



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13873
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94365
Type	doctoral thesis
File Information	Yasushi_Kato.pdf



博 士 論 文

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

令和 2 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻
加 藤 泰 史

目次

1. 要旨	3
2. 緒言	5
3. 材料と方法	12
4. 結果	19
5. 考察	27
6. 結論	30
7. 謝辞	31
8. 参考文献	32

要旨

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 は細胞の増殖に関連する遺伝子から転写される mRNA の分解を促す RNA エLEMENTで、ARE-mRNA は ARE に結合するタンパク質により分解や安定化が制御される。RNA 結合タンパクの一種である、embryonic lethal abnormal vision (ELAV) family に属する HuR は ARE-mRNA の核外輸送と安定化に寄与する。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 遺伝子の ARE を組み込んだ腫瘍溶解アデノウイルス (AdARET) を開発した。この 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。本研究では、このウイルスの腫瘍溶解効果および、この効果を増強させる因子の検討を行なった。

AdARET 感染により、がん細胞特異的にアデノウイルスの増殖に必須の E1A タンパクの発現を認め、正常細胞ではほとんど発現を認めなかった。また、ウイルスの生産効率に関しても、がん細胞である A549 細胞、HeLa 細胞では正常細胞よりも多くのウイルス産生を認めた。AdARET はがん細胞に対して濃度依存的に腫瘍溶解効果を示した。また、AdARET と TNF- α との併用により、細胞生

存率の低下を認め、TNF- α が AdARET の腫瘍溶解効果を増強させる因子となりうることが示唆された。以上の結果から、AdARET はがん細胞特異的に腫瘍溶解効果を発揮し、またがん周囲の炎症を利用し、TNF- α が周囲に存在するがんではよりその効果が増強されることが示された。

緒言

これまで、がん治療に対して、手術療法、化学療法、放射療法が主に用いられている。しかし、これらの治療法には、生体への大きな侵襲や、薬剤耐性細胞の存在、治療による有害な副作用など多くの問題点が存在する。近年、腫瘍溶解ウイルスによる新たながん治療法が注目されている。腫瘍溶解ウイルスは、ウイルスゲノム遺伝子に改変を加え、がん細胞特有の様々な形質を利用することにより、がん細胞特異的に増殖後、細胞を破壊し、正常細胞には何の影響も与えないウイルスである。したがって、腫瘍溶解ウイルスによるがん治療法は、理論的には副作用がなく、高い治療効果が期待できる。

これまで、レオウイルスや単純ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルスなど多くのウイルスを利用した腫瘍溶解性ウイルスが開発され¹⁾現在、日本国内でも C-REV^{2~3)}や G47Δ⁴⁾などの腫瘍溶解ウイルスの臨床試験などが行われており、がんに対する新たな治療法として期待されている。

抗がん剤治療など、これまでのがんの治療法は、患者に対して苦痛や副作用が伴うことが多いのが現状であるが、このウイルスを用いた治療法が確立されれば、理論上副作用がなく、使用法も簡便で、他のがん治療法との併用も容易なので、非常に有用な治療法になると期待できる。特に、アデノウイルスはそもそも病原性が低く、遺伝子治療用のベクターとしての実績もあり^{5~8)}、安全性が非常

に高く、複製効率も高いので、生産方法も簡便で安価なため、実用化しやすい⁹⁾。

これまでに多くのがん細胞で、AU-rich element (ARE) を持つ mRNA が核外輸送され安定化されることが見出され¹⁰⁻¹²⁾、また、ARE-mRNA の安定化の程度はがん細胞の悪性度と関連することが報告されている¹³⁾ (図 A)。ARE は細胞の増殖に必要な遺伝子から転写される mRNA の分解を促す RNA エLEMENT であり、ARE-mRNA は ARE に結合するタンパク質により分解や安定化が制御される^{14,15)}。

図A

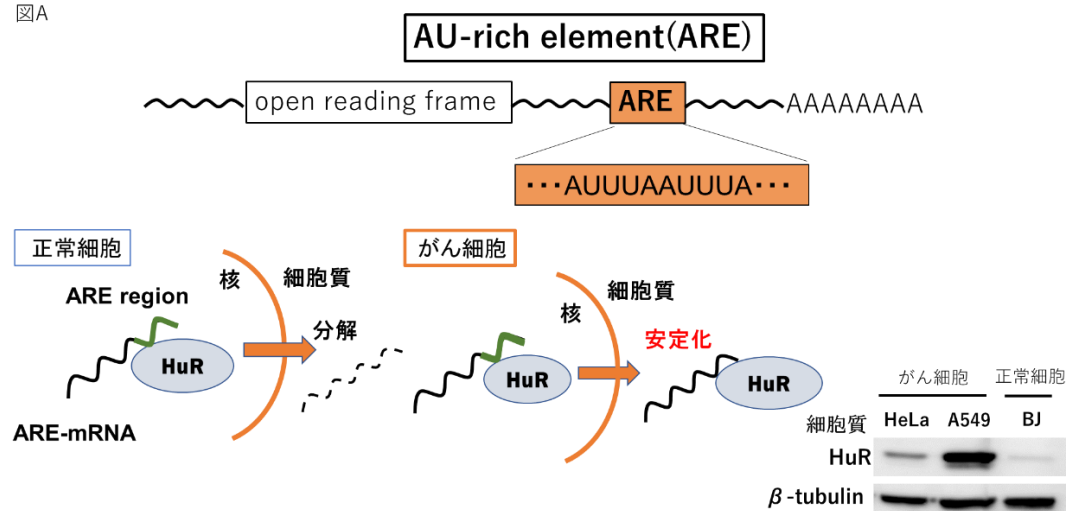


図 A AU-rich element (ARE) と ARE-mRNA の安定化

ARE は、アデニンとウラシルに富み mRNA の 3'-UTR に存在する領域で、主にかん遺伝子やサイトカインなど細胞増殖にかかわる遺伝子の mRNA に存在する。ARE-mRNA は通常、合成後すぐに分解されるが、ストレスが加わると ARE に特異的に結合する RNA 結合タンパク HuR と結合し、一時的に核外輸送され安定化されるが、がん細胞では恒常的に核外輸送され安定化している。

RNA 結合タンパクの一種で、embryonic lethal abnormal vision (ELAV) family に属する HuR は 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^{13,16)} (図 A)。

我々は以前、アデノウイルスのがん遺伝子産物 E4orf6 によりがん化した細胞では、ARE-mRNA や HuR などが CRM1 非依存性に細胞質に輸送されることを見出した¹⁷⁾。さらに、E4orf6 は核外輸送した ARE-mRNA を安定化することができ、安定化された ARE-mRNA は細胞をがん化した¹³⁾。その後、多くの研究グループが、ウイルスががん化の原因ではない様々ながん細胞で ARE-mRNA の核外輸送・安定化がそれぞれの細胞がん化に寄与することを示し、HuR の核外輸送や ARE-mRNA の安定化は、必ずしもウイルス遺伝子産物のみにより起こるわけではなく、多くのがん細胞にみられることがわかっている。さらに、ARE-mRNA の安定化は、がん細胞のみではなく、炎症やウイルス感染など様々な疾患に関わる細胞でも見られることが最近明らかになっている¹⁹⁾。

アデノウイルスは感染後、初期遺伝子である E1A が最初に発現し、それに続きそのほかの初期遺伝子 E1B, E2, E3, E4 の転写が活性化される。その後感染後期になると、後期遺伝子 L1~L5 が発現しウイルスが複製される。そのため、アデノウイルスの増殖には E1A の発現が必須となる^{20,21)} (図 B)。これまでの腫瘍溶解ウイルスは、特定の遺伝子の欠損が起こっているがん細胞や、一部の

