

令和元年9月30日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20381

研究課題名(和文) 口腔癌をターゲットとする腫瘍溶解アデノウイルスと抗癌剤の併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of a combination cancer therapy utilizing oncolytic adenovirus with chemotherapy

研究代表者

松田 彩 (Matsuda, Aya)

北海道大学・歯学研究院・特別研究員 (RPD)

研究者番号：60514312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、腫瘍溶解アデノウイルス(Ad E4)が、シスプラチン(CDDP)に抵抗性を示す口腔がんに奏功し、Ad E4とCDDPとの併用療法が成り立つかを検討することである。申請者はCDDP耐性細胞に対するAd E4の腫瘍殺傷効果が正常細胞と比較して高いことを示し、CDDPとAd E4の併用により腫瘍殺傷効果が増強されることを示した。また、CDDPとAd E4の併用による腫瘍殺傷効果の増強のメカニズムについて検討し、がん細胞にCDDPを投与すると、HuR/ARE-mRNA複合体が核外輸送されてARE-mRNAが安定化し、Ad E4の生産効率が増加することで腫瘍溶解効果が高まることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんが抗癌剤に対して抵抗性を示すことがあり、臨床上大きな問題になっている。我々は抗癌剤耐性を克服できる方法を探るため研究を行い、CDDPと腫瘍溶解ウイルス(Ad E4)の併用はCDDP耐性腫瘍に効果があることを見出した。このことからCDDPとAd E4の併用療法はこれまで治療がなかったがんの新しい治療法となる可能性があり、社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Oncolytic adenovirus is an attractive tool for cancer therapy. We developed a novel oncolytic adenovirus (Ad E4) based on the ARE-mRNA stabilization system. In this study, we examined the combination effect of Ad E4 with cisplatin (CDDP). In the case of combined use of Ad E4 with CDDP, the cell survival rate of CDDP resistant cancer cells were very lower compared with those of single treatments. These results indicate that new virus available for the combination cancer therapy with CDDP. To evaluate the mechanism of the combination effect of Ad E4 with CDDP, we treated cancer cells by CDDP. CDDP treatment of cancer cells resulted in higher expression of HuR protein in the cytoplasm of cancer cells. These results suggest that the HuR mediated ARE-mRNA stabilization system plays an important role in Ad E4 replication.

研究分野：口腔病理

キーワード：腫瘍溶解ウイルス 口腔がん 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

現在、口腔がんの治療法は手術療法が主体であるが、手術療法によって患者のQOLが著しく低下する。つまり、非観血的な処置の開発は、口腔がん治療に大いに寄与すると考えられる。シスプラチン(CDDP)は多くの悪性腫瘍に対する中心的薬剤として広く使用されている抗癌剤であり、CDDPを中心とした多剤併用化学療法は比較的良好な治療効果をあげている。しかし、がんが抗癌剤に対して抵抗性を示すことがあり、临床上大きな問題になっている。これまでに申請者らは、薬剤耐性には内因性と獲得性耐性の二種類あることに注目し、CDDPに対する内因性耐性マーカー数種を発見してきた。我々は、良好な治療成績実績のあるCDDP療法に加え、その問題点である抗癌剤耐性に対してAdを用いる併用療法の可能性を探るべく申請を行った。申請者らは、以前よりアデノウイルス(Ad)感染時の宿主のmRNA、特にARE-mRNAについて研究を行ってきた。ARE-mRNAはAU-rich element (ARE)と呼ばれる領域を含む特殊なmRNAの総称であり、癌遺伝子などの細胞増殖に関わる遺伝子から転写されるmRNAが多く含まれる。我々は、Ad感染時に宿主細胞のmRNAの大部分は核内に閉じ込められ、その働きが抑制されるが、ARE-mRNAは逆に細胞質へ輸送され、安定化することを報告してきた。またその働きには、Ad初期たんぱくの一つであるE4が重要であることを明らかにし、ARE-mRNAの安定化が、Adの複製に重要であることを示した。また、ARE-mRNAは正常細胞において、核外輸送されることなくすぐに分解されてしまうが、癌細胞では恒常的に核外輸送され、安定化していることが明らかとなり、我々はこの違いに注目した。つまりE4が、Adの複製に必要なARE-mRNAを核外輸送して安定化することから、E4を欠失したAd(Ad E4)(Fig.1)は正常細胞では増殖できないが、癌細胞では増殖できるのではないかと考えた(Fig.2)。

