HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腫瘍溶解ウイルスと5-FUとの併用効果の検討
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13055
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89184
Type	doctoral thesis
File Information	Junichi_Kanayama.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

腫瘍溶解ウイルスと 5-FU との併用効果の検討

平成３０年３月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

金　山　純　一

抄　　録

【背景】化学療法はがんに対する一般的な治療法の一つである．今日，広く用いられている抗がん剤であるシスプラチンや5-FUは，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治療効果が得られない．また，高濃度の抗がん剤は治療効果を上げることができるが，様々な副作用を引き起こすリスクも上がるため，副作用による患者のQOLの低下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得るために，様々な治療法との併用が行われている．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いる．腫瘍溶解ウイルスは正常細胞にほとんど傷害を与えず，がん細胞でより特異的にウイルスが増殖するため，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．本研究では，がん細胞に対する腫瘍溶解アデノウイルスと抗がん剤5-FUとの併用療法の効果について検討を行った．

【材料と方法】HeLa細胞を用いて，50%の細胞死が見られる5-FU濃度を決めた．次に，5-FU処理により，ARE-mRNAを核外輸送・安定化するRNA結合タン

パク HuR の細胞質局在をウエスタン法により検討した．さらに，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がん細胞を処理し，XTT アッセイにより細胞死を検討した．

【結果】5-FU 存在下で，HuR の細胞質局在の増加が認められ，ARE-mRNA の安定化に寄与する可能性が示唆された．また，腫瘍溶解アデノウイルスあるいは 5-FU 単独処理よりも，併用処理の方が，細胞障害性が高かった．

【結語】腫瘍溶解アデノウイルスは 5-FU 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，腫瘍溶解アデノウイルスがより増殖したことが考えられる．以上より，腫瘍溶解アデノウイルスと 5-FU との併用療法は有効ながん治療法になりうると思われる．

キーワード：dl355，5-FU，HuR，ARE-mRNA

緒　　言

今日まで，がん治療における検査，診断，および治療技術は著しく進歩してきたが，がんは今なお世界における主要な死因の一つであり，日本の死亡原因第一

位である．現在，がんに対する標準的な治療法として，外科療法，放射線治療，化学療法があり，がんの進行度や患者の状態により各治療法が組み合わされて用いられている．外科療法は，一般的にがん治療の主体であり，根治的な治療法となりうるが，形態的および機能的な欠損が大きくなる場合があり，患者の QOL の低下がしばしば問題となる．一方，放射線治療および化学療法は，外科療法と合わせて補助療法として用いられたり，進行がんに対しての姑息治療として用いられることが多く，血液疾患系などの悪性腫瘍を除き，単独では根治的な治療法とはなりにくい．さらに，放射線治療や化学療法に耐性を示すがんに対しては十分な治療効果が得られない症例も少なくない．また，放射線治療と化学療法は，腫瘍細胞以外の正常細胞にも傷害を与えるため，治療過程で様々な副作用を引き起こすことがあり，副作用を考慮すると低線量あるいは低濃度での使用が望ましい．

近年，腫瘍溶解ウイルス療法が新たながん治療法として注目されている[1)]．遺伝子工学等の発展により，比較的大きなウイルスゲノム遺伝子でも改変することが可能になり，様々な遺伝子を組み換えたウイルスが腫瘍溶解ウイルスとして開発されている[2)]．これらのウイルスは，がん細胞で特異的に増殖することにより，それらの細胞を破壊することが出来，正常細胞ではほとんど増殖できないため，過剰な傷害を与えることはない．従って，高いがん細胞特異性が期待でき

るため，副作用も他のがん治療法に比べて少ないことが期待できる．また，腫瘍溶解ウイルス療法は，現行の様々ながん治療法との併用も可能で，さらに，抗がん剤等に耐性を示す様々ながんに対しても，治療効果が期待できる[3)]．

AU-rich element（ARE）は，アデニンとウラシルに富んだ RNA element で，*c-fos*，*c-myc*，*COX-2* 等の oncogene や cytokine 等，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[4)]．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，ストレス条件下で細胞質に形成される Stress granules に ARE-mRNA が導入されることにより，安定化される．従って，正常細胞では，ストレス条件下でなければ ARE-mRNA は転写後すぐに分解されるが，がん細胞では，何らかの理由で，恒常的に核外輸送・安定化されることが報告されている．また，ARE-mRNA の核外輸送・安定化には，RNA 結合タンパク HuR が ARE に結合することが必須で，がん細胞では HuR タンパクが，恒常的に細胞質に局在している[6)]．

