

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22791310

研究課題名（和文）

マイクロ RNA 遺伝子制御ネットワークによるオートファジー細胞死誘導機構の解明

研究課題名（英文）

Induction of autophagic cell death via microRNA-mediated gene regulatory network

研究代表者

田澤 大 (TAZAWA HIROSHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90415513

研究成果の概要（和文）：癌細胞で選択的に増殖する腫瘍融解アデノウイルス製剤は、正常細胞を傷つけずに癌細胞のみを破壊する新しい抗癌治療剤として有望であるが、ウイルスが癌細胞を破壊する機序については不明な点が多い。本研究では、テロメラーゼ依存的に増殖する腫瘍融解アデノウイルス製剤テロメリシンを用いて、ウイルス遺伝子 E1A の蓄積がマイクロ RNA 遺伝子制御ネットワークを介してオートファジー細胞死を誘導する機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Tumor-specific replication-competent oncolytic adenovirus is a promising antitumor agent. However, the mechanism on the virus-mediated cell death remains unclear. Here we show that telomerase-specific replication-competent oncolytic adenovirus Telomelysin induces autophagic cell death through microRNA-mediated gene regulatory network.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子腫瘍学、遺伝子治療学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：癌、マイクロ RNA、アデノウイルス、テロメラーゼ、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌による死亡原因の第一位であり、特に非小細胞肺癌は放射線化学療法に対して治療抵抗性を示し、予後不良な疾患である。近年、癌細胞で選択的に増殖する遺伝子改変アデノウイルスを用いたがんウイルス療法が肺癌細胞を含めた様々な臓器由来の癌細胞に対して強力な抗腫瘍活性を示し、オートファジーを主体とする細胞死を誘導する事

が明らかとなった。しかし、腫瘍融解アデノウイルスによるオートファジー細胞死の誘導分子機構は未だ不明である。最近、ウイルスが細胞に感染すると、細胞内に存在するタンパク質をコードしない短いマイクロ RNA の発現プロファイルが大きく変化する事が報告され、がんウイルス療法によるオートファジー細胞死の誘導分子機構にマイクロ RNA が関与する可能性が示唆される。

がんにおけるマイクロ RNA 研究は、2005 年に各種固形癌におけるマイクロ RNA の制御異常が報告されてから新たな発がん制御機構として注目され、国内外で広く研究が進められている。1 つのマイクロ RNA が 100 種類以上の様々なターゲット遺伝子のメッセンジャー RNA を抑制的に制御して、細胞周期停止、細胞老化、アポトーシスなどを誘導する事が報告されているが、オートファジーとマイクロ RNA の関係は未だ不明である。

我々は、2004 年に正常 5 型アデノウイルス (Ad5) を基本骨格としてテロメラーゼ活性依存的に増幅して癌細胞のみを破壊する腫瘍融解アデノウイルス製剤テロメライシン (開発コード:OBP-301) を開発した。OBP-301 は様々な臓器由来の癌細胞に抗腫瘍活性を示し、アポトーシスと異なるオートファジーを主体とする細胞死を誘導する事を見出したが、細胞死の誘導分子機構は不明である。OBP-301 によるオートファジー細胞死の誘導分子機構を解明する事が出来れば、がんウイルス療法の治療効果を規定する標的分子とバイオマーカーの同定や、効率的な個別化医療の実現につながる事が予想される。

2. 研究の目的

本研究では、OBP-301を用いたがんウイルス療法におけるオートファジー細胞死の誘導に関与するマイクロRNAを同定し、マイクロRNA 遺伝子制御ネットワークの分子機構を明らかにする事を目的とした。マイクロRNAを介したオートファジー細胞死の誘導分子機構を解明する事で、将来のマイクロRNAを利用したオートファジー細胞死誘導性治療用製剤の開発のための分子基盤を得る事が期待される。

