1)]．腫瘍細胞で選択的に増殖する腫瘍溶解ウイルス（Oncolytic virus）によるがん治療は，正常組織に過剰な傷害を与えることなく，ウイルス自身が腫瘍細胞特異的に増殖および拡散し，腫瘍組織を破壊することを目的としており，高い治療効果と腫瘍特異性が期待される．さらに，腫瘍溶解ウイルスは，現在の治療法に耐性を示す，　様々ながんに対してもその治療効果が期

〒060−8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科　口腔病態学講座　口腔顎顔面外科学教室（主任：鄭　漢忠 教授）

待できる.

本研究では，AU-rich element（ARE）を持つmRNAの安定化システムを応用した腫瘍溶解アデノウイルスを用いた．AREはアデニンとウラシルに富むRNAのエレメントで，*c-fos*，*c-myc*，*COX-2*などのoncogeneやcytokineなど，細胞の増殖に関わる遺伝子から転写されるmRNAの非翻訳領域に存在する[2]．AREをもつmRNAは正常細胞では合成後すぐに分解されるが，がん細胞ではHuRタンパクがAREに結合することにより恒常的に安定化される[3]．我々は，アデノウイルスの複製に最も重要なE1A遺伝子にAREを組み込んだ腫瘍溶解アデノウイルス（Ad-ARET）を作成した．このウイルスは，AREを持つE1A mRNAが，正常細胞ではすぐに分解され，がん細胞では安定化されるため，がん細胞特異的に増殖できる.

一方，シスプラチンは頭頸部がん，肺がん，膀胱がん，前立腺がん，卵巣がん,食道がん，胃がん，子宮頸がん，悪性リンパ腫など，様々ながん治療に最も一般的に使用される抗がん剤の一つである．高い抗腫瘍効果を発揮するが，副作用も強いことが特徴である．作用機序としては，白金製剤がDNAと結合することにより，DNAの複製を阻害し，細胞分裂および増殖を阻害する[4−7]．口腔病理病態学教室では，これまでに，シングルセルクローニング法にてヒト口腔がん細胞株SASよりシスプラチン耐性株および感受性株を樹立した.

本研究では，がん細胞に対して，Ad-ARET単独処理，シスプラチン単独処理，および両者併用処理を行い，それぞれの処理で誘導される細胞死を比較・検討した．また，シスプラチンで処理により，ARE-mRNAが安定化することでAd-ARETの増殖効率上がり，腫瘍溶解効果が増強するかどうか検討した.

材 料 と 方 法

1．腫瘍溶解ウイルスと抗がん剤

腫瘍溶解アデノウイルスとして，5型ヒトアデノウイルスのE1A遺伝子の3′非翻訳領域に，TNF-α遺伝子のAREを組み込んだウイルスAd-ARETを用いた．抗がん剤はシスプラチン（プラトシン注10，ファイザー株式会社）を用いた.

2．腫瘍細胞および培養条件

ヒト口腔扁平上皮がん細胞であるSAS細胞のparent株（SAS-P細胞）および口腔病理病態学教室で樹立した，シスプラチン耐性を示すSAS-1，4細胞と感受性を示すSAS-5，12細胞を用いた．また，ヒト子宮頸がん細胞であるHeLa細胞，ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞であるA549細胞を用いた．各細胞は，37℃，5％ CO_2下において10％牛胎児血清（FBS）含有Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）を用いて培養した．なお，SAS細胞は理化学研究所（Tsukuba，Japan）から，他の細胞はATCC（Manassas，USA）からそれぞれ分与された.

3．細胞増殖アッセイ（MTS assay）

Cell Titer96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay（Promega，Japan）を用いて，MTS assayを以下の様に行った.

① SAS細胞（SAS-P，SAS-1，4，5，12），HeLa細胞，A549細胞を96穴プレートに1穴あたり3×10^3個播種した．24時間培養後に，様々な濃度（0，0.3，0.6，1.2，2.5，5，10，20μg/ml）のシスプラチンを添加し，48時間後にMTS reagentを加えて4時間反応させてから，Benchmark microplate reader（BIO-RAD，USA）を用いて490nmで吸光度を測定した.

② 次に，HeLa細胞を96穴プレートに1穴あたり1×10^3個播種した．24時間培養後に，multiplicity of infection（MOI）10 vp/cell（virus particle/cell）および100のAd-ARETをそれぞれ3，4，5日間感染させた．また，SAS-P細胞，SAS-1細胞，SAS-4細胞，SAS-5細胞およびSAS-12細胞に対して，MOI 1，10，100のAd-ARETを5日間感染させた．それぞれの細胞に，MTS reagentを加えて4時間反応させてから490nmで吸光度を測定した.