これまでに，アデノウイルス E4orf6 は，HuR と結合し，ARE-mRNA を核外輸送・安定化し，ウイルスの増殖に寄与することが解明されている[6)]．本研究で用いる変異型アデノウイルス dl355 は，E4orf6 を欠失しており，正常細胞ではストレス条件下以外では ARE-mRNA は安定化していないためウイルスはほとんど増殖できない．しかしながら，がん細胞では，あらかじめ ARE-mRNA が核外輸送・安定

化されているためにウイルスが効率的に増殖でき，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[7-8]。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おり，副作用には口内炎，骨髄抑制，腎機能障害等の報告がある．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[9-11]．従って，正常細胞に対しても同様の効果を持つため，副作用が問題となっている．

本研究では，各種がん細胞に対して，dl355 単独，5-FU 単独，および両者併用でそれぞれ処理を行い，各処理で誘導される細胞死を比較検討した．また，シスプラチンに耐性を持つ口腔がん細胞に対しても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，dl355 の増殖が増強されるメカニズムについても検討した．

材　料　と　方　法

1. 腫瘍溶解アデノウイルスと抗がん剤

腫瘍溶解アデノウイルスとして，ARE-mRNA を核外輸送・安定化させてウイルス増殖を促進する機能を持つ E4orf6 を欠失させたウイルス dl355 を用いた（図 1）．また，抗がん剤として，5-Fluorouracil（CAS 番号：51-21-8，製品コード：F0151，東京化生工業株式会社）を用いた．図１挿入箇所

2. 細胞および 5-FU 感受性試験

ヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞，また，口腔病理病態学教室で樹立された，ヒト口腔扁平上皮がん細胞である SAS 細胞のシスプラチン耐性 SAS 細胞株，SAS-4，さらに，シスプラチン感受性 SAS 細胞株，SAS-5 細胞を用いた[12]．各細胞は，37℃，5%CO_2 下で 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，HeLa 細胞は ATCC（Manassas，USA）から，SAS 細胞は理化学研究所（Tsukuba，Japan）から分与された．

HeLa 細胞に，様々な濃度（0，1，10，50，100μM）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．

3. HuR タンパク量測定（ウエスタンブロッティング法）

HeLa 細胞に対して，5μM の 5-FU を用い，様々な時間（0，30 分，1 時間，3 時間，6 時間，12 時間，18 時間，24 時間）で処理した．その後，PBS で洗浄してから Fractionation buffer（10mM Tri‐HCl，pH7.4/150mM NaCl/1.5mM $MgCl_2$/0.5%Nonidet P-40/protease inhibitor）を加えて細胞を回収した後，振盪および 12,000rpm で 30 秒間遠心分離し，上清を細胞質分画とした．さらに，Fractionation buffer を加えて洗浄してすぐに Fractionation buffer のみを捨て，最終的に Fractionation buffer を加えて振盪および 14,000rpm で 10 分間遠心分離して得られた上清を核分画とした．細胞分画は SDS‐polyachrylamidegelelectrophoresis（SDS‐PAGE）にて展開後，PVDF 膜（polyvinylidine difluoride membrane；Millipore，USA）に転写した。一次抗体として，HuR（SantaCruz），β‐Tubulin（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．

4. 免疫細胞染色（ICC）

HeLa 細胞を，24 穴プレートに敷いたスライドグラス上に，1 穴あたり 2×10^4 個播種した．24 時間培養後に，5μM の 5-FU を用い，様々な時間（0，30 分，1 時間，3 時間，6 時間，12 時間，18 時間，24 時間）細胞を処理した．その後，4%PFA

で固定し，PBS で洗浄してから Blocking buffer（1%BSA，0.1%Tween 20 in PBS）でブロッキングした．一次抗体として，HuR（SantaCruz）の抗体を用い，二次抗体として，Alexa Fluor®488（Thermo Fisher Scientific）を用いて処理し，FV10i Confocal Laser Scanning Microscope（Olympus，Japan）を用いて，細胞を観察した．

5. 生細胞率測定（XTT assay）

Cell Proliferation Kit Ⅱ（XTT）（Roche，Germany）を用いて，XTT assay を以下の手順で行った．

HeLa 細胞，SAS-4 および SAS-5 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，dl355（MOI 50）単独処理，5-FU（5μM）単独処理もしくは両者併用処理し，XTT reagent を加えて 2 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．

6. **cytopathic effect** assay（CPE assay）

HeLa 細胞，SAS-4 および SAS-5 細胞を 24 穴プレートに播種し，24 時間培養後に，dl355（MOI 50）単独処理，5-FU（5μM）単独処理もしくは両者併用処理し，7 日後に生細胞を固定後，クマシーブリリアントブルーで染色した．

7. 統計学的分析

5-FU 単独処理群あるいは dl355 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±S.D.で示した．

