

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09737

研究課題名(和文) 口腔がん幹細胞を標的とした腫瘍溶解ウイルスの作製

研究課題名(英文) Oncolytic virus targeting oral cancer stem cells

研究代表者

安田 元昭 (YASUDA, MOTOAKI)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：90239765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：tripartite leader配列は後期タンパク質の優先的な翻訳に必須である。ルシフェラーゼの上流にtripartite leader配列を付与したプラスミドを導入した細胞ではコントロールプラスミドを導入した細胞に比較して10倍のルシフェラーゼ活性が認められた。これらプラスミドと同時にアデノウイルスE4領域および一部を欠損させたミュータントを導入した結果、E4全域の共発現ではルシフェラーゼ活性は2倍以上になり、E4のうちE4 orf4がこの活性化に必須であることがわかった。E4 orf4と宿主由来OMB1の複合体は翻訳機構の調節に関与していることが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アデノウイルスは遺伝子治療研究の約25%で使用されるベクターであるが、ほとんどの組み換えウイルスは自己複製不能で全てのがん細胞への導入は困難であり、また大量に感染させると肝臓に集積し副作用の原因となる。本研究で明らかとなったウイルス遺伝子翻訳システムの詳細は腫瘍溶解アデノウイルスをより効果的な手法とするのに有用である。また「がん幹細胞」における本翻訳システムの詳細についての解析は、さらに効果的な腫瘍会ウイルス作成への大きな一歩となる。

研究成果の概要(英文)：All transcribed mRNAs, a minimum of 20 late viral RNAs, contain the common 5' UTR, which is called as Tripartite Leader, and this sequence is required for preferential translation of late viral proteins during late infection period. In the present study, we have demonstrated a novel role for E4 orf4 protein in the late adenoviral mRNA translation. Tripartite Leader tagged construct (TrLdr-LUC) transfected cells showed more than 10-fold higher luciferase activity compared with control transfectants, whereas no significant increase of luciferase mRNA amount was detected in TrLdr-LUC transfected cells. At least 2 folds increase of luciferase activities were observed, and the mutational analysis indicated that E4orf4, but not E4 orf3 or E4 orf6, was required for the enhanced translation. It is likely that E4 orf4 or OMB1 containing complex is involved in so-called Ribosome Shunt system.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アデノウイルス UTR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は、増殖因子や栄養の欠乏、ウイルス感染、突然の温度上昇などのさまざまな状況の変化に応答してタンパク質合成全体の速度を減少させる。がん細胞においては正常細胞とは異なった表現型がみられる。アデノウイルスはこのような宿主反応に対抗するため、二つの異なった方法でウイルス遺伝子発現を増強していることが明らかになった。一つは E4 orf6 を介した 3'UTR の ARE 配列依存的な mRNA 半減期の延長であり、もう一つは tripartite reader と呼ばれる 5'UTR によるウイルスタンパク質の翻訳活性化である。これらにより宿主細胞のタンパク質生成が減少している環境においても自身の構造タンパク質を優先的かつ高効率な状態で発現する(宿主細胞に発現させる)ことができる。我々は、がん細胞では正常細胞に比較して ARE を介した mRNA の分解が優位に抑制されていることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

上記の発見から、ヒトアデノウイルスの初期遺伝子である E1A の下流にあるいは E4 の上流に特異な配列を付与し、正常組織には影響を与えず、がん細胞にのみ傷害を与える腫瘍溶解ウイルス作成が本研究計画の目的である。

3. 研究の方法

(1) 3' 非翻訳領域の改変

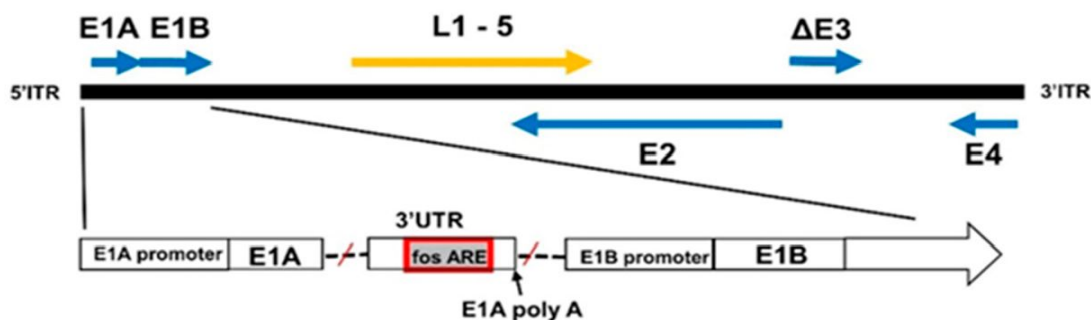
c-fos など多くの種類の ARE 配列をルシフェラーゼ遺伝子配列の下流に挿入しその発現プロフィールを解析する。

