

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10130

研究課題名（和文）難治性口腔がんに有効な腫瘍溶解ウイルスの開発

研究課題名（英文）Development of effective oncolytic virus for

研究代表者

安田 元昭（YASUDA, Motoaki）

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：90239765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がんは未だ主要な死因の一つであるが、ここ数十年の研究により、がん幹細胞の発見やがん細胞が免疫チェックポイントを欺く生存戦略の解明がなされ、がん治療における標的がより明確なものとなってきている。腫瘍溶解性アデノウイルスは有望ながん治療法の一つであるがん幹細胞のような治療抵抗性の腫瘍細胞に対する効果は明らかでなかった。我々はがん幹細胞の性質を維持するのに必要とされるOCT3/4およびSOX2がアデノウイルスの増殖を抑制することと、このような抑制を克服できるアデノウイルスに導入可能な遺伝子配列を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞の制御はがん克服における大きな課題のひとつであり、アデノウイルスは有望な治療手段の候補である。本研究で見出した遺伝子配列はがん幹細胞におけるアデノウイルスの増殖を活性化し、我々がこれまでに開発してきたがん細胞特異的な増殖を可能にする遺伝子配列と併用することにより、よりピンポイントに効果的ながん細胞の除去を可能にするものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cancer remains one of the leading causes of death, but in recent decades, research has led to the discovery of cancer stem cells and the elucidation of survival strategies by cancer cells that deceive immune checkpoints, resulting in clearer targets in cancer treatment. Oncolytic adenovirus is one of the promising cancer therapies, but its efficacy against treatment-resistant tumor cells such as cancer stem cells has not been clear. We found that OCT3/4 and SOX2, necessary to maintain the properties of cancer stem cells, suppress adenovirus proliferation, and identified gene sequences that can be introduced into adenoviruses to overcome such suppression.

研究分野：微生物学

キーワード：アデノウイルス 腫瘍溶解ウイルス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでアデノウイルス初期遺伝子コード領域の3' UTR(非翻訳領域)に ARE(AU rich element)配列を付与することにより、がん細胞特異的に増殖する腫瘍溶解性アデノウイルスの開発を行ってきた。このウイルスは効果的にがん細胞を除去できることが示されてきたが、近年のがん治療の目標である「がん幹細胞における効果」については不明な点が多かった。一方、オートファジーは細胞の修復に関わる重要な機構であり、がん組織の維持においても大きな役割を果たしていることが報告されていたが、オートファジーとアデノウイルス複製に関して「オートファジーがウイルス増殖にとって有益か否か」については相反する研究報告も多く、一定の見解は得られていなかった。そもそも生存の為に戦略であるオートファジーがアデノウイルス感染確立時期(感染2時間以内)にどのような働きをしているかについての知見はない。本研究は今後のウイルスによるがん治療法のアップグレードだけでなく、新型コロナウイルスに代表される新規のウイルス感染に対する感染防御に関する基礎的知見を得ることに役立つと考えられた。

2. 研究の目的

我々の先行実験は、放射線抵抗性のがん細胞ではアデノウイルスの複製が抑制される傾向があることが明らかにされており、このような弱点を克服し、がん幹細胞様細胞においても効率的に複製する腫瘍溶解ウイルスを作成すること、幹細胞の持つウイルス感染防御機を明らかにすること、オートファジーとアデノウイルス感染初期の関りを明らかにすること、アデノウイルス E4 領域の感染初期の役割を明らかにすること、を到達目標として本研究が計画された。