結　　果

1. 5-FU 処理による細胞への効果の検討

本研究で用いる，5-FU の濃度の目安を決めるために，HeLa 細胞を様々な濃度（0～100μM）の 5-FU で処理し，72 時間後の細胞生存率を測定した．その結果，HeLa 細胞は 5-FU の用量依存的に減少し，5-FU に対する感受性を認め，およそ 10μM の濃度で 72 時間処理すると，細胞数が半減することが明らかになった．（図 2）．図 2 挿入箇所

2. 5-FU 単独処理による HuR の局在変化の検討

これまでに，様々な抗がん剤による刺激によって細胞内の HuR の局在変化がみられることが報告されている[13]．本研究では，5-FU 処理した HeLa 細胞におけ

る，HuR の局在変化を検討した．HeLa 細胞を 5μM 5-FU で，様々な時間（30 分，1，3，6，12，18，24 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 タンパク量をウエ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 24 時間後まで増加し続けた（図 3）．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．図 3 挿入箇所

また，ウエスタン法と同じ条件で処理した 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，ウエ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（図 4）．図 4 挿入箇所

これらの結果より，5-FU 処理により HuR タンパクの細胞質への局在が増加することが解明された．

3. 5-FU と dl355 との併用効果の検討

図 3 と 4 の結果より，5-FU 処理後すぐに HuR の細胞質局在が上がることが分かったので，細胞に dl355 感染と 5-FU 処理を同時に行い，図 5 に示したスケジ

ュールで，5-FU と dl355 との併用効果を XTT assay で検討した．当初，細胞数が半減する程度の 5-FU 濃度 10uM（図１）と，dl355 を MOI（multiplicity of infection） 100 で検討を行ったが，XTT assay では７日間を要し，細胞が予想以上に減少し併用効果を見ることが困難だったため，細胞死活性がより低い（data not shown）5uM の 5-FU と，MOI 50 の dl355 を用いて検討を行った．図5 挿入箇所

HeLa 細胞を用いた検討では，dl355 単独では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下に減少し，両者を併用した場合，さらに大幅に細胞数が減少した（図 6）．この結果は，dl355 と 5-FU を併用した場合，相乗的に腫瘍溶解効果が上昇することを示している．図 6 挿入箇所

次に，シスプラチン耐性口腔がん細胞（SAS-4）とシスプラチンに感受性を持つ口腔がん細胞（SAS-5）を用いて，同様の検討を行った．SAS-4 細胞では，dl355 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た．そして，両者を併用した場合，さらに大幅に細胞数が減少した（図 7）．さらに，SAS-5 細胞を用いた検討では，dl355 単独では細胞が 40%程度減少し，5-FU 単独処理では細胞数が 10%程度に減少した．また，両者を併用した場合，さらに細胞数が減少した（図 7）．また，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．

図 7 挿入箇所

また，同様の細胞を用いて，各処理の効果を CPE assay で確認した．その結果，上述の XTT assay の結果と同様に，dl355 単独処理や，5-FU 単独処理では細胞が生き残ったが，併用処理により生細胞が消失した（図 8）．図 8 挿入箇所

ウイルス感染という刺激により，細胞死が活性化された可能性は否定できないが，以上の結果より，がん細胞，シスプラチン耐性細胞やシスプラチン感受性細胞でも，dl355 と 5-FU の併用は，腫瘍溶解に有効であることが解明された．

考　　察

本研究では，がん細胞に対する腫瘍溶解アデノウイルス dl355 と抗がん剤 5-FU との併用療法の効果について検討を行った．その結果，dl355 と 5-FU を併用して処理した群では，各々単独で処理した群よりも著しく高い細胞死がみられ，両者の併用効果によって抗がん作用が相乗的に向上した．

また，5-FU でがん細胞を処理することによって，早期に HuR が核外輸送することも解明された．これは，本来 ARE-mRNA が安定化しているがん細胞においても，5-FU 処理により HuR の核外輸送が促され，ARE-mRNA がさらに安定化し，腫瘍溶解アデノウイルスの増殖が促進されることを示唆しており，これが dl355 と 5-FU の相乗的な併用効果のメカニズムであると考えられる．