(2) 5' 非翻訳領域の改変

Hif 1a やアデノウイルス後期遺伝子の tripartite leader 配列をルシフェラーゼ遺伝子配列の上流に組み込みその発現プロフィールを解析する。

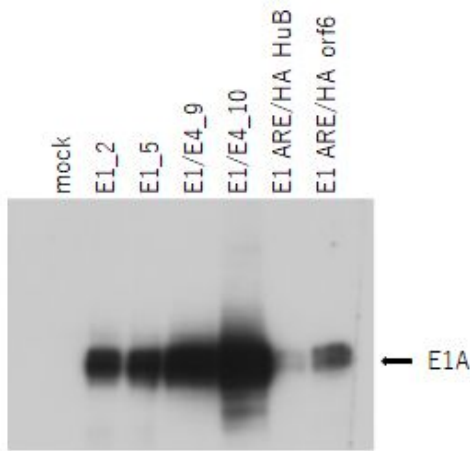
4. 研究成果

(1) 3' 非翻訳領域の改変による E1A 発現量の変化



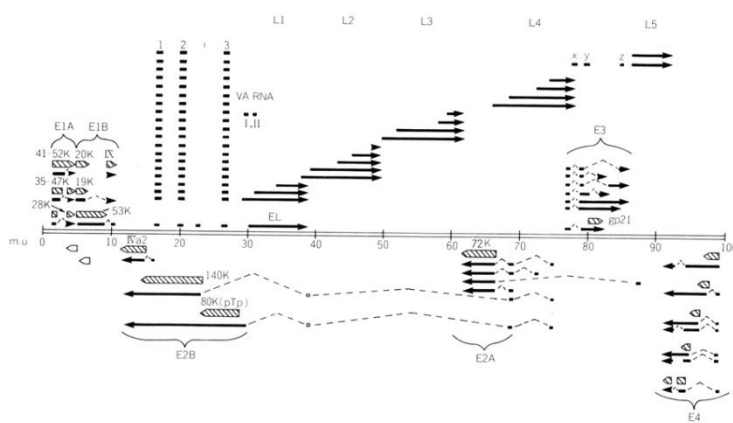
上図に示すごとく、E1A 下流に ARE 配列を組み込んだ組み替えアデノウイルスを作成した。このウイルスを、がん細胞 (HeLa, A549) あるいは正常細胞 (BJ) に感染させたところ、以下に示すように、正常細胞では E1A の発現は検出されなかった。

またこの組み換えウイルスゲノムの E1 領域から検出可能な E1A を発現させるためには、E4 orf6 あるいは HuB(ELAVL2) の発現が必須であることが示された。



左図は正常ラット線維芽細胞に E1 単独 E1 ARE 単独あるいは E4 領域、HuB、E4 orf6 を今日導入し、それら細胞のライセートを抗 E1A モノクローナル抗体にてウエスタンブロットした結果である。E4 領域が野生型および ARE 組み換え型 E1A の発現に重要な働きを示している。

