



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腫瘍溶解ウィルスとシスプラチンとの併用効果の検討
Author(s)	稗田, 敏雄
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12169号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12169
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62229
Type	doctoral thesis
File Information	Toshio_Hieda.pdf



博 士 論 文

腫瘍溶解ウイルスとシスプラチンとの
併用効果の検討

平成 2 8 年 3 月 申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

稗 田 敏 雄

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

〒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)

hieda@den.hokudai.ac.jp 090-7222-4428 内線 PHS 88507

キーワード：Ad-ARET, シスプラチン, HuR, ARE-mRNA

略題：腫瘍溶解ウイルスとシスプラチンとの併用効果

本文原稿枚数： 27 枚

表枚数： 0 枚

図枚数： 11 枚

写真枚数： 0 枚

必要別刷数： 50 部

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. (Mikawa Y, 投稿中)

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°C, 5%CO₂ 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)

CellTiter96® 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, 20 μ g/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 穴プレートに 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. ウェスタン法

SAS-P 細胞をシスプラチン 0.6 μ g/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 MgCl₂ /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 gelectrophoresis (SDS-PAGE)にて展開後, PVDF 膜 (polyvinylidene 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 0.6 μ g/ml, A549 細胞をシスプラチン 2.5 μ g/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™ Rapid Titer Kit(Takara, Japan)を用いてヘキソント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 $\pm$ 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(0~20 μ g/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.

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 5 a-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 タンパク量をウェ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 7 a, 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 7 a)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 5 b)。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。

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:
19976-89, 2015.
- 2) Chen CY, Shyu AB: AU-rich elements: characterization and importance in
mRNA degradation, *Trends Biochem Sci* 20: 465-70, 1995.
- 3) Brennan CM, Steitz JA: HuR and mRNA stability, *Cell Mol Life Sci* 58:
266-77, 2001.
- 4) Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ: Requirement for ERK activation in
cisplatin-induced apoptosis, *J Biol Chem* 275: 39435-43, 2000.
- 5) Horky M, Wurzer G, Kotala V, Anton M, Vojtěšek B, Vácha J, Wesierska-Gadek J:
Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in
cisplatin-treated HeLa cells, *J Cell Sci* 114: 663-70, 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: 327-33, 2003.
- 7) Wang D1, Lippard SJ: Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat Rev*

Drug Discov 4: 307-20, 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: 1128-40, 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: 18504-17, 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: 425-32, 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: 180-92, 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: 38333-41, 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 E₂ 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: 974-83, 2008.
- 16) Ben-Israel H, Kleinberger T: Adenovirus and cell cycle control, *Front Biosci* 1: 1369-1395, 2002.
- 17) Goh AR, Shin SP, Jung 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: 273-82, 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: 1850-7, 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: 803-13, 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: 603-10, 2012.

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．

図説

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, 20 $\mu\text{g/ml}$)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.

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。

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0.6 μ g/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タンパクをウェ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。

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0.6 μ g/ml, 2.5 μ g/mlでそれぞれ

れ 4, 8, 12 時間処理し, Ad-ARET の生産効率を測定した.

Combination effect of oncolytic adenovirus with cisplatin

Toshio Hieda

ABSTRACT : Oncolytic adenovirus is an attractive tool for cancer therapy. We developed a new oncolytic adenovirus Ad-ARET including AU-rich element (ARE) in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of 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, up-regulated and ARE-mRNA is stabilized. And the stabilization is co-related with the malignancy of the cancer cells.

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

In this study, I examined the combination effect of Ad-ARET with cisplatin using several kinds of cancer cells. In the case of combined use of Ad-ARET with cisplatin, the cell survival rate of cancer cells were lower compared with those of single treatments. The combined effect was also evident in cisplatin-resistant cells. I found that

cisplatin treatment induced HuR export and resulting in up-regulation of Ad-ARET replication through E1A mRNA stabilization. These results indicate that Ad-ARET is available for the combination cancer therapy with cisplatin.