3. 研究の方法

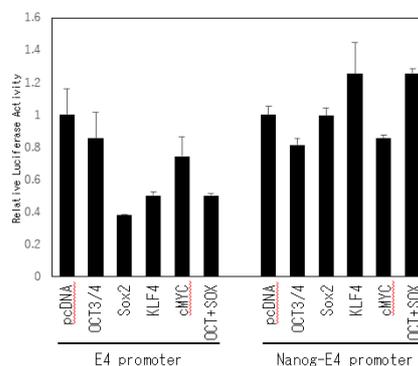
(1) Luciferase reporter plasmid にアデノウイルス E4 プロモーターをクローニングしたプラスミドを培養細胞 (HeLa, H1299 など) に導入し、幹細胞性維持に関わる転写因子群とのかかわりを Dual luciferase assay により定量的に解析した。共導入した幹細胞性維持転写因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, cMYC) は CMV プロモーターにクローニングした。これらのタンパク質発現は免疫プロットにて確認した。改変 E4 プロモーターとして、アデノウイルス初期プロモーター (E4) Luciferase 上流に Nanog プロモーター配列 (7788525-7789557: NC_000012.12) をクローニングし、HeLa 細胞を用いて、山中4因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) の強制発現によるルシフェラーゼ発現変化を検討した。

(2) E4 遺伝子群を培養細胞に導入し、これらの機能を NF- κ B Luciferase reporter にて解析した。E4 領域に存在する遺伝子群のそれぞれに HA タグを導入し、CMV プロモーター下流にクローニングし、免疫プロットにてタンパク質発現を確認した。ウイルスにより発現する E4orf4, E4orf6, E4orf6/7 の発現は作成した抗血清により確認した。RelA に Myc タグを導入し、免疫沈降では抗 MYC 抗体でプルダウンし、抗 HA モノクロー抗体により E4 タンパク質の共沈を解析した。単一の E4 タンパク質ではなく複数の E4 タンパク質の関与を想定し、レポーターアッセイでは全 E4 タンパク質を導入した細胞とそこから一つずつの E4 タンパク質を間引きしていく方法にてキーとなる E4 タンパク質を絞り込んだ。

(3) E1B19K 結合タンパク質 (BNIP1, BNIP3) とオートファジー関連タンパク質 (LC3, p62/SQSTM1) の結合性、細胞内局在について免疫沈降・免疫染色・Two Hybrid 法により解析した。Two Hybrid 法では酵母細胞ではなく哺乳動物に应用可能なベクターセット (プロメガ社製) を用いた。

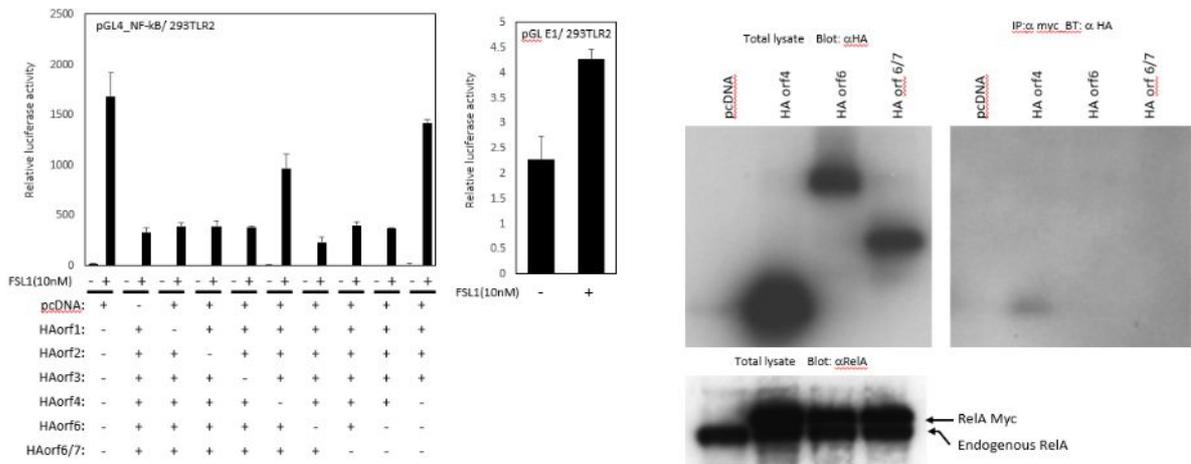
4. 研究成果

(1) アデノウイルス初期プロモーター (E4) Luciferase 上流に Nanog プロモーター配列 (7788525-7789557: NC_000012.12) をクローニングし、HeLa 細胞を用いて、山中4因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) の強制発現によるルシフェラーゼ発現変化を検討した。この実験では、山中4因子のうち Oct3/4, Sox2 がルシフェラーゼ発現を有意に抑制した。この配列をアデノウイルス E4 プロモーターの上流に組み込んだところ、Oct3/4, Sox2 による転写抑制は克服された (右図参照)。このような改変により組換え型腫瘍溶解性アデノウイルス増殖が、がん幹細胞においても効率よく行える可能性が示唆された。