③ SAS-P細胞，SAS-1細胞，HeLa細胞，A549細胞を96穴プレ-トに1穴あたり1×10^3個播種した．24時間培養後に，Ad-ARET単独処理，シスプラチン単独処理もしくは両者併用で細胞を処理し，MTS reagentを加えて4時間反応させてから490nmで吸光度を測定した.

4．ウエスタンブロッティング法

SAS-P細胞をシスプラチン0.6μg/mlで8，12時間処理した．その後，PBSで洗浄してからFractionation buffer（10mM Tris-HCl，pH7.4/150mM NaCl/1.5mM $MgCl_2$/0.5% Nonidet P-40/protease inhibitor）を加えて氷上静置後に，振盪および遠心分離し，上清を細胞質分画とした．さらに，Fractionation bufferを加えて，遠心分離した後，上清を核分画とした．細胞分画はSDS-polyachrylamide gelelectrophoresis（SDS-PAGE）にて展開後，PVDF膜（polyvinylidine difluoride membrane ; Millipore，USA）に転写した．一次抗体として，HuR（SantaCruz），β-Tubulin（Santa Cruz），laminB（Santa Cruz），β-actin（SantaCruz）の抗体を用い，HRP（Horseradish peroxidase）が結合した二次抗体で処理し，SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate（Thermo）にて発光させた.

5．ウイルス生産効率測定

SAS-P細胞およびA549細胞を12穴プレートに1穴あたり5×10^4個播種した．24時間培養後に，SAS-P細胞をシスプラチン0.6μg/ml，A549細胞をシスプラチン2.5μg/mlで

それぞれ４，８，12時間処理した．その後，MOI 100のAd-ARETを72時間感染させ，培地ごと回収した．凍結・融解を３回繰り返し，希釈したウイルス液をHEK293細胞に感染させ，48時間後にAdeno-X^{TM} Rapid Titer Kit（Takara, Japan）を用いてヘキソンタンパクを染色しウイルス生産効率を測定した．

６．統計学的分析

シスプラチン単独処理群あるいはAd-ARET単独処理群と，両者併用処理群との２群間における統計処理にはStudent's t-testを用い，統計的有意差をP＜0.05とした．また，グラフは平均値±S.D.で示した．

結　　果

１）シスプラチン，Ad-ARETそれぞれの単独処理効果の検討

がん細胞に対するシスプラチン単独での効果を検討するために，SAS細胞のparent株（SAS-P細胞）および口腔病理病態学教室で樹立した，シスプラチン耐性を示すSAS-1，4細胞と感受性を示すSAS-5，12細胞，その他にHeLa細胞，A549細胞を様々な濃度（０～20μg/ml）のシスプラチンで処理し，48時間後の細胞生存率を測定した．図１に示すように，用量依存的に生細胞率が減少し，各細胞間におけるシスプラチンに対する感受性が示された．SAS-P細胞を基準とすると，SAS-1，4細胞，HeLa細胞，A549細胞はシスプラチン耐性を示し，SAS-5，12細胞に関してはSAS-P細胞と同程度もしくは高いシスプラチン感受性を示した．

次に，がん細胞に対するAd-ARET単独の効果を検討するために，HeLa細胞に対し，Ad-ARETをそれぞれ３，４，５日間感染させ，生細胞率を測定した（図２）．MOI 100のAd-ARETを感染させた細胞では，経時的に多くの細胞死を誘導した．それに対して，MOI 10のAd-ARETを感染させても，ほとんど細胞死がみられなかった．

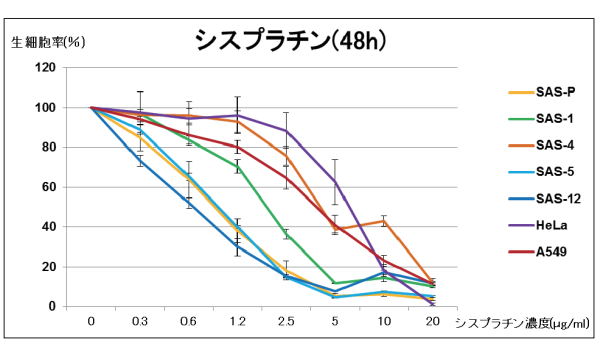


図１　シスプラチン単独処理

SAS細胞（SAS-P，SAS-1，4，5，12），HeLa細胞，A549細胞に様々な濃度（0，0.3，0.6，1.2，2.5，5，10，20μg/ml）のシスプラチンを添加し，48時間後にMTSアッセイを行い，生細胞率を求めた．