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

図1

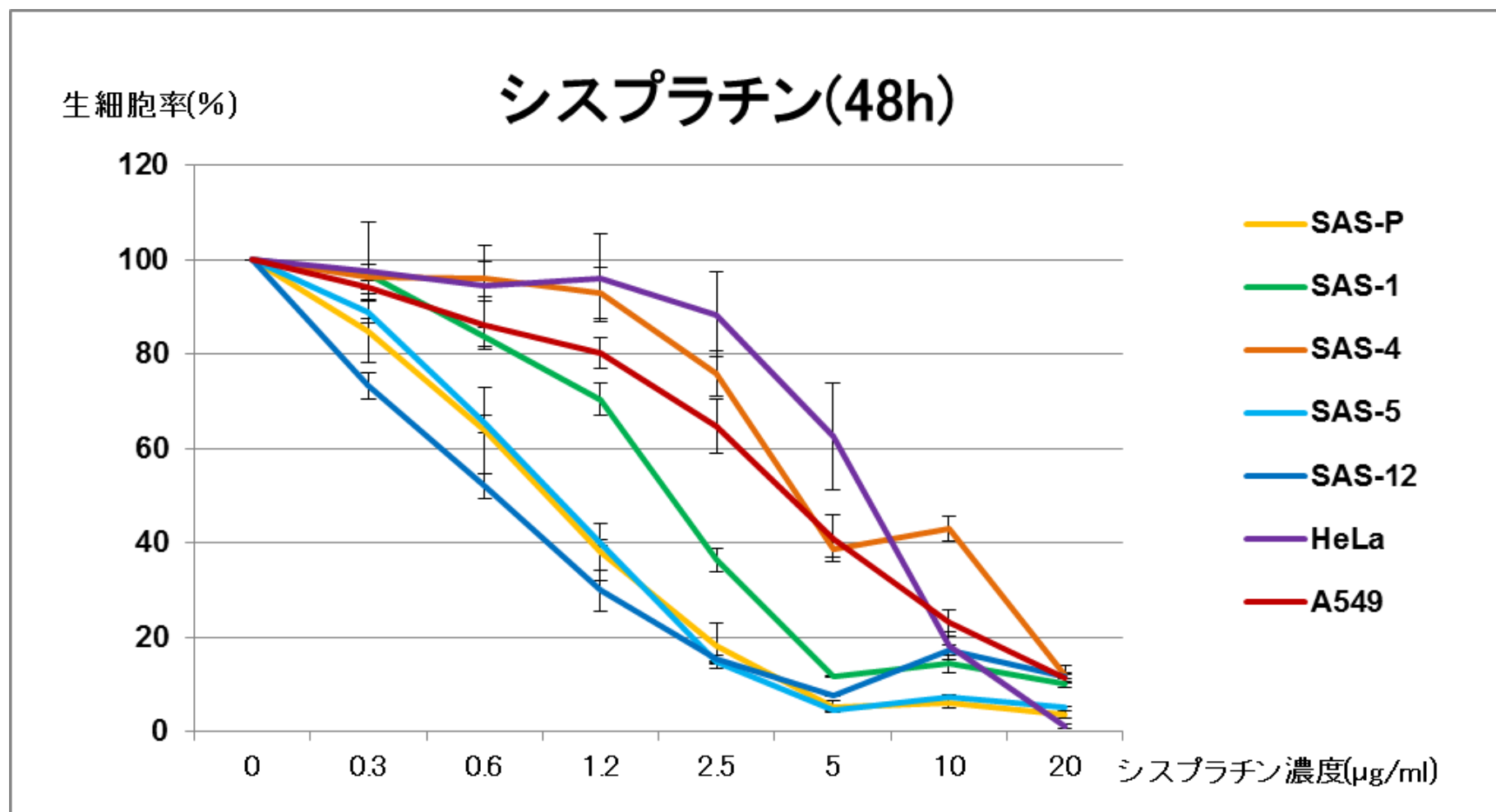


