



HOKKAIDO UNIVERSITY

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; Kato, Yasushi; 松田, 彩 他
Citation	北海道歯学雑誌, 46, 18-28
Issue Date	2025-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96137
Type	journal article
File Information	46_05.pdf



原 著

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

加藤 泰史^{1,2)} 松田 彩³⁾ 間石 奈湖³⁾ 北村 哲也⁴⁾
樋田 京子³⁾ 北川 善政²⁾ 東野 史裕⁵⁾

抄 録：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エレメントで、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 (Human antigen R) 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。

キーワード：腫瘍溶解ウイルス, HuR (Human antigen R), AU-rich element (ARE), E1A, TNF- α

緒 言

これまで、がん治療に対して、手術療法、化学療法、放射線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-REV²⁻³⁾ やG47 Δ ⁴⁾ 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

¹⁾ 〒073-0196 砂川市西4条北3丁目1-1

砂川市立病院 歯科口腔外科

²⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院 歯学研究院 口腔病態学講座 口腔診断内科学教室

³⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院 歯学研究院 口腔病態学講座 血管生物分子病理学教室

⁴⁾ 〒060-0003 札幌市中央区北3条西17丁目2-2-702

北海道口腔病理診断所

⁵⁾ 〒069-8585 北海道江別市西野幌59-2

北海道情報大学 医療情報学部 医療情報学科

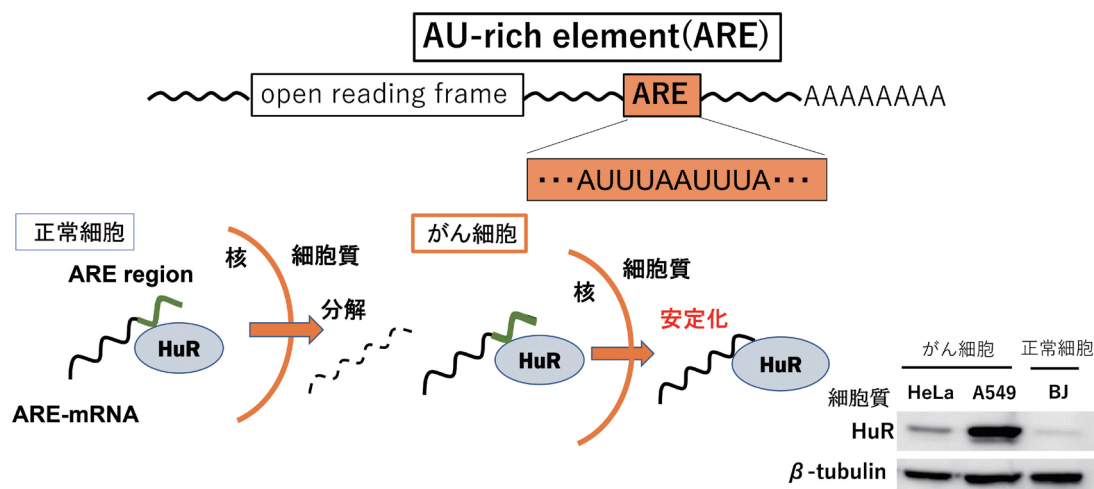


図1 AU-rich element (ARE) とARE-mRNAの安定化

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、主にが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。

