

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19221

研究課題名（和文）腫瘍溶解アデノウイルスの効果増強のための試み

研究課題名（英文）Attempt to enhance the effect of oncolytic adenovirus.

研究代表者

アラム M・トウフィック（Alam, Mohammad Towfik）

北海道大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号：60641694

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍溶解アデノウイルスAd+AUの腫瘍溶解効果が、エタノール処理で増強されるか検討した。エタノールの最適濃度を決定後、Ad+AUのがん細胞に対する腫瘍溶解効果を検討した。その結果、エタノール添加によりウイルス増殖効率およびAd+AUによる細胞死も活性化された。さらに、ヌードマウスにがん細胞の腫瘍を作成し、Ad+AUとエタノールを投与し、腫瘍溶解効果の増強をin vivoで検討した。その結果、Ad+AUはこの腫瘍の増殖を抑制し、ウイルスとエタノール両方で処理した系ではさらに腫瘍の増殖が抑制された。以上の結果より、エタノールによりAd+AUの腫瘍溶解活性が上がることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エタノールによるAd+AUの腫瘍溶解効果増強を証明することができた。この特徴は他の多くの腫瘍溶解ウイルスにはないこのウイルス独自の有利性である。抗がん剤など、これまでのがんの治療法は、患者に対して苦痛や副作用が伴うことが多いが、Ad+AUを用いた治療法は、副作用がなく、使用法も簡便で、他のがん治療法との併用も容易なので、非常に有用な治療法になると期待できる。また、アデノウイルスは病原性が低く、遺伝子治療用のベクターとしての実績もあり、安全性が非常に高く、実用化しやすい。さらに、アデノウイルスは複製効率も高く、生産方法も簡便で安価なため、企業化の面でもメリットが高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether the oncolytic effect of oncolytic adenovirus Ad + AU was enhanced by ethanol treatment. After determining the optimum concentration of ethanol, the oncolytic effect of Ad + AU on cancer cells was examined. The addition of ethanol activated both virus growth efficiency and cell death by Ad + AU. Furthermore, tumors of cancer cells were prepared in nude mice, and Ad + AU and ethanol were administered to examine the enhancement of the oncolytic effect in vivo. Ad + AU suppressed the growth of this tumor, and the system treated with both virus and ethanol further suppressed the growth of the tumor. These results indicate that ethanol can activate the oncolytic activity of Ad + AU.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：アデノウイルス 口腔がん 腫瘍 溶解 エタノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解ウイルス療法

腫瘍溶解ウイルス療法とは、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどを正常細胞に対するウイルスの病原性は除外し、腫瘍細胞でのみ増殖するように設計された遺伝子を持つウイルスに改変し、最終的には腫瘍組織を死滅させる治療法である。現在、世界中で盛んに臨床研究が進められており、中国では遺伝子改変アデノウイルスがすでに実用化されており、欧米でも治験が進められる段階にまで来ている。今後、腫瘍溶解ウイルス療法は、外科的切除、化学療法、放射線治療などと同様にがん治療法の選択肢の一つとなることが期待される。

アデノウイルスを基盤とした腫瘍溶解ウイルスにはこれまで大きく分けて 2 種類のウイルスが作成されている。Type I はウイルス遺伝子の一部が欠失したアデノウイルスで、E1B 遺伝子を欠失した様なウイルスである。Type II はウイルスの増殖に最も重要な E1A 遺伝子の転写調節領域に、がん細胞特異的に活性化されるプロモーターを挿入したウイルスである。

アデノウイルスと ARE-mRNA

ポストゲノム時代をむかえ、様々な RNA と発がんとの関わりが指摘されている中、AU-rich element (ARE) を持つ 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者が解明した。ARE は、mRNA 分解の標的で、アデニンとウラシルに富み、がん遺伝子など細胞増殖に関わる遺伝子の mRNA に存在する。ARE-mRNA は、正常細胞では転写後すぐに分解されるが、ストレス等により一時的に核外輸送・安定化される。しかし、発がん刺激等が来ると、恒常的に核外輸送・安定化され、この安定化により細胞がん化が誘起される。