次に，シスプラチン耐性細胞に対するAd-ARET単独の効果を検討するために，SAS-P細胞，SAS-1細胞，SAS-4細胞，SAS-5細胞およびSAS-12細胞に対して，Ad-ARETを５日間感染させ，生細胞率を測定した（図３）．すべての細胞においてMOI 100のAd-ARETを感染させたものでは多くの細胞死がみられた．SAS-P細胞ではMOI 1および10のAd-ARETを感染させたものでも約50％の細胞死がみられたが，他の細胞では約70～90％程度の細胞が生存していた．

２）シスプラチンとAd-ARETの併用効果の検討

図１および図２の結果より，図４に示すようなスケジュールで，Ad-ARETとシスプラチンとの併用効果を調べた．使用したシスプラチンおよびAd-ARETの用量は，それぞれ単独処理において，約50～75％の細胞が生存する用量とした．実験には，何も処理をしないMOCK群，細胞をプレートに播種してから４日後にシスプラチン処理したシスプラチン群，細胞をプレートに播種した次の日（24時間後）にAd-ARETを感染させたAd-ARET群，細胞をプレートに播種した次の日（24時間後）にAd-ARETを感染させ，３日後にシスプラチンで処理した併用群の４つ

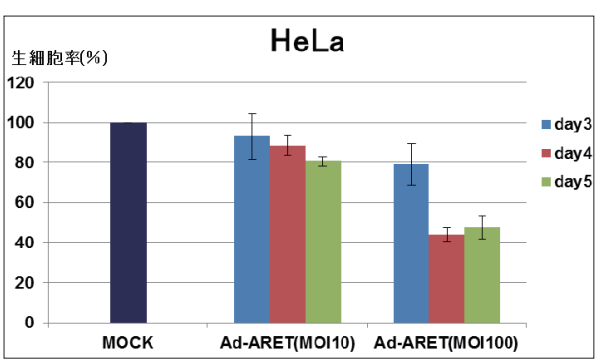


図２　Ad-ARET単独処理

HeLa細胞に，MOI 10および100のAd-ARETをそれぞれ３，４，５日間感染させ，MTSアッセイを行い，生細胞率を求めた．

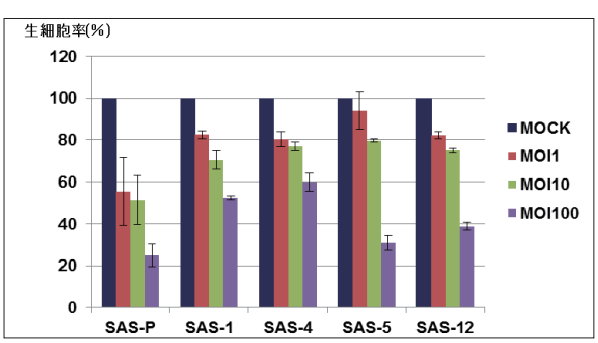


図３　SAS細胞に対するAd-ARET単独処理

SAS細胞のparent株（SAS-P細胞）およびシスプラチン耐性を示すSAS-1，4細胞と感受性を示すSAS-5，12細胞を用いて，MOI 1，10，100のAd-ARETを５日間感染させ，MTSアッセイを行い，生細胞率を求めた．

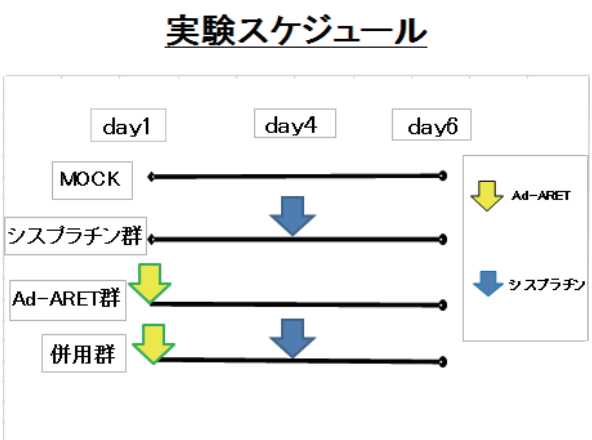


図４　併用実験スケジュール

Ad-ARETとシスプラチンの併用実験のスケジュールを以下の様に決定した．MOCK：何も処理をしていないもの，シスプラチン群：細胞をプレートに播種してから，４日後にシスプラチンで処理し，48時間作用させたもの，Ad-ARET群：細胞をプレートに播種した次の日（24時間後）にAd-ARETを感染させ，５日間作用させたもの，Ad-ARETとシスプラチンとの併用群：細胞をプレートに播種した次の日（24時間後）にAd-ARETを感染させ，３日後にシスプラチンで処理したもの．それぞれの処理が終了後，MTSアッセイを行い，生細胞率を求めた．