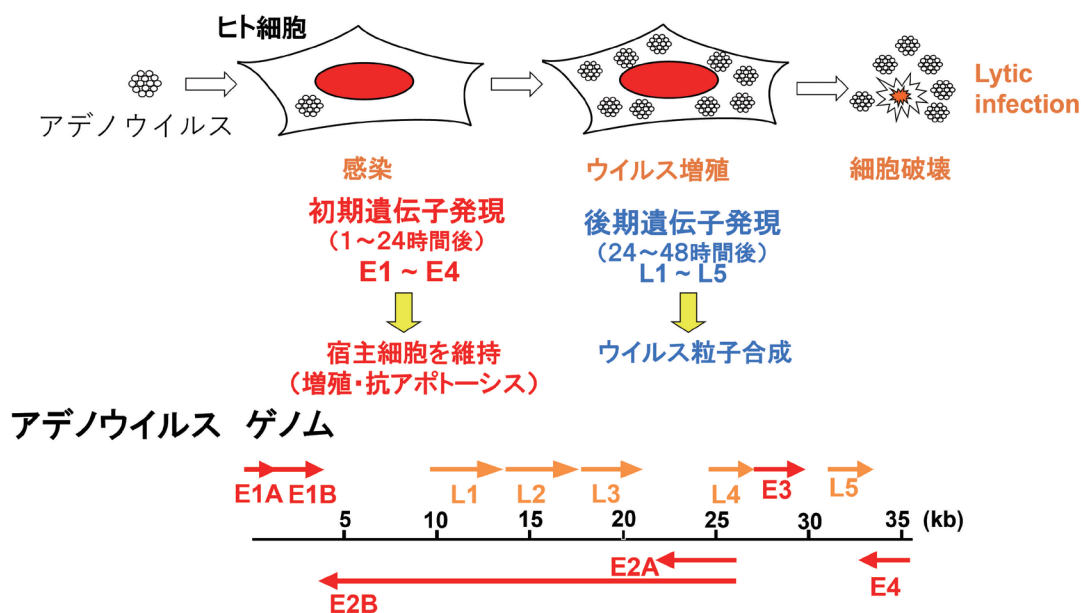


図2 アデノウイルスの複製にE1Aの発現が必須

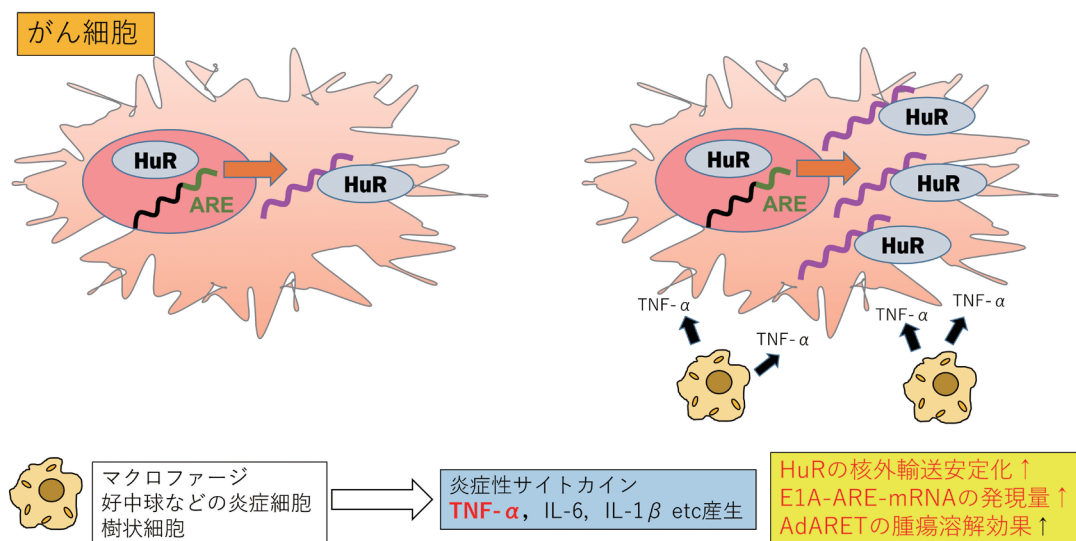
アデノウイルス感染後、24時間後までに初期遺伝子E1A, E1B, E2, E3, E4の転写が活性化され、それ以降は後期遺伝子が発現し、ウイルスが複製される。E1Aは他の全てのウイルス遺伝子の転写を活性化できるため、アデノウイルスの増殖にはE1Aの発現が必須となる。

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1)。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エレメントであり、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)}。

