

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670840

研究課題名(和文) ウイルスを利用した腫瘍検出センサーの開発

研究課題名(英文) Development of cancer sensor by utilizing oncolytic virus

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が開発した腫瘍溶解アデノウイルス(Ad E4)を応用して、がん細胞のみが発行し、蛍光を照射するとがんを可視化できるシステムを構築することを目的とした。当初、ウイルスのゲノム中に緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子を組み込んだウイルスを作成することを目的としたが、GFPの発現アデノウイルスとAd E4を同時に感染させる手法も効率的であることを見出し検討した。その結果、両ウイルスを感染させたがん細胞は特異的に発光し、正常細胞では発光が弱かった。これらの結果より、Ad E4とGFP発現アデノウイルスを共感染することにより腫瘍センサーとして機能することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a cancer sensor by applying oncolytic adenovirus which we exploited in the previous study. We didn't succeed to produce a GFP including adenovirus, but noticed that the co-infection of two kinds of viruses, a GFP-expressing adenovirus and an our oncolytic adenovirus, is available for a cancer sensor. In cancer cell such as HeLa and H1299, GFP was activated by co-infection with our oncolytic adenovirus, whereas it was not activated in normal BJ cells. The data indicates that co-infection of these virus is suitable for a cancer sensor.

研究分野：分子生物学

キーワード：アデノウイルス GFP センサー 腫瘍 溶解

## 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。初期遺伝子群の一つ E4 領域には6種類の遺伝子が存在し、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。申請者は E4 領域の遺伝子が、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 ) を恒常的に核外輸送・安定化し、細胞が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なく大多数のがんの発生原因で、しかも悪性度と輸送・安定化の程度は相関することが申請者達を含む多くの研究グループにより解明された。

また、ARE-mRNA の核外輸送・安定化はアデノウイルスの複製にも必須で、申請者は E4 領域を欠失したアデノウイルス ( Ad $\Delta$ E4 ) は、正常細胞では増殖しないが、ARE-mRNA があらかじめ核外輸送・安定化されているがん細胞では複製することを見出し、現在 Ad $\Delta$ E4 を腫瘍溶解ウイルスとして開発している。本研究では Ad $\Delta$ E4 に緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子を組み込んだウイルス ( Ad $\Delta$ E4 センサー ) を作成し、がん細胞での Ad $\Delta$ E4 の増殖に伴い GFP が発現するシステムを構築することを当初の目的とした。

これまでに腫瘍溶解アデノウイルスと GFP を発現する目的で作製された GFP 発現アデノウイルスとを共に細胞に感染させ、がん細胞を特異的に発光させる手法も報告されている。これは GFP 発現アデノウイルスには含まれていないウイルス遺伝子 E1A が、腫瘍溶解ウイルス側から提供されることにより、本来は増殖することのない GFP 発現アデノウイルスが増殖するため、発光が強くなるというのがその機

序である。本研究でもこの手法を検討することにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が開発した腫瘍溶解アデノウイルス ( Ad $\Delta$ E4 ) を応用して、がん細胞のみが発行し、蛍光を照射するとがんを可視化できるシステムを構築することを目的とした。そのために、GFP 発現用のアデノウイルスと Ad $\Delta$ E4 を同時に感染させ、がん細胞が特異的に発光するか解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) Ad $\Delta$ E4 を用いた CPE assay

がん細胞として HeLa ( 子宮頸がん細胞 )、H1299 ( 肺がん細胞 ) を用い、正常細胞として BJ ( 陰茎線維芽細胞 ) を用いて、CPE ( Cytopathic effect ; 細胞変性効果 ) を検討した。各細胞に、MOI ( multiplicity of infection ) が、0.1、0.5、1、10、100 pfu ( plaque forming unit ) / cells になるように Ad $\Delta$ E4 を感染させ、1~2 週間後に生き残った細胞をクリスタルバイオレットで染色した。

### (2) Ad $\Delta$ E4 と GFP 発現用アデノウイルスの感染

HeLa、H1299、BJ 細胞に GFP 発現アデノウイルスを MOI 1 の力価で感染させ、12 時間後蛍光顕微鏡を用いて各細胞を観察した。次に、同細胞に同様に GFP 発現アデノウイルスと、同時に Ad $\Delta$ E4 を MOI 10 で感染させ、12 時間後蛍光顕微鏡で細胞を観察し、写真撮影を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Ad $\Delta$ E4 を用いた CPE assay

概略でも述べたように、GFP 発現アデノウイルスと Ad $\Delta$ E4 を同時に感染させる手法がより強い効果を持つと考え検討した。この実験系では、増殖に必須な E1A 遺伝子を持たず、自立増殖できない GFP 発現アデノウイ