ん細胞特異的に活性化しているものを利用して効果を発揮するため、腫瘍溶解効果は限られた種類のがんにのみにしか有効ではなかった²²⁻²⁴⁾。

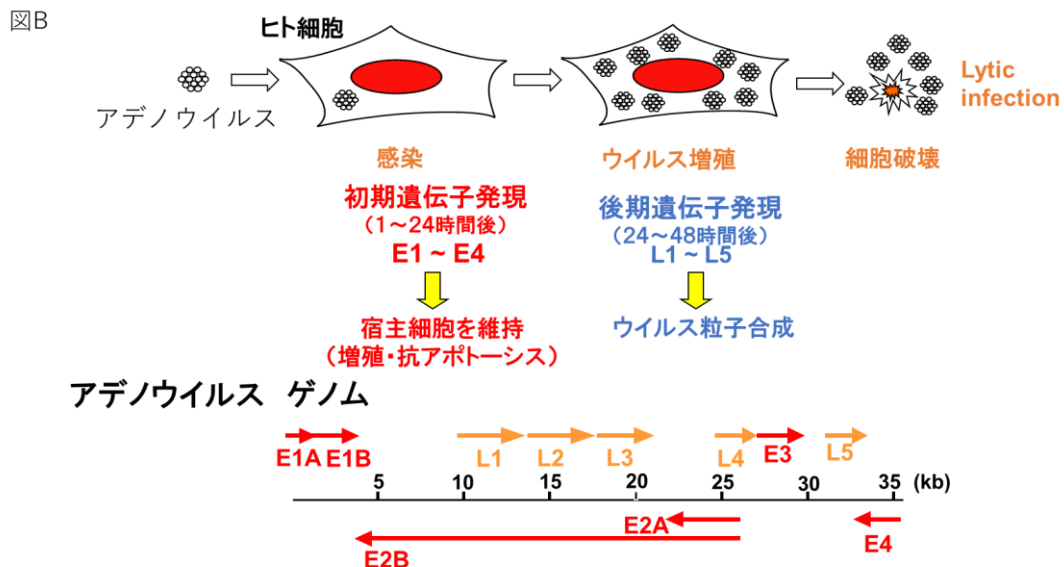


図 B アデノウイルスの複製に E1A の発現が必須

アデノウイルス感染後、24 時間後までに初期遺伝子 E1A, E1B, E2, E3, E4 の転写が活性化され、それ以降は後後期遺伝子が発現し、ウイルスが複製される。E1A は他の全てのウイルス遺伝子の転写を活性化できるため、アデノウイルスの増殖には E1A の発現が必須となる。

がん細胞周囲には多くの免疫細胞浸潤が認められており、これらの細胞が引き起こす免疫応答による炎症によってがんの浸潤に好都合な微小環境が作り出される。炎症性サイトカインである TNF- α は、主にマクロファージや単球などの免疫細胞から産生され、がんの増殖、発育、転移などを促進し、がんの悪性度と関連している²⁵⁾ (図 C)。

図C

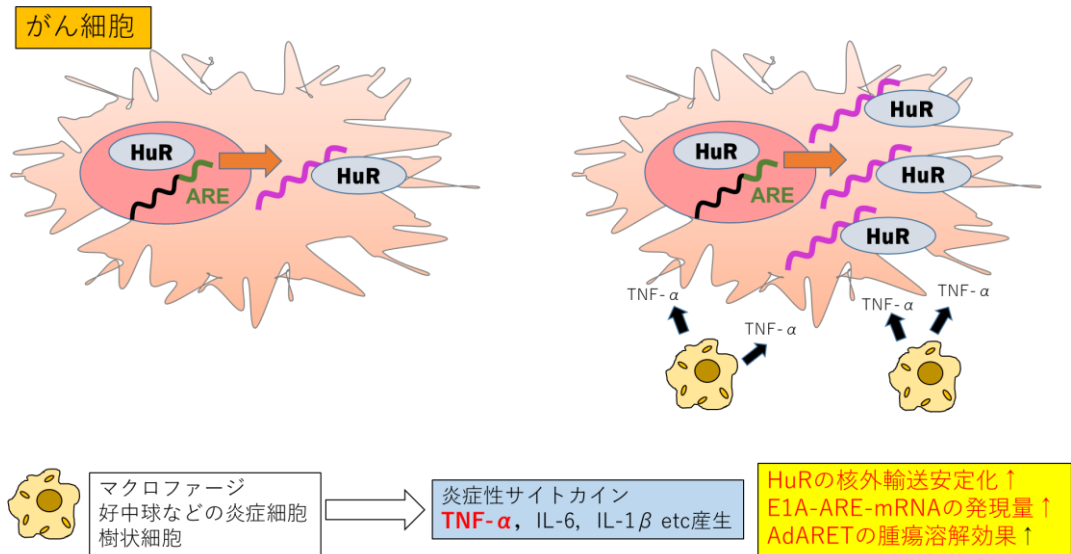


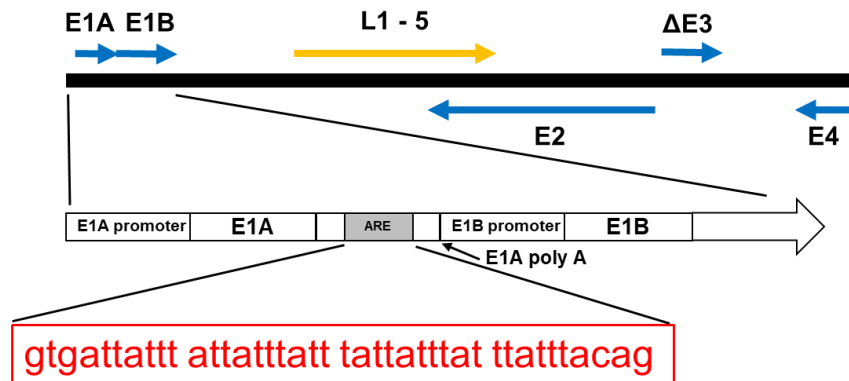
図 C TNF- α による HuR の核外輸送

がん間質には多くの免疫細胞浸潤が認められており、これらの細胞が引き起こす免疫応答により生じる炎症によってがんの浸潤を促進する微小環境が作り出される。炎症性サイトカインである TNF- α は、主にマクロファージや単球などの免疫細胞から産生され、がんの増殖、発育、転移などを促進し、がんの悪性度と関連している。この TNF- α の刺激により、HuR の核外輸送が促進され、E1A-ARE-mRNA が安定化され、AdARET の腫瘍溶解効果が亢進すると考えられる。

本研究では、アデノウイルスの E1A 遺伝子の 3'-UTR に TNF の ARE を組み込んだ腫瘍溶解アデノウイルス (AdARET) を開発し (図 D)、その腫瘍溶解効果と効果を増強させる因子の検討をおこなった。

図D

A:AdARETfw



B:AdARETrv

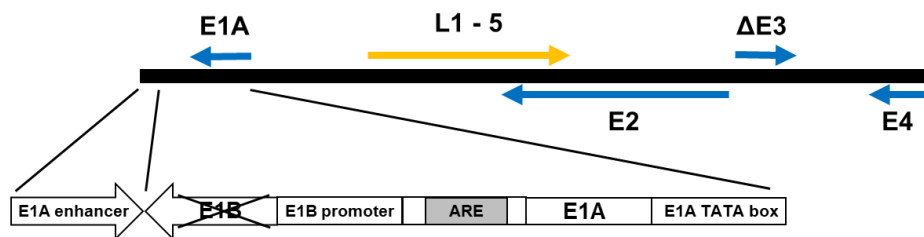


図 D AdARET の構造

すでに我々が開発している、B : AdARETrv は E1A 遺伝子が逆向きに組み込まれており、E1A の発現が低く、E1B55k 遺伝子も欠失している。新たに開発した A : AdARETfw は、TNF- α 遺伝子の ARE を持つ E1A 遺伝子が正方向に組み込まれており、E1A の発現が AdARETrv に比べ高く、腫瘍溶解効果が高いことが期待される。