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

図3 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。

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1)。

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2)。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、一部のが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⁾。

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3)。

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4)、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。

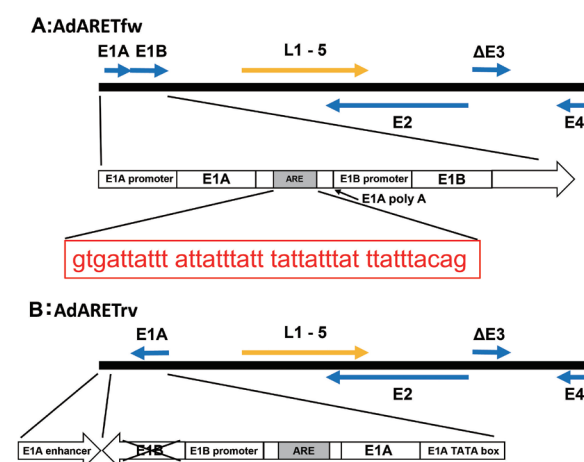


図4 AdARETの構造

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。

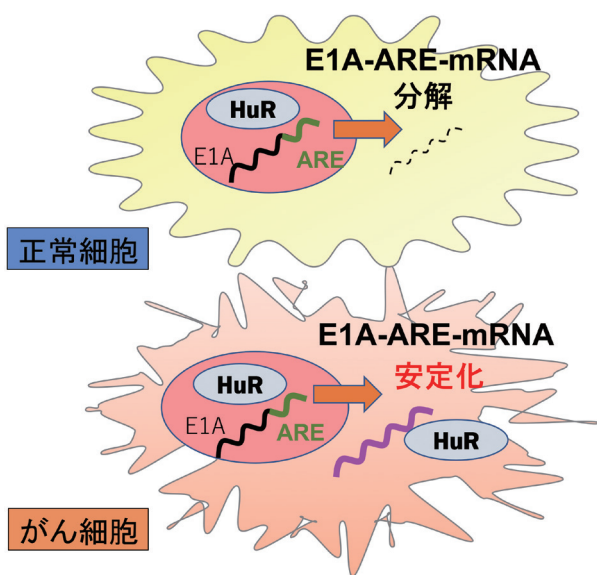


図5 E1A-ARE-mRNAはがん細胞で安定化する

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。

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5)、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。

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

用い37℃, 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E1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4)。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回繰り返して回収した。ウイルス粒子の力価 (infectious unit:ifu) はAdeno-XTM Rapid Titer Kit (Clontech) を用いて測定した。

3. タンパク質の抽出

10 cm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 (-), 日本製薬株式会社, Japan) にて洗浄後, fractionation lysis buffer (10 mM Tris-HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 % NP40, protease Inhibitor Cocktail) を200 μ l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℃, 12,000 rpmで30秒間遠心分離し, 上清を200 μ l回収し, 細胞質分画とした。lysis bufferを100 μ l加えペレットを2回洗浄し, 4℃, 12,000 rpmで30秒間遠心分離し, 残ったペレットにlysis bufferを30 μ l加え超音波ホモジナイザー (Sonifier 250, BRANSON, USA) により核を破碎した。その後, 4℃, 14,000 rpmで10分間遠心分離し, 上清30 μ l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 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris HCl, 50 mM NaF, 5 mM 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℃, 14,000 rpm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500 mMTris HCl pH 6.8, 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℃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100 ng/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 (100 V, 80分間) し、ポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride : PVDF) 膜 (Millipore, USA) に転写 (100 V, 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⁾, E1A M58 (Santa Cruz, USA), Lamin B C-20 (Santa Cruz, USA) をそれぞれ4 °C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 °C、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回繰り返す、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づつ添加し、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-X™ Rapid 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-X™ Rapid Titer Kit, Takara, Japan) 250 μ lを加え37 °C、60分間反応させた。PBS洗浄を2回行いDAB染色にてヘキソタンパクを染色した。Adeno-X™

