

令和元年9月26日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659928

研究課題名(和文)新しい腫瘍溶解アデノウイルスの開発

研究課題名(英文)Development of new oncolytic adenovirus

研究代表者

東野 史裕 (Higashino, Fumihiro)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50301891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍細胞で増殖し、正常細胞ではほとんど増殖しない腫瘍溶解アデノウイルスの開発を試みた。我々は、アデノウイルスの特定のタンパクを欠損したアデノウイルス(Ad- $\Delta$ )が、がん細胞では増殖でき、正常細胞では増殖できないことを解明した。さらに、Ad- $\Delta$ はがん細胞で強く細胞死を誘導し、ヌードマウスに作成した腫瘍にも効果を持つことがわかった。これらの結果は、Ad- $\Delta$ が腫瘍溶解ウイルスとして利用できることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ほぼ全てのがん細胞で安定化されている、AU-rich element(ARE)を持つmRNAの安定化機構を応用して、新しい腫瘍溶解ウイルスの開発を行った。このウイルスは、がん細胞では正常細胞よりも効率よく複製し、それと呼応してがん細胞を効率よく溶解した。また、ヌードマウスに移植した人細胞の腫瘍にも効果を示した。さらに、既存の主要溶解ウイルスと比較した実験を行ったところ、そのウイルスより効率よく複製及び細胞溶解する能力があることが明らかになった。これらの結果は、我々が開発したウイルスが、腫瘍溶解ウイルスとして高い潜在能力を持つことを示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a new oncolytic adenovirus, which is able to propagate in cancer cells relative to normal cells. The protein-deleted adenovirus (Ad- $\Delta$ ) replicated in cancer cells, whereas the virus proliferation was restricted in normal cells. Furthermore, Ad- $\Delta$  induced cell death of cancer cells and it was effective for human cancer xenografts in nude mice. These results indicate that Ad- $\Delta$  is available as an oncolytic virus.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アデノウイルス 腫瘍 溶解 ARE-mRNA

### 1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスは、古くから発がんモデルとして研究され、最近では遺伝子治療用のベクターとしても使われている。E4 領域のタンパクアデノウイルスが持つ遺伝子にコードされているタンパクで、アデノウイルスの複製に必須で、発がん活性も持つことが知られている。我々は E4 領域のタンパクが、通常ならすぐに分解される AU-rich element (ARE) を持つ mRNA (がん遺伝子など主に細胞の増殖に関わる遺伝子の mRNA に存在) を恒常的に核外輸送・安定化し、細胞がん化に寄与することを見いだした。この ARE-mRNA の輸送・安定化による細胞がん化機構は、ウイルスによるがんだけではなく、大多数のがんの発生原因であり、しかも悪性度と核外輸送・安定化の程度は相関することが我々を含む多くの研究グループにより解明されている。

一方、我々は最近 E4 タンパクの ARE-mRNA を核外輸送・安定化する機能が、アデノウイルスの複製にも必須であることを見出した。このことから、我々は E4 を欠失したアデノウイルス (Ad E4) でも、ARE-mRNA があらかじめ核外輸送・安定化されている細胞では複製可能なのではないかと推測した。即ち、Ad E4 は ARE-mRNA が核外輸送・安定化されているがん細胞では効率よく増殖・細胞破壊し、ほとんど輸送されていない正常細胞では増殖できないのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、Ad E4 ががん細胞選択的に増殖し、ヌードマウスで作成した腫瘍でも有効かなどを検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Ad E4 のがん細胞での増殖を検討

Ad E4 が、がん細胞と正常細胞とでどれくらい異なった生産効率を示すかを細胞レベルで究明する。具体的には、がん細胞として HeLa (子宮頸がん) C33A (子宮頸がん) A549 (肺がん) H1299 (肺舌がん)、正常細胞として BJ (陰茎上皮細胞) などの細胞に、アデノウイルスを感染させ、感染後 24 - 48 時間後の増殖ウイルス数を titer 測定キットで確定する。