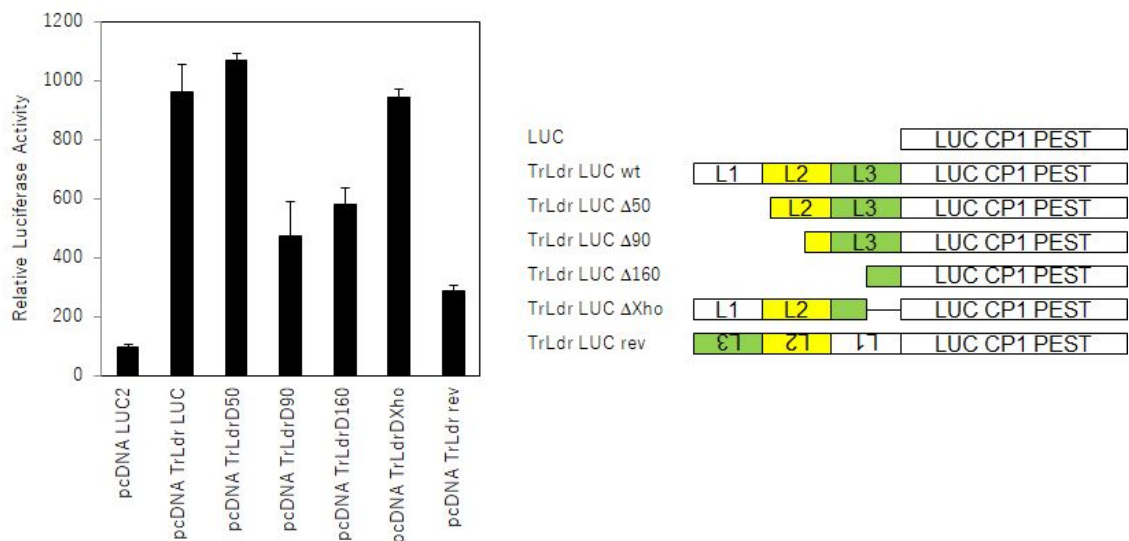
(2) 5' 非翻訳領域の改変による翻訳調節



左図はヒトアデノウイルスゲノムの転写単位を示した模式図であるが、全ての後期遺伝子 mRNA は共通の配列を 5'UTR に有することを示している。

この tripartite leader 配列(以降 TrLdr 配列と略する)の遺伝子発現における役割を理解するため、我々はルシフェラーゼ遺伝子の 5'UTR にこの TrLdr 配列を

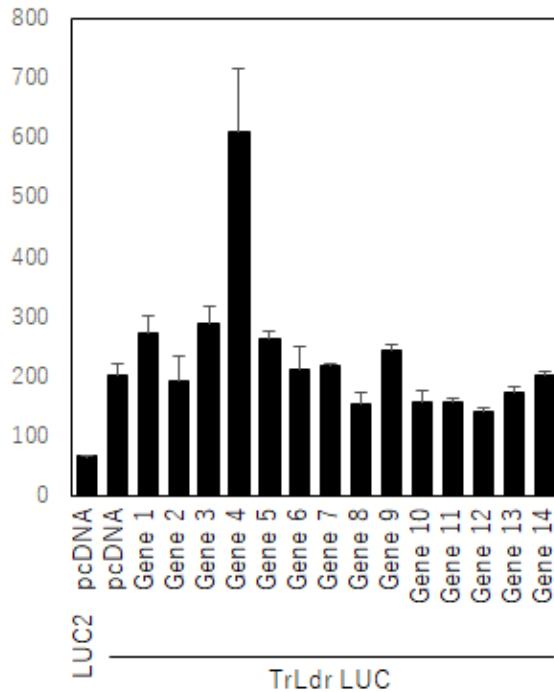
組み込み、ルシフェラーゼアッセイおよび RealTime PCR 法により解析を行った。



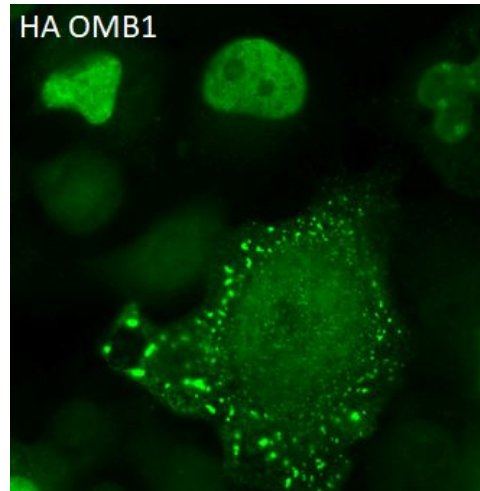
上図に示すごとく、この TrLdr 配列は、有意にルシフェラーゼ発現を亢進する働きがあることが分かった。RealTime PCR 解析の結果、各ルシフェラーゼコンストラクトの転写量に有意差はなく、このような発現量の更新は転写ではなく、翻訳過程における何らかの機構が関わっていることが示唆された。またこの現象は遺伝子導入の対象となる細胞腫によって大きく異なることも明らかとなった。興味深いことに TrLdr 配列の方向性(5' 3')も重要であり、mRNA 上の TrLdr ヌクレオチドに何らかの細胞性因子が結合することが予想された。