図2

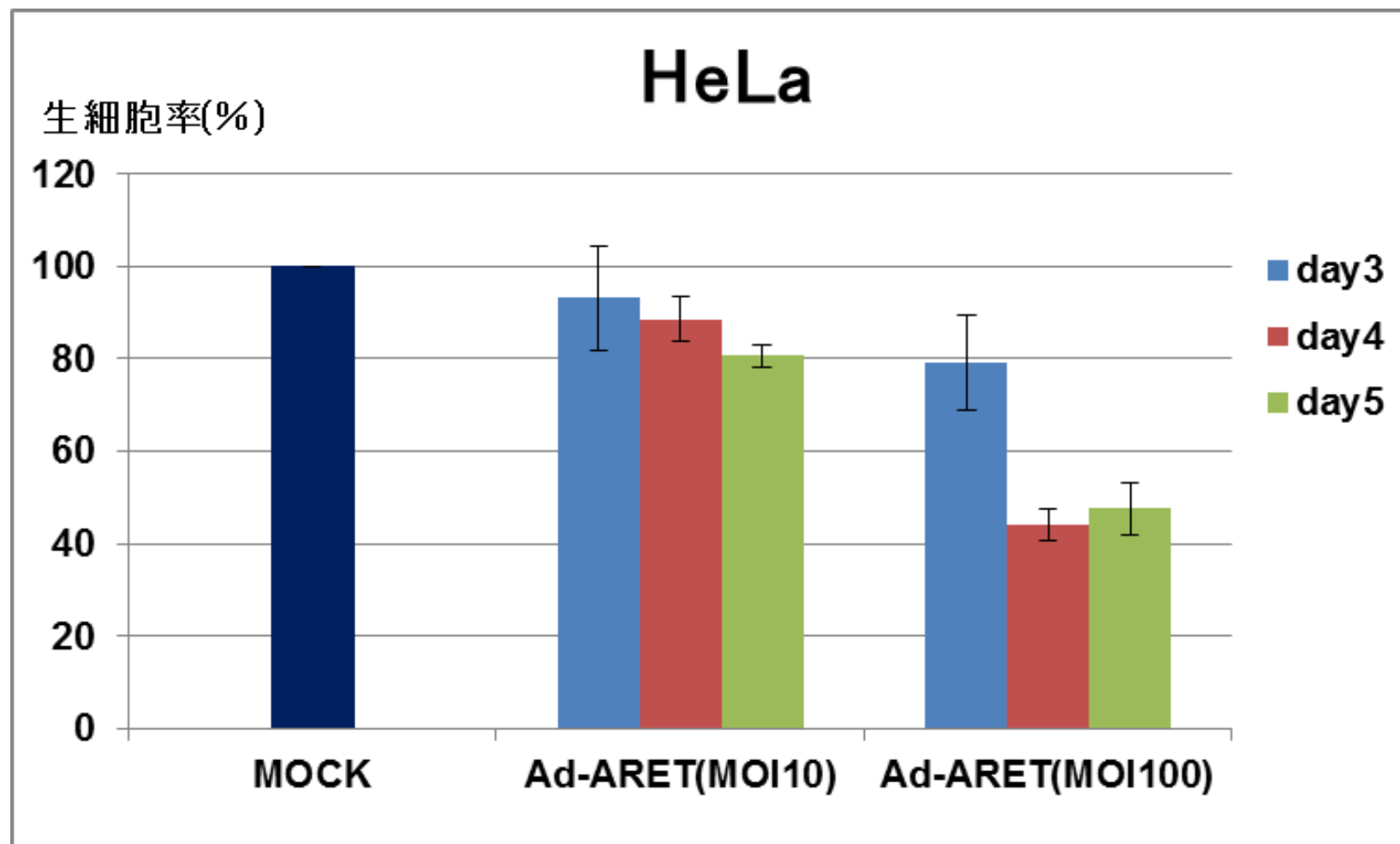


図3

