

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293423

研究課題名(和文) 口腔がんを標的にした腫瘍溶解アデノウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of oncolytic adenovirus targeting oral cancer

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、E4領域欠失アデノウイルス(Ad E4)の口腔がん及びその他のがん細胞に対する腫瘍溶解効果を検討した。Ad E4は、正常細胞と比べて、様々ながん細胞で、増殖効率が高く、また、その細胞溶解効果もがん細胞の方が顕著に高かった。さらに、動物に移植したヒト細胞の腫瘍は、Ad E4投与により縮小することが見出された。また、シスプラチンと併用することにより、腫瘍溶解アデノウイルスは口腔がん細胞に対して、単独で使用するより、相乗的に腫瘍細胞を溶解することが解明された。これらの結果は、Ad E4は様々ながん細胞に対して、腫瘍溶解効果を持つことを示し、将来的に臨床応用できる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed an oncolytic adenovirus (Ad E4), which has mutation in E4 region, targeting oral and other cancer cells. The replication rate of Ad E4 in cancer cells was higher than that in normal cells. The cytolitic activity of Ad E4 was also higher in cancer cells. Ad E4 reduced the volume of tumor formed in nude mice. Furthermore, an oncolytic adenovirus synergistically killed oral cancer cells with cisplatin. These results indicate that Ad E4 has potential as an oncolytic virus and it suggests the possibility of clinical application.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：口腔がん 腫瘍溶解アデノウイルス シスプラチン

## 1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスは、DNA をゲノムに持つ DNA ウィルスで、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。アデノウイルスゲノムには多くの遺伝子が存在し、大きく分けると初期遺伝子 (early genes ; E1 から E4 が存在) と後期遺伝子 (late genes ; L1 から L5 が存在) に分類される。初期遺伝子群から産生されるタンパクは、宿主細胞側のタンパクと相互作用し、それらの機能を制御することにより、ウィルスが生存・増殖しやすいように宿主細胞を改変する。また後期遺伝子群はウィルス粒子を構成するタンパクをコードしており、ウィルスの複製に必須の働きをしている。E4 領域の中には 6 種類の遺伝子が存在し、その中のいくつかの遺伝子は、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 ; がん遺伝子など主に細胞の増殖に関わる多くの遺伝子の mRNA に存在) を持つ mRNA 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、ウィルスによるがんだけではなく、口腔がんを含む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。

<Ad E4>

一方、我々は最近 E4 領域のタンパクが持つ 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 領域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ず、何の影響も与えないのではないかと考えた。

その後、培養細胞を用いた予備実験では、予想通り、Ad E4 はがん細胞では正常細胞に比べて 100 ~ 1000 倍増殖効率がよく、さらに、正常細胞よりがん細胞の方が効率よく細胞死が誘導されることも明らかになった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Ad E4 が口腔がん細胞に対して腫瘍溶解効果を持つか検討することである。そのために Ad E4 が口腔がん培養細胞や、ヌードマウスに移植した口腔がんに対して有効か検討し、さらに抗がん剤との併用なども解析し、口腔がんを標的とした Ad E4 の実用化のための基礎検討をする。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔がん細胞への効果検証

口腔がん細胞に対する Ad E4 の効果  
HeLa (子宮頸がん)、C33A (子宮頸がん)、PC3 (前立腺がん)、U2OS (骨肉腫) 等様々ながん細胞や HSC3 等の口腔がん細胞と、MRC5 (肺線維芽細胞)、BJ (陰茎表皮線維芽細胞) 等の正常細胞や HGF 等の口腔正常細胞に、Ad E4 を感染させ、感染後 24 - 48 時間後の増殖ウィルス数を titer 測定キット (クローンテック社の Adeno-X rapid titer kit など) で確定した。また、同様の細胞を用いて、XTT assay (Roche 社の Cell Proliferation kit II など) や、CPE assay により細胞死を検討した。

### 既存の腫瘍溶解アデノウイルスと比較

これまでに E1B55k 遺伝子を欠失したアデノウイルス ONYX-015 が腫瘍溶解アデノウイルスとして知られている。現在、中国ではこの ONYX-015 (中国名 H101) が実際に臨床に使われており、臨床応用されている世界中で唯一の腫瘍溶解ウイルスである。ここでは (1) と同様の方法で、Ad E の腫瘍溶解効果を ONYX-015 と比較した。

