



Title	腫瘍溶解ウイルスと5-FUとの併用効果の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	金山, 純一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13055号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70714
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Junichi_Kanayama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 金 山 純 一

学 位 論 文 題 名 腫瘍溶解ウイルスと 5-FU との併用効果の検討

化学療法はがんに対する一般的な治療法の一つであり、これまでに優れた治療効果をもたらしてきた一方で、治療抵抗性を示すがんに対しては十分な効果が得られない場合もある。また、抗がん剤の濃度を上げると、治療効果は期待できるが、様々な副作用を引き起こすリスクも上がり、患者の QOL を考慮すると可及的に低濃度での使用が望ましい。そこで、高濃度の抗がん剤と同等の効果をを得るために、様々な治療法との併用が考えられている。

近年、新たながん治療法として注目されている腫瘍溶解ウイルスは、がん細胞で効率よく増殖し細胞を溶解でき、かつ正常細胞ではほとんど増殖することができないため、副作用のリスクを低減しつつ高い治療効果が期待できる。我々は、AU-rich element (ARE) を持つ mRNA の安定化システムに着目し、ARE-mRNA が安定化されているがん細胞で効果的に増殖できる腫瘍溶解アデノウイルスを抗腫瘍ウイルスとして応用した。ARE は、アデニンとウラシルに富んだ RNA element で、*c-fos*, *c-myc*, *GM-CSF* 等の oncogene や cytokine 等、細胞の増殖に関わる多くの遺伝子から転写される mRNA の非翻訳領域に存在する。ARE は mRNA の分解シグナルで、ARE-mRNA は、通常合成後すぐに分解されるが、ストレスなどで一時的に核外輸送され、安定化される。一方、これまでに、多くの種類のがん細胞では、ARE-mRNA が恒常的に核外輸送及び安定化されることが多くの研究グループから報告されている。この ARE-mRNA の核外輸送・安定化には、RNA 結合タンパク HuR が ARE に結合することが重要で、がん細胞では HuR タンパクが恒常的に細胞質に局在し、正常細胞ではほとんど核のみに HuR が存在している。

我々は、アデノウイルス E4orf6 が、HuR などのタンパクと結合することにより ARE-mRNA を核外輸送・安定化し、この安定化がウイルスの増殖に必須であることを解明した。本研究で用いた変異型アデノウイルス dl355 は、E4orf6 を欠

失しており、正常細胞では ARE-mRNA を核外輸送・安定化できないためウイルスはほとんど増殖できないが、がん細胞ではあらかじめ ARE-mRNA が核外輸送・安定化されているため、このウイルスは増殖でき、結果として細胞を溶解することができる。

一方、5-Fluorouracil (5-FU) は、頭頸部がん、乳がん、結腸・直腸がん等、様々な固形がんの治療に広く使用されている抗がん剤の一つである。頭頸部がんにおいては、一般的に導入化学療法、化学療法・放射線治療同時併用療法、および初回治療後の維持化学療法として用いられているが、口内炎、骨髄抑制、腎機能障害等の副作用が報告されている。作用機序としては、5-FU が、ウラシルと同じ経路で代謝を受けて F-deoxy UMP を生じ、チミジル酸合成酵素上で deoxy UMP と拮抗してチミジル酸合成を抑制することにより、DNA 合成を阻害する。従って、正常細胞に対しても同様の効果を持つため、副作用が大きな問題点となっている。

本研究では、d1355 と 5-FU との併用効果を解明するために、各種がん細胞に対して、d1355 単独、5-FU 単独、および両者併用でそれぞれ細胞を処理し、各処理で誘導される細胞死を比較検討した。また、抗がん剤シスプラチンに耐性を持つ口腔がん細胞に対しても、各処理により同様の効果が見られるか検討した。さらに、5-FU 処理による HuR タンパクの局在変化を調べ、d1355 の増殖が促進されるメカニズムについても検討した。

HeLa 細胞に対する 5-FU の効果を確認するために、様々な濃度の 5-FU を添加し、72 時間後の生細胞を測定し、細胞生存率を決定した。その結果、HeLa 細胞は 5-FU に対して感受性を示し、用量依存性に細胞数が減少した。

次に、HeLa 細胞を 5-FU で、様々な時間処理した後に、細胞を核と細胞質に分離し、細胞質分画の HuR タンパク量をウェスタンブロッティング法で比較した。その結果、5-FU で処理していない細胞の細胞質 HuR の量と比較して、処理した細胞では、細胞質の HuR タンパク量が、5-FU 処理 30 分後から増加し、それ以降も少なくとも 24 時間後まで増加し続けた。また、同様の条件で処理した HeLa 細胞を用い、免疫細胞染色法を用いて、HuR タンパクの局在を確認した。その結果、ウェスタン法で得られた結果と同様に、5-FU 処理を行った 30 分後から、HuR の細胞質局在が観察できた。この結果より、5-FU 処理により、早期に HuR の細胞質局在が促進され、その後も、この局在が維持されることが明らかになった。

HeLa 細胞、シスプラチンに耐性を持つ口腔扁平上皮がん細胞株、SAS-4 細胞、およびシスプラチン感受性株、SAS-5 細胞を用い、腫瘍溶解アデノウイルス単独、5-FU 単独もしくは両者併用で処理し、XTT アッセイおよび CPE アッセイにより細胞死を検討した。HeLa 細胞を用いた検討では、d1355 単独ではあまり効果が認められなかったが、5-FU 単独処理では細胞数が半分以上に減少し、両者を併用

した場合、さらに大幅に細胞数が減少した。また、SAS-4 細胞を用いた検討でも、d1355 単独、5-FU 単独処理で、それぞれ細胞数が半分程度に減少し、両者を併用した場合、さらに大幅に細胞数が減少した。さらに、SAS-5 細胞を用いた検討では、d1355 単独では細胞数が 40%程度に減少し、5-FU 単独処理では細胞数が 10%程度に減少し、両者を併用した場合、さらに細胞数が減少した。なお、併用効果の細胞数減少は、統計学的にも有意な差を認めた。また、同様の細胞を用いて、各処理による細胞死活性を CPE assay で検討した。その結果、上述の XTT assay の結果と同様に、d1355 単独処理や、5-FU 単独処理では細胞死活性が低かったが、併用処理により生細胞がほとんど消失し、d1355 の持つがん細胞溶解効果が活性化された。これらの結果は、がん細胞、シスプラチン耐性がん細胞やシスプラチン感受性がん細胞でも、d1355 と 5-FU の併用は、腫瘍溶解に有効であることを示しており、d1355 と 5-FU を併用した場合、協調的にがん細胞に対する d1355 の腫瘍溶解効果が上昇することを示している。

本研究により、がん治療に対して、腫瘍溶解アデノウイルス d1355 と抗がん剤 5-FU との併用が有効であることが明らかになった。d1355 の腫瘍溶解効果促進の理由として、5-FU 処理によって、HuR 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 d1355 がより増殖し、細胞溶解効果が上昇したと考えられる。また、本研究では、シスプラチン耐性口腔がん細胞でも、これらの併用効果が有効であることが明らかになった。この結果は、腫瘍溶解アデノウイルスと 5-FU との併用療法は、シスプラチンなどに対して耐性を持つ口腔がんに対する有効ながん治療法となる可能性を示している。