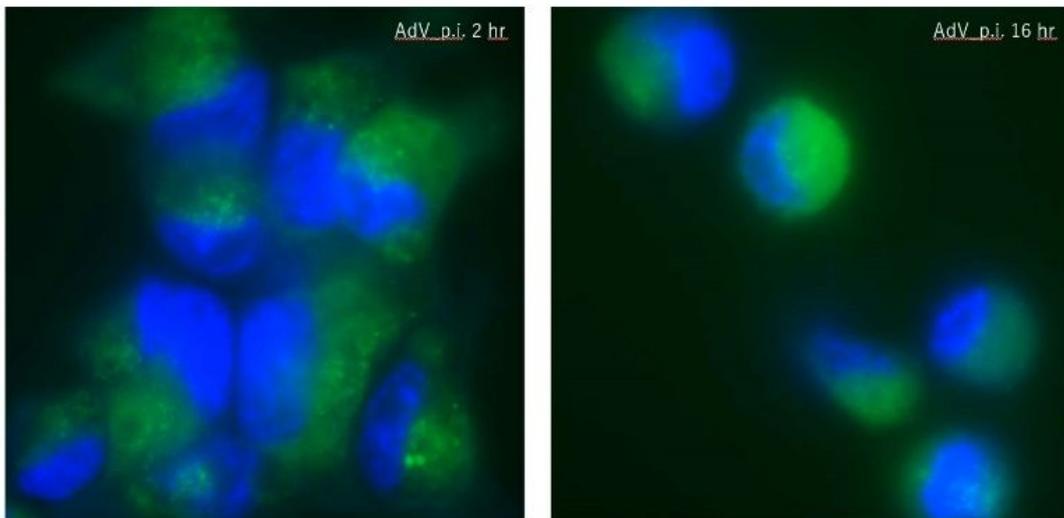


(2) 野生型アデノウイルスで見られる NF- κ B 機能の抑制は E4 を削除した組換えアデノウイルスには認められなかった。そこで6種類の E4 タンパク質と NF- κ B ファミリーの代表である

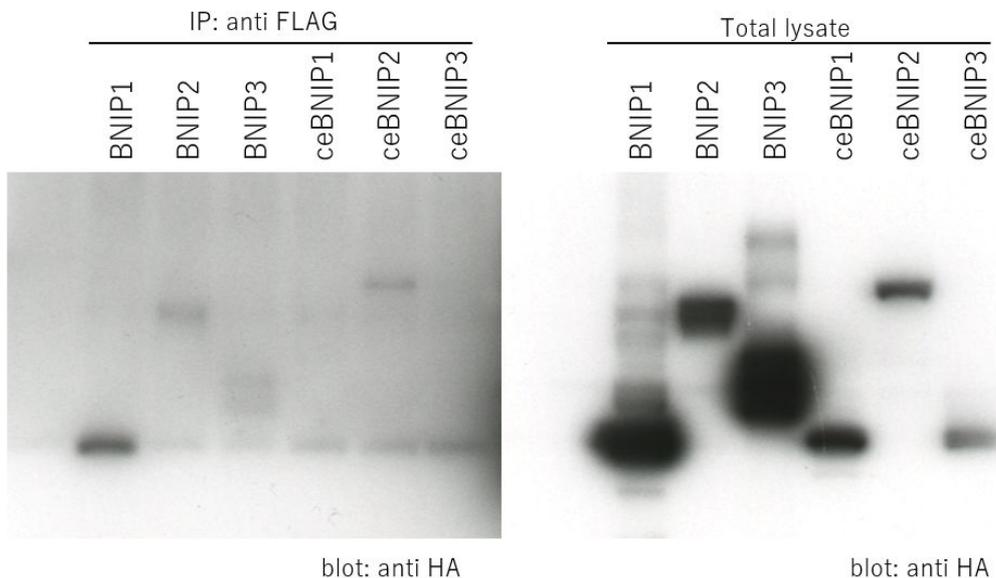
RelA について検討したところ RelA と E4orf4 が直接結合することにより、E4orf6/7 が E2F4 を介することにより NF- κ B の転写活性化能を抑制することが明らかとなった (下図参照)。