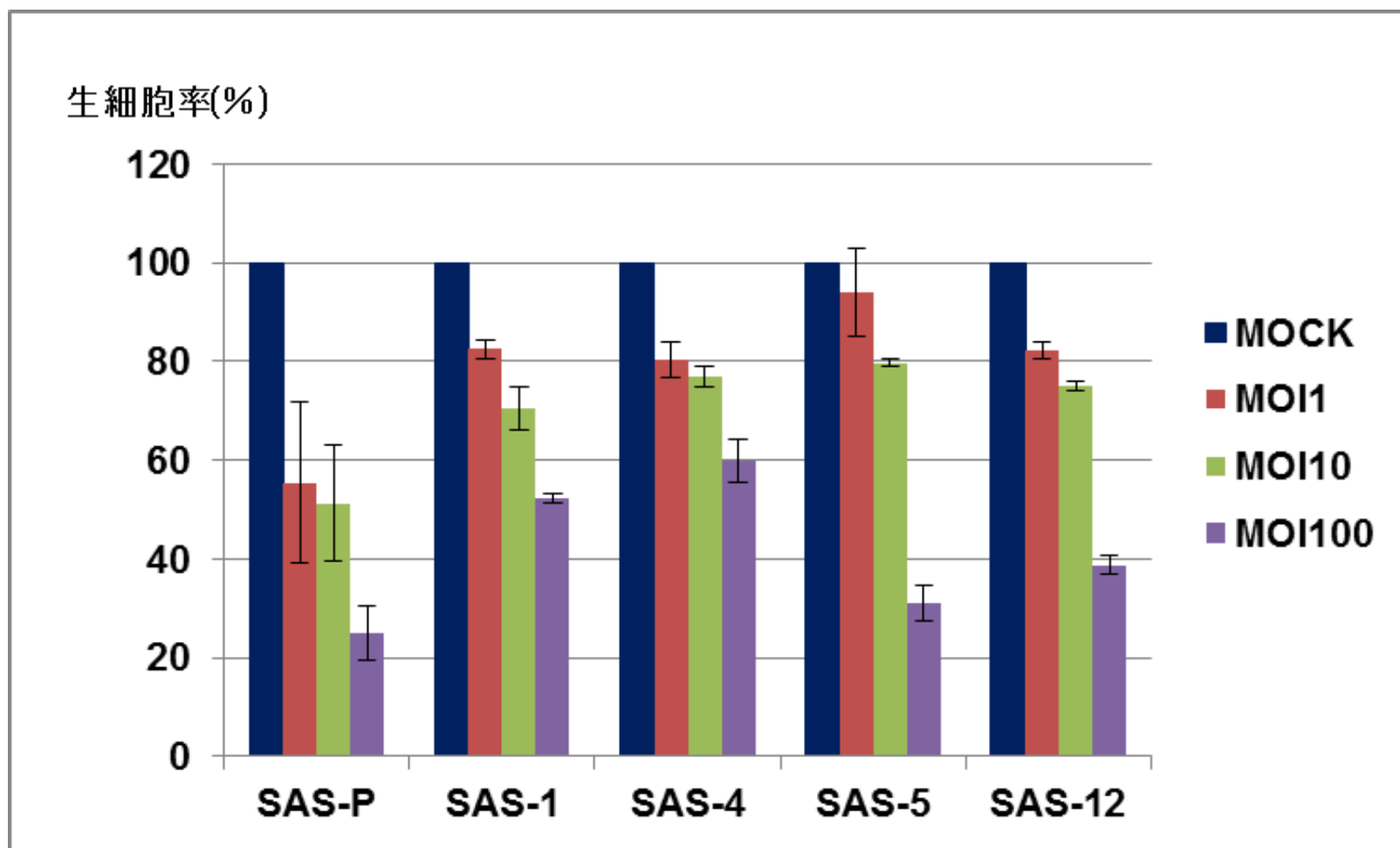


図4

実験スケジュール

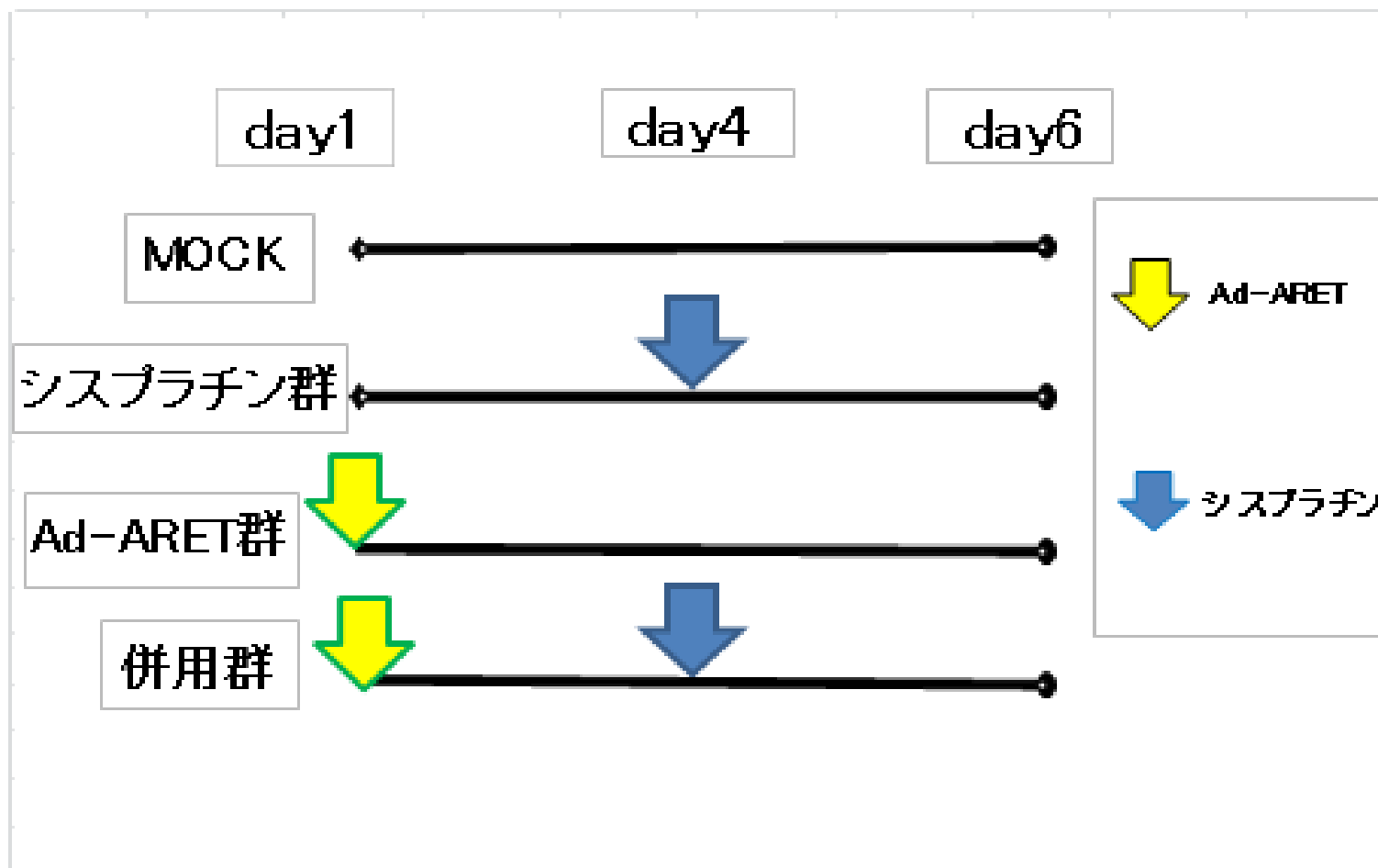


図5 a)