#### (2) Ad E4 感染がん細胞の細胞死を検討

(1) と同様の細胞を用いて、XTT assay

(Roche 社の Cell Proliferation kit II など) により細胞死を検討する。

#### (3) 既存の腫瘍溶解ウイルスとの比較

すでに腫瘍溶解アデノウイルスとして臨床利用されている ONYX-015 と、Ad E4 との生産効率を比較する。

#### (4) ヌードマウスに移植した腫瘍に対する Ad E4 の効果を検討

ヌードマウスにヒトのがん細胞を移植後、Ad E4 を注入し、時間経過と共に腫瘍の体積を測定する。

### 4. 研究成果

#### (1) Ad E4 のがん細胞での増殖

Ad E4 (図 1) は E4orf6 遺伝子に 14bp の欠失があり、アデノウイルス感染宿主細胞の E4 領域に位置する遺伝子の機能を研究するた

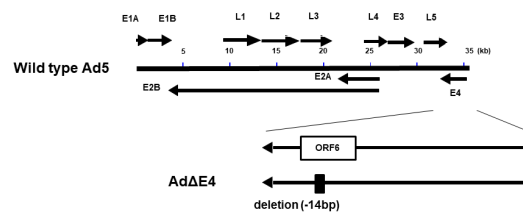


図 1

めに構築された。Ad E4 の生産効率を調べるために、癌細胞 (HeLa、C33A、A549、および H1299) および正常細胞 (BJ) に MOI=1 (1VP/cell) のウイルス力価で Ad E4 を感染させ、48 時間後のウイルス生産を検討した (図 2)。がん細胞では、Ad E4 の増殖は

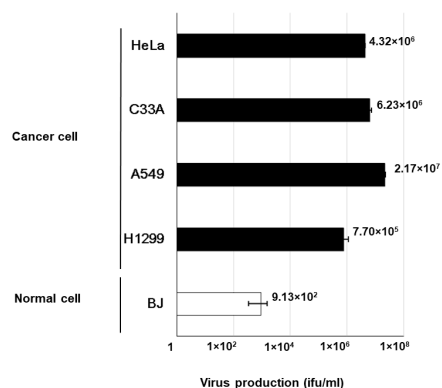


図 2

非常に高く、力価は  $7.70 \times 10^5 \sim 2.17 \times 10^7$  ifu / mL だった。一方、正常細胞 (BJ; 包皮線維芽細胞) の Ad E4 の力価は、がん細胞

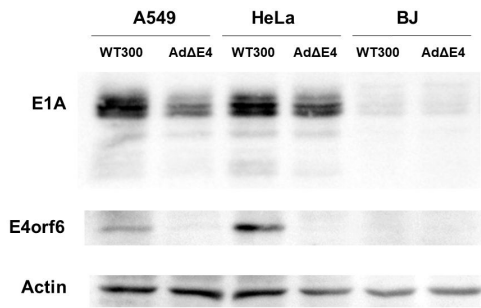


図3

よりも 3~5 log (9.13 x 10<sup>2</sup> ifu / mL) 低くなった (図2)。感染後に最初に発現する E1A タンパク質の発現を調べました。E1A タンパク質の量は、Ad E4 感染 A549 および HeLa 細胞で高レベルでしたが、正常な BJ 細胞では低レベルだった (図3)。これらの結果は、Ad E4 ががん細胞で選択的に産生されることを示唆している。

Ad E4 は ARE-mRNA が安定化されたがん細胞で増殖すると考えられるため、Ad E4 の複製に ARE-mRNA 安定化システムが必要かどうかを調べた。このために、HuR が枯渇している細胞でのアデノウイルス産生を確認した。熱ショック (HS) は、ユビキチン媒介タンパク質分解により HuR を減少させることが知られており、Ad E4 が ARE-mRNA 安定化システムを使用して複製する場合、ウイルス生産は HS 処理で低下すると予想される。HeLa 細胞を HS で処理し、HuR タンパク質とウイルス産生について検討した。予想どおり、HeLa 細胞の 2 時間の HS 処理により、HeLa 細胞の細胞質における HuR タンパク質の発現が減少しまし