(3) GFP-LC3 を導入した HeLa 細胞に野生型アデノウイルスを感染させると、感染 2 時間後には顕著に観察される LC3 の顆粒状構造が感染 16 時間後にはほとんど消失することが明らかとなった (下図参照)。

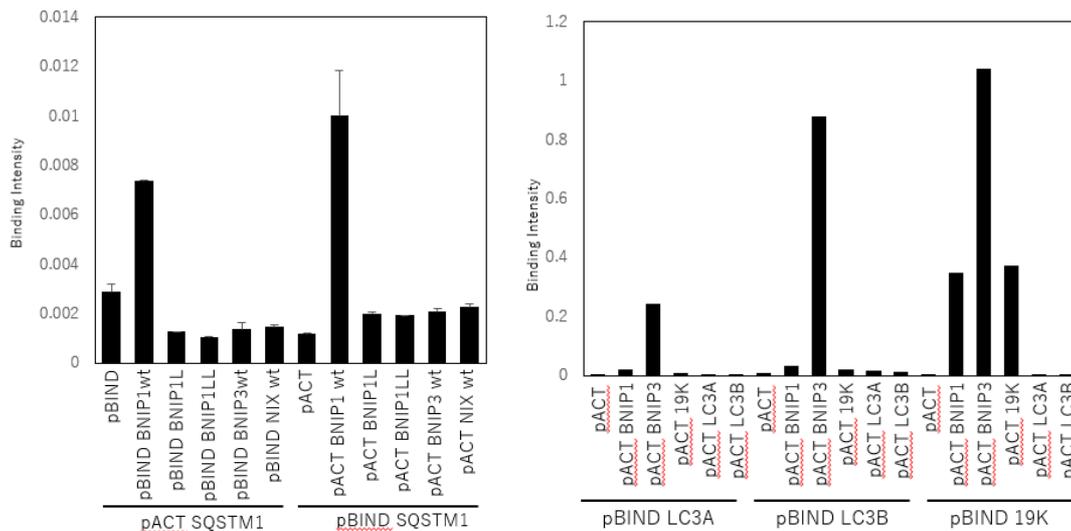


我々の実験条件下で E1B19K とその標的タンパク質の結合を再現できるか否かを免疫沈降法にて解析した。対象として HA タグを付与した BNIP1, BNIP2, BNIP3、さらにこれらの線虫ホモログ ceBNIP1, ceBNIP2, ceBNIP3 についても FLAG タグを付与した E1B19K との共沈の有無で検討した。



