HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Human adenovirus oncolytic properties and the inhibitory role of E4 orf4 and E4 orf6/7 on endogenously activated NF-κ B [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	王, 安然; Wang, Anran
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15931号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92133
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Wang_Anran_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　Wang Anran

審 査 担 当 者	主査	教授	長谷部　晃
	副査	教授	飯村　忠浩
	副査	教授	樋田　京子
	副査	教授	横山　敦郎
	副査	准教授	安田　元昭

学　位　論　文　題　名

Redundant Repressive Effects of Human Adenovirus E4 Proteins
on NF-κB Activation via TLR2
（ヒトアデノウイルス E4 タンパク質群は TLR2 経路による NF-κB 活性化を
複数の機構により抑制する）

審査は，オンラインにて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，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．以下に論文内容と審査の要旨を述べる．

組換えアデノウイルス（Ad）は遺伝子導入のための最も有望な手段の一つであり，中でもヒトアデノウイルス 5 型（Ad5）は重要である．Ad5 ゲノムは，5 つの初期転写ユニット（E1A，E1B，E2，E3，E4）と，5 つの後期タンパク質（L1 から L5）をコードする後期転写ユニットから構成されている．E1 領域はしばしば標的導入遺伝子で置換されるが，E1A の発現は E4 タンパク質の発現に必須であることから，組換えアデノウイルスからの E4 タンパク質の発現は，野生型 Ad5 に比べて極めて低い可能性がある．E4 領域を欠く Ad5 については様々な報告があり，それにより宿主の免疫応答を抑制するというものとそうではなかったという矛盾するものであるが，申請者は腫瘍特異的な腫瘍溶解ウイルスの開発に取り組んでおり，E4orf6 を改変した Ad はその有力な候補であることから，本研究では免疫応答において重要な転写因子である NF-κB の活性化における E4 タンパク質の関与を明らかにすることを目的とした．

Ad は野生型としてヒト Ad5 を，また E1 領域を β-ガラクトシダーゼと置換した AdLacZ を用いた．細胞は H1299，HEK293，3Y1，NIH3T3，RAW264.7 や RPC C2A などを用い，様々な Toll 様受容体（TLR）遺伝子を導入した HEK293 細胞を種々の TLR リガンドで刺激した．RelA 遺伝子を pcDNA3 にクローニングし，NF-κB や E1 応答性エレメント，E1，E2A

プロモーターをルシフェラーゼプロモーターにクローニングするなど，必要な遺伝子のクローニングを行った. E4 orf4 においては 34077 位の TATTTC を GAATTC に置換し, E4 orf4 88/89 として知られる変異体を得た．さらに，34015 番目と 34016 番目のヌクレオチド間に ATTC を挿入し，E4 orf4CT と呼ばれる変異体を作製した．NF-κB の活性化はルシフェラーゼレポーターアッセイで確認した．また，HA タグ付きの E4 タンパク質と Myc タグ付きの RelA の相互反応は免疫沈降法で確認し，E2F4 と RelA，NF-κB/p50 の細胞質における局在は共焦点レーザー顕微鏡で調べた.

これらの実験により，Ad5 感染細胞における TLR2 依存性の NF-κB 活性化が，感染後 24 時間で有意に抑制されることがわかった．これは，内因性に活性化された NF-κB が，感染初期に Ad の E1 プロモーターの活性化因子として機能し，その後発現する 6 種類の E4 タンパク質のうち，E4 orf4 と E4 orf6/7 が NF-κB の活性化に対して顕著な抑制効果を示したことによるものと考えらえた．また，そのうち E4 orf4 だけが，p65 としても知られる RelA タンパク質と共免疫沈降した. 一方 E4 orf6/7 の転写因子 E2F ファミリーの結合性を亢進させることができない C 末欠損変異体が NF-κB の活性化を抑制できなかったことから，E4 orf6/7 は E2F に依存した経路で NF-κB の活性化を抑制していると考えられた．申請者の得た結果は，E4 orf4 と E4 orf6/7 の両方が NF-κB 活性化の新規阻害剤であることを示唆している．感染後期における E4 タンパク質による内因性 NF-κB 活性化の阻害は，以前に報告された感染後期における E1A 発現の抑制を解明するものと思われる．したがって，NF-κB に対する E4 orf4 と E4 orf6/7 のこれらの冗長な抑制効果は，Ad の複製と局所の自然免疫学的監視の抑制の両方に役割を果たしていると言える.

上記の論文内容及び関連事項について，以下の項目を中心に質疑応答がなされた.

1. 実験の背景を理解するため、TP53，PP2A と E4orf4 の関係について
2. この抑制効果は TLR2 特異的ではないのかもしれないが、それについてどう考えるか
3. 一般にがん溶解ウイルスの実用化で炎症によるウイルスの排除が問題となるが、このウイルスの場合の実用化への障害と研究の背景の詳細について
4. TLR2 はこのウイルス由来のどのような物質を認識するのか
5. Non-permissive cell line について
6. この研究の臨床応用への可能性について
7. このウイルスに対する血管内皮細胞の反応について

これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答および説明が得られ，研究の立案と遂行ならびに結果の収集とその評価について，申請者が十分な能力を有していることを確認した．本研究業績は，組換えアデノウイルスの腫瘍特異的な腫瘍溶解ウイルスへの応用の研究だけでなく，新たな免疫抑制剤としての NF-κB 阻害剤の可能性を示唆するものであり，医学の進歩に非常に貢献することが期待された．したがって審査担当者全員は，学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに相応しいと認めた.