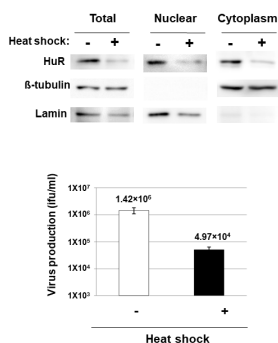


図4

た (図4)。さらに、HS 処理細胞は、非処理細胞と比較してウイルス産生が有意に減少した (図4)。

HSは細胞におけるHuRタンパク質分解以外の多くの影響を与えるため、HuR ノックダウン

(KD)によるHuR枯渇効果を確認した。HuRを導入した細胞のsiRNAでのウイルス産生(図5)は、コントロールsiRNAをトランスフェクトした細胞を含む細胞のウイルス産生よりもはるかに少なかった(図5)。これらの結果は、HuRがAd E4複製で重要な役割を果

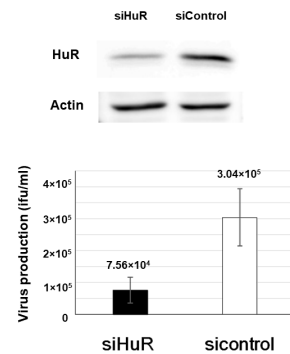


図5

たすことを示唆している。

## (2) Ad E4 感染がん細胞の細胞死

Ad E4 の細胞溶解活性を推定するために、XTT アッセイを使用して細胞生存率を調べた。HeLa、A549、C33A、H1299、BJ、および WI38 細胞に d1355 を MOI 100 (vp / cell) で感染させ、感染後 1、3、5、7 日後に XTT アッセイを行った (図6)。HeLa 細胞の場合、Ad E4 感染により、感染後 3 日で細胞の生存率が低下し、ほとんどの細胞は 7 日後に死亡した。また、他のがん細胞でも、ほぼすべての細胞が 7 日目に死んだ。対照的に、Ad E4 に感染したほとんどの正常細胞は 7 日後でも死ななかった。

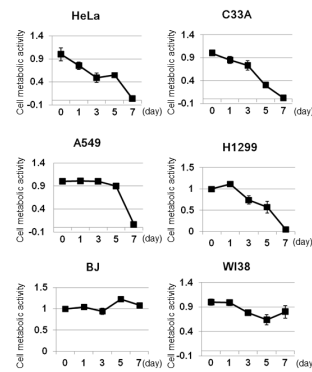


図6

Ad E4 の細胞溶解活性をさらに評価するために、Cytopathic effect (CPE) アッセイを使用して感染細胞を調べた。4つの異なる癌細胞タイプ(HeLa、C33A、A549、およびH1299)および2つの正常細胞タイプ(BJおよびWI38)に、0.1、0.5、1、10、または100のMOIでd1355を感染させました。感染から7

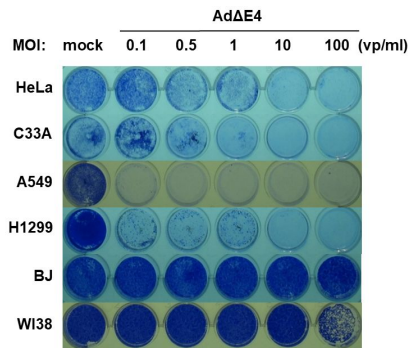


図7

日後に生存している細胞をクマシーブリリアントブルーで染色した(図7)。いくつかの細胞株は低 MOI で生存したが、すべてのがん細胞は用量依存的に Ad E4 によって溶解された。一方、ほとんどの正常細胞はすべての感染濃度でも生き残った。これらの結果は、Ad E4 の *in vitro* 選択的細胞溶解活性を示している。