3. 研究の方法

(1) オートファジー細胞死を誘導したヒト癌細胞株におけるマイクロアレイを用いた

網羅的なマイクロ RNA 発現プロファイリング

2 種類のアデノウイルス (OBP-301、Ad5) の感染によってオートファジー細胞死が誘導されたヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 と非感染の H1299 から RNA サンプルを抽出し、マイクロ RNA マイクロアレイを用いてマイクロ RNA の発現変化を網羅的に解析する。

(2) リアルタイム RT-PCR 法によるマイクロ RNA の発現変化の検証

2 種類のアデノウイルス (OBP-301、Ad5) の感染に共通して、オートファジー細胞死の誘導とともに発現が変化するマイクロ RNA を同定し、マイクロ RNA の濃度・時間依存的な発現変化について TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で検証する。

(3) マイクロ RNA の発現調節によるオートファジー誘導能の検証

マイクロ RNA の発現誘導系あるいは発現抑制系を用いて、細胞内へのオートファジー誘導能について、1) GFP 標識 LC3 の細胞内局在、2) アクリジン染色陽性細胞の出現、3) オートファジー関連蛋白質の発現変化について検証する。

(4) アデノウイルス感受性・抵抗性細胞株におけるマイクロ RNA 発現量とオートファジー誘導能の関係

ウイルスによる細胞障害感受性が異なるヒト正常細胞株やヒト癌細胞株を用いて、2 種類のアデノウイルス (OBP-301、Ad5) 感染に伴う細胞障害、マイクロ RNA 発現量、オートファジー誘導の関連性について検証する。

(5) マイクロ RNA 遺伝子制御ネットワークに関与する分子機構の解明

マイクロ RNA の発現を調節する転写因子や

マイクロ RNA の主な標的分子を同定する。

(6) 皮下腫瘍動物モデルにおけるアデノウイルス感染後のマイクロ RNA 発現変化の検証

ヒト肺癌細胞株 H1299 を移植したマウス皮下腫瘍モデルを用いて、OBP-301 を腫瘍内投与した場合の腫瘍組織内でのマイクロ RNA の発現変化を検証する。

4. 研究成果

(1) オートファジー細胞死を誘導したヒト癌細胞株におけるマイクロアレイを用いた網羅的なマイクロ RNA 発現プロファイリング

2 種類のアデノウイルス製剤 (OBP-301, Ad5) 感染後のヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 において、共通して発現が上昇する 11 種類のマイクロ RNA (miR-665, 483-3p, 923, 885-5p, 7, 18*, 371-5p, 361-3p, Plus-17952, 42487, 42526) と、発現が低下する 4 種類のマイクロ RNA (miR-576-3p, 183, 33a, 29a*) を同定した。

(2) リアルタイム RT-PCR 法によるマイクロ RNA の発現変化の検証

発現が上昇する 2 種類のマイクロ RNA (miR-483-3p, miR-7) と、発現が低下する 2 種類のマイクロ RNA (miR-33a, miR-183) について TaqMan リアルタイム RT-PCR 法を行い、miR-7 の発現上昇のみがマイクロアレイとリアルタイム RT-PCR で一致した結果であった。さらに、マイクロ RNA-7 は OBP-301 や Ad5 感染後に濃度・時間依存的な発現増加を認めた。

(3) マイクロ RNA の発現調節によるオートファジー誘導能の検証

ヒト肺癌細胞株 H1299 と A549 に人工マイクロ RNA-7 誘導剤 (Pre-miR-7) を導入して細胞内のマイクロ RNA-7 濃度を上げると、細

胞質内にドット状の GFP 標識 LC3 が出現し、アクリジン染色陽性細胞の増加やオートファジー関連蛋白質 p62 発現の減少を認めた。

(4) アデノウイルス感受性・抵抗性細胞株におけるマイクロ RNA 発現量とオートファジー誘導性の関係

ウイルス感受性のヒト肺癌細胞株 (H1299, A549) とウイルス抵抗性のヒト食道癌細胞株 (T. Tn) や正常線維芽細胞株 (NHLF) を用いて、OBP-301 や Ad5 感染後の細胞障害活性とオートファジー関連蛋白質 (LC3-II/I 比、Atg5 発現量、p62 発現量) の変化に有意な相関関係を認めた。さらに、マイクロ RNA-7 発現量と細胞障害活性に有意な相関関係を認めた。