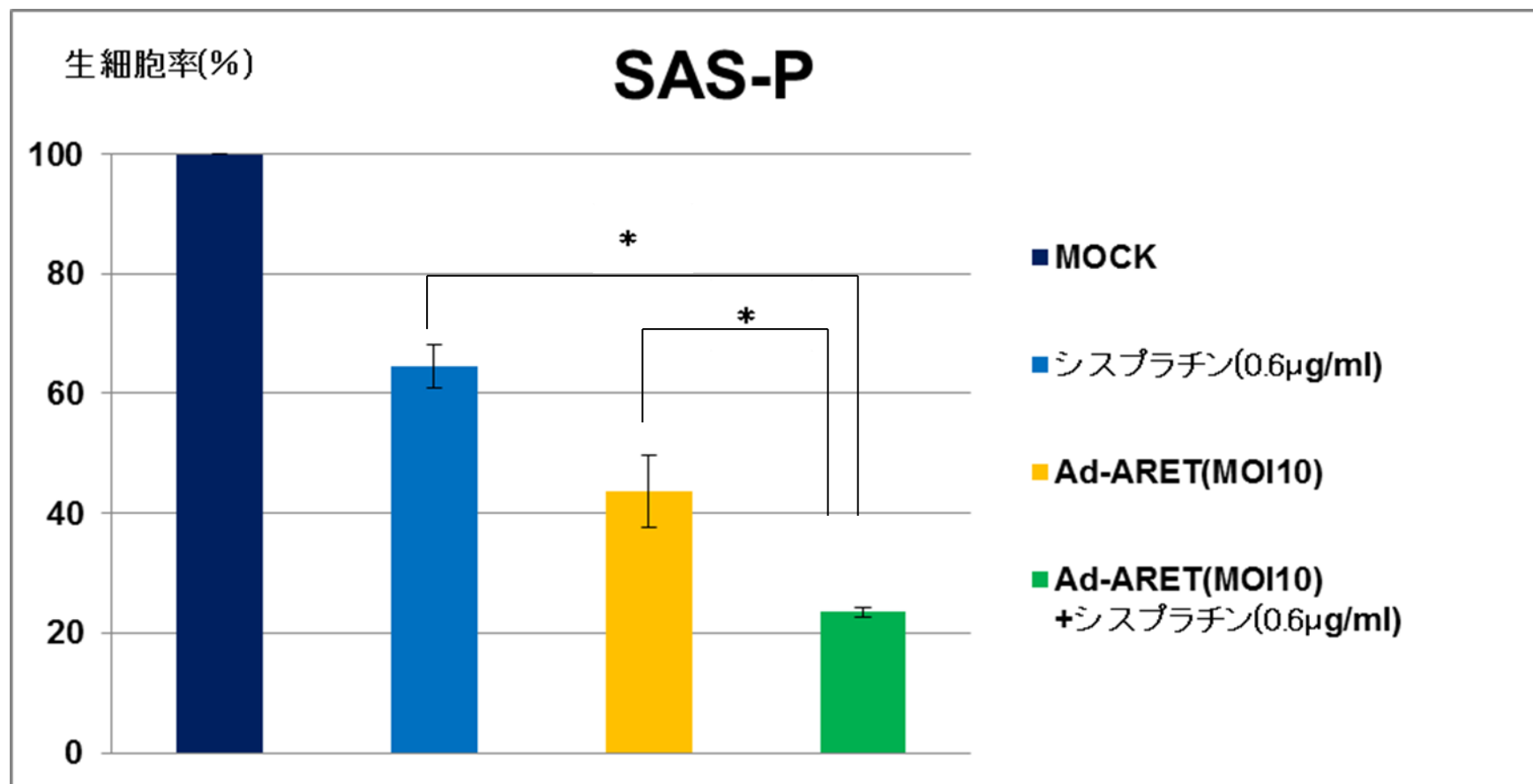


図5 b)

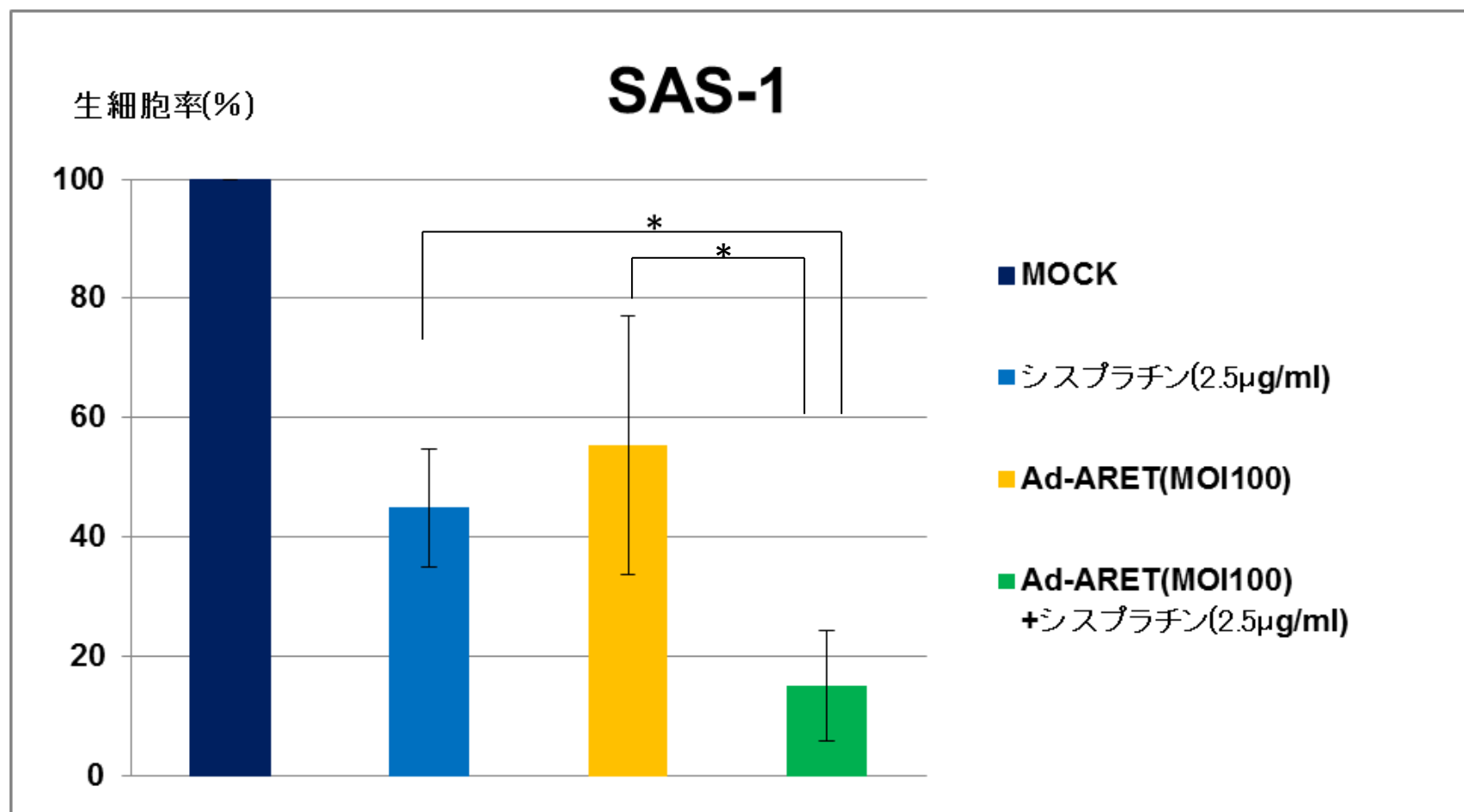


図5 c)