今日まで，口腔外科やその他の医科分野において用いられている 5-FU は，術前後の化学療法として優れた治療成績を上げてきたが，高濃度での使用や，投与期間が長くなることによって副作用のリスクも上昇するため，可及的に低濃度かつ短期間での使用が望ましい．したがって，本研究によって示された，腫瘍溶解ウイルスと 5-FU との併用効果は，これまでよりも低用量の 5-FU で，かつ投与期間を短縮して，より大きな抗がん作用を得られる可能性を示唆している．また，併用療法で，シスプラチン耐性のがん細胞にも効果がみられたことから，今までシスプラチンだけでは十分な効果がみられなかった症例に対しても効果が期待できる．北海道大学歯学研究院口腔病理病態学教室では，シスプラチンと腫瘍溶解アデノウイルスとの併用療法でも高い腫瘍溶解効果を示すことを解明しており[2)]，今後，臨床応用に向けて，シスプラチンあるいは 5-FU などの抗がん剤に耐性を持つがん細胞に対して，どの抗がん剤と腫瘍溶解ウイルスとの併用療法が望ましいかなどについて検討する必要があり，さらに，腫瘍溶解アデノウイルス単独あるいは併用療法による副作用のリスクについても検討が必要である．

アデノウイルス感染細胞では，感染後 12 時間までの初期では，初期遺伝子（E1A～E4）が発現され，ウイルス感染に対して抵抗する宿主細胞側の防御機構を抑制し，ウイルス増殖に適した環境を作る．感染後 12 時間以降の後期では，後期遺

伝子(L1～L5)の発現が始まり，大部分の宿主 mRNA の核外輸送や翻訳は停止し，かわりにウイルスの後期 mRNA が選択的に核外輸送・翻訳され，ウイルスの増殖に寄与することが知られている[14]．アデノウイルス E4orf6 は，宿主細胞やウイルスの mRNA の輸送を制御することでウイルス増殖を調節する機能を有することが知られており，発がん活性も持つウイルス初期遺伝子である．北海道大学歯学研究院口腔病理病態学教室では，E4orf6 が，HuR や pp32 と結合し，宿主の ARE-mRNA を強制的かつ恒常的に核外輸送・安定化することを解明した[6]．本研究で使用した dl355 は，この E4orf6 を欠失した変位型の 5 型アデノウイルス(Ad5)であり，宿主細胞の ARE-mRNA の核外輸送・安定化を促進する機能は失われているため，ARE-mRNA があらかじめ核外輸送・安定化されているがん細胞で効率よく増殖する．そして，5-FU 処理によって HuR の細胞質局在が促進され，ARE-mRNA の核外輸送がさらに上がることにより，通常よりも多くのウイルスが産生され，より多くの細胞が溶解されたと考えられる．しかしながら，本実験においては，正常細胞に対する 5-FU や dl355 への影響を検討できていないことから，5-FU や dl355 によるストレスによる細胞死の可能性を否定できていない．したがって，この点においては今後の検討が必要であると思われる．このように，HuR の細胞質局在を促進する何らかの手法を検索し，dl355 の腫瘍溶解効果を高める手法をさらに見つけることが今後の課題である．

今日，5-FU を含めた抗がん剤治療における薬剤耐性や薬剤抵抗性の機序の解明は，重要な問題でありその機序について様々な研究が進んでいる．その一つに，5-FU と Stress Granule（SG）との関連が指摘されている[8]．SG は，細胞が様々なストレスに曝された場合に，細胞質に形成される messenger ribonucleoprotein (mRNP)顆粒で，mRNA の安定性や翻訳活性の調節という mRNA の運命決定機構に関与していると考えられている．また，SG は mRNA を一時的に保管する場としても知られており[15]，ARE-mRNA が局在することも報告されている[16]．さらに，HuR は SG を構成する主要なタンパクの一つであり，SG 形成に重要な役割を果たしている[17]．北大口腔病理病態学教室では，アデノウイルスの感染・複製に最も重要な E1A が，HuR とともに細胞質に存在している場合にのみ SG の形成を抑制することを発見し[18]，ウイルス感染時の ARE-mRNA の安定化には SG の関与は少ないことを見出した（未投稿）．したがって，アデノウイルス感染が，SG の形成を抑制し，抗がん剤の効果をより高めることも考えられる．

結　　論

本研究では，HeLa 細胞に対して，抗がん剤（5-FU）と腫瘍溶解アデノウイルス（dl355）との併用処理群は，それぞれの単独処理群よりも，相乗的に腫瘍溶

解効果が高いことが示された．また，シスプラチン耐性細胞にも同様の併用効果がみられた．この相乗的な腫瘍溶解効果は，5-FU 処理によって，HuR が細胞質に核外輸送され，ARE-mRNA がより安定化することによって，dl355 の増殖が促進された結果であると考察される．本研究より，5-FU と dl355 の併用療法は有効ながん治療法になりうることが明らかになった．

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院口腔病態学分野口腔診断内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．

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 6：19976-19989, 2015.

2) Bressy C, Benihoud K：Association of oncolytic adenoviruses with

chemotherapies : An overview and future directions. Biochemical pharmacology, 90 : 97-106, 2014.

3) 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. 北海道歯誌, 36 : 90-97, 2016.