Rapid 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。

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づつ添加し、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560 nm)。

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。

7. データ処理

Western blottingは定量化を行い、正常細胞とがん細胞の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。それぞれのグラフは平均値とSD値を求め、グラフを作成した。また、AdARET単独での効果の検討では、未処理群とAdARET処理群の2群間、AdARETfwとTNF- α の併用効果の検討では、TNF- α 単独処理群あるいはAdARETfw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。

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

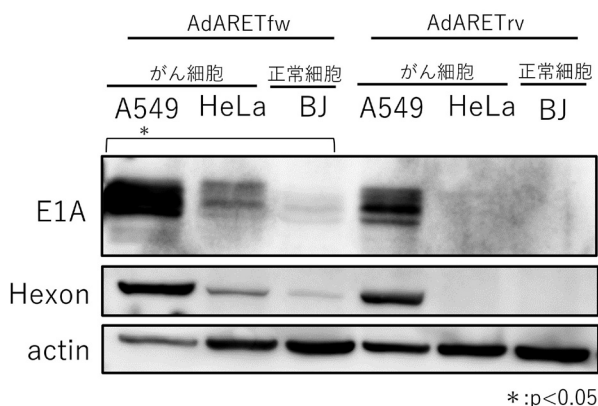


図6 がん細胞と正常細胞でのアデノウイルス遺伝子産物の発現
AdARETfw, AdARETrvをMOI10 (ifu/cell) でがん細胞 (A549細胞, HeLa細胞) と正常細胞 (BJ細胞) に感染させ、感染から4日後にタンパクを回収し、アデノウイルスの初期遺伝子産物であるE1Aと後期遺伝子産物Hexonの発現量をWestern blottingで調べた。

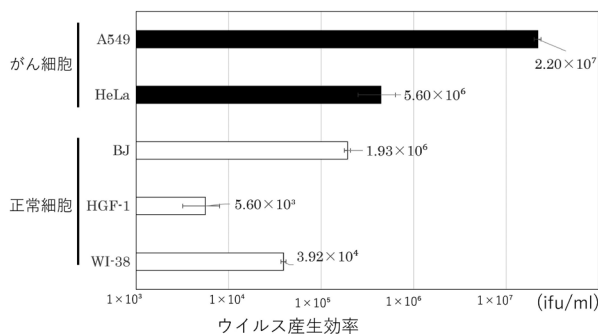


図7 がん細胞及び正常細胞でのウイルス産生効率
ウイルスの感染効率の測定を行うため、がん細胞 (A549細胞, HeLa細胞) と正常細胞 (BJ細胞, HGF-1細胞, WI-38細胞) にAdARETfwをMOI1 (ifu/cell) で感染させ、感染から6日後にウイルスの回収を行った。回収したウイルスをHEK293細胞に感染させ、感染後48時間後にHexonタンパクの染色を行いウイルスの産生効率の測定を行った。

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 blotting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6)。さらに、ウイルス後期遺伝子産物Hexon (L3) についても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6)。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。

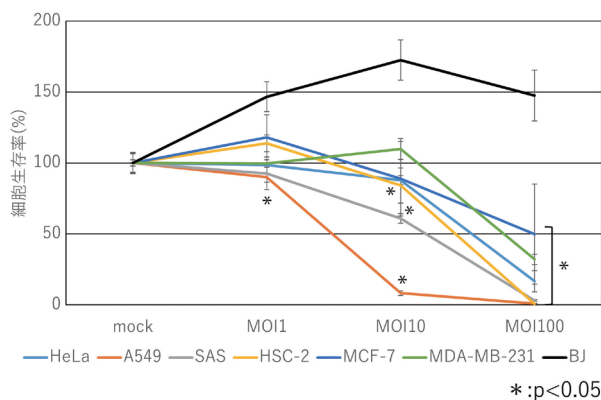


図8 AdARETfwによるがん細胞溶解効果

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, MCF-7細胞, MDA-MB-231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日目に細胞生存率の測定をXTT assayで行った。