AdARET は mRNA の安定化システムを応用した腫瘍溶解ウイルスであり、ARE-mRNA が安定化されているがん細胞²⁶⁾ (すべてのがんの約 80%~90%と推測される) に対し、特異的に溶解させることが予想される。その結果、AdARET を感染させたがん細胞では、ARE を持つ E1A mRNA が HuR により安定化されるため (図 E)、がん細胞特異的にウイルスが増殖することができ、がん細胞特異的に殺細胞効果を示した。

図E

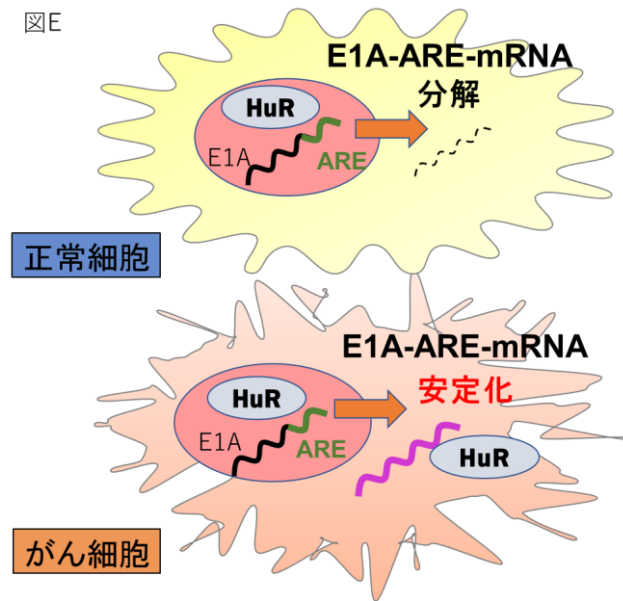


図 E E1A-ARE-mRNA はがん細胞で安定化する

我々の開発した AdARETfw の E1A-ARE-mRNA は、正常細胞ではすぐに分解されウイルスは増えることはできないが、がん細胞では HuR と結合し核外輸送されることで安定化するので、E1A が発現し、アデノウイルスが複製することができる。

また、がん周囲の炎症を利用することを想定した、TNF- α との併用により、細胞質中に HuR の発現量が増加したがん細胞では腫瘍溶解効果の増強を示した。

これらの結果は AdARET が、腫瘍溶解効果を持ち、TNF- α との併用によってその効果を増強できることを示している。

材料および方法

1. 細胞株および細胞培養

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa, ヒト肺がん細胞 A549, ヒト口腔がん細胞 HSC-2, ヒト口腔がん細胞 SAS, ヒト乳腺がん細胞 MDA-MB-231, ヒト乳腺がん細胞 MCF-7, ヒト包皮線維芽細胞 BJ, ヒト歯肉線維芽細胞 HGF-1, ヒト胎児肺線維芽細胞 WI-38, ヒト胎児腎細胞 HEK293 を使用した. すべての細胞は ATCC より入手し, 培地には Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM, Sigma-Aldrich, USA) に 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS, Sigma-Aldrich, USA) を添加したものをを用い 37°C, 5%CO₂ 存在下で培養した.

2. AdARET の構築

AdARET は pXhoIC plasmid²⁷⁾と pAxcwit2 cosmid vector (Takara Bio, Japan) を用いて作成した. pXhoIC は 5 型ヒトアデノウイルスの E1 遺伝子を持つ. 合成した TNF- α の ARE フラグメント (40 base pairs) を pXhoIC vector の E1A 遺伝子 3'-UTR の HpaI site に組み込んだ. E1 領域全体を PCR 法で増幅し, 制限酵素 ClaI を用いて pAxcwit2 cosmid の E1 欠損部に挿入した. この時, ClaI を両端に持つ挿入フラグメントが順方向に入ったクローンを AdARET

forward (AdARETfw) とし、逆方向に挿入されたクローンを AdARET reverse (AdARETrv) とした (図 D). これらのコスミドから AdARET のゲノム DNA を Pac I で単離し、DNA フラグメントを 293 細胞に導入後、増殖したウイルス粒子を、凍結融解を 3 回繰り返し回収した. ウイルス粒子の力価 (infectious unit ; ifu) は Adeno-X™ Rapid Titer Kit (Clontech) を用いて測定した.

3. タンパク質の抽出

10cm 培養ディッシュ中の細胞をリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline : PBS, ダルベッコ PBS (-), 日水製薬株式会社, Japan) にて洗浄後, fractionation lysis buffer (10mM Tris-HCL pH7.4, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5% NP40, protease Inhibitor Cocktail) を 200μl 加え, 細胞溶解液をセルスクレーパーで回収した. 細胞溶解液を vortex ミキサーで 4℃, 5 分間攪拌し, その後, 4℃, 12,000rpm で 30 秒間遠心分離し, 上清を 200μl 回収し, 細胞質分画とした. lysis buffer を 100μl 加えペレットを 2 回洗浄し, 4℃, 12,000rpm で 30 秒間遠心分離し, 残ったペレットに lysis buffer を 30μl 加え超音波ホモジナイザー (Sonifier 250, BRANSON, USA) により核を破砕した. その後, 4℃, 14,000rpm で 10 分間遠心分離し, 上清 30μl を核分画として回収した. 細胞の全タンパクの抽出には NP40 lysis buffer (150mM NaCl, 1% NP-

40, 50mM Tris HCl, 50mM NaF, 5mM B-Gly, 1mM Na₃VO₄, 10%Glycerol, Protease Inhibitor Cocktail) を 200 μ l 加えセルスクレーパーで細胞溶解液を回収し, 超音波ホモジナイザーにより細胞を破碎した. その後, 4°C, 14,000rpm で 10 分間遠心分離し, 上清 200 μ l を採取した. これらに, サンプルバッファーとして 500mMTris HCl pH6.8, 10%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate : SDS), 50%Glycerol, ブロモフェノールブルー (bromophenol blue : BPB) を加えたものを混和し, 2-メルカプトエタノールを加えたものをそれぞれのサンプルに添加した. さらに, 95°Cで 5 分間熱変性処理を行い, これをタンパク質の発現解析に用いた. TNF- α 使用実験には Recombinant Human TNF- α (E. coli derived) (R&D systems, USA), IL-1 β 使用実験には Recombinant Human IL-1 β (E. coli derived) (R&D systems, USA) を用い, 細胞を培養ディッシュに播種し 24 時間培養後, TNF- α , IL-1 β をそれぞれ 100ng/ml になるよう添加し, 3, 6, 12, 24 時間後に上記方法にて細胞質分画, 核分画に分けたタンパクの回収を行った.