4) Chen CY, Shyu AB : AU-rich elements : characterization and importance in mRNA degradation : Trends Biochem Sci 20 : 465-470, 1995.

5) Brennan CM, Steitz JA : HuR and mRNA stability. Cell Mol Life Sci 58 : 266-277, 2001.

6) Higashino F, Aoyagi M, Takahashi A, Ishino M, Taoka M, Isobe T, Kobayashi M, Totsuka Y, Kohgo T, Shindoh M : Adenovirus E4orf6 targets pp32/LANP to control the fate of ARE-containing mRNAs by perturbing the CRM1-dependent mechanism. J cell Biol 170 : 15-20, 2005.

7) Longley DB, Harkin DP, Johnston PG : 5-fluorouracil mechanisms of action and clinical strategies : Nat Rev Cancer 3 : 330-338, 2003.

8) Christian K, Jörg I, Tim H, Hans L, Sylvia H : 5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation : Nucleic Acids Research 42 : 6436-6447, 2014.

9) Santi DV, McHenry CS, Sommer H : Mechanism of interaction of thymidylate

synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate:Biochemistry 13:471-481,1974.

10)Pettersen HS, Visnes T, Vagbo CB, Svaasand EK, Doseth B, Slupphaug G, Kavli B, Korokan HE：UNG-initiated base excision repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation：Nucleic Acids Research 39：8430-8444, 2011.

11)Parker WB,Cheng YC:Metabolism and mechanism of action 5-fluorouracil: Pharmacol Ther 48：381-395, 1990.

12)Kitamura T, Higashino F, Yanagawa-Matsuda A, Ueda M, Kashiwao K, Okada T, Ohiro Y, Shindoh M：Identification of marker genes required to predict oral cancer cells with intrinsic resistance to cisplatin：Oncol Lett：in press, 2017.

13)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 74：1128-1140, 2014.

14)東野史裕，安田元昭，進藤正信：アデノウイルスと細胞のクロストーク．蛋白質核酸酵素．45：1350-1357, 2000.

15)Kedersha N, Anderson P：Stress granules:sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. Biochem Soc Trans 30：963-969, 2002.

16)Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE：Inhibition of the ubiquitin proteasome system induces stress granule formation. Mol Biol Cell 18：2603-2618, 2007

17)Buchan JR, Parker R：Eukaryotic stress granules:the ins and outs of translation. Mol Cell 36：932-941, 2009.

18)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.

図1

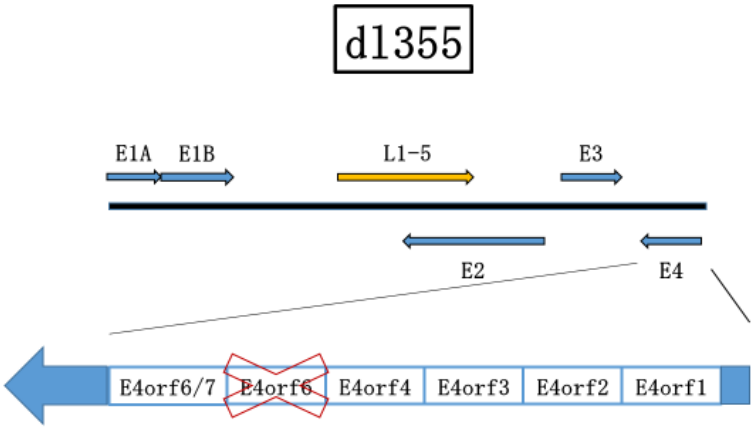

dl355
E1A
E1B
L1-5
E3
E2
E4
E4orf6/7
E4orf6
E4orf4
E4orf3
E4orf2
E4orf1

図2

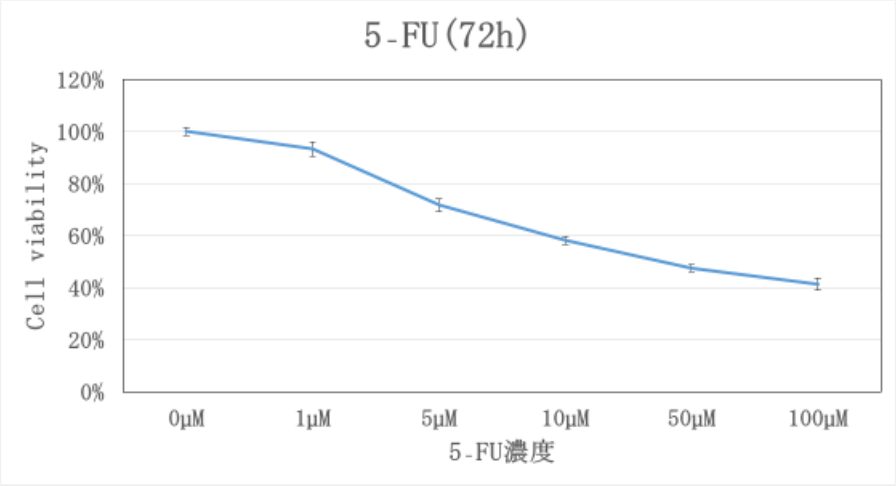

5-FU(72h)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Cell viability
0μM
1μM
5μM
10μM
50μM
100μM
5-FU濃度