のグループに分け，SAS-P細胞，SAS-1細胞，HeLa細胞，A549細胞に対する併用効果の検討をした（図５ａ－ｄ）．その結果，SAS-P細胞およびシスプラチン耐性を示したSAS-1細胞，HeLa細胞，A549細胞においても，Ad-ARET群やシスプラチン群よりもAd-ARETとシスプラチンとの併用群の方が生細胞率が下がり，より多くの細胞死が明らかになり，統計学的にも有意差を認めた．

３）シスプラチン処理によるHuRの局在変化

これまで，様々な抗がん剤処理によりHuRの細胞内での局在が変化することが証明されている[8]．そこで，シスプラチン処理した細胞におけるHuRの細胞内局在変化を検討した．SAS-P細胞にシスプラチン処理をし，８，12時間後細胞を核分画と細胞質分画に分け，HuRタンパク量をウエスタン法を用いて比較した．その結果，核のHuRタンパク量は経時的に減少したが，細胞質のHuRタンパク量は増加した（図６）．この結果より，シスプラチン処理により，HuRが細胞質に多く局在することが明らかになった．

４）シスプラチン処理後のウイルス生産効率

HuRの細胞質局在は，ARE-mRNAの安定化を誘導する．そこで，図６と同様の条件で処理した細胞を用いて，シスプラチン処理後のウイルス生産を検討した．SAS-P細胞およびA549細胞をシスプラチンでそれぞれ４，８，12時間処理し，Ad-ARETの生産効率を検討した．どちらの細胞も，何も処理していないものと比較すると,ウイルスの増殖がみられた（図７ａ，ｂ）．A549細胞では顕著な増加はみられなかったが，SAS-P細胞では大幅にウイルス生産

