



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 加 藤 泰 史

主査 教授 樋 田 京 子
審査担当者 副査 教授 北 川 善 政
副査 准教授 東 野 史 裕

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

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。その内容を以下に記す。

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エレメントで、細胞増殖に必要な多くの遺伝子から転写されるmRNAに存在する。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ている。

RNA結合タンパクの一種であるHuRは、AREに結合し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。

我々は最近、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が安定化されるため、AdARET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、E1A mRNAが分解されるため、AdARETの増殖が制限されることが予想された。また、がん微小環境には、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、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ため、がん微小環境ではAdARETの効果が増強されることが予想された。

本研究では、AdARETの持つ腫瘍溶解効果を検証し、さらに炎症性因子TNF- α によるAdARETの効果増強の有無を検討することを目的とした。

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。

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の抗腫瘍効果におけるTNF- α の作用を検討した。その結果、AdARET単独よりも、TNF- α 併用により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を示唆している。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。本研究より、AdARETはTNF- α が存在するがん微小環境で特異的に、腫瘍溶解効果を示す可能性が示された。

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。

審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下にその項目を記す。

- (1) 腫瘍溶解ウイルスの副作用
- (2) 実用化された際の炎症による腫瘍溶解効果の増強
- (3) HuRの核外輸送のメカニズム
- (4) BJ細胞へのTNF- α 以外のサイトカイン刺激によるHuRの核外輸送の有無
- (5) 臨床応用に向けた今後の展望

本研究の結果は、がん研究において重要な基礎科学的情報を提供しており、また、学術的にも高く評価されたと考えられた。加えて、上記の質疑応答から、申請者は本研究内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された。

以上のことから、審査担当者全員は学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認めた。