図3

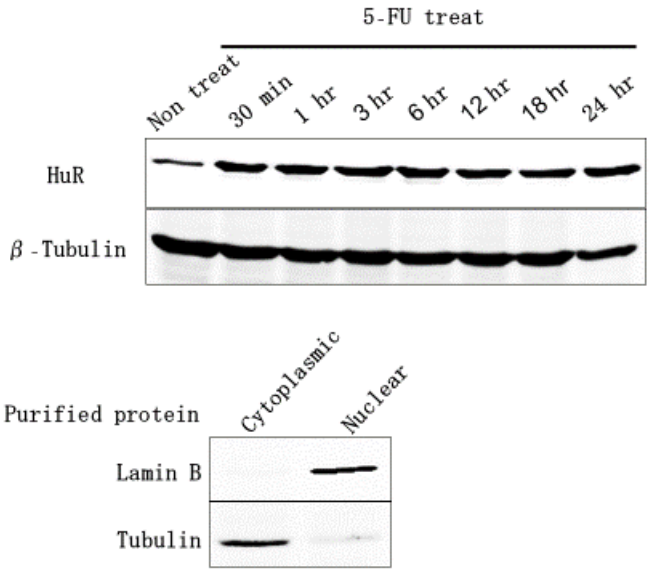

5-FU treat
Non treat
30 min
1 hr
3 hr
6 hr
12 hr
18 hr
24 hr
HuR
β-Tubulin
Purified protein
Cytoplasmic
Nuclear
Lamin B
Tubulin