申請者らは、このシステムを応用して、アデノウイルスの増殖必須遺伝子 E1A に ARE を挿入したウイルス (Ad+AU) を開発した。Ad+AU を感染させると、正常細胞では E1A-ARE mRNA が分解され、逆にがん細胞では、E1A-ARE mRNA が安定化されるため、Ad+AU は、がん細胞特異的に増殖でき、最終的にはがん細胞だけを破壊する。mRNA 安定化システムを応用した、腫瘍溶解ウイルスは申請者らのオリジナルのアイデアで、その後、HSC-3 などの口腔がん細胞を用いた実験では、予想通り、Ad+AU 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。

一方、ARE-mRNA は様々な刺激で安定化されることが知られており、この時 ARE に特異的に結合する RNA 結合タンパク HuR が結合し、このタンパクと共に核外へ輸送される。申請者は、予備実験で、細胞に影響を与えない程度の濃度のエタノール処理で、細胞質の HuR 量が上昇することを見出した。前述のように、Ad+AU は、ARE-mRNA が核外輸送・安定化されている細胞でより増殖する可能性があるため、ARE-mRNA や HuR の核外輸送を増強すれば、ウイルスの複製効率も増強するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔がんに対して効果を持つ Ad+AU の腫瘍溶解効果を増強するための検討を行うことである。基本的には、ARE-mRNA をより多く核外輸送するシステムがあれば、Ad+AU はより多く複製し、腫瘍溶解効果が増強されることになる。本研究では、エタノールが Ad+AU の腫瘍溶解効果を増強するかを in vitro 及び in vivo の実験系を用いて詳細に検討する。

3. 研究の方法

初年度は、エタノールの最適条件を確立し、Ad+AU の活性に対するエタノールの効果を *in vitro* で検討する。次年度は、既存のウイルスと Ad+AU+エタノールの効果を比較し、動物を用いてその効果を検討する。

(1) がん細胞への効果検証

各種がん培養細胞をエタノール処理し、エタノールが HuR の核外輸送を活性化するか検討し、細胞質に存在する HuR が最も多い条件を確立させる。次に、その条件下で、Ad+AU のがんに対する腫瘍溶解効果、即ち増殖ウイルス数を確定し、XTT assay により細胞死を検討する。

(2) 動物実験

ヌードマウスに口腔がん細胞の腫瘍を作成し、Ad+AU とエタノールを投与し、腫瘍溶解効果の増強を *in vivo* で検討する。

4. 研究成果

まず、エタノールの最適条件を確立し、Ad+AU の活性に対するエタノールの効果を *in vitro* で検討した。がん培養細胞をエタノール処理し、エタノールが HuR の核外輸送を活性化するか検討し、細胞質に存在する HuR が最も多い条件を確立した。その結果、0.3%の濃度エタノールが最適であることが明らかになった (Fig. 1)

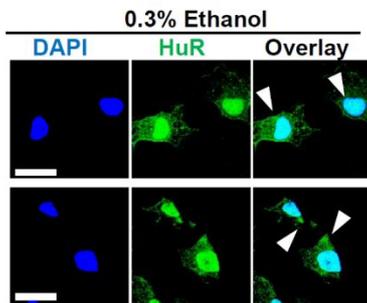


Figure 1 エタノールの最適濃度の検討

また、その条件で、Ad+AU のがん細胞に対する腫瘍溶解効果、即ち複製ウイルス数を確定し、XTT assay により細胞死を検討した。その結果、エタノール添加によりウイルス複製が上がり (Fig. 2) さらに、Ad+AU による細胞死も活性化された (Fig. 3) 以上の結果より、エタノールにより Ad+AU の腫瘍溶解活性が上がることを示された。