Ad Δ E4の腫瘍溶解効果のメカニズム

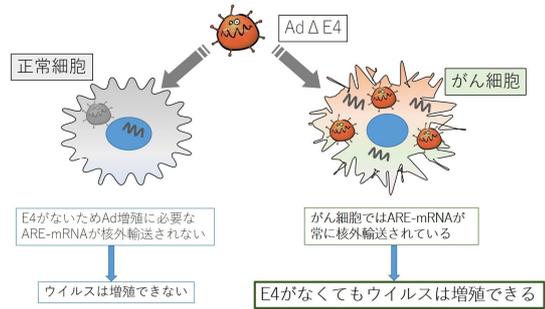


Fig.2

Adは、体内での半減期が短く、腫瘍全体を溶解させるためには、複数回投与する必要があると考えられている。よって、腫瘍に対して比較的良好な治療効果のあるCDDPで大半の腫瘍を死滅させた後に、残存したCDDPに対して耐性を示す腫瘍をAdにて死滅させる併用療法を考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々がこれまで研究を続けてきたAd E4が、CDDPに抵抗性を示す口腔がんに奏功し、併用療法として成り立つかを検討することである。CDDPは口腔がんの治療に広く用いられている抗癌剤の一つだが、CDDPに対して抵抗性を示す腫瘍があり問題となっている。

これまで申請者らは、Adの増殖には細胞内のAU-rich element (ARE) -mRNAの安定化が必須であり、それにはAd初期遺伝子E4領域が重要であることを明らかにしてきた(Fig.3)。

アデノウイルス感染細胞におけるmRNAの制御

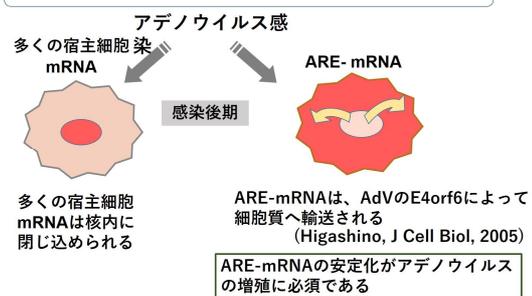


Fig.3

多くの癌細胞では恒常的にARE-mRNAが安定化することが知られている。つまりE4を欠失したAd E4は、癌細胞でのみ増殖できると考えられることから、我々はこのウイルスの可能性について研究を行ってきた。今回、良好な治療成績実績のあるCDDP療法に加え、その問題点である抗癌剤耐性に対してAd E4を用いる併用療法について検討を行うこととした。

Ad Δ E4の構造

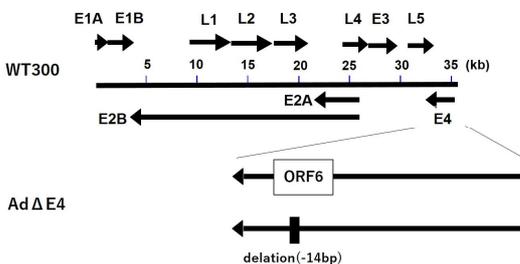


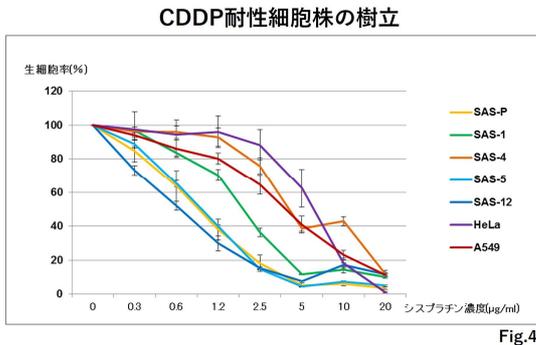
Fig. 1

### 3. 研究の方法

申請者らは口腔がん細胞株数種からシングルセルクローニングにより株化した細胞を CDDP 耐性細胞株、感受性細胞株として樹立しており、それらと親株を使用して CDDP と Ad E4 との併用療法の効果について検討した。まず、アデノウイルスの増殖に必須である ARE-mRNA と結合し、ARE-mRNA の核外輸送、安定化に関与する RNA 結合タンパク HuR の局在が CDDP 処理により変化するかどうかが Western blot、免疫染色により検討した。CDDP 耐性細胞株、感受性細胞株を使用して、CDDP または Ad E4、およびその両方を用いた腫瘍殺傷効果を XTT assay、CPE assay により検討した。それに加えて CDDP 以外の 5-FU やエトポシドなどの抗がん剤と Ad E4 との併用効果についても検討した。

### 4. 研究成果

まず口腔がん細胞株からシングルセルクローニングにより CDDP 耐性株、感受性株を樹立した (Fig.4)