図4

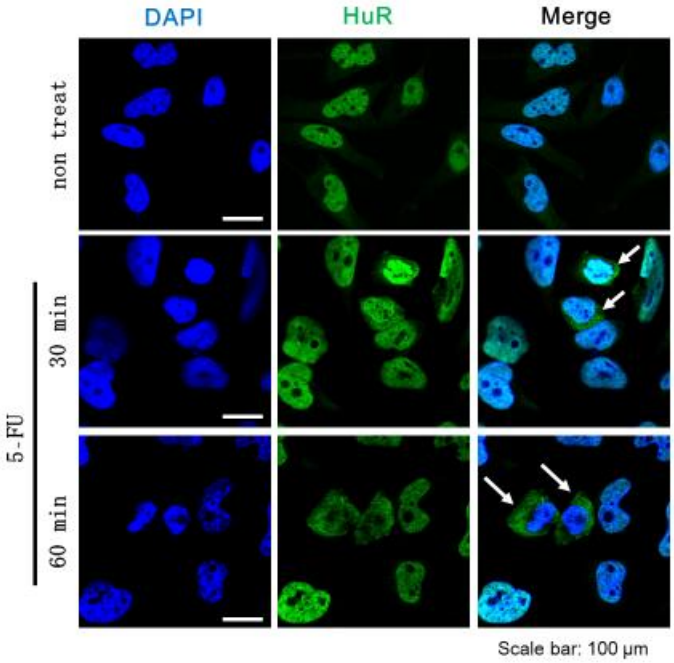

DAPI
HuR
Merge
non treat
5-FU
30 min
60 min
Scale bar: 100 μm

図5

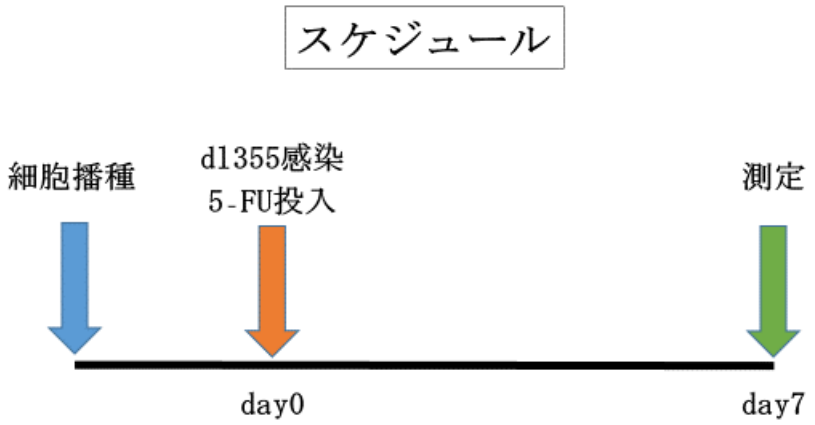
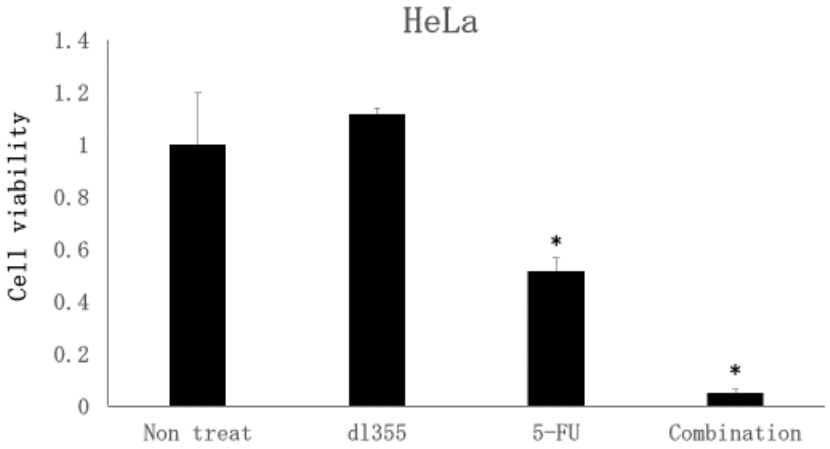


図6



＊ P ＜ 0.05 versus control; two-sided Student’ s t-test

図7

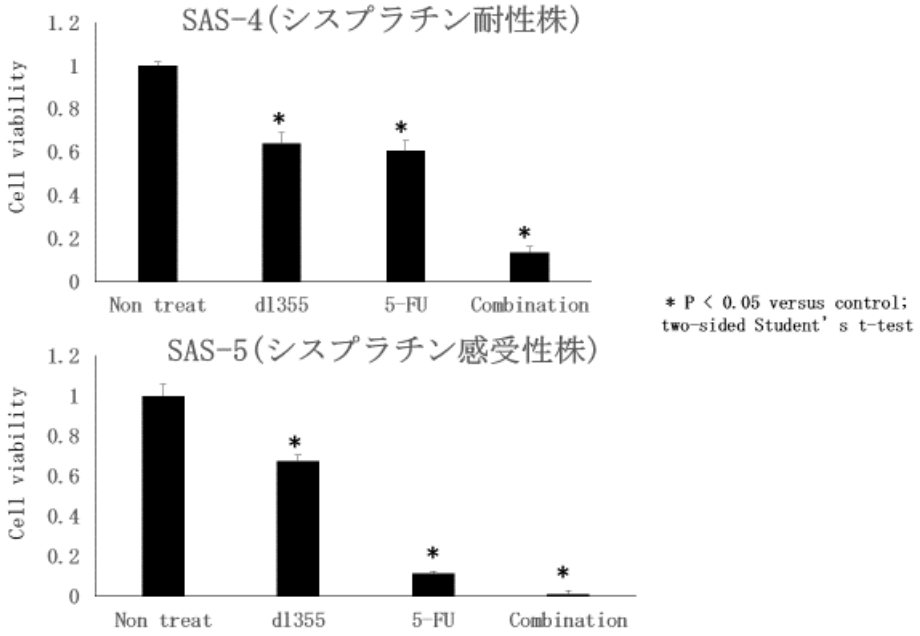

SAS-4(シスプラチン耐性株)
Cell viability
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Non treat
dl355
5-FU
Combination
* P < 0.05 versus control;
two-sided Student's t-test
SAS-5(シスプラチン感受性株)
Cell viability
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Non treat
dl355
5-FU
Combination

図8

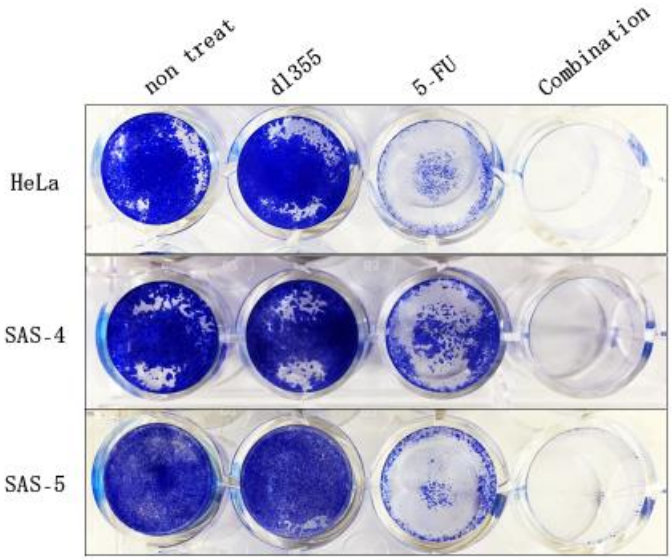

non treat
dl355
5-FU
Combination
HeLa
SAS-4
SAS-5

図　　説

図 1：dl355 の構造

本研究で用いる変異型アデノウイルス dl355 を示す．dl355 は，ウイルス初期遺伝子 E4 領域の open reading frame の一つ E4orf6 を欠失している．