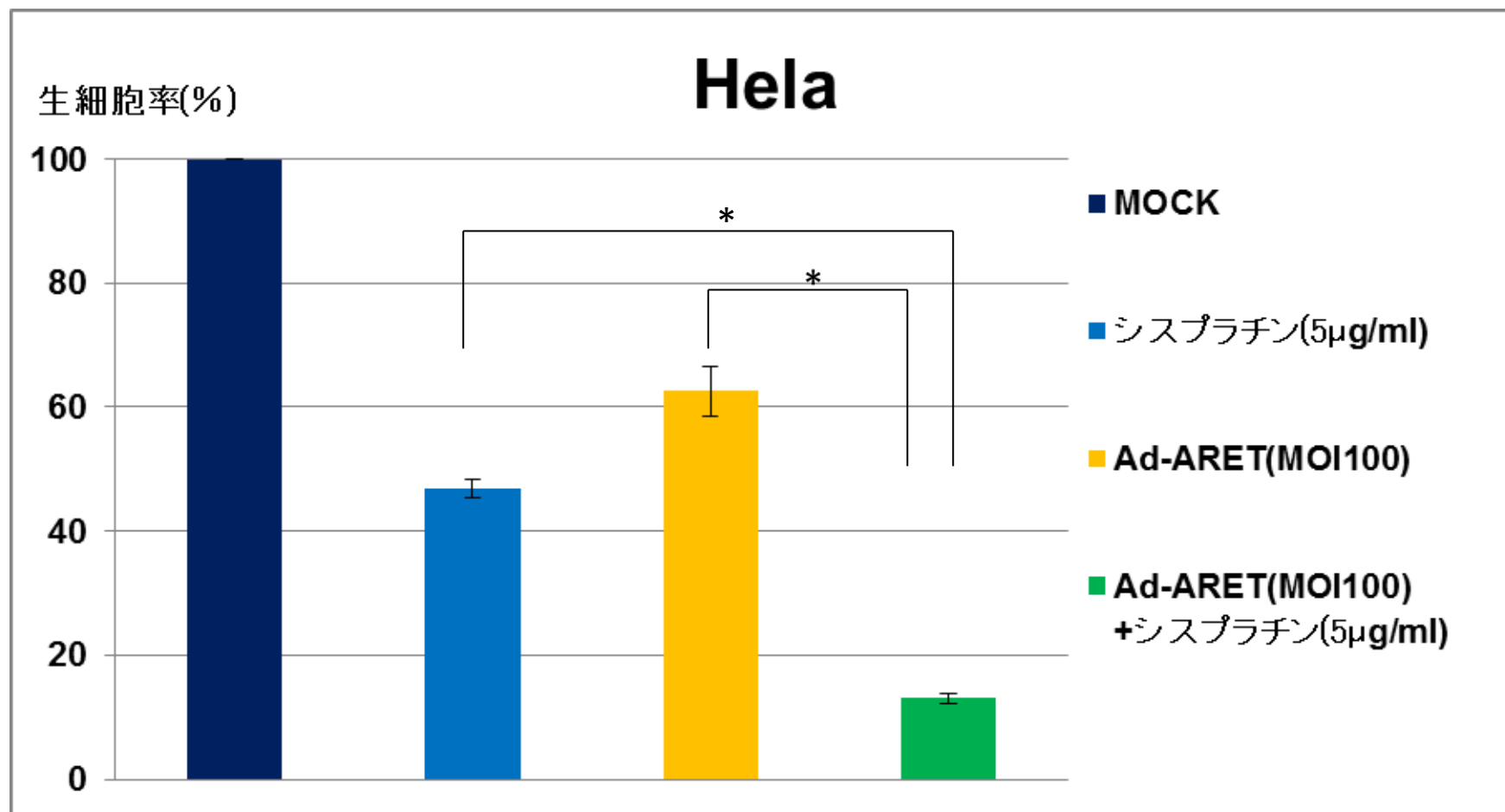


図5 d)