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7)。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。

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8)。

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

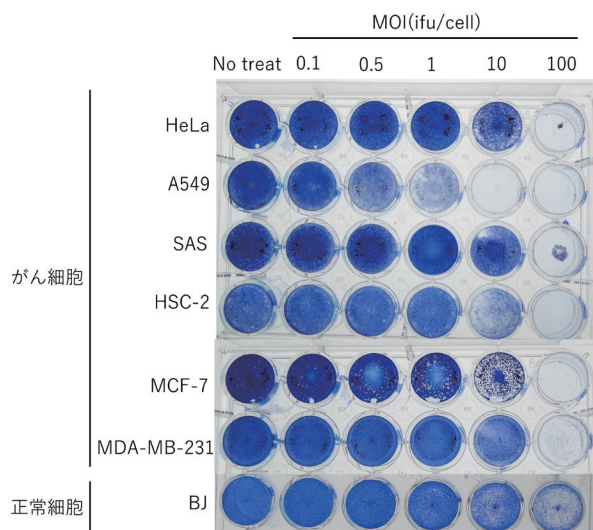


図9 AdARETfwによるがん細胞溶解効果

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、MCF-7細胞、MDA-MB-231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。

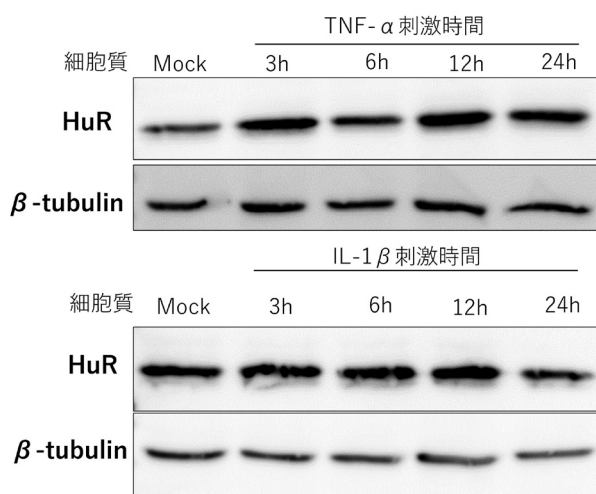


図10 TNF- α 、IL-1 β 刺激によるHuRの局在の変化

HeLa細胞にTNF- α 、IL-1 β 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 blottingにて確認した。

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（図1）、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9）。

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。

4. TNF- α 、IL-1 β 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

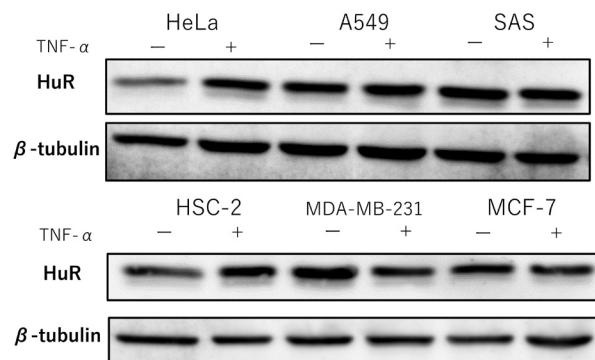


図11 TNF- α 刺激によるHuRの局在の変化

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 blottingにて確認した。

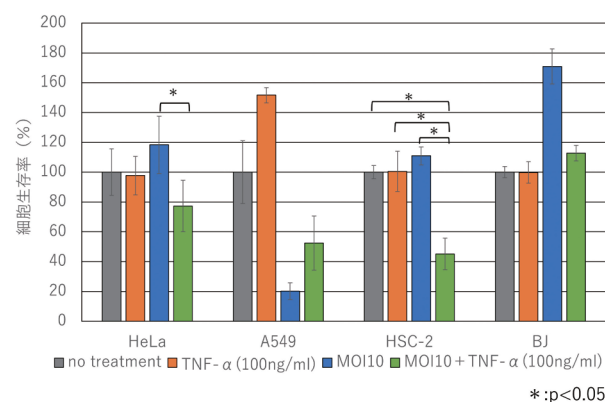


図12 AdARETfwとTNF- α との併用効果

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。

細胞を炎症性サイトカインIL-1 β 、TNF- α （それぞれ100 ng/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 blotting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10）。