図 2：5-FU が HeLa 細胞に及ぼす効果

HeLa 細胞に，様々な濃度（0，1，5，10，50，100μM）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．

図 3：5-FU 単独処理による HuR の局在変化

HeLa 細胞を 5μM の 5-FU で各時間（0，30 分，1 時間，3 時間，6 時間，12 時間，18 時間，24 時間）処理し，細胞質分画中の HuR タンパクをウエスタンブロッティング法で検出した．また，核と細胞質の分離を，ウエスタン法で確認した．Lamin B は核の，β-Tubulin は細胞質のマーカーである．

図 4：5-FU 単独処理による HuR の局在変化

HeLa 細胞を 5μM の 5-FU で各時間（0，30 分，60 分）処理し，HuR タンパクの局在を免疫染色法で検討した．DAPI は核を示し，Merge は DAPI と HuR の染

色画像を重ねた写真である．矢印は，HuR が細胞質に局在している細胞を示す．

図 5：併用実験スケジュール

各細胞播種後，day0 で，dl355 の感染と，5-FU の投与を同時に行い，day7 で細胞を回収し，XTT assay を行った．

図 6：HeLa 細胞に対する併用効果

HeLa 細胞を dl355（MOI 50）単独処理，5-FU（5μM）単独処理もしくは両者併用処理を行い，1 週間後に XTT assay を行い，生細胞率を求めた．

図 7：シスプラチン耐性細胞に対する併用効果

シスプラチン耐性口腔がん細胞 SAS-4 とシスプラチン感受性口腔がん細胞 SAS-5 を，dl355（MOI 50）単独処理，5-FU（5μM）単独処理もしくは両者併用処理を行い，1 週間後にそれぞれ XTT assay を行い，生細胞率を求めた．

図 8：各細胞に対する併用効果（CPE assay）

HeLa 細胞，SAS-4 および SAS-5 細胞を dl355（MOI 50）単独処理，5-FU（5μM）単独処理もしくは両者併用処理し，7 日後に生細胞を染色した.

英 文 抄 録

Combination effect of oncolytic adenovirus with 5-FU

Junichi Kanayama, Aya Matsuda-Yanagawa, Tetsuya Kitamura,

Yoshimasa Kitagawa, Fumihiro Higashino

ABSTRACT：

[Background] Chemotherapy, one of the general treatment for cancer therapy, has brought excellent therapeutic effect, whereas sufficient therapeutic effect has not been obtained for cancers showing resistance to the treatment. Furthermore, as the risk of various side effects increases if we use high concentration of anticancer drugs, it is desirable to use the low concentration drugs in consideration of the patient’s quality of life. Therefore, in order to obtain an effect equivalent to that of a high concentration anticancer agent, a combination with various treatment methods is considered. Recently,

many kinds of oncolytic virus had been developed. Since these viruses do not damage normal tissues and they specifically propagate only in cancer cells, this reagent can be expected to have low side effects. We have developed an oncolytic adenovirus, of which replication is controlled by the stabilization of AU-rich element containing mRNA. In this study, we examined the combination effect of the oncolytic adenovirus with anticancer agent 5-FU for cancer cells.

[Materials and Method] We treated HeLa cells by anticancer drug 5-FU to examine localization of cytoplasmic RNA-binding protein HuR which causes ARE-mRNA stabilization by western blotting. We had treated cancer cells by an oncolytic adenovirus alone, 5-FU alone or both combination and examined cell death by analyzing them by XTT assay.

[Result] The cytoplasmic localization of HuR protein was up-regulated by 5-FU treatment. Both cancer cells and cisplatin-resistant oral cancer cells, the oncolytic effect was higher in combination treatment than on oncolytic adenovirus or 5-FU alone treatment.

[Conclusion] The oncolytic adenovirus was shown to have a higher oncolytic effect in combination with 5-FU. We suspect that the

replication of the virus was increased by cytoplasmic relocation of HuR, which causes ARE-mRNA stabilization. Therefore, the combination therapy oncolytic adenovirus with 5-FU is expected as an effective cancer therapy.

Key Words：dl355, 5-FU, HuR, ARE-mRNA