### (2) 動物実験

ヌードマウスの皮下に HeLa 細胞を移植し、できた腫瘍にアデノウイルスを投与することにより腫瘍溶解効果を検討した。具体的には以下の様な手順で実験を行った。ヌードマウス (athymic nu/nu: 6 週令) を購入し、1 週間順化 (馴化) させた、約  $10^7$  個程度の HSC3 を皮下に移植し経過観察した、直径が 10mm 程度になったら腫瘍に直接  $10^{10}$  virus particles の Ad E を投与した、3 日間連続で投与し 2 日おきに腫瘍の体積を測定した、3 ~ 4 週間後終了した。時間経過とともに変化する腫瘍の大きさをグラフにし、コントロール (PBS を投与した群) と

比較して、Ad E の腫瘍溶解効果を決定した。

### (3) 抗がん剤との併用の検証

これまでに様々ながんで腫瘍溶解アデノウイルスとシスプラチンとの併用が検討されている。(1) - と同様の細胞を用いて、Ad E4 とシスプラチンを投与し、腫瘍溶解効果が相乗的に活性化されるか検討した。方法は(1) - と同様の方法に従った。

## 4. 研究成果

### (1) Ad E4 確認

Ad E4 が、本当に ARE-mRNA が核外輸送する条件で複製するか確認するために、ARE-mRNA の核外輸送が抑制される実験系を用いて Ad E4 の増殖を検討した。ARE-mRNA は、ARE に結合する HuR タンパクと共に核外に輸送され、安定化される。そこで、以前より heat shock で細胞を処理すると、HuR 量が減少し、ARE-mRNA の核外輸送・安定化が抑制されることが知られているので、HeLa 細胞を heat shock 処理後、Ad E4 の生産効率を測定した。その結果、heat shock 処理により、HeLa 細胞の全細胞及び細胞質に存在する HuR 量は減少し (Fig. 1a) Ad E4 の生産量も 1/30 程度に減少した (Fig. 1b)。従って、Ad E4 は ARE-mRNA の核外輸送・安定化に依存して複製することが明らかになった。

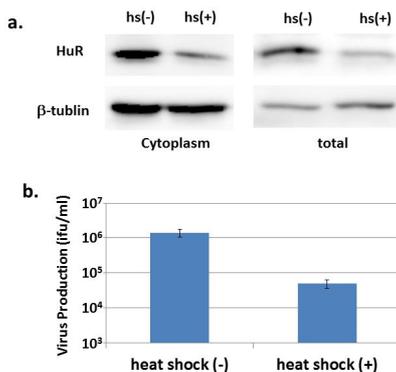


Fig. 1 HuRが減少する条件でのAdΔE4の生産効率

### (2) Ad E4 の増殖能検討

次に、Ad E4 のがん細胞と正常細胞での増殖能を検討した。口腔がん以外のがん細胞では、H1299 (肺がん) U20S (骨肉腫) A549 (肺がん) C33A (子宮頸がん) HeLa (子宮頸がん) 細胞で Ad E4 の増殖能は高く、約  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  ifu/ml 程度であったのに対し、正常細胞の BJ (陰茎上皮) 細胞では約  $1 \times$

$10^3$  ifu/ml で、100 倍から 100 倍くらい増殖能に差があった (Fig. 2)。口腔がん細胞の HSC3 では、Ad E4 の増殖は約  $5 \times 10^4$  ifu/ml 程度でそれほど高くなかったが、口腔正常細胞の HGF-1 では約  $5 \times 10^2$  ifu/ml 程度で、100 倍くらいの差があった (Fig. 2)。がん細胞でも、Saos-2 (骨肉腫) PC3 (前立腺がん) 細胞では、Ad E4 の増殖能は高くなく、正常細胞でも、HMEC (乳腺上皮細胞) MRC5 (肺線維芽細胞) などでは、Ad E4 の増殖能が高かった (Fig. 2)。これらの結果より、Ad E4 は、口腔がんなどでは非常に有用であるが、全てのがん細胞で、増殖効率が良いわけではないことが明らかになった。