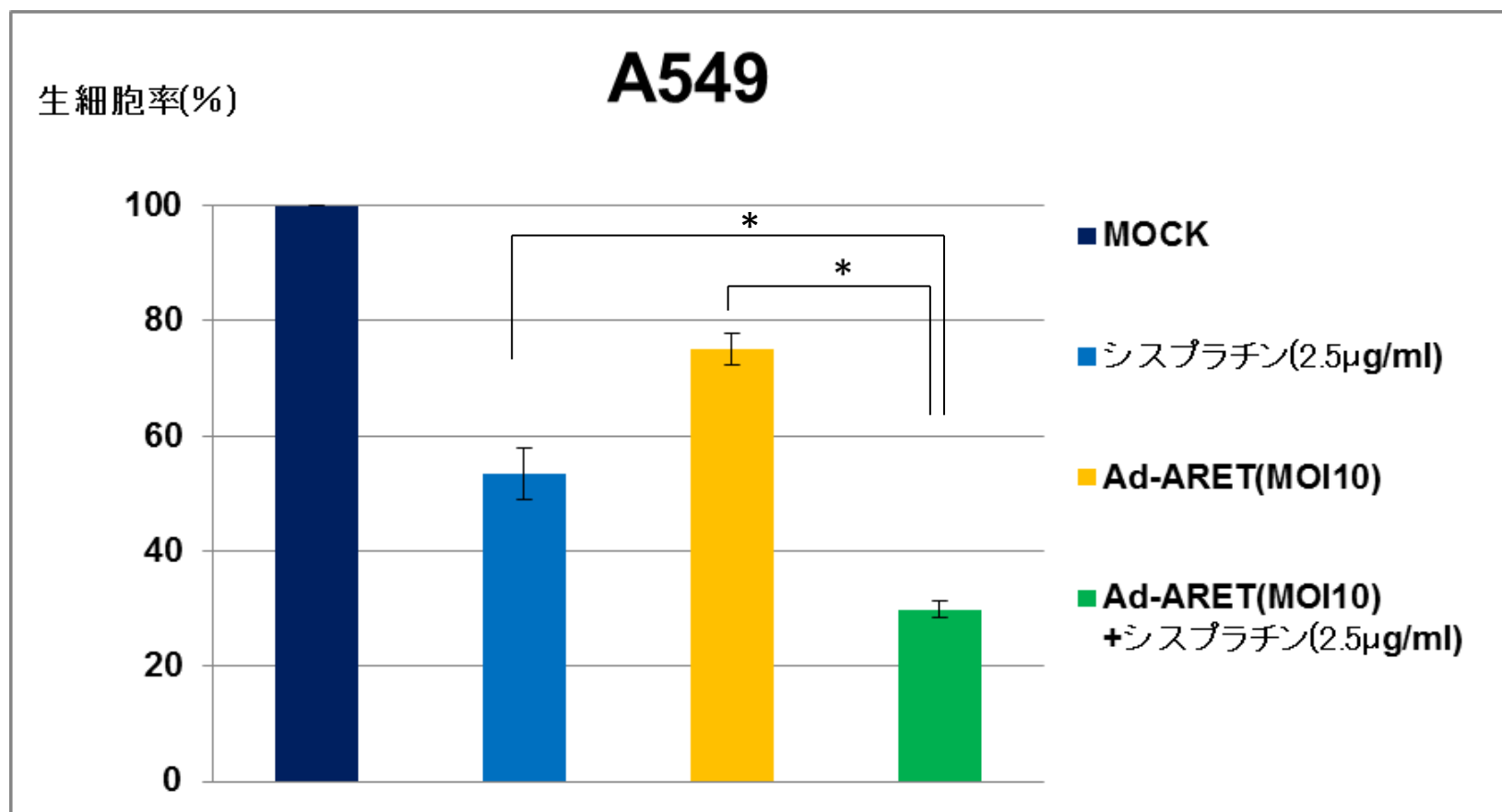


图6

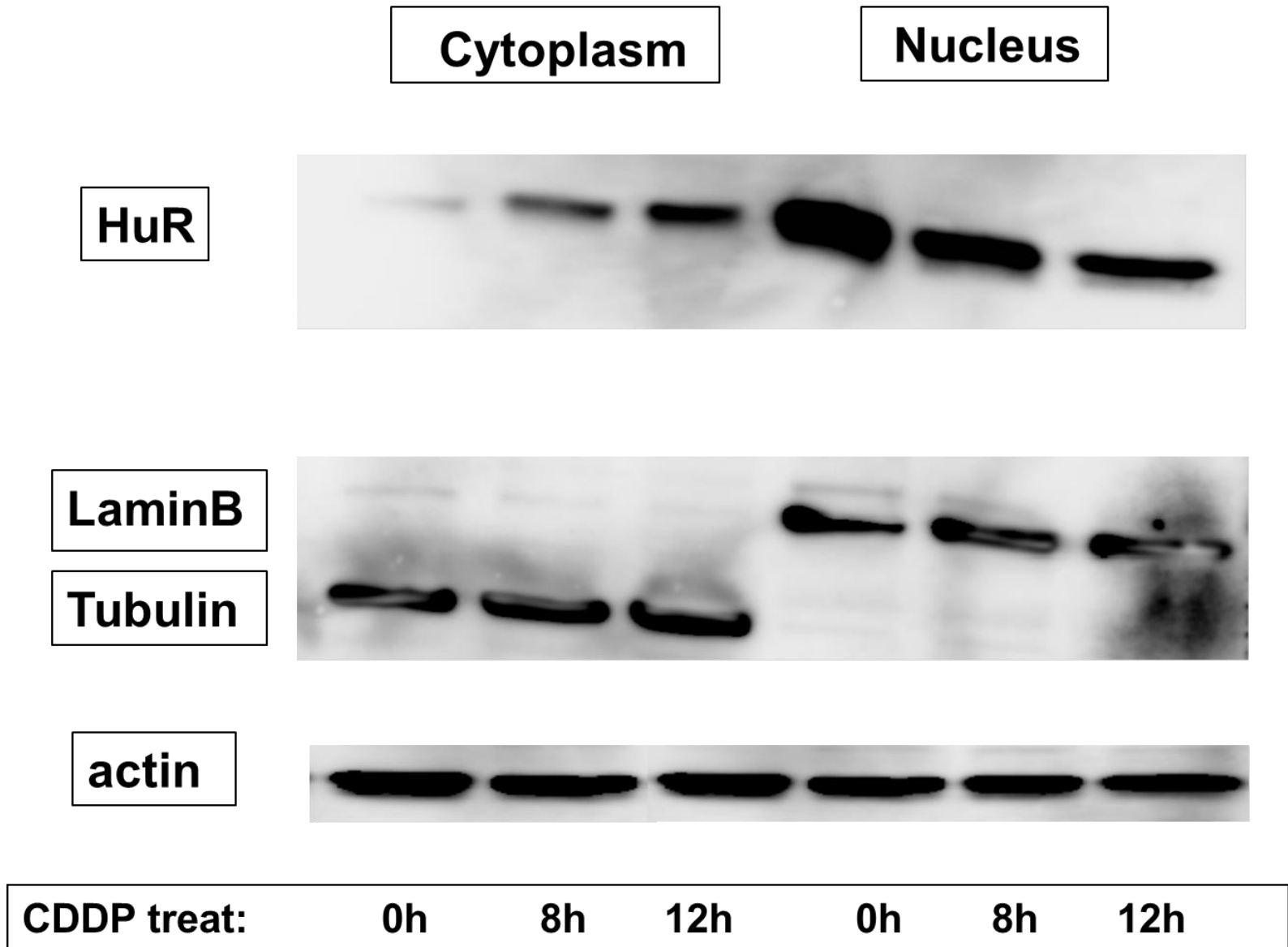