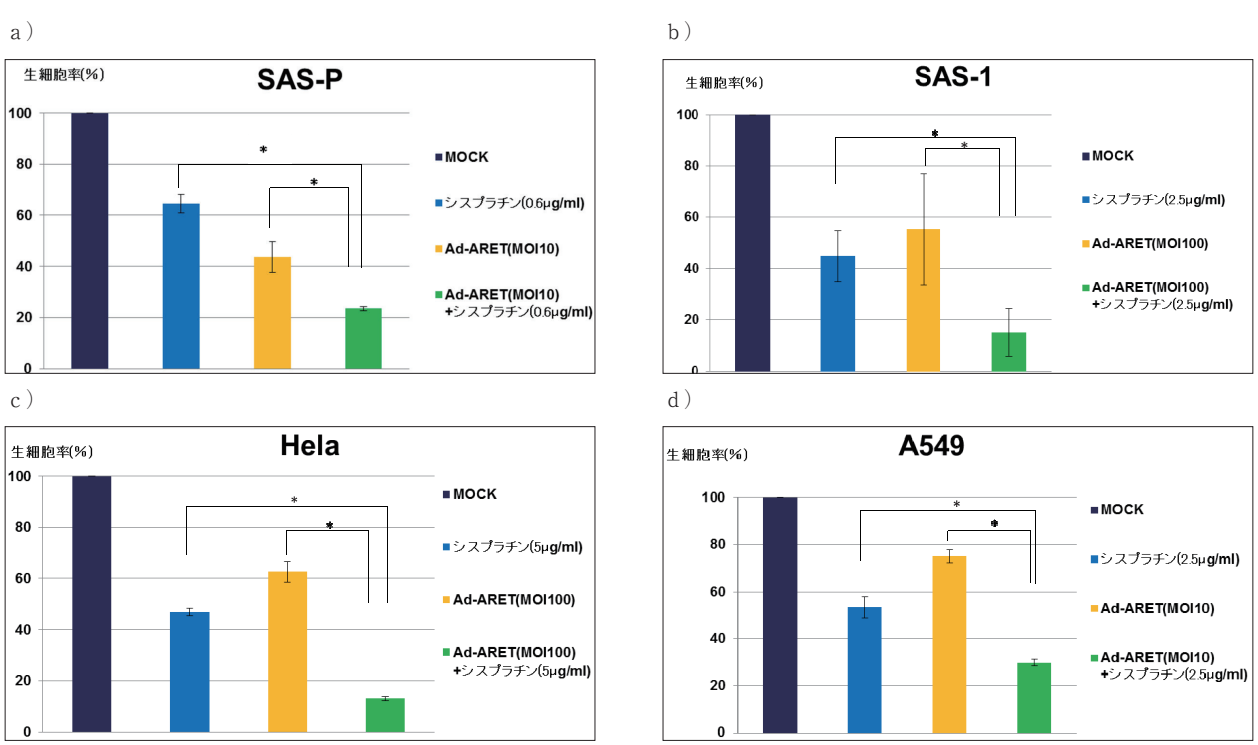


図５　併用実験における生細胞率測定

ａ）SAS-P細胞，ｂ）SAS-1細胞，ｃ）HeLa細胞，ｄ）A549細胞に対し，各図に示したAd-ARET量およびシスプラチン濃度で，図４に示した条件で細胞を処理し，それぞれMTSアッセイを行い，生細胞率を求めた．（*P＜0.05）

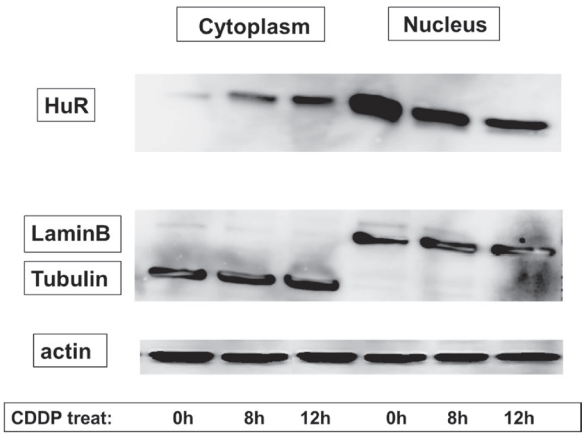


図６　シスプラチン処理によるHuRの核外輸送
SAS-P細胞に対し，シスプラチン0.6μg/mlで８，12時間処理し，細胞を核と細胞質に分離し，各分画のHuRタンパクをウエスタン法で検出した．Laminは核の，Tubulinは細胞質のマーカー．Actinはタンパクのローディングマーカー．

量が増加した．

考　　察

本研究では，がん細胞に対して，腫瘍溶解アデノウイルスAd-ARETが，抗がん剤シスプラチンと併用効果を持つか検討した．その結果，Ad-ARETとシスプラチンを併用して処理したがん細胞は，それぞれを単独で作用させた場合より強い細胞溶解効果を示し，両者の併用効果は高いことが証明された．

さらに，シスプラチンで細胞を処理することにより，細胞質に局在するHuR量が増加することも解明された．この結果は，HuRの核外輸送によりARE-mRNAが安定化されることを示しており，シスプラチン処理細胞ではAd-ARETから発現されるE1A-ARE mRNAが安定化され，その結果ウイルス増殖が促進されることを強く示唆している．本研究で，明らかになったAd-ARETとシスプラチンの併用効果には，このメカニズムが関与していると考えられる．図６において，シスプラチンで12時間処理したものは，８時間処理したものよりもHuRの細胞質への核外輸送が明らかに増加しているのに対し，図７ａ）ではAd-ARETの増加はほとんどみられなかった．これに関して，シスプラチンで処理した細胞においては，ウイルスの増殖に必要なE1A遺伝子が既に十分発現しているため，HuRが増加してもウイルスの増殖にあまり影響はみられなかったと推測される．

抗がん剤治療では，一般的に用量依存的に良好な効果をもたらすことが多いが，がん細胞特異的ではないため正常組織に不可逆的な損傷を引き起こし，その副作用が問題視されている．従って，できるだけ低濃度の抗がん剤使用が臨床のあらゆる状況で望まれている．本研究で示したAd-ARETとシスプラチンの併用効果は，シスプラチンの使用量が少なくても，併用により必要な抗がん作用をもたらすことを示しており，シスプラチンによる副作用を抑制できる可能性を示している．今後さらに両者の併用効果を臨床に応用するための研究が望まれる．

