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［論文内容及び審査の要旨］
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
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62230
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Toshio_Hieda_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　稗　田　敏　雄

学　位　論　文　題　名
腫瘍溶解ウイルスとシスプラチンとの併用効果の検討

【緒言】

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．腫瘍溶解ウイルスによるがん治療は，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いる．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, oncogene や cytokine などの遺伝子から転写される mRNA の非翻訳領域に存在する. 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.

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，様々ながんの治療に最も一般的に使用される抗がん剤の一つである.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．

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を用いた．

２. 腫瘍細胞

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．

３. 細胞増殖アッセイ (MTS assay)

① 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 reagent を加えて 4 時間反応させてから, Benchmark microplate reader を用いて 490nm で吸光度を測定した．

② 次に, HeLa 細胞に, MOI10 vp/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，吸光度を測定した．

③ SAS-P 細胞, SAS-1 細胞, HeLa 細胞, A549 細胞に, 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，吸光度を測定した．

４. ウエスタン法

SAS-P 細胞をシスプラチン 0.6μg/ml で 8, 12 時間処理した. Fractionation buffer を加えて細胞質分画と核分画に分けた．細胞分画は SDS-PAGE にて展開後，PVDF 膜に転写した．一次抗体として, HuR, β-Tubulin, laminB, β-actin の抗体を用

い, HRP が結合した二次抗体で処理し, SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate にて発光させた.

５. ウイルス生産効率測定

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.

【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

すべての細胞で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, 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. 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, 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. 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

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 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 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. 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

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．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

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．

【考察】

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.

また, シスプラチン抵抗性を持つ細胞でも, Ad-ARET とシスプラチンの併用効果が証明された.

【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.