(3) TrLdr 配列依存性翻訳効率活性化に関する宿主因子の検索

我々はマイクロアレイ解析により細胞間の遺伝子発現比較を行うことにより、TrLdr mRNA 結合性蛋白質の候補を 14 遺伝子に絞り込み、それぞれの cDNA を発現ベクターに組み込み、その機能をルシフェラーゼアッセイにより数値化した。結果を下図に示す。



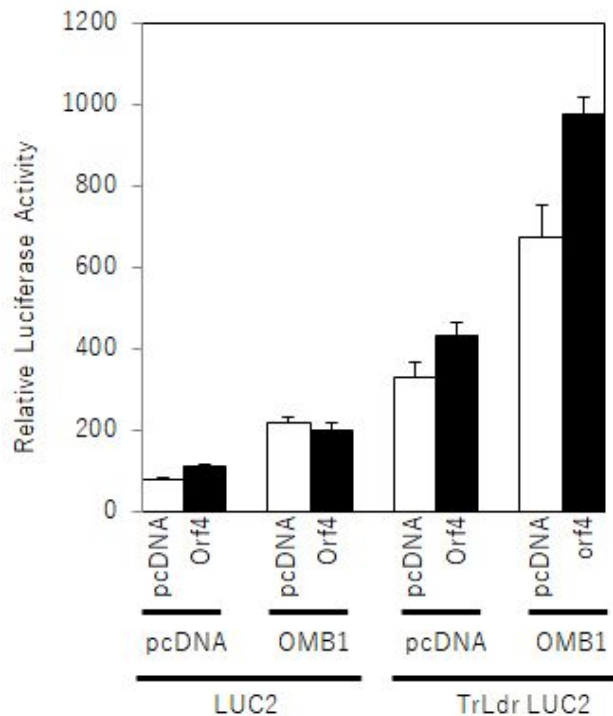
候補遺伝子 4 は有意に TrLdr ルシフェラーゼの翻訳反応を亢進することが明らかになった(この遺伝子を以下 OMB1 と呼称する)。



OMB1 は細胞核 細胞質をシャトルすることを示唆する蛍光顕微鏡像も確認された。

(4) OMB1 は E4 orf4 と協調的に遺伝子発現を増強する。

Immunoprecipitation 法を用いた解析により、OMB1 は E4 orf4 と共沈し、それら共発現が TrLdr 配列を含むルシフェラーゼの発現をさらに増強することが明らかとなった (右図参照)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatanaka T, Higashino F, Tei K, Yasuda M.	4. 巻 517(2)
2. 論文標題 The neural ELAVL protein HuB enhances endogenous proto-oncogene activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 38-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.07.089.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagawa-Matsuda A, Mikawa Y, Habiba U, Kitamura T, Yasuda M, Towfik-Alam M, Kitagawa Y, Minowa K, Shindoh M, Higashino F	4. 巻 41(2)
2. 論文標題 Oncolytic potential of an E4-deficient adenovirus that can recognize the stabilization of AU-rich element containing mRNA in cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 954-960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2018.6865.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hossain E, Habiba U, Yanagawa-Matsuda A, Alam A, Ahmed I, Alam MT, Yasuda M, Higashino F.	4. 巻 12(5)
2. 論文標題 Advantages of Using Paclitaxel in Combination with Oncolytic Adenovirus Utilizing RNA Destabilization Mechanism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12051210.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Motoaki Yasuda, Fumihiro Higashino
2. 発表標題 A novel role for E4 orf4 in the translation of late adenovirus mRNA
3. 学会等名 RNA学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	東野 史裕 (HIGASHINO FUMIHIRO) (50301891)	北海道大学・歯学研究院・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------