本研究では，シスプラチン抵抗性を持つ細胞にも，Ad-ARETは高い濃度で効果を持つことが解明された（図３）．また，シスプラチン抵抗性を持つ細胞（SAS-1）でも，Ad-ARETとシスプラチンの併用効果が証明された（図５ｂ）．これまで，がん幹細胞はシスプラチンなどの抗がん剤に対して抵抗性を持つことが知られており[9–11]，本研究で使用したSAS-1細胞もがん幹細胞様の性質を持つことが予想される．今後，さらにSAS-1細胞の解析を行い，その研究成果をがん幹細胞に対するAd-ARETとシスプラチンの併用効果に反映できる可能性がある．

近年，ARE-mRNAの核外輸送に関して様々な解析が進み，特に細胞がん化に関して多くの関連が指摘されている．また，HuRを細胞質へ核外輸送させ，ARE-mRNAを安定化する手段に関しても，ヒ素，エタノール，LPS，低

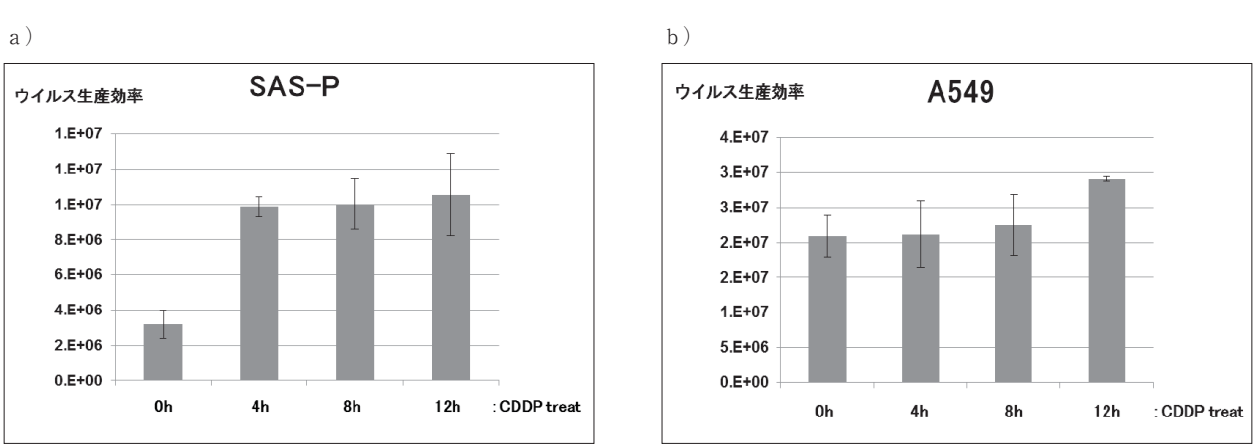


図７　シスプラチン処理によるAd-ARETの生産効率
ａ）SAS-P細胞，ｂ）A549細胞をそれぞれシスプラチン0.6μg/ml，2.5μg/mlでそれぞれ４，８，12時間処理し，Ad-ARETの生産効率を測定した．

酸素，低栄養状態，TNF処理，ウイルスタンパクおよび紫外線照射など様々な処理方法が報告されている[12-15]．本研究では，Ad-ARETとシスプラチンの２種類のみの併用効果を調べたが，上述の様な処理法をさらに検討し，よりHuRが核外輸送される条件を解明できれば，２種類以上の手法の併用ができる可能性があると思われる．

シスプラチンはDNA合成阻害作用を持つ試薬で，シスプラチン処理した細胞ではアポトーシスが誘導される[4, 5]．従って，シスプラチン処理は，アデノウイルスのゲノムDNAにも影響を与える可能性があり，さらにアデノウイルスE1AによりウイルスDNAが複製するG1/G0期からS期への進行を停止させる可能性もあるため[16]，本研究でもAd-ARETの複製に影響が出ることを危惧した．しかしながら，Ad-ARETとシスプラチンとで併用処理した系は，それぞれ単独処理した系よりも高い抗腫瘍効果を示し，本研究では併用処理によってそのような拮抗作用は見られなかった．この理由として，本研究では，先にAd-ARETを感染させてからシスプラチン処理を行ったので（図４），シスプラチンがアデノウイルスの複製時にウイルスゲノムDNAおよび細胞周期に与える影響が少なかったと考察できる．今後，シスプラチンがアデノウイルスの複製に与える影響を検討し，シスプラチンのDNA合成阻害効果を軽減できれば，より効率よくがん細胞を溶解できる可能性がある．