図7 a)

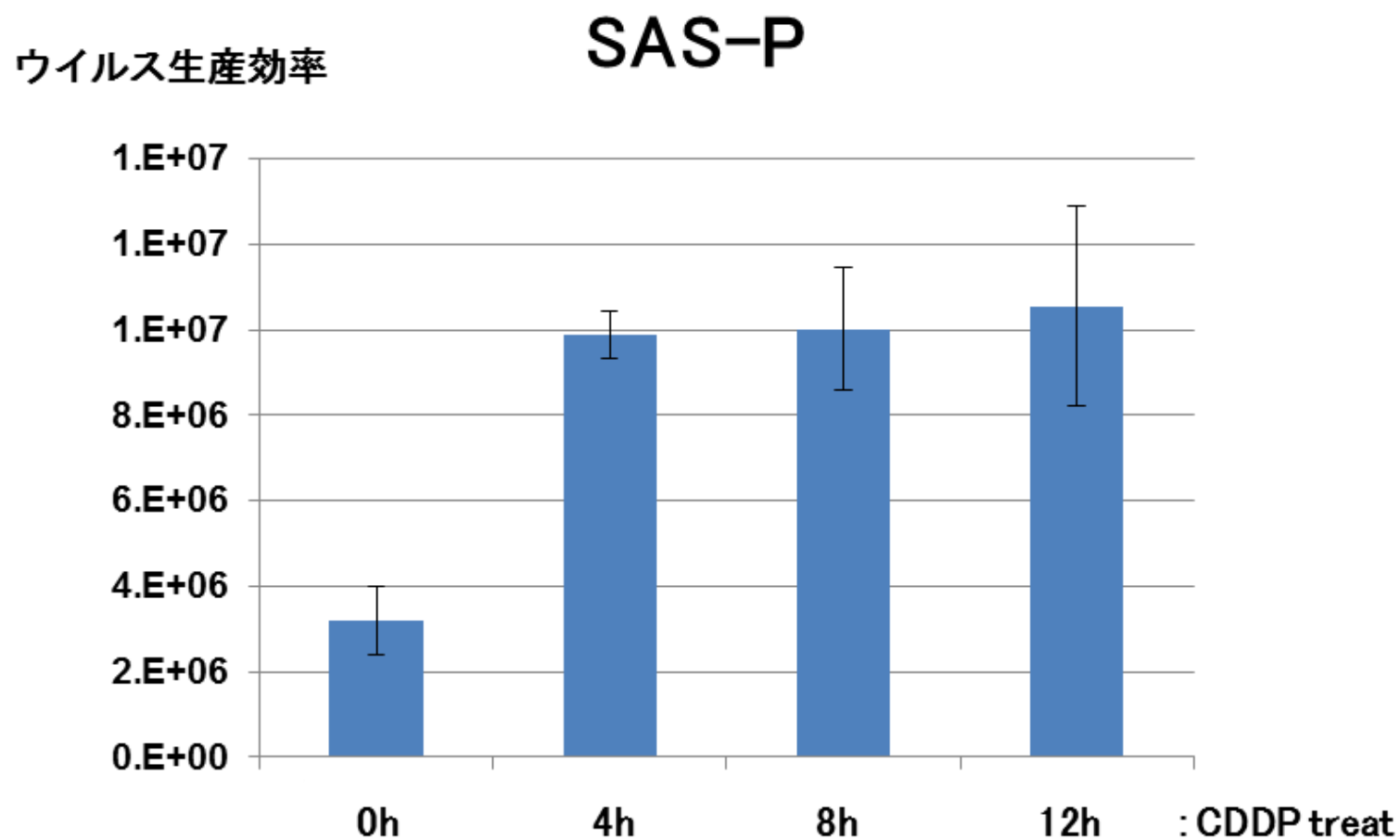


図7 b)

ウイルス生産効率

A549