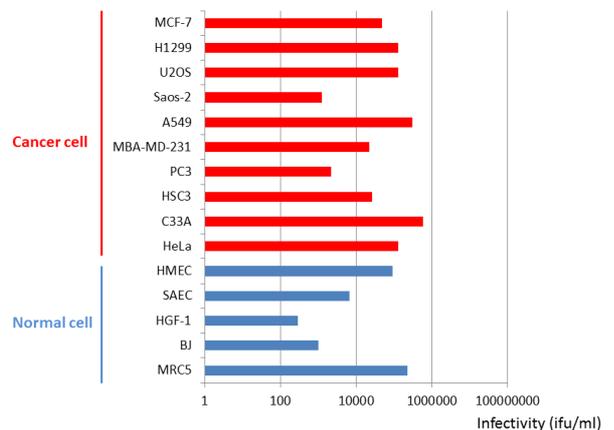


Fig. 2 がん細胞と正常細胞でのAdΔE4の生産効率

### (3) Ad E4 の腫瘍溶解能検討

Ad E4 の腫瘍溶解能をがん細胞と正常細胞を用いて検討した。口腔がん以外のがん細胞では、HeLa、C33A、A549、H1299 細胞では、低い MOI でも細胞死が CPE assay で認められたのに対して、正常細胞の BJ、WI38-40 細胞ではほとんど細胞は死ななかった (Fig. 3)。

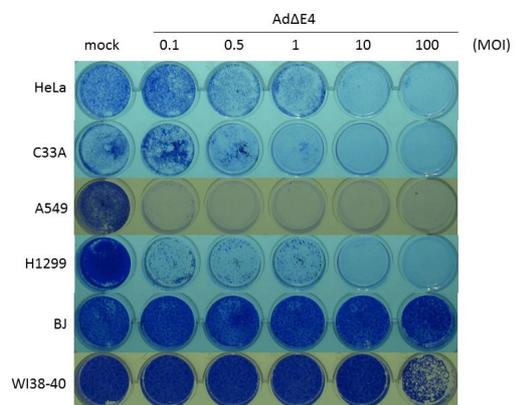


Fig. 3 がん細胞と正常細胞でのAdΔE4の細胞死活性 (CPE assay)

次に、口腔がん細胞に対する Ad E4 の細胞死効果を XT assay で検討した。HSC4 細胞は、Ad E4 感染後 7 日目に細胞数が約 40% になり、十分な腫瘍溶解効果が認められた。さらに、SAS 細胞では、感染後 1~3 日あたりから細胞数が減少し始め、5 日目には約 30%、7 日目には 20% まで細胞数が減少し、より強い溶解活性が得られた (Fig. 4)。一方、正

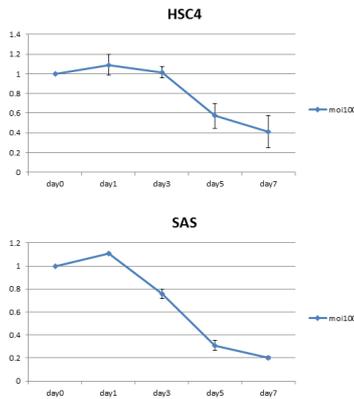


Fig. 4 口腔がん細胞におけるAdΔE4の細胞死活性(XTT assay)

常細胞の HGF-1 細胞を用いたときは、Ad E4 の感染量を MOI 100 にしても細胞が死なず、14 日目でも細胞数がほとんど変化しなかったため、Ad E4 は正常細胞をあまり溶解しないことが判明した (Fig. 5)。以上の結果より、Ad E4 はがん細胞特異的に溶解効果を持つことが明らかになった。

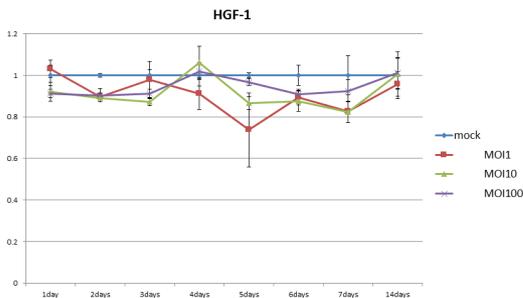


Fig. 5 口腔正常細胞におけるAdΔE4の細胞死活性(XTT assay)

#### (4) Ad E4 と既存のウイルスとの比較

これまでに E1B55k 遺伝子を欠失したアデノウイルス ONYX-015 (d11520) が腫瘍溶解アデノウイルスとして知られている。このウイルスは E1B55k タンパクが宿主細胞の p53 と結合し、その機能を抑制することによりウイルス増殖を導くことを応用している。即ち、

p53 の機能が欠失したようながん細胞では、p53 の機能を抑制する必要がないので、ONYX-015 が効率良く複製され、p53 が正しく機能する正常細胞ではその増殖がきびしく制限される。そこで、Ad E4 と ONYX-015 との腫瘍溶解効果を比較するため、各種がん細胞及び正常細胞でのウイルス増殖と、細胞死を検討した。Fig. 6 に示すように、測定した全てのがん細胞で、Ad E4 の方が増殖効率が高いことがわかった。特に、U2OS や A549 細胞など、p53 遺伝子に損傷を持たない細胞で、よりその傾向が強かった (Fig. 6)。さらに、

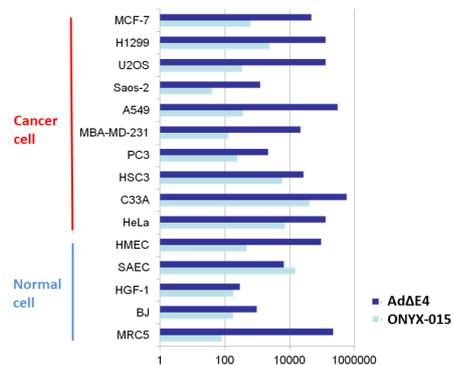


Fig. 6 各種がん細胞及び正常細胞におけるAdΔE4とONYX-015の増殖の比較

細胞死も感染 5 日目以降、ONYX-015 よりも Ad E4 の方が、細胞融解活性が高いことが解明された (Fig. 7)。以上の結果より、既存の腫瘍溶解アデノウイルス ONYX-015 よりも Ad E4 の方が、腫瘍溶解効果が高いことが示

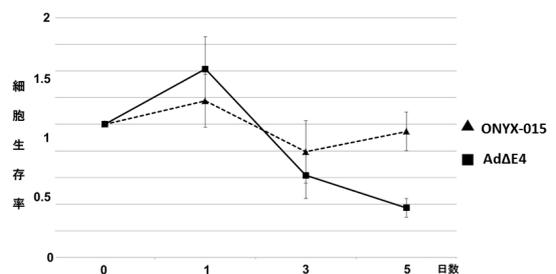


Fig. 7 AdΔE4とONYX-015の細胞死活性の比較

された。

#### (5) 動物実験

次に、ヌードマウスに形成した、HeLa 細胞の腫瘍に対して、Ad E4 が溶解効果を持つか検討した。その結果、PBS を投与したコント

ローレル群に比べて、Ad E4 を投与した群では明らかに腫瘍の体積が小さくなった(Fig. 8)。この結果は、Ad E4 が *in vivo* でも有効であ

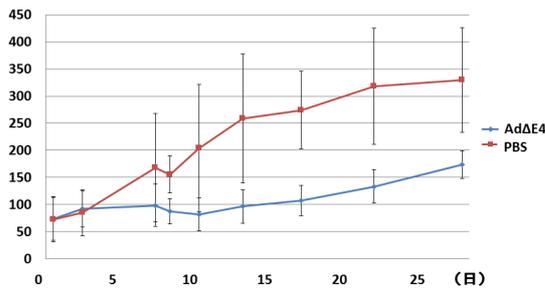


Fig. 8 スードマウスに形成した腫瘍に対するAdΔE4の効果

ることを示している。

#### (6)腫瘍溶解アデノウイルスとシスプラチンとの併用効果

この当時、Ad E4 の増殖が原因不明ながら停止し、ストックが減少したため、開発中の他のウイルス(Ad+AU)を用いて、シスプラチンとの併用効果を検討した。シスプラチン、ウイルス単独で処理したときの細胞生存率は、それぞれ60%、40%程度であったが、両者を併用した場合生存率は20%程度に減少した(Fig. 9)。この結果は、シスプラチンとウイルスの併用が、がん細胞溶解に有用であることを示しており、シスプラチンに対して抵抗性を持つがん細胞でもウイルスを併用することにより、治療効果が期待できる可能性を示している。