併用処理に関して重要なことは，ウイルス療法と化学療法との間に交差耐性を誘導しないことである[17-20]．アデノウイルスE1Aの発現は，化学療法による細胞傷害の感受性を高める可能性があり，さらに，化学療法が細胞内のウイルス受容体に影響を及ぼした結果，アデノウイルスの増殖を引き起こす可能性も考えられている[21]．今後，DNA複製阻害剤以外の抗がん剤との併用効果ならびに併用処理における細胞死のメカニズムや作用機序に関しても更なる検討が必要である．

結　　論

本研究では，がん細胞に対して，腫瘍溶解ウイルス（Ad-ARET）とシスプラチンを併用処理した方が，それぞれ単独で処理した場合より，高い抗腫瘍効果を持つことが解明された．この併用効果は，シスプラチンに耐性を示す細胞においても同様であった．また，シスプラチン処理により，HuRタンパクが細胞質に核外輸送され，ARE-mRNAが安定化されることにより，Ad-ARETの増加が活性化されることが併用効果の機序であることが示唆された．以上の結果は，Ad-ARETとシスプラチンとの併用療法は有効ながんの治療法であることを示している．

謝　　辞

本稿を終えるにあたり，本研究に数々のご援助，ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座顎顔面外科学教室ならびに口腔病理病態学教室員各位に厚く御礼申し上げます．

参 考 文 献

1） Larson C, Oronsky B, Scicinski J, Fanger GR, Stirn M, Oronsky A, et al : Going viral: a review-selective oncolytic adenoviruses. Oncotarget 6 : 19976-19989, 2015.
2） Chen CY, Shyu AB : AU-rich elements : characterization and importance in mRNA degradation. Trends Biochem Sci 20 : 465-470, 1995.
3） Brennan CM, Steitz JA : HuR and mRNA stability. Cell Mol Life Sci 58 : 266-277, 2001.
4） Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ : Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. J Biol Chem 275 : 39435-39443, 2000.
5） Horky M, Wurzer G, Kotala V, Anton M, Vojtěsek B, Vácha J, Wesierska-Gadek J : Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. J Cell Sci 114 : 663-670, 2001.
6） Licitra L1, Grandi C, Guzzo M, Mariani L, Lo Vullo S, Valvo F, Quattrone P, Valagussa P, Bonadonna G, Molinari R, Cantù G : Primary chemotherapy in resectable oral cavity squamous cell cancer : a randomized controlled trial. J Clin Oncol 21 : 327-333, 2003.
7） Wang D1, Lippard SJ : Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov 4 : 307-320, 2005.
8） Lal S, Burkhart RA, Beeharry N, Bhattacharjee V, Londin ER, Cozzitorto JA, Romeo C, Jimbo M, Norris ZA, Yeo CJ, Sawicki JA, Winter JM, Rigoutsos I, Yen TJ, Brody JR : HuR posttranscriptionally regulates WEE1 : implications for the DNA damage response in pancreatic cancer cells. Cancer Res 74 : 1128-1140, 2014.
9） Basak SK, Zinabadi A, Wu AW, Venkatesan N, Duarte VM, Kang JJ, Dalgard CL, Srivastava M, Sarkar FH, Wang MB, Srivatsan ES : Liposome encapsulated curcumin-difluorinated (CDF) inhibits the growth of cisplatin resistant head and neck cancer stem cells. Oncotarget 6 : 18504-18517, 2015.
10） Li S, Yue D, Chen X, Wang L, Li J, Ping Y, Gao Q, Wang D, Zhang T, Li F, Yang L, Huang L, Zhang Y

