



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	mRNAの安定化機構を応用した新しい腫瘍溶解アデノウイルスの開発と解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	加藤, 泰史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13873号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78641
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasushi_Kato_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 加 藤 泰 史

学 位 論 文 題 名

mRNA の安定化機構を応用した新しい腫瘍溶解アデノウイルスの開発と解析

キーワード（5つ） 腫瘍溶解ウイルス, HuR, AU-rich element (ARE), E1A, TNF- α

多くのがん細胞では, AU-rich element (ARE) を持つ mRNA が核外輸送され安定化されることが知られている. ARE は mRNA の分解を促す RNA エLEMENT で, 細胞の増殖に必要な多くの遺伝子から転写される mRNA に存する. ARE-mRNA は ARE に結合する RNA 結合タンパクによりその分解や安定化が制御される. HuR は embryonic lethal abnormal vision (ELAV) family に属する RNA 結合タンパクの一種で, ARE に結合することにより ARE-mRNA の核外輸送と安定化に寄与することが知られており, ARE-mRNA が安定化しているがん細胞では, 細胞質中の HuR 発現量も上昇している. 我々はアデノウイルスの増殖に必須の E1A 遺伝子の 3'非翻訳領域 (3'-UTR) に TNF- α の ARE を組み込んだ腫瘍溶解アデノウイルス (AdARET) を開発した. AdARET を感染させたがん細胞では, ARE を持つ E1A mRNA が安定化され, がん細胞特異的

にウイルスが増殖する。一方、ARE-mRNA の安定化機構の備わっていない正常細胞ではその増殖が制限される。本研究では、AdARET の持つ腫瘍溶解効果を検証し、さらに ARE-mRNA の安定化を促進し、AdARET の効果を増強させる因子として TNF- α との併用効果を検討することを目的とした。

本研究では、がん細胞および正常細胞に AdARET を感染させ、アデノウイルスの増殖に必須の E1A タンパクの発現について検討を行なった。その結果、E1A はがん細胞で高レベルで発現し、正常細胞ではほとんど発現を認めなかった。また、がん細胞では正常細胞よりも多くのウイルス増殖を認め、ウイルスの生産効率もがん細胞の方が高いことが明らかになった。さらに、AdARET による細胞溶解効果もがん細胞の方が正常細胞よりも高く、AdARET の感染濃度依存的に腫瘍溶解効果の増強を認めた。一方、正常細胞ではウイルス感染濃度を高くしても、細胞死をほとんど認めなかった。以上の結果から、AdARET はがん細胞特異的に増殖し、腫瘍溶解効果を発揮することが示された。

がん細胞周囲には、マクロファージや樹状細胞、好中球などの炎症性細胞が存在し、それらの細胞から IL-1 β や TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインが分泌されていることが知られている。これまでに TNF- α や IL-1 β 刺激により、細胞質中の HuR 発現量が上昇することが報告されているので、これらの炎症性サイトカインが AdARET の効果を増強できるか検討した。HeLa 細胞を IL-1 β で

刺激すると細胞質中の HuR の発現量上昇は認めなかったが、TNF- α の刺激により HeLa 細胞や口腔がん細胞の HSC-2 の細胞質 HuR の発現量が上昇した。そこで、HeLa 細胞、HSC-2 細胞を用いて、AdARET と TNF- α との併用効果を検討した。その結果、AdARET 単独よりも、TNF- α との併用の方が、高い細胞溶解活性を認め、TNF- α が AdARET の腫瘍溶解効果を増強させる因子であることが明らかになった。

これらの研究結果は、AdARET はがん細胞特異的に溶解効果を持ち、また周囲に炎症を伴うがんではよりその効果が増強されることが示唆された。腫瘍溶解ウイルスを生体に使用する場合、安全性の観点からより低濃度で作用させることが望ましい。AdARET は TNF- α と併用することにより、より安全に使用できる可能性が示された。今後、ほかの腫瘍溶解ウイルスとの比較、動物を用いた *in vivo* の実験などを行い、さらに AdARET の腫瘍溶解効果を確立する必要がある。