(5) マイクロ RNA 遺伝子制御ネットワークに関与する分子機構の解明

アデノウイルス感染後のウイルス遺伝子 E1A の蓄積とともに活性化される転写因子 E2F1 の発現増強がマイクロ RNA-7 の発現を誘導している事を E2F1 の発現誘導系 (E2F1 発現アデノウイルス)・発現抑制系 (E2F1 siRNA) の実験で確認した。一方、マイクロ RNA-7 のターゲット遺伝子である EGFR の発現量がウイルス抵抗性 T. Tn 細胞でウイルス感受性 H1299, A549 細胞よりも約 6 倍高く、EGFR siRNA による細胞障害活性にも抵抗性を示す事から、EGFR がウイルス感受性を規定する重要な因子であると思われた。

(6) 皮下腫瘍動物モデルにおけるアデノウイルス感染後のマイクロ RNA 発現変化の検証

ウイルス感受性のヒト肺癌細胞株 H1299 を移植したマウス皮下腫瘍モデルにおいて、OBP-301 を腫瘍内投与した後にマイクロ RNA-7 の発現が一時的に上昇する事を確認し

た。

以上の結果から、アデノウイルス由来の E1A 遺伝子の活性化に伴い、E2F1-マイクロ RNA-7-EGFR 経路が誘導され、オートファジーや細胞障害が進行する事が示唆された。本研究で解明された OBP-301 の治療メカニズムにおけるマイクロ RNA-7 や癌遺伝子 EGFR は、これまで不明であったがんウイルス療法における治療効果を規定するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。さらに、これまで不明であったオートファジー細胞死の誘導分子機構におけるマイクロ RNA 遺伝子制御ネットワークの存在が今回明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Hasei J, Sasaki T, Tazawa H, Osaki S, Yamakawa Y, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Onishi T, Uno F, Kagawa S, Urata Y, Ozaki T, Fujiwara T. Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 314-325. (査読有)
- ② Sasaki T, Tazawa H, Hasei J, Osaki S, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Yano S, Yoshida R, Kagawa S, Uno F, Urata Y, Ozaki T, Fujiwara T. A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *Gene Ther* 2013; 20: 112-118. (査読有)
- ③ Hashimoto Y, Tazawa H, Teraishi F, Kojima T, Watanabe Y, Uno F, Yano S, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. The hTERT promoter enhances the antitumor activity of an oncolytic adenovirus under a hypoxic microenvironment. *PLoS One* 2012; 7: e39292. (査読有)
- ④ Yoshida R, Tazawa H, Hashimoto Y, Yano S, Onishi T, Sasaki T, Shirakawa Y, Kishimoto H, Uno F, Nishizaki M, Kagawa S, Fujiwara T. Mechanism of resistance to trastuzumab and molecular sensitization via ADCC activation by exogenous expression of HER2-extracellular domain in human cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 1905-1916. (査読有)
- ⑤ Tazawa H, Yano S, Yoshida R, Yamasaki Y, Sasaki T, Hashimoto Y, Kuroda S, Ouchi M, Onishi T, Uno F, Kagawa S, Urata Y, Fujiwara T. Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *Int J Cancer* 2012; 131: 2939-2950. (査読有)
- ⑥ Yamasaki Y, Tazawa H, Hashimoto Y, Kojima T, Kuroda S, Yano S, Yoshida R, Uno F, Mizuguchi H, Ohtsuru A, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. A novel apoptotic mechanism of genetically engineered adenovirus-mediated tumour-specific p53 overexpression through E1A-dependent p21 and MDM2 suppression. *Eur J Cancer* 2012; 48: 2282-2291. (査読有)
- ⑦ Sasaki T, Tazawa H, Hasei J, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Yano S, Yoshida R, Uno F, Kagawa S, Morimoto Y, Urata Y, Ozaki T, Fujiwara T. Preclinical evaluation of telomerase-specific oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 1828-1838. (査読有)
- ⑧ Kuroda S, Fujiwara T, Shirakawa Y, Yamasaki Y, Yano S, Uno F, Tazawa H, Hashimoto Y, Watanabe Y, Noma K, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery. *Cancer Res* 2010; 70: 9339-9348. (査読有)