上図に示すごとく、FLAG19K は各々の親和性にて核 E1B19K 標的タンパク質と共沈してきた。

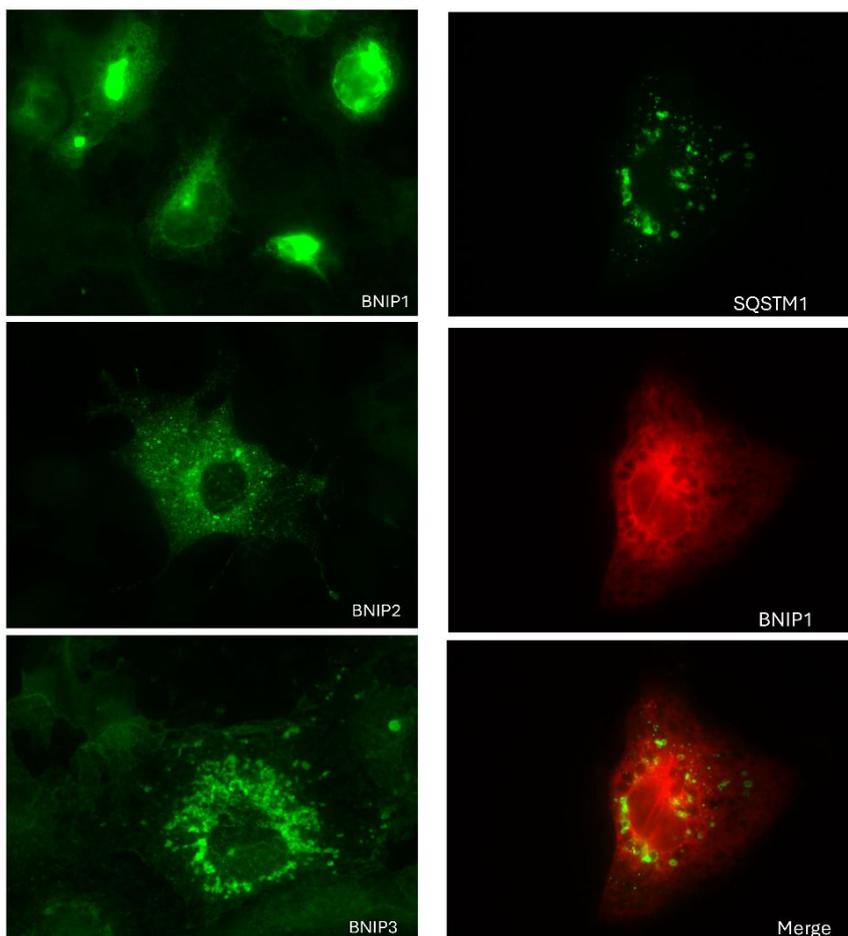
E1B19K 標的タンパク質と p62/SQSTM1 との結合についての解析では、BNIP1 が主要な結合パートナーであり BNIP3 は SQSTM1 との結合性を示さなかった。一方、LC3 との結合性を同様な Two Hybrid 法で検討してみると、ここでは BNIP3 のみが顕著な結合性を示した



感染後 16 時間後には感染細胞における E1B19K の発現がピークに達することが分かっており、E1B19K がその標的タンパク質であり、オートファジー関連単分子との結合性を持つ BNIP1 および BNIP3 の機能を阻害することが感染 16 時間後から認められるオートファジー抑制の主たるメカニズムであることが示唆された。

次に E1B19K 標的タンパク質の細胞内局在を免疫抗体法にて確認した。下図に示すごとく BNIP1, BNIP2, BNIP3 は異なる細胞内局在性を示した。

これらの内、SQSTM1 と BNIP1 が細胞内において共局在するか否かを検証するため、HeLa 細胞



に両遺伝子を強制発現し、それぞれのタンパク質に対する抗体で染め分け解析した。左図に示すごとく、BNIP1 は SQSTM1 と共にオートファゴソーム用の構造の外周に局在を示すことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuroshima Takeshi, Matsuda Aya Yanagawa, Hossain Elora, Yasuda Motoaki, Kitamura Tetsuya, Kitagawa Yoshimasa, Higashino Fumihiro	4. 巻 573
2. 論文標題 Adenovirus infection controls processing bodies to stabilize AU-rich element-containing mRNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 124 ~ 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2022.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Anran Wang, Kazuki Uchida, Atsuro Yokoyama, Fumihiro Higashino, Motoaki Yasuda	4. 巻 37
2. 論文標題 Human adenovirus oncolytic properties and the inhibitory role of E4 orf4 and E4 orf6/7 on endogenously activated NF- B	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep .	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2023.101616. eCollection 2024 Mar.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分担者	東野 史裕 (HIGASHINO Fumihiro) (50301891)	北海道情報大学・医療情報学部・教授 (30115)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------