HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	E4領域によるアデノウイルス後期遺伝子群 翻訳反応の活性化［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	内田, 知希
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16461号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94905
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Uchida_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　内　田　知　希

学　位　論　文　題　名

E4 領域によるアデノウイルス後期遺伝子群　翻訳反応の活性化

キーワード（５つ）アデノウイルス，腫瘍溶解性ウイルス，翻訳，E4，tripartite leader

腫瘍溶解性ウイルスはがんに対する外科的治療、放射線治療、化学療法とは根本的に異なるモダリティであり、特に化学療法や放射線治療に対する抵抗性を獲得した症例に対する有効な治療手段となる可能性を有している。臨床応用されているＤＮＡウイルスの中でアデノウイルスは最も詳細に研究されているウイルスであり、腫瘍細胞の溶解においては後期遺伝子ユニットからのウイルス後期タンパク質の発現が必須となる。後期タンパク質群の転写は共通の後期主要プロモーター(Major late promoter: MLP)によってドライブされる。宿主細胞においては感染後期（感染後24時間以降）には宿主細胞の遺伝子発現は極度に抑制され、ウイルス後期タンパク質の転写・翻訳が観察される。これら後期タンパク質の発現には初期遺伝子の発現が必須である。アデノウイルスの初期遺伝子は4つの転写ユニットからなり、E1およびE4領域からの遺伝子発現がMLPの活性化に必要なことが知られている。E1領域からの遺伝子発現は感染６時間後から検出されるが、これのみでは後期タンパク質の発現には不十分であり、E1発現からやや遅れて(感染12時間以降)検出されるE4タンパク質の発現が重要となる。E4領域を削除した5型アデノウイルス(Ad5)は宿主細胞中で後期蛋白質を発現させることができず、腫瘍溶解性を示すことができない。Ad5後期遺伝子は５つの転写ユニットからなるが、全ての後期mRNAの5’非翻訳領域(untranslated region: UTR)には同一の塩基配列が含まれるのが特徴である。この203ヌクレオチドからなる5’ UTRはtripartite leader(TL)と呼ばれ、この配列の存在により下流にコードされる遺伝子発現が強調されることが知られているが、この遺伝子発現亢進の詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで著者はH1299肺がん細胞やH1299に放射線を照射して得られたH1299IRなど、様々な細胞を用いて、Ad5 E4遺伝子群がTLを介した遺伝子発現に関わっているのか否か、さらにいかなる細胞性因子が関わっているのかを検討した。実験には肺がん細胞H1299と24Gyの照射後に生残したH1299IRさらにE4領域約3200塩基対を導入したH1299E4を使用した。Real Time PCR法によりTL配列を介したタンパク質発現の上昇は翻訳反応の活性化によることが明らかとなった。このような翻訳反応の活性化は野生型E4遺伝子の導入細胞H1299E4では著しく増強された。一方、同一条件化においてH1299IRではこのような増強反応は減弱していた。これら細胞の遺伝子発現プロフィールをマイクロアレイ法にて解析したところ、RNA結合タンパク質であるKHDRBS3の発現が親株に対して、H1299IRでは0.006倍に低下していた。内在性KHDRBS3が低発現であることが示されているMCF7細胞においてはTL配列による翻訳反応の活性化はわずかであり、アデノウイルスE4によるルシフェラーゼ活性の亢進も見られなかった。一方、内在性KHDRBS3の発現量がH1299の2倍以上であるHEK293細胞では、TL配列による翻訳反応の活性化がみられ、そこにE4を導入した場合はさらにルシフェラーゼ活性が上昇していた。E4転写ユニットには、E4 orf1、E4 orf2、E4 orf3、E4 orf3/4、E4 orf4、E4 orf6、E4 orf6/7のタンパク質がコードされている。著者はこれら各々のE4タンパク質が単独でTL配列由来の翻訳増強を行っているかについても検討を加えた。リポーターアッセイの結果は、E4 orf4がこの増強反応に単独で関わっていることを示唆するものであった。またこの増強作用はProtein phosphatase 2A (PP2A)に結合できないE4 orf4ミュータントでは消失していたことからこの翻訳反応の増強にはPP2Aが大きな役割を果たしていることが予想された。

TL配列の変異体を用いた実験から、この作用にはTL配列の方向性が重要であり、かつ5’側90ヌクレオチドを削除すると増強作用が消失することが示された。しかしながらこの90ヌクレオチドには、従来

KHDRBS3の結合標的配列とされる5’-[AU]UAA-3は認められず、新たにこの配列を5’側に組み込んだルシフェラーゼ・リポーターのライブラリーの中に、TL配列を組み込んだルシフェラーゼ・リポーターを上回る活性を示すものはなかった。これは、この反応におけるKHDRBS3の標的配列は5’-[AU]UAA-3ではないことを示唆するものと考えられた。H1299IR細胞で見られたKHDRBS3の発現低下は細胞性タンパク質の翻訳反応を抑えるものであり、細胞が放射線照射やウイルス感染といったストレス環境下において細胞内の限られたリソースを有効に使用して、自己の生残を達成するための戦略である可能性が考えられるが、アデノウイルスはこのような宿主細胞においてもTL配列によりウイルスタンパク質の翻訳量を高いレベルに保っていることが考えられた。

腫瘍溶解ウイルスを含む新規のがん治療戦略は、治療効果において新しい可能性を提供する。腫瘍溶解性ウイルス完成形は、がん細胞に特異的に感染して増殖し、最終的にがん細胞を破壊するものと想定されている。このような腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍の微小環境や免疫システムをも利用し、かつがん細胞特有の特徴を利用して感染を引き起こすため、健常な細胞にはほとんど影響を与えないはずである。著者の所属するグループは3’UTRを改変した腫瘍溶解性アデノウイルスの作成に成功しており、今後さらにTL配列を介したウイルス後期遺伝子産物の翻訳を活性化する機構を用いて、ウイルスを改良することができれば上記のような腫瘍溶解性ウイルスの完成形により近づくことが可能ではないかと考える。