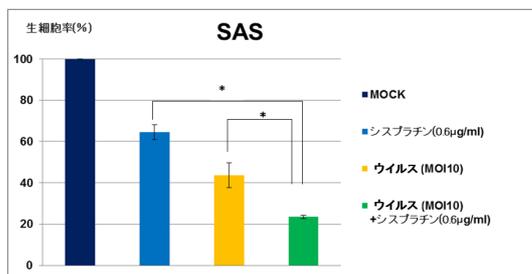


Fig. 9 腫瘍溶解アデノウイルスとシスプラチンとの併用効果

#### 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., Kitamura T.,  
Yanagawa-Matsuda A., Higashino F.,

Hida K., Totsuka Y. and Shindoh M. HuR and podoplanin expression is associated with high risk of malignant transformation in patients with oral preneoplastic lesions. *Oncol Lett*, 査読有, 12, 3199-3207 (2016).

Habiba U., Hida K., Kitamura T., Yanagawa-Matsuda A., Higashino F., Ito Y.M., Ohiro Y., Totsuka Y. and Shindoh M. ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia. *Oncol Lett*, 査読有, 13, 321-328 (2017).

Kitamura T., Higashino F., Yanagawa-Matsuda A., Ueda M., Kashiwano K., Okada T., Ohiro Y., and Shindoh M. Identification of marker genes required to predict oral cancer cells with intrinsic resistance to cisplatin. *Oncol Lett*, 査読有, in press, (2017).

[学会発表](計 17 件)

Mikawa Y: Conditionally replicative adenovirus controlled by the stabilization system of AU-rich elements containing mRNA. **3<sup>rd</sup> International Conference on Oral and Maxillofacial Syrgery**, Hong Kong (China) 2017/3/31-4/3.

Matsuda A: Development of oncolytic adenovirus controlled by the stabilization system of AU-rich element cantaining mRNA. **第64回日本ウイルス学会学術総会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)** 2016/10/23-2

Habiba U: Cancer therapy by combining oncolytic adenovirus with anticancer drug. **第27回日本臨床口腔病理学会、広島大学応仁会館(広島県・広島市)** 2016/8/10-12

柳川-松田 彩: AU-rich element を持つ mRNA 安定化機構で制御される新しい腫瘍溶解アデノウイルス. **第27回日本臨床口腔病理学会、広島大学応仁会館(広島県・広島市)** 2016/8/10-12

松田 彩: 化学療法耐性がんに対する腫瘍溶解アデノウイルスの効果. **第105回日本病理学会総会、仙台国際センター(宮城県・仙台市)** 2016/5/12-14

東野史裕: mRNA 安定化機構を利用した腫瘍溶解アデノウイルス. **第74回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)** 2015/10/8-10

大橋雄高: 新たに開発された腫瘍溶解ウイルスの性質. **第26回日本臨床口腔病理学会、北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)** 2015/7/29-31

稗田敏雄: 腫瘍溶解ウイルスとシスプラ

チンとの併用効果の検討、**第26回日本臨床口腔病理学会**、北海道大学学術交流会館（北海道・札幌市）2015/7/29-31

**三河洋平**：mRNAの安定化システムを利用した腫瘍溶解アデノウイルスの開発、**第26回日本臨床口腔病理学会**、北海道大学学術交流会館（北海道・札幌市）2015/7/29-31

**鄭 朱蒙パトリック**：アデノウイルス感染による ARE-mRNA の安定化、**第26回日本臨床口腔病理学会**、北海道大学学術交流会館（北海道・札幌市）2015/7/29-31

**松田 彩**：アデノウイルス感染による HuR の挙動はウイルス複製と関連する、**第104回日本病理学会総会**、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）2015/4/20-5/2

**松田 彩**：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 朱蒙パトリック**：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

**北村哲也**：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**：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**：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**：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

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：腫瘍溶解改変アデノウイルス、疾患治療用改変ウイルス及びこれらを含むウイルス製剤

発明者：東野史裕

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-43345

出願年月日：2015年3月5日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://bmse.med.hokudai.ac.jp/higashino>

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

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