次に、ヌードマウスにヒトがん細胞を移植することにより腫瘍を作成し、Ad+AU とエタノールを腫瘍に直接投与し、腫瘍溶解効果の増強を *in vivo* で検討した。ヌードマウスを用いて、HeLa 細胞を移植して形成した腫瘍に対して、Ad+AU 単独、エタノール単独、Ad+AU とエタノール両方を投与してその効果を検討した。その結果、Ad+AU はこの腫瘍の増殖を抑制し、*in vivo* 担癌モデルでも腫瘍溶解効果があることがわかり、さらにウイルスとエタノール両方で処理した系ではさらに腫瘍の増殖が抑制された (Fig. 4) また、腫瘍中の Ad+AU の増殖を、ウイルスのヘクソンタンパクの存在により検出し、実際にウイルスが

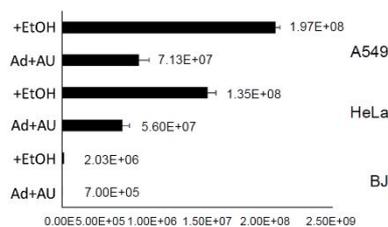


Figure 2 がん細胞および正常細胞でのエタノールによるウイルス複製能の増強

Ad+AU はこの腫瘍の増殖を抑制し、*in vivo* 担癌モデルでも腫瘍溶解効果があることがわかり、さらにウイルスとエタノール両方で処理した系ではさらに腫瘍の増殖が抑制された

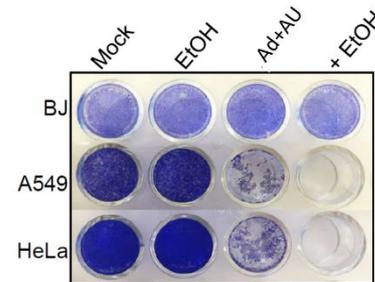


Figure 3 がん細胞および正常細胞でのエタノールによる細胞溶解能の増強

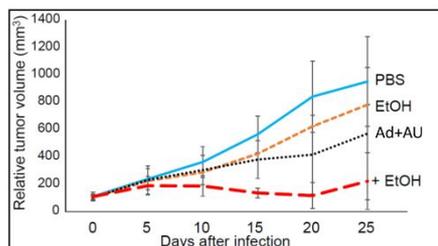


Figure 4 *in vivo* 担癌モデルでの Ad+AU の腫瘍溶解効果

増殖して腫瘍が縮小したことを証明した (Fig. 5)。以上の結果より、エタノールにより Ad+AU の腫瘍溶解活性が上がることを示された。

本研究のこれらの結果により、ARE-mRNA が核外輸送され安定化される条件では、Ad+AU の腫瘍溶解活性が上がることを明かになった。

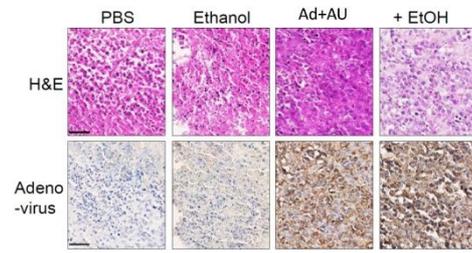


Figure 5 担癌モデルの腫瘍中に存在するAd+AU

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 3件）

1. 著者名 Ahmed I., Towfik Alam M., Yanagawa-Matsuda A., Hossain E., Kitamura T., Minowa K., Higashino F.	4. 巻 529
2. 論文標題 Enhanced oncolytic activity of E4orf6-deficient adenovirus by facilitating nuclear export of HuR.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 494-499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hossain E., Habiba U., Yanagawa-Matsuda A., Alam A., Ahmed I., Towfik Alam M., Yasuda M., Higashino F.	4. 巻 12
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	6. 最初と最後の頁 1210
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mikawa Y., Towfik Alam M., Hossain E., Yanagawa-Matsuda A., Kitamura T., Yasuda M., Habiba U., Ahmed I., Kitagawa Y., Shindoh M., Higashino F.	4. 巻 12
2. 論文標題 Conditionally Replicative Adenovirus Controlled by the Stabilization System of AU-rich Elements Containing mRNA.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12051205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 Fumihiro Higashino, Aya Yanagawa-Matsuda, Mohammad Towfik-Alam, Tetsuya Kitamura
2. 発表標題 Oncolytic potential of an E4-deficient adenovirus that can recognize the stabilization of AU-rich element containing mRNA in cancer cells.
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------