: Epigenetic regulation of CD271, a potential cancer stem cell marker associated with chemoresistance and metastatic capacity. Oncol Rep 33 : 425-432, 2015.
11) Zhao Y, Bao Q, Schwarz B, Zhao L, Mysliwietz J, Ellwart J, Renner A, Hirner H, Niess H, Camaj P, Angele M, Gros S, Izbicki J, Jauch KW, Nelson PJ, Bruns CJ : Stem cell-like side populations in esophageal cancer: a source of chemotherapy resistance and metastases. Stem Cells Dev 23 : 180-192, 2014.
12) 黒嶋雄志：アデノウイルス感染によるRNA結合タンパクHuRの制御，北海道歯誌, 33 : 3-9, 2012.
13) McMullen MR, Cocuzzi E, Hatzoglou M, Nagy LE : Chronic ethanol exposure increases the binding of HuR to the TNFalpha 3'-untranslated region in macrophages. J Biol Chem 278 : 38333-38341, 2003.
14) Fan MJ, Huang-Liu R, Shen CY, Ju DT, Lin YM, Pai P, Huang PY, Ho TJ, Tsai FJ, Tsai CH, Huang CY : Reduction of TLR4 mRNA stability and protein expressions through inhibiting cytoplasmic translocation of HuR transcription factor by E_2 and/or ER α in LPS-treated H9c2 cardiomyoblast cells. Chin J Physiol 57 : 8-18, 2014.
15) Zhang J, Bowden GT : UVB irradiation regulates Cox-2 mRNA stability through AMPK and HuR in human keratinocytes. Mol Carcinog 47 : 974-983, 2008.
16) Ben-Israel H, Kleinberger T : Adenovirus and cell cycle control. Front Biosci 1 : 1369-1395, 2002.
17) Goh AR, Shin SP, J ung NR, Ryu CH, Eom HS, Lee JH, Choi K, Lee SJ, Jung YS : Low-dose cisplatin converts the tumor microenvironment into a permissive state for HSVtk-induced antitumor immunity in HPV16-related tonsillar carcinoma. Cancer Lett 356 : 743-750, 2015.
18) Liljenfeldt L, Gkirtzimanaki K, Vyrla D, Svensson E, Loskog AS, Eliopoulos AG : Enhanced therapeutic anti-tumor immunity induced by co-administration of 5-fluorouracil and adenovirus expressing CD40 ligand. Cancer Immunol Immunother 63 : 273-282, 2014.
19) Yamanaka M, Tada Y, Kawamura K, Li Q, Okamoto S, Chai K, Yokoi S, Liang M, Fukamachi T, Kobayashi H, Yamaguchi N, Kitamura A, Shimada H, Hiroshima K, Takiguchi Y, Tatsumi K, Tagawa M : E1B-55 kDa-defective adenoviruses activate p53 in mesothelioma and enhance cytotoxicity of anticancer agents. J Thorac Oncol 7 : 1850-1857, 2012.
20) Ma G, Kawamura K, Li Q, Okamoto S, Suzuki N, Kobayashi H, Liang M, Tada Y, Tatsumi K, Hiroshima K, Shimada H, Tagawa M : Combinatory cytotoxic effects produced by E1B-55kDa-deleted adenoviruses and chemotherapeutic agents are dependent on the agents in esophageal carcinoma. Cancer Gene Ther 17 : 803-813, 2010.
21) Rein DT, Volkmer A, Bauerschmitz G, Beyer IM, Janni W, Fleisch MC, Welter AK, Bauerschlag D, Schöndorf T, Breidenbach M : Combination of a MDR1-targeted replicative adenovirus and chemotherapy for the therapy of pretreated ovarian cancer. J Cancer Res Clin Oncol 138 : 603-610, 2012.

ORIGINAL

Combination effect of oncolytic adenovirus with cisplatin

Toshio Hieda

ABSTRACT : The Oncolytic Adenovirus is an attractive tool for cancer therapy. We developed a new oncolytic adenovirus Ad-ARET including the AU-rich element (ARE) in the 3'-utranslated region (3'-UTR) of the E1A gene. ARE is the RNA element which enhances the rapid decay of mRNAs including those of the genes required for cell growth and proliferation. In the vast majority of cancer cells, the amount of cytoplasmic HuR, which binds to ARE and protects ARE-mRNA from rapid degradation. In this case ARE-mRNA is also up-regulated and stabilized. And the stabilization is co-related with the malignancy of the cancer cells.

Cisplatin demonstrates significant anti-tumor activity against a wide variety of tumors. Since cisplatin may injure normal cells, ineffective drug treatment of cancer tissue causes some side effects. The combination of oncolytic virus and cisplatin can allow the use of a reduced dosage of each reagent, and reduce side effects.

In this study, I examined the combination effect of Ad-ARET with cisplatin using several kinds of cancer cells. In the case of a combined use of Ad-ARET with cisplatin, the cell survival rate of cancer cells was lower compared with those of single treatments. The combined effect was also evident in cisplatin-resistant cells. I found that the cisplatin treatment induced HuR export resulting in up-regulation of Ad-ARET replication through E1A mRNA stabilization. These results indicate that Ad-ARET is possible for combination cancer therapy with cisplatin.

Key Words : Ad-ARET, cisplatin, HuR, ARE-mRNA

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief : Prof. Kanchu Tei) Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan