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_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　内　田　知　希

審査担当者	主査　教授	長　谷　部　晃
	副査　教授	大　廣　洋　一
	副査　教授	樋　田　京　子
	副査　特任准教授	安　田　元　昭

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

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，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．

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治療法であり，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．5 型ヒトアデノウイルスは代表的な腫瘍溶解性ウイルスであるが，後期遺伝子を発現できない変異型アデノウイルスは，腫瘍溶解性を示すことができない．後期遺伝子は共通の後期主要プロモーターによってドライブされるが，それには E1 および E4 領域からの遺伝子発現が必要なことが知られている．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．この配列は 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．そこで本研究では 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 TL による遺伝子発現亢進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 ならびにそれらに放射線を照射後に生残した H1299IR，さらに E4 領域を導入した 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り，それは H1299E4 で著しく増強されたが，H1299IR ではこのような増強反応は減弱していた．そこで，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すると，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 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．また E4 の中では E4 orf4 がこの翻訳増強作用に単独で関わっていることから，さらにこの機能には Protein phosphatase 2A 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ることがわかった．また TL 配列による翻訳反応の増強における KHDRBS3 の標的配列は 5'-[AU]UAA-3’ではないことが示唆された．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．しかしながら，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．以上のことから，このメカニズムは腫瘍微小環境での様々な状態のがん細胞に対して，ウイルスの腫瘍溶解性をより高める一助になると思われた．

審査担当者により研究内容および関連事項についての質問を行った．主な質問事項については以下の通りである．

1. 5'-[AU]UAA-3’配列と作製したクローンから予測される RNA の二次構造との関係性についての解説
2. KHDRBS3 が高発現している正常細胞に対するウイルスの増殖はどのように考えるか
3. 腫瘍溶解性ウイルスによって溶解したがん細胞はどのような細胞死に分類されるか
4. 腫瘍溶解性ウイルスと免疫チェックポイント阻害剤の併用について
5. 腫瘍溶解性ウイルスと免疫チェックポイント阻害剤を併用する場合，投与する順序についての考察
6. 既感染による獲得免疫によって腫瘍溶解性ウイルスの効果は変化するのか
7. KHDRBS3 は核と細胞質をどのような機序で行き来しているのか
8. 放射線などのストレスを受けた細胞における TL 配列の意義についてと，予想される治療法について

申請者はすべての質問に対して，適切かつ明快な回答・説明を行うことができた．また，今後の研究についても発展的な将来展望を示した．

以上より本研究には結果の新規性が認められると同時に，根拠に基づいた論理展開がなされており，申請者が学位取得に十分な業績と知識を有していることが確認された．さらに本研究は，今後腫瘍溶解性ウイルスを用いた研究や治療の発展へとつながる可能性が高いことも評価され，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．