4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) および Western blotting

Western blotting は, Aoyagi の方法に従った²⁸⁾. 抽出したタンパク質は 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動 (100V, 80 分間) し, ポリフッ化

ビニリデン (poly vinylidene difluoride : PVDF) 膜 (Millipore, USA) に転写 (100V, 60 分間) した。その後、抗体の非特異的吸着を防ぐため、5%スキムミルクで 60 分間反応させ、その後一次抗体 HuR 3A2 (Santa Cruz, USA), β -tubulin AA2 (Millipore, USA), β -actin C4 (Santa Cruz, USA) , Ad5 rabbit polyclonal serum L133²⁹⁾, E1AM58 (Santa Cruz, USA), Lamin B C-20 (Santa Cruz, USA) をそれぞれ 4℃で 24 時間反応させた。Washing buffer にて 45 分間洗浄し、二次抗体として HRP (Horseradish peroxidase) が結合した 2 次抗体で処理し、室温で 60 分間反応させた。最後に washing buffer にて 45 分間洗浄後、SuperSignal®West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo, USA) にて標識し、Image Quant LAS-4000mini (富士フイルム, Japan) を用いて特異的なバンドを検出した。

5. ウイルス生産効率の測定

ウイルス生産効率の測定は、Yanagawa-Matsuda の方法に従った³⁰⁾。12well プレートに HeLa 細胞, A549 細胞, HGF-1 細胞, WI-38 細胞, BJ 細胞を 1.0×10^4 個播種し、37℃, 5%CO₂ 下で、10%FBS 含有 DMEM を用いて 24 時間培養後、AdARETfw を multiplicity of infectivity (MOI) 1 (ifu/cell) で感染させ、感染後 6 日目にセルスクレーパーで細胞を培地ごと回収し、凍結、融解を 3 回

繰り返し、ウイルスの回収を行った。24well プレートに HEK293 細胞を 2.5×10^5 個播種し、それぞれの細胞から回収したウイルスを 10%FBS 含有 DMEM で 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000 倍に希釈し、希釈した溶液を 50 μ l ずつ添加し、HEK293 細胞に感染させ、37°C, 5%CO₂ 下で 48 時間培養した。48 時間後に PBS 洗浄し、100%メタノールを添加し、-20°C で 10 分間固定した。固定後 PBS 洗浄を 2 回行い、1 次抗体 (Mouse Anti-Hexon Antibody : Adeno-XTMRapid Titer Kit, Takara, USA) 250 μ l を加え 37°C, 60 分間反応させた。その後 PBS 洗浄を 2 回行い、2 次抗体 (Rat Anti-Mouse Antibody (HRP Conjugate) Adeno-XTMRapid Titer Kit, Takara, Japan) 250 μ l を加え 37°C, で 60 分間反応させた。PBS 洗浄を 2 回行い DAB 染色にてヘキソントンパクを染色した。Adeno-XTMRapid Titer Kit のマニュアルに従い AdARETfw のウイルス生産効率の測定を行った。各細胞で少なくとも 3 回同様の検討を行い、平均値と SD 値を求め、グラフを作成した。

6. 細胞生存率の測定

ウイルス生産効率の測定は、Yanagawa-Matsuda の方法に従った³⁰⁾。HeLa 細胞, A549 細胞, HSC-2 細胞, SAS 細胞, MCF-7 細胞, MDA-MB-231 細胞, BJ 細胞をそれぞれ 3×10^3 個 96well dish に播種し、37°C, 5%CO₂ 存在下で 24

時間培養後、AdARETfw を MOI1, 10, 100 (ifu/cell) で感染させ、感染させた日を 0 日とし、感染後 7 日目に細胞生存率の測定を行った。細胞生存率の測定には Cell Proliferation Kit II (XTT) (Sigma-aldrich, USA) を 100 μ l ずつ添加し、2 時間 37°C, 5%CO₂ 存在下で反応させた。反応後、マイクロプレートリーダー (GloMax multi detection system : Promega Corporation, USA) にて細胞生存率の測定を行った (測定波長 560nm)。各細胞で少なくとも 3 回同様の検討を行い、平均値と SD 値を求め、グラフを作成した。また、AdARET と TNF- α の併用効果の検討では、TNF- α 単独処理群あるいは AdARET 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。

同様に、cytopathic effect (CPE assay) にて細胞生存率の測定を行った。HeLa 細胞, A549 細胞, HSC-2 細胞, SAS 細胞, MCF-7 細胞, MDA-MB-231 細胞, BJ 細胞を 24well プレートに 5×10^4 個播種し、37°C, 5%CO₂ 存在下で 24 時間培養後、AdARETfw を MOI0.1, 0.5, 1, 10, 100 (ifu/cell) で感染させ、感染させた日を 0 日目とし、感染後 7 日目に PBS 洗浄を 2 回行い、10%酢酸 10%メタノールで 15 分間細胞の固定を行った。固定後、CBB 染色液 (Coomassie Brilliant Blue R-250, 100%メタノール, 酢酸) で 30 分間染色を行い、PBS で 2 回洗浄を行った。その後 CBB 脱色液 (100%メタノール, 酢酸) で 2 回脱色を

行い，生細胞を染色し細胞変性効果を確認した．

結果

1. がん細胞と正常細胞でのアデノウイルス遺伝子産物の発現

すでに我々が開発している, AdARETrv は E1A 遺伝子が逆向きに組み込まれており, E1A の発現が低く腫瘍溶解効果は低かった. 今回新たに開発した AdARETfw は, アデノウイルスの E1A 遺伝子が正方向に組み込まれており, E1A の発現が AdARETrv に比べ高く, 腫瘍溶解効果が高いことが期待できる. そこで, AdARETfw, rv を MOI10 (ifu/cell) でがん細胞 (A549 細胞と HeLa 細胞) と正常細胞 (BJ 細胞) に感染させ, 感染 96 時間後にタンパク質を回収し, アデノウイルスの初期遺伝子産物 E1A の発現量を Western 法で調べた. がん細胞では多くの E1A の発現を認めた. 特に, A549 細胞でその発現が高く, HeLa 細胞では低く, 正常細胞ではほとんど確認できなかった. また, AdARETrv の E1A 発現量は AdARETfw の発現量に比べて低かった (図 1). さらに, ウィルス後期遺伝子産物 Hexon (L3) に関しても E1A の発現と同様に, がん細胞, 特に A549 細胞で多く発現を認めたが, HeLa 細胞ではその発現が低く, 正常細胞ではさらに低かった (図 1). これらの結果は, 両腫瘍溶解ウイルスとも, がん細胞特異的に E1A や後期タンパクを発現させることを示している.

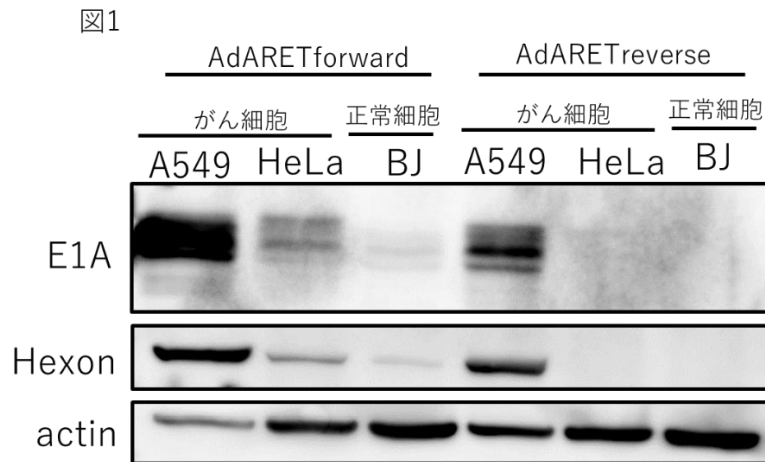


図1 がん細胞と正常細胞でのアデノウイルス遺伝子産物の発現
AdARETfw, AdARETrv を MOI10 (ifu/cell) でがん細胞 (A549 細胞, HeLa 細胞) と正常細胞 (BJ 細胞) に感染させ, 感染から 4 日後にタンパクを回収し, アデノウイルスの初期遺伝子産物である E1A と後期遺伝子産物 Hexon の発現量を Western 法で調べた.

2. 正常細胞及びがん細胞でのウイルス産生効率

ウイルスの産生効率を測定するために, がん細胞 (HeLa 細胞, A549 細胞) と正常細胞 (HGF-1 細胞, BJ 細胞, WI38-40 細胞) に, AdARETfw を MOI1 で感染させ, 感染 6 日目にウイルスの回収を行った. 回収したウイルスを HEK293 細胞に感染させ, 感染後 48 時間後に Hexon タンパクの染色を行い, ウイルスの産生効率の測定を行った. がん細胞では AdARETfw の産生効率が高く, HeLa, A549 細胞ではそれぞれ 5.60×10^6 , 2.20×10^7 (ifu/ml) であった. 正常細胞では, HGF-1, BJ, WI-38 細胞で, それぞれ 5.60×10^3 , 1.93×10^6 , 3.92×10^4 (ifu/ml) で, がん細胞と比べて, 4 倍程度から 10^4 倍程度の差があっ

た（図 2）. これらの結果は、AdARETfw はがん細胞特異的にウイルス産生効率が高いことを示している.

図2

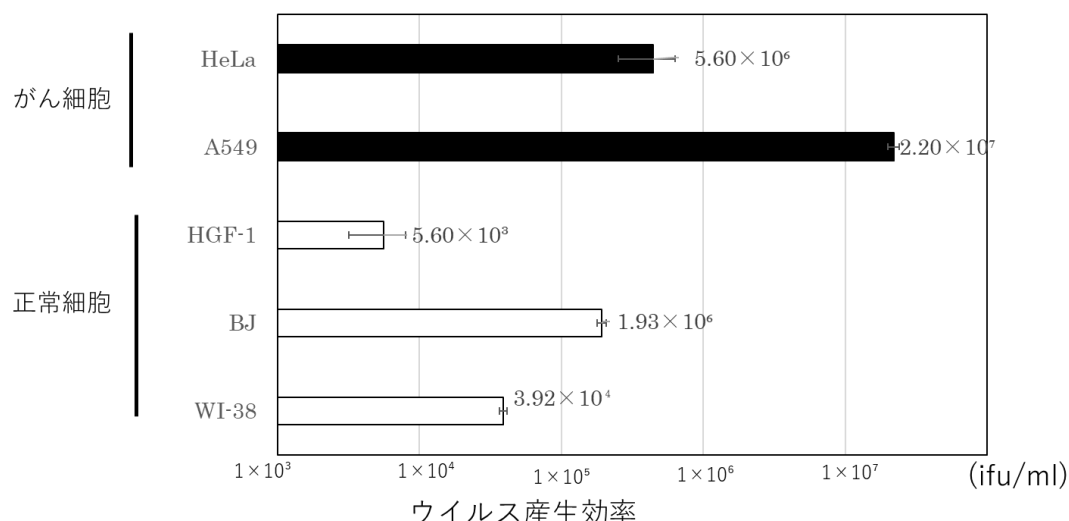


図 2 正常細胞及びがん細胞でのウイルス産生効率

ウイルスの感染効率の測定を行うため、がん細胞（HeLa 細胞, A549 細胞）と正常細胞（HGF-1 細胞, BJ 細胞, WI-38 細胞）に AdARETfw を MOI1（ifu/cell）で感染させ、感染から 6 日後にウイルスの回収を行った。回収したウイルスを HEK293 細胞に感染させ、感染後 48 時間後に Hexon タンパクの染色を行いウイルスの産生効率の測定を行った。

3. AdARETfw はがん細胞特異的に殺細胞効果を示す

AdARETfw の腫瘍溶解効果を検討するため、がん細胞（HeLa 細胞, A549 細胞, SAS 細胞, HSC-2 細胞, MDA-MB-231 細胞, MCF-7 細胞）と正常細胞（BJ 細胞）に AdARETfw を MOI1, 10, 100（ifu/cell）で感染させ、感染後 7 日目に XTT assay によって細胞生存率の測定を行った。すべてのがん細胞にお

いてウイルス濃度依存的に細胞死の増加を認め、正常細胞では細胞死を認めなかった (図 3-1).

図3-1

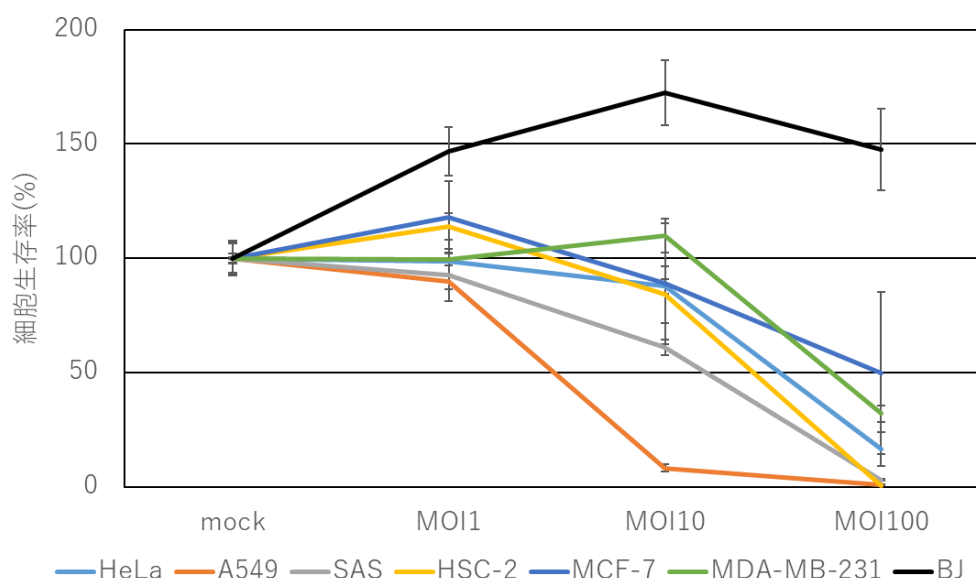


図 3-1 AdARETfw によるがん細胞溶解効果

AdARETfw の腫瘍溶解効果を調べるためがん細胞 (HeLa 細胞, A549 細胞, SAS 細胞, HSC-2 細胞, MDA-MB-231 細胞, MCF-7 細胞) と正常細胞 (BJ 細胞) に AdARETfw を MOI100 (ifu/cell) で感染させ, 感染後 7 日目に細胞生存率の測定を XTT assay で行った.

同様に, AdARETfw の腫瘍溶解効果を検討するため, CPE assay によりがん細胞 (HeLa 細胞, A549 細胞, SAS 細胞, HSC-2 細胞, MDA-MB-231 細胞, MCF-7 細胞) と正常細胞 (BJ 細胞) に AdARETfw を MOI0.1, 0.5, 1, 10, 100 (ifu/cell) の濃度で感染させ, 感染後 7 日目に生細胞の染色を行った. 全てのがん細胞ではウイルス感染濃度依存的に殺細胞効果が見られ, MOI100 ではほぼすべてのがん細胞が死滅した. 一方, 正常細胞では, MOI100 でも多くの細

胞が生き残った。また、細胞質中に HuR が多く発現している A549 細胞では、

XTT assay 同様、ほかのがん細胞と比べてより多くの細胞死を認めた (図 3-2)。

これらの結果は、AdARETfw は強い腫瘍溶解効果を持つことを示している。

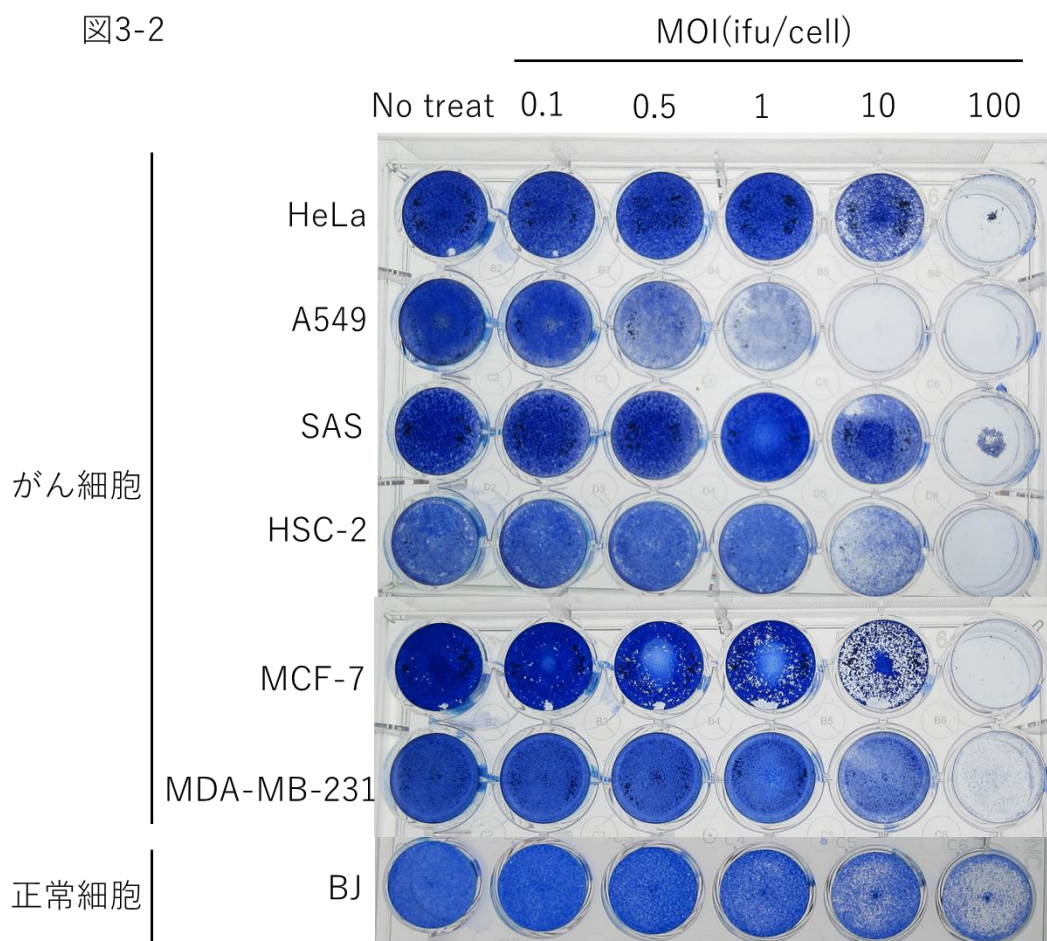


図 3-2 AdARETfw によるがん細胞溶解効果

AdARETfw の腫瘍溶解効果を検討するため、がん細胞 (HeLa 細胞, A549 細胞, SAS 細胞, HSC-2 細胞, MDA-MB-231 細胞, MCF-7 細胞) と正常細胞 (BJ 細胞) に AdARETfw を MOI0.1, 0.5, 1, 10, 100 (ifu/cell) で感染させ、感染後 7 日目に生細胞の染色を行った。

4. TNF- α , IL-18 刺激による HuR の局在の変化

がんの周囲には炎症を伴うことが多いため、炎症が起こっている環境での AdARETfw の効果を検討した。HeLa 細胞を炎症性サイトカイン IL-1 β , TNF- α (それぞれ 100ng/ml) で処理し, 3, 6, 12, 24 時間後に細胞を細胞質分画と核分画に分け, 細胞質分画中の HuR の発現量を Western 法にて解析した。その結果, IL-1 β では効果はなかったものの, TNF- α 処理により 3, 12, 24 時間後に, 細胞質中の HuR 発現量の上昇を認めた (図 4)。

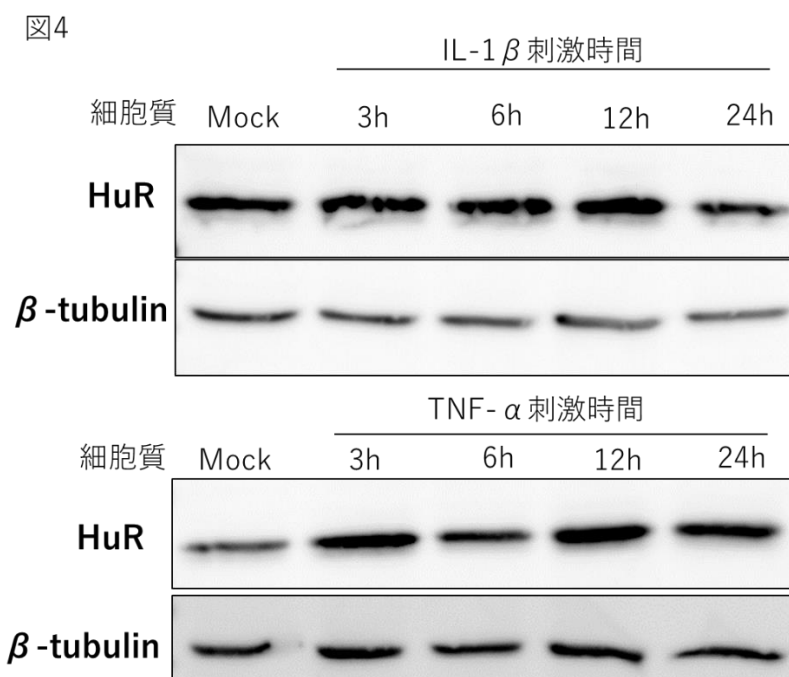


図 4 TNF- α , IL-1 β 刺激による HuR の局在の変化

HeLa 細胞に IL-1 β , TNF- α を 100ng/ml の濃度でそれぞれ添加し, 3 時間, 6 時間, 12 時間, 24 時間後に細胞質分画, 核分画に分けタンパクを回収し, 細胞質中の HuR の発現量を Western 法にて確認した。

5. TNF- α 刺激による HuR の局在の変化

次に、がん細胞に対する TNF- α の効果を検討するために、がん細胞（HeLa 細胞，A549 細胞，SAS 細胞，HSC-2 細胞，MDA-MB-231 細胞，MCF-7 細胞）を 100ng/ml の TNF- α で処理し，3 時間後に細胞質分画の HuR 発現量を Western 法にて確認した。その結果，TNF- α 処理により HeLa 細胞，HSC-2 細胞では細胞質中の HuR 発現量の上昇を認めた（図 5）。

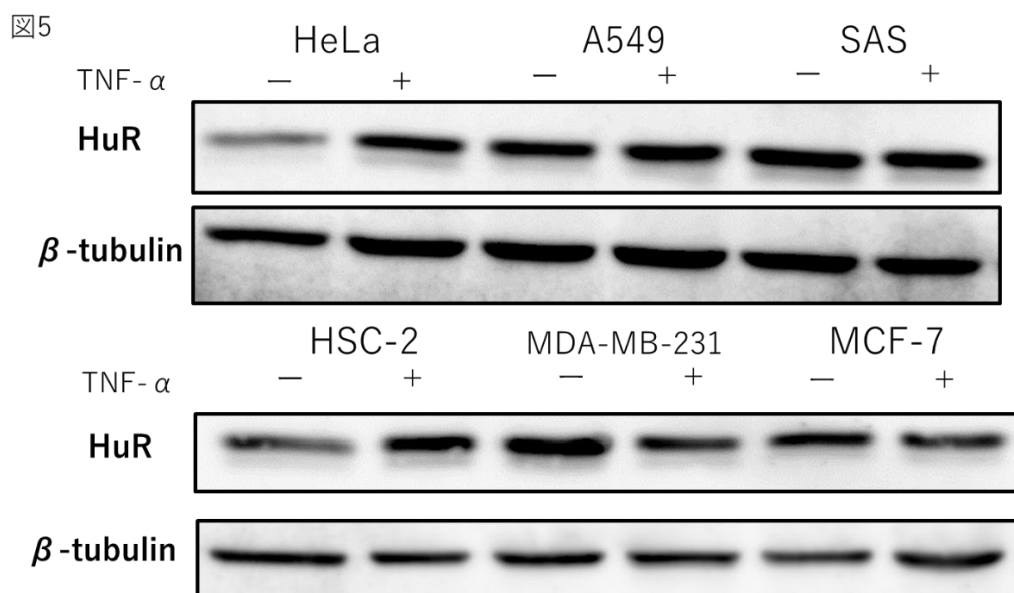


図 5 TNF- α 刺激による HuR の局在の変化

がん細胞（HeLa 細胞，A549 細胞，SAS 細胞，HSC-2 細胞，MDA-MB-231 細胞，MCF-7 細胞）に TNF- α を 100ng/ml の濃度で添加し，3 時間後に細胞質分画，核分画に分けタンパクを回収し，細胞質中の HuR の発現量を Western 法にて確認した。

6. AdARETfw と TNF- α との併用効果

TNF- α により AdARETfw の腫瘍溶解能が活性化されるかを検討するために，AdARETfw を MOI10 でがん細胞（HeLa 細胞，A549 細胞，HSC-2 細胞）と正

常細胞（BJ 細胞）に感染させ、TNF- α を 100ng/ml で同時に添加し、感染後 7 日目に細胞生存率の測定を XTT assay を用いて行った。HeLa 細胞、HSC-2 細胞では、AdARETfw と TNF- α の併用を行ったものでは、それぞれ単独で細胞を処理した時よりも細胞生存率は低下した。一方、正常細胞ではどの処理によっても細胞死は認められなかった（図 6）。これらの結果は、TNF- α 処理により AdARETfw の腫瘍溶解能が活性化されることを示しており、特に TNF- α により HuR の細胞質発現が上昇する細胞では、この効果が顕著であることを示している。

図6

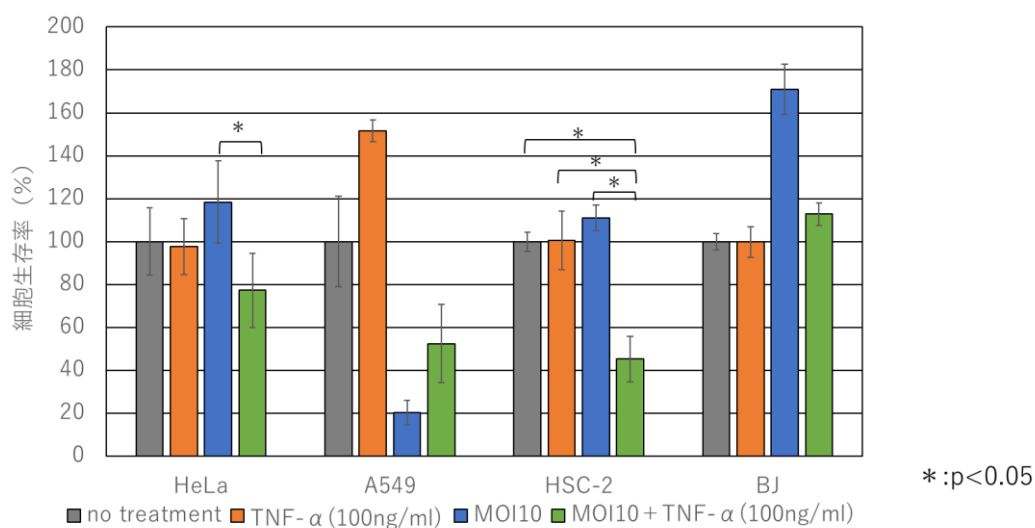


図 6 AdARETfw と TNF- α との併用効果

AdARETfw と TNF- α との併用効果を確認するため、がん細胞（HeLa 細胞、A549 細胞、HSC-2 細胞）と正常細胞（BJ 細胞）を播種し、24 時間培養後 AdARETfw を MOI10 (ifu/cell) で感染させ、TNF- α を 100ng/ml で同時に添加を行い、感染後 7 日目に細胞生存率の測定を XTT assay で行った。

考察

本研究ではアデノウイルスの E1A 遺伝子の 3'-UTR に TNF- α 遺伝子の ARE を組み込んだ腫瘍溶解アデノウイルス AdARETfw の腫瘍溶解効果の検討を行った。AdARETfw を感染させたがん細胞では E1A タンパクの発現量が上昇したが、正常細胞ではほとんど検出されなかった。また、E1A の発現と呼応して AdARETfw の生産効率はがん細胞で高くなり、殺細胞効果もがん細胞の方が高いことが明らかになった。さらに、TNF- α の添加により、HuR の細胞質発現レベルが上がり、AdARETfw の腫瘍溶解効果も上昇した。これらの結果は、AdARETfw が腫瘍溶解ウイルスとして利用可能であり、特に周りに炎症がある環境でその機能をより発揮できることを示している。

がん細胞では、常時 ARE-mRNA が安定化されているため、E1A-ARE-mRNA が安定化され、正常細胞では逆に ARE-mRNA が分解され、E1A-ARE-mRNA が分解され、E1A タンパクが合成されなかったために、AdARETfw はがん細胞特異的に増殖したと考えられる。この結果は AdARETfw はがん細胞特異的に増殖できることを示しており、同様に、E1A タンパクを多く発現していた A549 細胞、HeLa 細胞ではウイルス生産効率が正常細胞と比べ高く、E1A タンパクの発現量と生産効率が相関するような傾向があり合理的な結果であった。

がん細胞を取り巻く微小環境にはマクロファージや好中球などの炎症細胞が

多く存在し、IL-1 β や IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインが産生されている。このような正常組織の微小環境と異なる癌微小環境因子を応用し、AdARETfw の腫瘍溶解効果を増強させることができるのではないかと考えた。ARE-mRNA の安定化は炎症やウイルス感染、低酸素状態、放射線照射など様々な生物学的、病理学的刺激により、HuR の核外輸送が促進されると報告されている³¹⁻³³⁾。本研究では、炎症性サイトカインである IL-1 β や TNF- α に着目し、それぞれの刺激下による HuR の核外輸送の有無を Western 法で検討を行なった。その結果、HeLa 細胞では、IL-1 β 刺激により細胞質に存在する HuR の発現量の上昇を認めなかったが、TNF- α ではその発現量の上昇を認めた。この結果は、TNF- α レセプターと IL-1 ファミリーサイトカインに対するレセプターの発現の違いなどによるものと考えられ、今後、検討を行なう必要がある^{34,35)}。

さらに、上述の結果より、TNF- α の刺激により ARE-mRNA が安定化され、より E1A-ARE-mRNA が安定化し AdARETfw の複製がより活性化されることが予想されたため、その他の多くのがん細胞に対しても TNF- α の効果を検討したところ、HeLa 細胞、HSC-2 細胞では TNF- α 刺激で細胞質中の HuR 発現量が増加した。そこで、TNF- α がこれらの細胞で AdARETfw の腫瘍溶解効果を増強させるかどうか検証した。その結果、TNF- α 刺激により、これらのがん細胞では AdARETfw 単独よりも高い腫瘍溶解効果を示し、TNF- α が AdARETfw

の効果を増強させる因子として有用であることが示された．これまで関節リウマチやベーチェット病など，TNF- α の関連する疾患の治療では，TNF 阻害薬などにより TNF- α の働きを抑制する治療法が行われてきている³⁶⁾．TNF- α を利用し効果増強させることができれば，AdARET は周囲に炎症が存在するがん以外の疾患に対しても有用である可能性がある．今後は，AdARETfw を用いた治療法が，がん以外の治療法となりうるかどうかについても検討を進めていく．

これらの結果から，AdARETfw はがん細胞特異的に腫瘍溶解効果を示すこと，また周囲に炎症を伴う環境下では，より大きな効果を発揮する可能性が示唆された．今後は動物を用いた *in vivo* での実験を行って AdARETfw の効果の検証を行う必要がある．さらに，TNF- α との併用効果を他の腫瘍溶解ウイルスと比較し，さらに AdARETfw の有用性を解析する必要がある．

結論

我々の開発した腫瘍溶解アデノウイルス AdARETfw はがん細胞特異的に増殖し腫瘍溶解効果を発揮した。また、TNF- α との併用によりその腫瘍溶解効果を増強され、炎症の存在する環境下で有用なウイルスであることが明らかになった。

謝辞

本稿を終えるにあたり数々のご指導，ご協力をいただきました北海道大学歯学院歯学研究院口腔病理病態学講座血管生物分子病理学教室，樋田京子先生，東野史裕先生，間石奈湖先生，松田彩先生，教室員各位ならびに口腔診断内科学教室北川善政先生に厚く御礼申し上げます．

参考文献

- 1) John Bell Grant, McFadden: Viruses for Tumor Therapy. *Cell Host & Microbe* 15: 260-265, 2014.
- 2) Eissa IR, Bustos-Villalobos I, Kodera Y, Kasuya H, et al: The Current Status and Future Prospects of Oncolytic Viruses in Clinical Trials against Melanoma, Glioma, Pancreatic, and Breast Cancers. *Cancers* 10: 356, 2018.
- 3) Wu Z, Ichinose T, Naoe Y, et al: Combination of Cetuximab and OncolyticVirus Canerpaturev Synergistically Inhibits Human Colorectal Cancer Growth. *Molecular Therapy* 13: 107-115, 2019.
- 4) 田中 実, 藤堂 具紀: G47 Δ を用いた悪性グリオーマのウイルス療法. *脳神経外科ジャーナル* 25 巻: 12 号, 973-978, 2016.
- 5) Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford-Perricaudet LD, PoenaruL, Perricaudet M, Kahn A, and Peschanski MR: Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat Genet* 3: 224-228, 1993.
- 6) Bajocchi G, Feldman SH, Crystal RG, and Mastrangeli A.: Direct in vivo gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using

- recombinant adenovirus vectors. *Nat Genet* 3: 229-234, 1993.
- 7) Davidson BL, Allen ED, Kozarsky KF, Wilson JM, and Roessler BJ.: A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat Genet* 3: 219-223, 1993.
 - 8) Hashimoto M, Aruga J, Hosoya Y, Kanegae Y, Saito I, and Mikoshiba K.: A neural cell-type-specific expression system using recombinant adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 7: 149-158, 1996.
 - 9) 東野史裕: 腫瘍溶解ウイルスの口腔領域疾患への応用 (Application of oncolytic virus for oral diseases) , 北海道歯学雑誌 38 : 247-248, 2018.
 - 10) Brennan CM, Steitz JA: HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58: 266-77, 2001.
 - 11) Hinman MN, Lou H: Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci* 65: 3168-81, 2008.
 - 12) Hasegawa H, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kitamura T, Tanaka S, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M and Higashino F: HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells via the different manner from normal cells. *Br. J. Cancer* 100: 1943-1948, 2009.
 - 13) Lopez de Silanes I, Lal A, Gorospe M: HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol* 2: 11-13, 2005.
 - 14) Chen CY, Shyu AB: AU-rich elements: characterization and

- importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20: 465-70, 1995.
- 15) Brennan CM, Steitz JA: HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58: 266-77, 2001.
 - 16) Hinman MN, Lou H: Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci* 65: 3168-81, 2008.
 - 17) Higashino F, Aoyagi M, Takahashi A, Ishino M, Taoka M, Isobe T, et al: Adenovirus E4orf6 targets pp32/LANP to control the fate of ARE-containing mRNA by perturbing the CRM1-dependent mechanism. *J Cell Biol* 170: 15-20, 2005.
 - 18) Kuroshima T, Aoyagi M, Yasuda M, Kitamura T, Jehung JP, Ishikawa M, et al: Viral-mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation. *Oncogene* 30: 2912-20, 2011.
 - 19) Srikantan S, Gorospe M: HuR function in disease. *Front. Biosci* 17: 189-205, 2012.
 - 20) Shenk T. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fundamental virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: pp 1053-88, 2001.
 - 21) Berk AJ. Adenoviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: pp 1704-31,

2013.

- 22) James R. Bischoff, David H. Kirn, Angelica Williams, Carla Heise, et al:
An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient
human tumor cells. *Science* 274(5286):373-6, 1996.
- 23) Takeshi Kawashima, Shunsuke Kagawa, Naoya Kobayashi,et al:
Telomerase-Specific Replication-Selective Virotherapy for Human
Cancer. *Clin Cancer Res*10: 285-292, 2004.
- 24) Yuuri Hashimoto, Yuichi Watanabe, Yoshiko Shirakiya, et al:
Establishment of biological and pharmacokinetic assays of
telomerase - specific replication - selective adenovirus. *Cancer Sci* 99:
385–390, 2008.
- 25) Ferrone C, Dranoff G: Dual,roles for immunity in gastrointestinal
cancers. *J Clin Oncol* 28 (26) : 4045-51, 2010.
- 26) Isabel Lo'pez de Silanes, Jinshui Fan, Xiaoling Yang, et al: Role of the
RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* 22: 7146–
7154, 2003.
- 27) Michael Nevels, Thilo Spruss, Hans Wolf and Thomas Dobner : The
adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by

- antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene* 18: 9-17,1998.
- 28) Aoyagi M, Higashino F, Yasuda M, Takahashi A, Sawada Y, Totsuka Y, Kohgo T, Sano H, Kobayashi M. and Shindoh M: Nuclear export of the adenovirus E4orf6 protein is necessary for its ability to antagonize the apoptotic activity of the BH3-only proteins. *Oncogene* 22: 6919-6927, 2003.
- 29) Kindsmu"ller,K, Groitl,P, Ha"rtl,B, Blanchette,P, Hauber,J. and Dobner,T: Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 6684–6689, 2007.
- 30) Yanagawa-Matsuda A, Mikawa Y, Habiba U, Kitamura T, Yasuda M, Towfik-Alam M, Kitagawa Y, Minowa K, Shindoh M, Higashino F: Oncolytic potential of an E4-deficient adenovirus that can recognize the stabilization of AU-rich element containing mRNA in cancer cells. *Oncol. Rep.* 41: 954-960, 2019.
- 31) Suswam, E. A. Nabors, L. B, Huang, Y, Yang, X, King, P. H: IL-1beta induces stabilization of IL-8 mRNA in malignant breast cancer cells via

- the 3' untranslated region. Involvement of divergent RNA-binding factors HuR, KSRP and TIAR. *Int. J. Cancer* 113: 911–919, 2005.
- 32) Nabors, L. B, Suswam, E, Huang, Y, Yang, X, Johnson, M. J, King, P. H: Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells. A role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Res* 63: 4181–4187, 2003.
- 33) Jun Wang, Yan Guo, Huili Chu, Yaping Guan, Jingwang Bi, et al: Multiple Functions of the RNA-Binding Protein HuR in Cancer Progression, Treatment Responses and Prognosis, *Int. J. Mol. Sci* 14: 10015-10041, 2013.
- 34) 向田直史: 【マクロファージのすべて】基礎 IL-1 ファミリーサイトカインと TNF(解説/特集), *医学のあゆみ*, (0039-2359)259 巻 5 号: 365-370, 2016.
- 35) Dmitrieva-Posocco, Dzutsev A, Posocco DF, Hou V, Yuan W: Cell-Type-Specific Responses to Interleukin-1 Control Microbial Invasion and Tumor-Elicited Inflammation in Colorectal Cancer . *Immunity*. 50(1):166-18, 2019.
- 36) 天野 宏一: TNF 阻害薬, *日内会誌* 100 : 2966～2971, 2011.