ルスが、AdΔE4が発現するE1Aにより増殖することにより、より強く発光する。従って、この方法が成功する前提としてAdΔE4ががん細胞特異的に増殖することが必須になる。

そこで、AdΔE4が実際にがん細胞に対して効果があるか、CPE assayを行った。Fig. 1に示すように、HeLa細胞では、MOIが0.1の場合、細胞がほとんど生き残ったが、0.5、1ではかなり細胞がウイルスの効果により減少した。さらに、MOIが10、100の系ではほとんどの細胞が死に、ウイルスの効果が顕著に認められた。また、肺がん細胞H1299の実験系では、0.1でHeLa細胞より効果が見られ、0.5、1でも同様に細胞死が認められ、HeLa同様MOIが10、100でほぼ細胞が全滅した。一方、正常細胞BJにAdΔE4を同様に感染させた実験系では、MOIが100の場合でも細胞死は認められず(Fig. 1)、AdΔE4は正常細胞に対しては効果を持たないことが明らかになった。これらの結果は、AdΔE4ががん細胞特異的に増殖し、宿主細胞の細胞死を誘導することを示している。

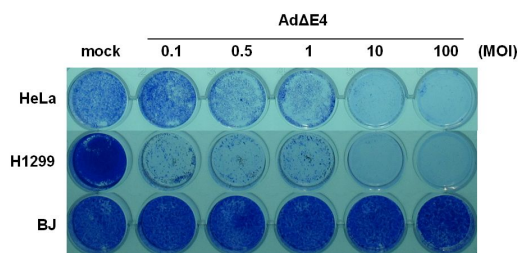


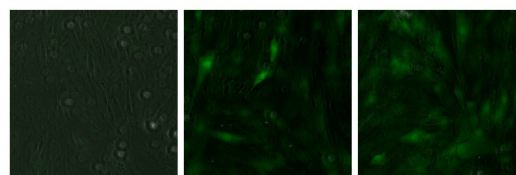
Fig. 1

## (2) AdΔE4 と GFP 発現用アデノウイルスの感染

次に、GFP発現アデノウイルスとAdΔE4の同時感染が、腫瘍センサーとして利用できるか検討するために、がん細胞と正常細胞に両ウイルスを感染させ、正常細胞よりがん細胞の方が発光量が多くなるか観察した。HeLa、H1299、BJ細胞にまずGFP発現ア

デノウイルスを単独でMOI 1の力価で感染させ、12時間後蛍光顕微鏡を用いて各細胞を観察した。その結果、それぞれの細胞で発光がみられた(Fig. 2~4)。これはGFP発現アデノウイルスが本来持っている機能で、感染した細胞でウイルスゲノム中のGFP遺伝子が発現した結果である。次に、同様の細胞にGFP発現アデノウイルスと、同時にAdΔE4をMOI 10で感染させ、12時間後蛍光顕微鏡で細胞を観察し、写真撮影を行った。その結果、がん細胞のHeLa、H1299では、GFP発現ウイルス単独感染に比べて、両方のウイルスを感染させた方が顕著に発光量が多かった(Fig. 2, 3)。それに対し、正常細胞に両ウイルスを感染させた系では、がん細胞ほどの発光量の差はなかった(Fig. 2)。これらの結果は、がん細胞ではAdΔE4が増殖できるため細胞中のE1A量が増加し、その結果GFP発現ウイルスも複製するため、GFP量も増加したため起こった現象であると考察できる。

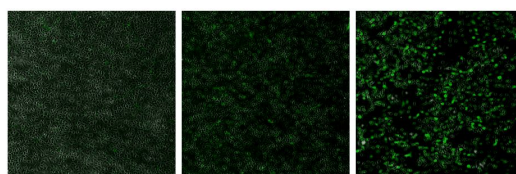
BJ細胞



Mock Ad-GFP Ad-GFP + AdΔE4

Fig. 2

HeLa細胞



Mock Ad-GFP Ad-GFP + AdΔE4

Fig. 3

H1299細胞

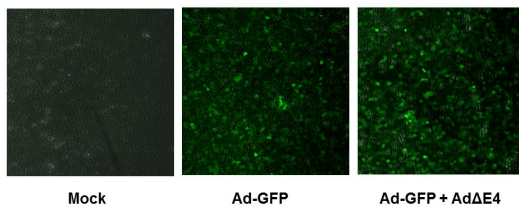


Fig. 4

本研究から、GFP 発現アデノウイルスと AdΔE4 を同時に感染させると、がん細胞の方がより強く発光することが明らかになり、この結果は両方のウイルスを感染させる手法が腫瘍センサーとして有用で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 3 件)

Habiba U., Hida K., Higashino F., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Totsuka Y. and Shindoh M. HuR and podoplanin expression is correlated with high risk of malignant transformation in patients with oral preneoplastic lesions. *Oncol Let*, 査読有, in press, (2015).

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

[学会発表](計 15 件)

Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino F, Totsuka Y, Shindoh M: Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and podoplanin in oral leukoplakia and the risk of malignant transformation、**第25回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会**、メディアシップ日報ホール、新潟県(新潟市)、2014/8/27-29

**松田 彩、東野史裕、黒嶋雄志、安田元昭、北村哲也、進藤正信**：アデノウイルスの感染による P-Bodies の変化は ARE-mRNA を安定化する、**第25回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会**、メディアシップ日報ホール、新潟県(新潟市)、2014/8/27-29  
**鄭 朱蒙バトリック、北村哲也、松田 彩、東野史裕、進藤正信**：アデノウイルス感染細胞の RNA 結合タンパク HuR と ARE-mRNA の動態、**第25回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会**、メディアシップ日報ホール、新潟県(新潟市)、2014/8/27-29

Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino F, Totsuka Y, Shindoh M Overexpression of HuR and Podoplanin predicts the development of oral cancer in patients with preneoplastic lesion. **17th International Congress on Oral**

Pathology and Medicine, Istanbul (Turkey), 2014/5/25-30.

**北村哲也、柳川-松田 彩、東野史裕、進藤 正信**：5 型アデノウイルスによる Stress Granule 形成阻害、**第 68 回日本口腔科学会学術集会**、京王プラザホテル、東京都（新宿区）2014/5/8-9

**東野史裕、今待賢治、北村哲也、柳川-松田 彩、進藤 正信**：発がん関連 RNA タンパク HuR の分解抑制機構、**第 68 回日本口腔科学会学術集会**、京王プラザホテル、東京都（新宿区）2014/5/8-9

Umma Habiba, **北村哲也、柳川-松田 彩、樋田京子、東野史裕、進藤 正信**：Podoplanin and HuR expression predict the malignancies in patients with oral epithelial dysplasia、**第 103 回日本病理学会**、広島国際会議場、広島県（広島市）2014/4/24-26

**北村哲也、柳川-松田 彩、東野史裕、進藤 正信**：アデノウイルスによる宿主細胞のストレス応答機構の制御、**第 103 回日本病理学会**、広島国際会議場、広島県（広島市）2014/4/24-26

**東野史裕、今待賢治、北村哲也、松田 彩、進藤 正信**：発がんを促進する RNA 結合タンパク HuR の分解制御、**第 93 回北海道医学大会病理分科会、第 46 回北海道病理談話会**、北海道大学医学部フラテ会館、北海道（札幌市）2013/10/12

**北村哲也、松田 彩、鄭 朱蒙パトリック、ウンマ ハビバ、三河洋平、稗田敏雄、東野史裕、進藤 正信**：5 型アデノウイルス感染による Stress Granules 形成阻害、**第 93 回北海道医学大会病理分科会、第 46 回北海道病理談話会**、北海道大学医学部フラテ会館、北海道（札幌市）、2013/10/12

Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino F, Shindoh M:

Overexpression of podoplanin and HuR may predict the development of oral cancer in patients with oral epithelial dysplasia、**第 24 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会**、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール、東京都（千代田区）2013/8/28-30

**北村哲也、松田-柳川 彩、東野史裕、進藤 正信**：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**、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール、東京都（千代田区）2013/8/28-30

**東野史裕、今待賢治、北村哲也、柳川-松田 彩、進藤 正信**：発がんに関わる RNA 結合タンパク HuR の分解制御、**第 24 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会**、日本大学理工学部 1 号館 CST ホール、東京都（千代田区）2013/8/28-30

**松田 彩、北村哲也、東野史裕、進藤 正信**：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く、**第 102 回日本病理学会総会**、ロイトン札幌、北海道（札幌市）2013/6/7

**今待賢治、東野史裕、北村哲也、北川善政、進藤 正信**：pp32r1 は HuR と結合しクリベージを抑制することで細胞がん化誘導にはたらく、**第 67 回日本口腔科学会学術大会**、栃木県総合文化センター、栃木県（宇都宮市）2013/5/22-24

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

東野 史裕 (HIGASHINO, Fumihiko)

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

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

### (3)連携研究者

なし