次に、動物の腫瘍移植モデルを使用して、ヒトがんに対する Ad E4 の治療効果を検討した。HeLa S3 細胞を5週齢の雌の BALB / c nu / nu マウスの皮下に移植し、腫瘍が直径約5~6 mm に成長したら、 $10^9$  vp dI355 (100  $\mu$ L) または同量の PBS をコントロールとして、腫瘍に直接2回(0および3日目)投与した。その結果、腫瘍の成長は Ad E45 の投与により有意に抑制されたが、PBS を投与した腫瘍は18日間ではほぼ3倍の大きさで成長した(図8)。従って、Ad E4 は *in vivo* でも腫瘍溶解効果を持つことが明らかになった。

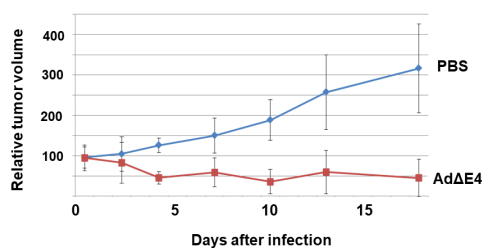


図8

### (3) 既存の腫瘍溶解ウイルスとの比較

E1B-55k 遺伝子欠失アデノウイルスは腫瘍溶解性アデノウイルスとして開発されており、すでに臨床的に応用されているため、次に Ad E4 の腫瘍溶解活性を E1B-55k 欠失アデノウイルス dI1520 の腫瘍溶解活性と比較した。

がん細胞、HeLa、C33A、A549、および H1299、およびコントロールとして正常細胞の BJ 細胞に、Ad E4、dI1520、および WT300 を MOI 1 で感染させ、ウイルス力価を感染の 48 時間後に解析した。異なる細胞株 293 および W162 細胞) を使用して各ウイルスのウイルス生産率 (ifu / mL) を決定したため、両方のウイルスの生産効率とウイルス粒子 (VP / mL) を比較した。図9に示すように、dI355 ウイルスの生産は、すべてのがん細胞で dI1520 ウイルスの生産よりも有意に高かった(1~3 対数高い)。

さらに、細胞溶解活性を比較するために、両方のウイルス (MOI 100) を同じ癌細胞と正常細胞に感染させ、感染から7日後に XTT アッセイを実施した。C33A を除き、dI355 は癌細胞で dI1520 より強い細胞死活性を示した(図9)。しかし、正常な細胞では、両方のウイルスは細胞死の影響をほとんど示さなかった。これらのデータは、少なくともいくつかのがん細胞株において、dI355 が dI1520 よりも強い腫瘍溶解効果を持っていることを示している。

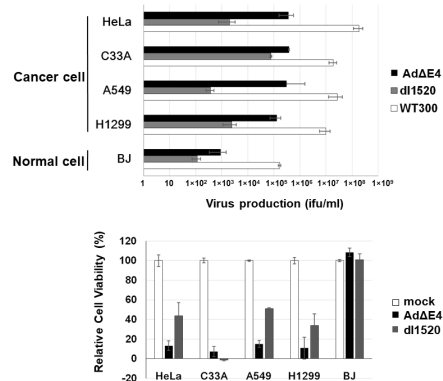


図9

以上の検討より、Ad E4 は腫瘍溶解ウイルスとして利用可能であることが明らかになった。

本研究では、E4orf6 が欠失したアデノウイルス Ad E4 の腫瘍溶解能について検討した。このウイルスのがん細胞での生産効率は、正常細胞の約  $10^3 \sim 10^5$  倍だった(図2)。 *in vitro* で子宮頸がんおよび肺がん細胞に対して高レベルの細胞溶解活性を示し、動物移植モデルでも同じ効果が得られた。さらに、Ad E4 は、現在臨床的に使用されている dI1520 よりも優れた腫瘍溶解活性を持って

いた。これらの結果は、Ad E4 が腫瘍溶解ウイルスとしての潜在能力を持つことを示している。

がん細胞を標的とする多くのタイプの増殖制限型アデノウイルス (CRAd) が開発されており、現在いくつかのウイルスが臨床試験中である。腫瘍溶解アデノウイルスは、少なくとも2つのタイプに分類することができ、そのうちの1つはウイルス複製に必要な遺伝子に変異を持つ。例えば、E1A または E1B-55k 遺伝子欠失ウイルスは CRAd として開発されており、pRB または p53 欠損がん細胞に対して腫瘍溶解効果がある。もう1つのグループは、E1A などの複製に必要なウイルス遺伝子にがん特異的な転写システムを持つウイルスである。たとえば、テロメラゼ遺伝子、または前立腺特異抗原遺伝子などのプロモーターを E1A 遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR) に挿入して、がん細胞で特異的に活性化される CRAd が開発されている。しかしながら、mRNA の安定性に基づいた腫瘍選択性を有する腫瘍溶解ウイルスの報告はほとんどない。従って、Ad E4 はその複製が RNA の修飾によって制御されるまれなタイプの腫瘍溶解ウイルスである。

以前の報告で示されたように、HuR ノックダウン (KD) は ARE-mRNA の核外輸送と安定化を低下させる。これは、HuR が ARE に直接結合する唯一のタンパク質であるため、HuR が消失すると ARE-mRNA が細胞質に輸送されないのがその原因である。本研究では、HuR の HS または HuR KD 条件下でウイルス増殖効率が低下した。これらの結果は、ARE-mRNA の核外輸送と安定化が Ad E45 の増殖に不可欠であることを示唆している。以前から、さまざまな刺激が HuR の細胞質への局在化と ARE-mRNA の安定化を促進することが明らかにされている。従って、ARE-mRNA の核外輸送と安定化を強化するための刺激を加えると、Ad E4 の生産効率が向上し、より強力な腫瘍溶解活性が得られる可能性がある。

本研究ではさまざまな種類のがん細胞を使用した。ウイルスの感染効率は各細胞で異なることが予想される。Ad E4 の感染性を評価するために、感染後に最初に発現する E1A タンパク質の発現を調べた。E1A タンパク質の量は Ad E4 感染 A549 細胞と HeLa 細胞でほぼ同じであったため (図 3)、感染性は同

等であると考えることができる。さらに、図 3 に示すように、異なるタイプのがん細胞に感染させた WT300 のウイルス産生は有意に異なるわけではないため、感染効率はそれほど異なるわけではない。これらのデータは、Ad E4 と dl 1520 の生産効率を比較することの妥当性を示している。

大部分のがん細胞では、ARE-mRNA は HuR とともに細胞質に移動し、恒常的に安定化される。Ad E4 の複製は HuR が枯渇した癌細胞で低下するため、Ad E4 の複製は ARE-mRNA 安定化システムに依存することが示された (図 4, 5)。これらの事実は、Ad E4 が多くの種類のがん細胞に効果的である可能性があることを示している。

#### 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 5 件)

Habiba U., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Hida K., Higashino F., Ohiro Y., Totsuka Y. and Shindoh M. Cytoplasmic expression of HuR may be a valuable diagnostic tool for determining the potential for malignant transformation of oral verrucous borderline lesions.

Oncology Reports, 査読有, 31, 1547-1554 (2014).

10.3892/or.2014.3017

Imamachi K., Higashino F., Kitamura T., Kakuguchi W., Yanagawa-Matsuda A., Ishikawa M., Kitagawa Y., Totsuka Y. and Shindoh M. pp32r1 controls the decay of the RNA-binding protein HuR.

Oncology Reports, 査読有, 31, 1103-1108 (2014).

10.3892/or.2013.2956

Nagamine K., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Ohiro Y., Tei K., Hida K., Higashino F., Totsuka Y. and Shindoh M. Expression of parathyroid hormone-related protein confers malignant potential to mucoepidermoid carcinoma.

Oncology Reports, 査読有, 29, 2114-2118 (2013).

10.3892/or.2013.2393

Yanagawa-Matsuda A., Kitamura T., Higashino F., Yamano S., Totsuka Y. and Shindoh M. E1A expression might be controlled by miR-214 in cells with low adenovirus productivity.

Virus Res., 査読有, 170, 85-90 (2012).

10.1016/j.virusres.2012.09.001.

東野史裕、北村哲也、柳川 - 松田彩、進

**藤正信**:新しい口腔がんの発生メカニズムとそのトランスレショナルリサーチ (A new oncogenic mechanism of oral cancer and its translational research) **北海道歯学雑誌**、査読有、32:65-67、2011

[学会発表](計 16 件)

**黒嶋雄志**:アデノウイルスによる mRNA 代謝機構の制御、**第 14 回日本アデノウイルス研究会**、神戸、神戸ポートピアホテル、2013/11/9

**北村哲也**:5 型アデノウイルス感染による Stress Granules 形成阻害、**第 46 回北海道病理談話会**、札幌、北海道大学医学部フラテ会館、2013/10/12

**北村哲也**:アデノウイルス感染による Stress Granules 形成阻害、**第 24 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会**、東京、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール、2013/8/28-30

**松田 彩**:アデノウイルスは P-body の局在変化により ARE-mRNA の分解抑制にはたらき、**第 102 回日本病理学会総会**、札幌、ロイトン札幌、2013/6/7

**柳川-松田 彩**:アデノウイルス感染による P-bodies の変化は ARE-mRNA の分解に影響する、**第 35 回日本分子生物学会年会**、福岡、福岡国際会議場、2012/12/11-14

**柳川-松田 彩**:アデノウイルス感染は宿主細胞の P-Bodies に特異的な変化をもたらす、**第 92 回北海道医学大会病理分科会**、札幌、札幌医大、2012/10/13

**横井有沙**:アデノウイルスの複製における ARE-mRNA の役割、**第 101 回日本病理学会総会**、東京、京王プラザホテル、2012/4/26-28

**柳川-松田 彩**:アデノウイルス感染がもたらす宿主細胞 P-body の変化、**第 101 回日本病理学会総会**、東京、京王プラザホテル、2012/4/26-28

**Kuroshima T.**: Stabilization of AU-rich element containing mRNA mediated by adenovirus gene product contributes to cell transformation. **IUMS 2011 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress)**, Sapporo Convention Center, Sapporo, Sapporo, JAPAN, 2011/9/14

**松田 彩**:miR-214 はアデノウイルスの増殖に抑制的にはたらき、**第 22 回日本臨床口腔病理学会**、福岡、九州大学医学部百年講堂、2011/8/24-25

**東野史裕**:アデノウイルス感染細胞での RNP 顆粒構造の挙動、**第 63 回日本細胞生物学会大会**、札幌、北海道大学、2011/6/28

**柳川彩**:miR-214 はアデノウイルス感染の抑制に働く、**第 63 回日本細胞生物学会大会**、札幌、北海道大学、2011/6/27

**Kuroshima T.**: Modulation of P bodies

and stress granules in adenovirus infected cells. **RNA 2011 (Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society)**, Kyoto International Convention Center, Kyoto, Japan, 2011/6/15

**黒嶋雄志**:ARE-mRNA の安定化は細胞がん化を誘導する、**第 100 回日本病理学会総会**、横浜、パシフィコ横浜、2011/4/28-30

**柳川 彩**:miR-214 は E1A をターゲットにしてアデノウイルス感染の抑制にはたらき、**第 100 回日本病理学会総会**、横浜、パシフィコ横浜、2011/4/28-30

**黒嶋雄志**:ARE-mRNA を安定化させることは細胞のがん化に寄与する、**第 65 回日本口腔科学会学術総会**、東京、タワーホール船堀、2011/4/21-22

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**東野 史裕** (HIGASHINO, Fumihiro)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 50301891

### (2) 研究分担者

**進藤 正信** (SHINDOH, Masanobu)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 20162802

**戸塚 靖則** (TOTSUKA, Yasunori)  
北海道大学・名誉教授  
研究者番号: 00109456

**北村 哲也** (KITAMURA, Tetsuya)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 00451451

**安田元昭** (YASUDA, Motoaki)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 90239765