有)

- ⑨ Kojima T, Watanabe Y, Hashimoto Y, Kuroda S, Yamasaki Y, Yano S, Ouchi M, Tazawa H, Uno F, Kagawa S, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. In vivo biological purging for lymph node metastasis of human colorectal cancer by telomerase-specific oncolytic virotherapy. *Ann Surg* 2010; 251: 1079-1086. (査読有)

[学会発表] (計9件)

- ① 長谷井 嬢、佐々木 剛、田澤 大、橋本悠里、国定俊之、浦田泰生、尾崎敏文、藤原俊義：p53 関連アポトーシス経路の誘導はヒト骨肉腫細胞における腫瘍融解アデノウイルスに対する抵抗性を減弱する。**第71回日本癌学会学術総会**、2012年9月21日、札幌
- ② Onishi T, Tazawa H, Yano S, Hashimoto Y, Kikuchi S, Shigeyasu K, Osaki S, Kagawa S, Fujiwara T. Telomerase-specific oncolytic adenovirus suppresses the stem-like properties of CD133+ human gastric cancer MKN45 cells through microRNA modulation. **第18回日本遺伝子治療学会**、2012年6月28日、熊本
- ③ Tazawa H. A simple detection system for viable circulating tumor cells using genetically bioengineered adenovirus. **4th World Circulating Tumor Cell Summit**, 2012年4月25日、Berlin (Germany)
- ④ Tazawa H, Sasaki T, Hashimoto Y, Kikuchi S, Kishimoto H, Mizuguchi H, Fujiwara T. Preclinical evaluation of cytotoxic effect of photosensitive fluorescent protein in human cancer cells. **103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research**, 2012年4月4日、Chicago (USA)
- ⑤ Tazawa H, Onishi T, Yano S, Urata Y, Fujiwara T. Oncolytic adenovirus inhibits the cancer-stem cell properties through microRNA modulation.

8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, 2011年9月22日、大阪

- ⑥ 田澤 大、矢野修也、吉田亮介、浦田泰生、藤原俊義：ヒト癌細胞におけるマイクロRNAを介したオートファジー細胞死の誘導分子機構。**第29回日本ヒト細胞学会**、2011年8月20日、富山
- ⑦ Tazawa H, Yano S, Yoshida R, Urata Y, Fujiwara T. Bioengineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. **102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research**, 2011年4月5日、Orlando (USA)
- ⑧ 田澤 大、矢野修也、吉田亮介、浦田泰生、藤原俊義：アデノウイルス感染に伴うE2F1の活性化によるマイクロRNA-7の発現誘導とオートファジー細胞死の制御機構。**第69回日本癌学会学術総会**、2010年9月24日、大阪
- ⑨ Tazawa H, Yano S, Yoshida R, Urata Y, Fujiwara T. Oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through microRNA-7-mediated suppression of EGFR in human cancer cells. **第16回日本遺伝子治療学会**、2010年7月3日、宇都宮

[その他]

報道関連情報

山陽新聞朝刊掲載記事 (2011年9月22日)
「独自開発ウイルス製剤使用時 がん細胞死仕組み解明」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田澤 大 (TAZAWA HIROSHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：90415513

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし