

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15728

研究課題名(和文) RNA安定化機構を応用した新しい腫瘍溶解ウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of new oncolytic adenovirus utilizing RNA stabilization system

研究代表者

東野 史裕 (Higashino, Fumihiro)

北海道大学・歯学研究院・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)：AU-rich element (ARE) は、細胞増殖に関わる遺伝子などのmRNAに存在し、多くのがん細胞ではARE-mRNAが安定化される。また、ARE-mRNAの安定化は、がんの悪性度に相関している。本研究では、アデノウイルスの増殖の必須のE1A遺伝子にAREを挿入したウイルス(Ad+AU)を開発し、がん細胞に対する腫瘍溶解効果を検討した。Ad+AUは、正常細胞と比べて、がん細胞で増殖効率が高く、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、動物に移植した腫瘍は、Ad+AU投与により縮小することが見出された。これらの結果は、Ad+AUが腫瘍溶解効果を持つことを示している。

研究成果の概要(英文)：AU-rich elements (ARE) are RNA elements that enhance the rapid decay of mRNAs including those of the genes required for cell growth and proliferation. The stabilization of ARE-mRNA has been correlated with the malignancy of cancer cells. We herein developed an adenovirus designated Ad+AU including ARE in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the E1A gene. The expression level of E1A was high when the virus infected cancer cells, but was very low in normal cells. The productive rate of the virus correlated with the expression of E1A. Ad+AU exerted markedly stronger cytolytic effects in multiple cancer cell lines than in normal cells. The growth of human tumors that formed in nude mice was inhibited by an intratumoral injection of Ad+AU. These results indicate that Ad+AU has potential as an oncolytic adenovirus for a vast majority of cancers in which ARE-mRNA is stabilized.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：アデノウイルス 腫瘍溶解 AU-rich element E1A

### 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代をむかえた現在、様々な RNA と発がんとの関わりが指摘されている。ARE-mRNA も細胞がん化との関連が注目されており、ARE-mRNA が核外輸送され安定化されると細胞がん化に寄与することを申請者を含む多くの研究グループが解明した(1, 2)。ARE はがん遺伝子など主に細胞の増殖に関わる遺伝子の mRNA に存在するアデニンとウラシルに富んだエレメントで、ARE-mRNA は正常細胞では転写後すぐに分解されるが、heat shock 等の刺激で一時的に核外輸送・安定化され、何らかの発がん刺激で恒常的に安定化されると細胞がん化を誘発する。

申請者はアデノウイルス感染細胞でもウイルスの E4 領域により ARE-mRNA が核外輸送・安定化され、ウイルスの増殖にも ARE-mRNA が寄与することを見出した。そこでアデノウイルスの E4 領域を欠失したウイルス Ad E4 を腫瘍溶解ウイルスとして開発してきた。このウイルスは正常細胞では E4 領域がないため増殖できないが、ARE-mRNA があらかじめ輸送・安定化されているがん細胞では良く増殖し、がん細胞を破壊する能力を持つことを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでとは異なる新しい理論に基づく腫瘍溶解アデノウイルスを開発する。このウイルス(Ad+AU)は複製に必須の E1A 遺伝子の 3' 非翻訳領域に ARE を持つため、ARE-mRNA が安定化されているがん細胞では E1A の mRNA も安定化され、その結果アデノウイルスの複製が起こる。それに対して、正常細胞では E1A mRNA は安定化しないのでウイルス増殖は制限される。本研究ではこのウイルスががん細胞を特異的に破壊することを検討する。

### 3. 研究の方法

初年度は Ad+AU を作成し、様々ながん細胞および正常細胞を用いてそのウイルスの増殖効率(タイタ-)と、増殖によって誘導される細胞死を決定した。また既存の腫瘍溶解アデノウイルス ONYX-015 とその効果を比較した。次年度は、ヌードマウスにヒトの腫瘍を移植し、Ad+AU の *in vivo* での効果を検討した。最後は、Ad+AU と抗がん剤などの他のがん治療法との併用を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) Ad+AU の作製

E1A 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、TNF- 遺伝子の ARE を挿入したアデノウイルス(Ad+AU; 図 1A)を作製した。また、このウイルスをがん細胞(A549)と正常細胞(BJ)に感染させて、E1A の発現が本当にがん細胞で高いか確認した。その結果、Ad+AU を感染させたがん細胞では、高いレベルの E1A およびウイルス構成タンパクのヘクソンの発現が見られた(図 1B)。この結果は、Ad+AU はがん細胞特異的に複製出来る可能性を示している。

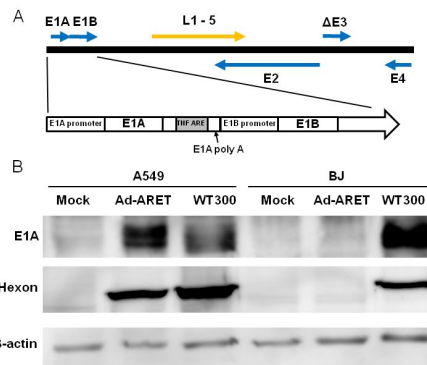


図1 A Ad+AUの構造、B Ad+AU感染細胞のE1AおよびHexonの発現

#### (2) Ad+AU の複製

Ad+AU を C33A、HeLa、H1299、A549 などのがん細胞と、WI38 や BJ などの正常細胞に感染させ、ウイルス生産を確定した。その結果、がん細胞の方が正常細胞よりも生産効率が高いことが明らかになった(図 2)。

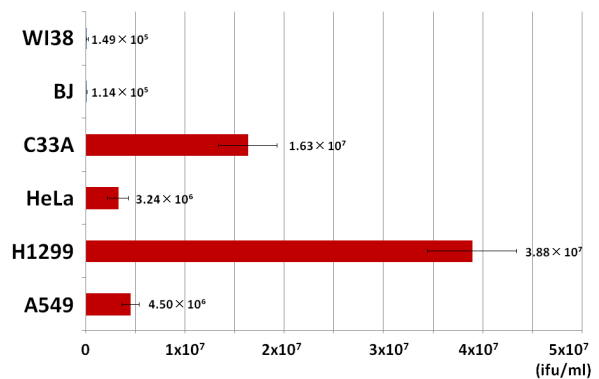


図2 がん細胞と正常細胞でのAd+AUの生産効率

#### (3) Ad+AU の細胞溶解効率

次に、Ad+AU の腫瘍溶解効果を検討するために、Ad+AU を各種がん細胞(A549、H1299、C33A)と正常細胞(BJ)に感染させ、7日後に生き残った細胞を染色し、CPE assay を行った(図 3)。その結果、がん細胞は感染ウイ

ルス濃度依存的に細胞が死んだが、それに対して正常細胞は高いウイルス濃度でも生き残った。

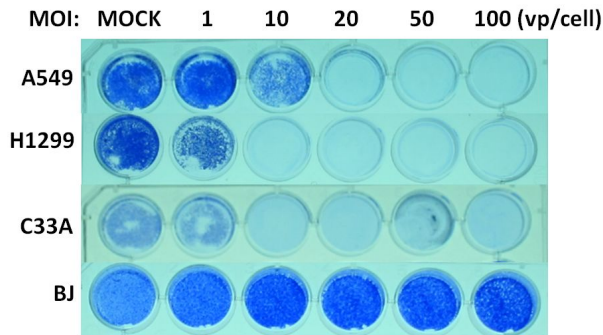


図3 Ad+AUによる各種細胞の溶解効果

Ad+AU の腫瘍溶解効果をさらに検討するために、Ad+AU を各種がん細胞 (A549、H1299、C33A、HeLa、U2OS、SAS) と正常細胞 (BJ、HGF-1) に感染させ、生細胞の活性を測定できる XTT assay を行った。その結果、がん細胞は感染後 7 日目までに、ウイルス感染により細胞が全滅したが、正常細胞はほとんど影響がなかった (図 4)。CPE assay と XTT assay の結果は、Ad+AU が腫瘍溶解効果を in vitro で持つことを示している。

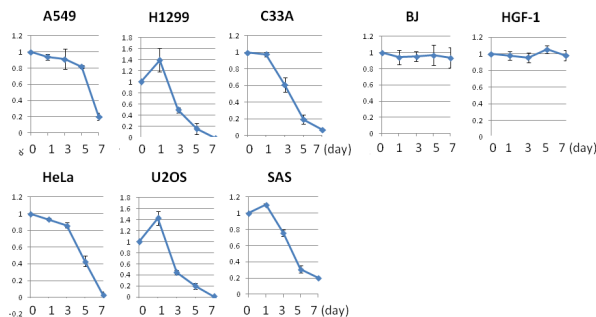


図4 Ad+AUによる各種細胞の溶解効果(XTT assay)

#### (4) Ad+AU の in vivo での効果

最後に、Ad+AU の in vivo での効果を検証するために、ヌードマウスに HeLa S3 細胞を移植し、できた腫瘍に対して Ad+AU を直接投与し (合計 2 回) 感染後の腫瘍の体積を求めた。その結果、Ad+AU を問うよした群は、コントロールの PBS 投与群と比較して顕著に腫瘍が縮小した (図 5)。

以上の検討より、Ad+AU はがん細胞特異的に増殖し、がん細胞を溶解できる腫瘍溶解効果を持つアデノウイルスであることが明らか

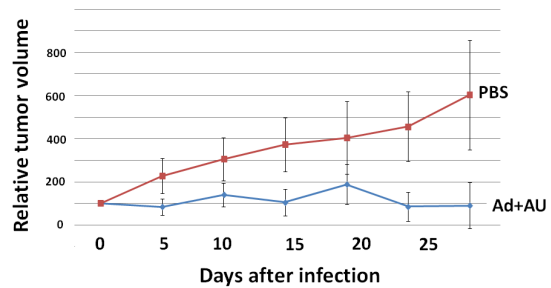


図5 ヌードマウスに移植したヒトがん細胞の腫瘍に対するAd+AUの溶解効果

かになった。今後は、このウイルスの臨床応用を目指して研究を進める予定である。

#### 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 4 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, 2018, 1795-1800  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.036

Kitamura T, Higashino F, Yanagawa-Matsuda A, Ueda M, Kashiwao 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.

Habiba U, Hida K, Kitamura T, Matsuda A, 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, 2017, 321-328  
DOI: 10.3892/ol.2016.5379

Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Higashino F, Hida K, Totsuka Y, Shindoh M, 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, 2016, 3199-3207  
DOI: 10.3892/ol.2016.5061

[学会発表](計 13 件)

**金山純一**：腫瘍溶解アデノウイルスと 5-FU との併用効果の検討、**第 29 回日本臨床口腔病理学会** (埼玉県・川越市)

2017/8/23-25

**松田 彩**：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**（東京都・新宿区）2017/4/27-29

**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**（China・Hong Kong）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

〔その他〕

ホームページ等

<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・大学院歯学研究院・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・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：00451451