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100 ng/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 blotting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11）。

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100 ng/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12)。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。

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なった。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。しかし、がん細胞の種類によってはAdARETfwの濃度が低い条件では、ウイルス刺激によるがん細胞の増殖と考えられる結果が認められたが、高濃度の条件ではすべてのがん細胞に腫瘍溶解効果を認めた。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。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、ARE-mRNAが安定化し、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 blotting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

ました北海道情報大学 医療情報学部医療情報学科, 東野史裕先生, 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, 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 Oncolytic Virus 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, Poenaru L, 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 Lopez 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) Kinds Mueller, K, Groitl, P, Hartl, 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.

ORIGINAL

Development and analysis of a new oncolytic adenovirus that utilizes mRNA stabilization mechanisms.

Yasushi Kato^{1, 2)}, Aya Matsuda³⁾, Nako Maishi³⁾, Tetsuya Kitamura⁴⁾, Kyoko Hida³⁾
Yoshimasa Kitagawa²⁾ and Fumihiro Higashino⁵⁾

ABSTRACT : mRNAs containing AU-rich elements (AREs) are exported from the nucleus and stabilized in the cytoplasm of many cells, including cancer cells. AREs are RNA elements that promote the degradation of mRNA transcribed from genes associated with cell proliferation, and ARE mRNA degradation and stabilization are controlled by proteins that bind to AREs. HuR, a member of the embryonic lethal abnormal vision family of RNA-binding proteins, is one such protein that contributes to the nuclear export and stabilization of ARE-mRNA. Cancer cells with stabilized ARE mRNA have increased expression levels of HuR in the cytoplasm. We developed an oncolytic adenovirus (AdARET) that incorporates an ARE from the tumor necrosis factor (TNF- α) into the 3' untranslated region of the adenovirus early region 1A gene (E1A), which is essential for adenovirus replication. In cancer cells infected with AdARET, E1A mRNA containing ARE is stabilized, and the virus proliferates specifically in cancer cells. Here, we investigated the oncolytic effect of the virus and factors that enhance this effect.

AdARET infection induced the expression of E1A protein, which is essential for adenovirus proliferation, specifically in cancer cells, but E1A was hardly expressed in normal cells. Moreover, enhanced virus production was observed in infected cancer cells, A549 cells, and HeLa cells compared with non-infected cells. AdARET showed a concentration-dependent tumor lytic effect on cancer cells, while the combined use of AdARET and TNF- α further reduced cell viability, suggesting that TNF- α enhances the tumor lytic effect of AdARET. These results indicate that AdARET exerts tumor lytic effects specifically on cancer cells, and that these are enhanced by surrounding inflammatory molecules such as TNF- α .

Key Words : oncolytic virus, HuR, AU-rich elements, E1A, TNF- α

¹⁾ Department of Dental and Oral Surgery, Sunagawa City Hospital, 1-1, Kita 3 chome, Nishi 4 jou, Sunagawa-shi, Hokkaido 073-0196

²⁾ Oral Diagnosis and Medicine, Department of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita 13 jo, Nishi 7 chome, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8586

³⁾ Vascular Biology and Molecular Pathology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13 jo, Nishi 7 chome, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8586

⁴⁾ Hokkaido Oral Pathology Diagnostic Clinic, 2-2-702 Nishi 17 chome, Kita 3 jou, Chuo-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-0003

⁵⁾ Department of Medical Management and Informatics, Faculty of Medical Informatics, Hokkaido Information University, 59-2 Nishinopporo, Ebetsu-shi, Hokkaido 069-8585