次に CDDP と Ad E4 の併用により腫瘍殺傷効果が増強されるか検討した。これまで申請者らは、Ad の増殖には細胞内の AU-rich element (ARE) -mRNA の安定化が必須であることを示している (Fig.3)。また、RNA 結合タンパク HuR は ARE-mRNA と結合し、ARE-mRNA の核外輸送、安定化に関与することが知られており、HuR がより多く核外輸送されている細胞で Ad が増殖し、細胞溶解効果が増強されることが考えられる。そこで申請者は CDDP で処理したがん細胞を細胞質分画と核分画に分けて、western blot 法により CDDP 処理による HuR の局在の変化を検討した (Fig.5)。

### CDDP処理によるHuRの局在の変化

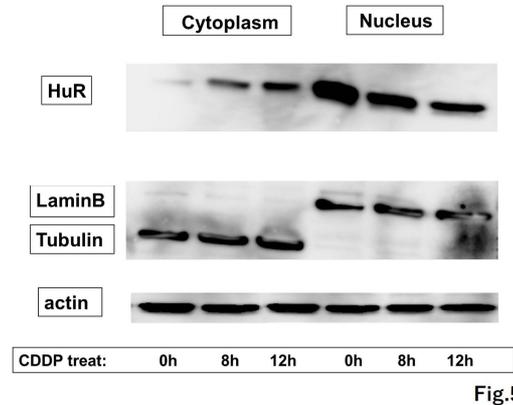


Fig.5

その結果、CDDP 処理したがん細胞で HuR の細胞質における局在が増加し、CDDP により HuR が核外輸送されることが示された。

また、HuR を knockdown して Ad E4 のウイルス産生効率を検討した (Fig.6)。

### HuRをknockdownするとウイルス産生効率が低下する

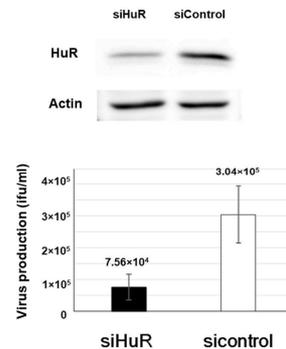


Fig.6

その結果、HuR を knockdown した細胞では Ad E4 の生産効率が低下することが示された。

このことから HuR が Ad E4 の生産効率に関与することが示され、がん細胞に CDDP を投与すると、HuR / ARE-mRNA 複合体が核外輸送されて ARE-mRNA が安定化し、Ad E4 の生産効率が増加することが示唆された。

そこで CDDP と Ad E4 の併用により Ad の生産効率が増加し、腫瘍殺傷効果が増強するか検討するため、CDDP 単独処理、Ad E4 単独処理、CDDP / Ad E4 併用処理した CDDP 耐性株、CDDP 感受性株、正常細胞を用いて XTT assay により細胞溶解効果を検討した (Fig.7)。

The combination effect of Ad Δ E4 with CDDP

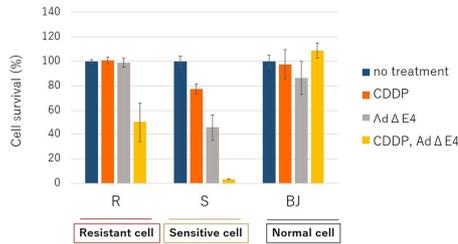


Fig.7

その結果、CDDP 耐性細胞では CDDP、Ad E4 それぞれの単独投与では細胞死がみられないが、CDDP と Ad E4 の併用により腫瘍溶解効果が増強され、細胞死がみられた。CDDP 感受性細胞では CDDP、Ad E4 それぞれの単独投与でも効果がみられ、CDDP と Ad E4 の併用ではより細胞溶解効果が増強された。

また正常細胞では CDDP と Ad E4 の併用によっても細胞溶解効果はみられなかった。

これらの結果より、CDDP と Ad E4 の併用は CDDP 耐性細胞、CDDP 感受性細胞両方に効果があり、CDDP と Ad E4 の併用により CDDP の投与量を減少することができ、CDDP の副作用を低減させる可能性が示唆された。

CDDP 以外の抗がん剤と腫瘍溶解ウイルスの併用の可能性を考え、5-FU が HuR の局在を変化させるか確認するために、5-FU をがん細胞に投与し、western blot 法、免疫染色法により HuR の局在の変化を検討した (Fig.8, Fig.9)。

5-FU処理による細胞質におけるHuR量の変化

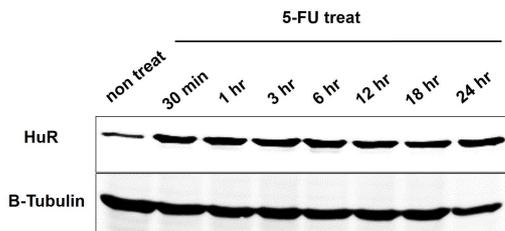


Fig.8

5-FU処理によるHuRの局在の変化

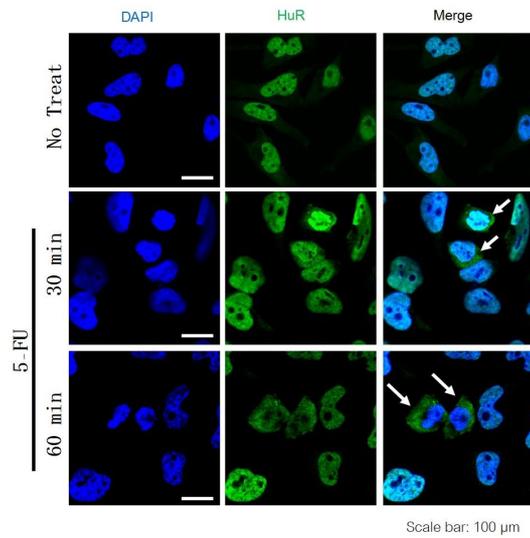


Fig.9

その結果、5-FU を投与した細胞では control と比較し、HuR の細胞質における局在が増加した。

この結果から、CDDP と同様にがん細胞に 5-FU を投与すると HuR / ARE-mRNA 複合体が核外輸送されて ARE-mRNA が安定化し、Ad E4 の生産効率が増加することが示唆され、5-FU と Ad E4 の併用により腫瘍溶解効果が増強されることが示唆された。

CDDP 投与後の CDDP 耐性腫瘍に対する 5-FU と Ad E4 の併用療法の効果を検討するため、CDDP 耐性細胞と CDDP 感受性細胞を 5-FU、Ad E4 で処理し、細胞溶解効果を XTT assay により検討した (Fig.10)。

CDDP耐性細胞、CDDP感受性細胞における5-FUとAd Δ E4の併用効果

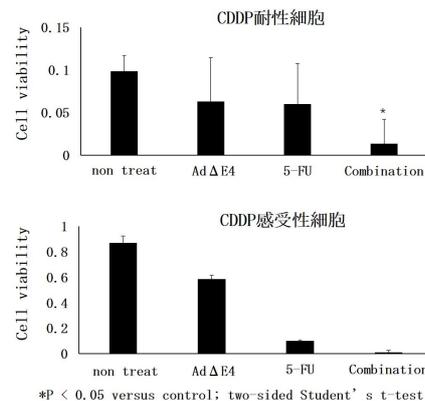


Fig.10

その結果、CDDP 耐性細胞は 5-FU による細胞溶解効果が低いことが示され、5-FU に対しても耐性があることが示された。5-FU と Ad E4 を併用すると、単独投与群と比較し、併用群では腫瘍溶解効果が高まることが示され、5-FU 単独では効果が低い CDDP 耐性細胞においても 5-FU と Ad E4 の併用により、腫瘍溶解効果が増強されることが示された。

また、CPE assay により CDDP 耐性細胞、CDDP 感受性細胞における細胞死を確認した (Fig.11)。

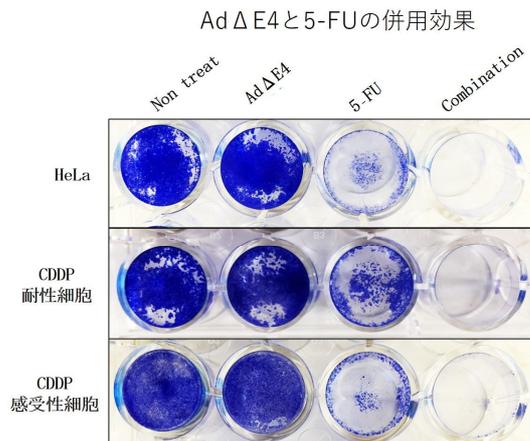


Fig. 11

その結果 CPE assay でも CDDP 耐性細胞、CDDP 感受性細胞ともに Ad E4 と 5-FU の併用による細胞溶解効果の増強が示された。

他の抗がん剤との併用の可能性を考え、エトポシドについても処理後の HuR の局在の変化を検討した (Fig.12)。

### エトポシド処理による HuR の局在変化

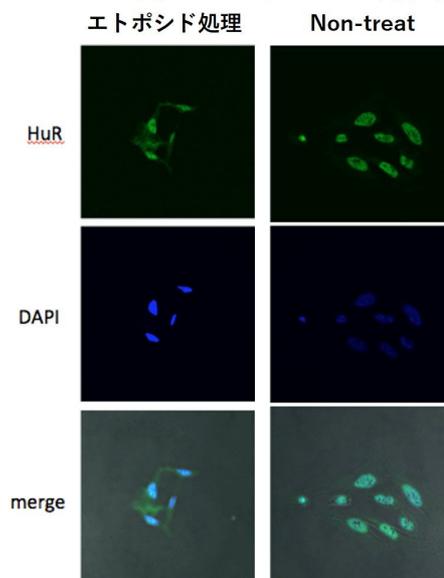


Fig.12

その結果、エトポシド処理により HuR の核外輸送が確認され、CDDP、5-FU と同様に Ad E4 の生産効率を増加させることにより、腫瘍溶解効果を増強させる可能性があることが示唆された。

以上の結果より、抗がん剤を使用すると腫瘍細胞では HuR/ARE-mRNA 複合体が核外輸送され Ad が増殖しやすい環境となり、そこに Ad E4 を投与すると、ウイルスが増殖し、細胞溶解効果が高まることが示唆された。また抗がん剤耐性細胞においても Ad E4 と抗がん剤の併用により、腫瘍細胞を死滅させることが示された。

抗がん剤治療では、一般的に用量依存的に良好な効果をもたらすことが多いが、がん細胞特異的ではないため正常組織に不可逆的な損傷を引き起こし、その副作用が問題視されている。従って、できるだけ低濃度の抗がん剤使用が臨床のあらゆる状況で望まれている。本研究では抗がん剤と Ad E4 の併用により抗がん剤の用量を減量しても細胞溶解効果がみられることから、併用により抗がん剤の濃度を減らして、副作用を抑制することができると考えられる。

今後は抗がん剤、Ad E4 の投与量や投与時期など臨床応用のためにさらなる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Jehung JP, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Kuroshima T, Towfik A, Yasuda M, Sano H, Kitagawa Y, Minowa K, Shindoh M, Higashino F, Adenovirus infection induces HuR relocalization to facilitate virus replication, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 495(2), 2018, 1795-18HuR00  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.036

Habiba U, Hida K, Kitamura T, Matsuda AY, Higashino F, Ito YM, Ohiro Y, Totsuka Y, Shindoh M, ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia, *Oncol Lett*, 査読有, 13(1), 2017, 321-328  
DOI: 10.3892/ol.2016.5379

Umma Habiba, Tetsuya Kitamura, Aya Yanagawa - Matsuda, Fumihiro Higashino, Kyoko Hida, Yasunori Totsuka, Masanobu Shindoh, HuR and podoplanin expression is associated with a high risk of malignant transformation in patients with oral preneoplastic lesions, *Oncol Lett*, 査読有, 12(5), 2016, 3199-3207  
DOI: 10.3892/ol.2016.5061

〔学会発表〕(計 6 件)

金山 純一、松田 柳川 彩、北村 哲也、北川 善政、東野 史裕、腫瘍溶解アデノウイルスと 5-FU との併用効果の検討、第 28 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2017/8/23-2017/8/25

松田 彩、東野 史裕、北村 哲也、進藤正信、E4 領域の遺伝子を欠失した新たな腫瘍溶解アデノウイルスの開発、第 106 回日本病理学会総会、2017/4/27-2017/4/29、京王プラザホテル

Matsuda A, Mikawa Y, Kitamura T, Yasuda M, Higashino F, Shindoh M, Development of oncolytic adenovirus controlled by the stabilization system of AU-rich element containing mRNA, 第 64 回日本ウイルス学会学術総会、2016/10/23-2016/10/25、札幌コンベンションセンター

柳川 - 松田 彩、東野 史裕、北村 哲也、進藤 正信、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、2016/8/10-2016/8/12、広島大学

松田 彩、北村 哲也、東野 史裕、進藤正信、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、2016/5/12-2016/5/14、仙台国際センター

松田 彩、北村 哲也、東野 史裕、黒嶋雄志、鄭 朱蒙、ウンマ ハビバ、進藤正信、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、2015/5/2、名古屋国際会議場

〔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：  
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

松田 彩 ( Matsuda, Aya )  
北海道大学・歯学研究院・特別研究員(RPD)  
研究者番号：60514312