

## 腫瘍融解アデノウイルスによる E2F1-マイクロRNA-7-EGFR 経路を介したオートファジー細胞死の誘導分子機構

田澤 大<sup>a,b,\*</sup>, 矢野 修也<sup>b</sup>, 吉田 亮介<sup>b</sup>, 山崎 泰源<sup>b</sup>, 佐々木 剛<sup>c</sup>, 橋本 悠里<sup>b</sup>, 黒田 新士<sup>b</sup>, 大内 正明<sup>d</sup>, 大西 哲平<sup>b</sup>, 宇野 太<sup>b</sup>, 香川 俊輔<sup>b</sup>, 浦田 泰生<sup>d</sup>, 藤原 俊義<sup>b</sup>

<sup>a</sup>岡山大学病院 新医療研究開発センター, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 <sup>b</sup>消化器外科学, <sup>c</sup>整形外科, <sup>d</sup>オンコリスバイオファーマ株式会社

キーワード: アデノウイルス, テロメラーゼ, マイクロRNA, オートファジー, EGFR

### Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis

Hiroshi Tazawa<sup>a,b,\*</sup>, Syuya Yano<sup>b</sup>, Ryosuke Yoshida<sup>b</sup>, Yasumoto Yamasaki<sup>b</sup>, Tsuyoshi Sasaki<sup>c</sup>, Yuuri Hashimoto<sup>b</sup>, Shinji Kuroda<sup>b</sup>, Masaaki Ouchi<sup>d</sup>, Teppei Onishi<sup>b</sup>, Futoshi Uno<sup>b</sup>, Syunsuke Kagawa<sup>b</sup>, Yasuo Urata<sup>d</sup>, Toshiyoshi Fujiwara<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Center for Innovative Clinical Medicine, Okayama University Hospital, Departments of <sup>b</sup>Gastroenterological Surgery, <sup>c</sup>Orthopaedic Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, <sup>d</sup>Oncolys BioPharma Inc.

### はじめに

オートファジーは、細胞質成分の一部をオートファゴソーム内に取り込み、リソソームとの融合による分解を介して必要な栄養素を作り出す機構である<sup>1)</sup>。オートファジーは、低栄養<sup>2)</sup>、低酸素<sup>3)</sup>、増殖シグナルの抑制<sup>4)</sup>などの飢餓状態の生理的条件下で細胞生存を維持するために誘導される。一方、がんウイルス療法に用いられるがん細胞で選択的に増殖する腫瘍融解アデ

ノウイルスが感染した場合もがん細胞にオートファジーが誘導され、最終的に細胞死を引き起こす事が報告されている<sup>5-7)</sup>。腫瘍融解アデノウイルスによるがん細胞へのオートファジー細胞死の誘導はオートファジーの腫瘍抑制的機能として重要であるが、腫瘍融解アデノウイルスによるオートファジー細胞死の誘導分子機構は未だ不明である。

近年、マイクロRNAと呼ばれるタンパク質をコードしない約22塩基長の短いRNAが新たな遺伝子制御機構として注目されている。マイクロRNAは複数のターゲット遺伝子のメッセンジャーRNAを抑制してがん細胞の増殖<sup>8)</sup>、老化<sup>9)</sup>、アポトーシス<sup>10)</sup>などに関与する事が知られている。しかし、腫瘍融解アデノウイルスによるオートファジー細胞死の誘導におけるマイ

平成25年7月受理

\*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7491 FAX: 086-235-7492

E-mail: htazawa@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



田澤 大

昭和46年生まれ

平成7年3月 秋田大学医学部医学科卒業

平成7年4月 秋田県厚生連雄勝中央病院 外科 研修医

平成8年4月 秋田大学大学院医学研究科博士課程 入学

平成12年3月 秋田大学大学院医学研究科博士課程 修了

平成12年4月 山形県鶴岡協立病院 外科 医員

平成14年4月 フランス WHO 国際癌研究機関 (IARC) 客員研究員

平成17年2月 国立がんセンター研究所 生化学部 研究員

平成19年12月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 特任助教

平成22年4月 岡山大学病院 遺伝子・細胞治療センター 助教

平成23年10月 岡山大学病院 新医療研究開発センター 助教

現在に至る

クロ RNA の関与は不明である。

本研究では、独自に開発したテロメラーゼ活性依存的に制限増殖する腫瘍融解アデノウイルス製剤テロメライシン（開発コード：OBP-301）（図 1 A）ががん細胞にオートファジー細胞死を誘導する分子機構におけるマイクロ RNA による遺伝子制御ネットワークの関与について検討した<sup>11)</sup>。

## テロメライシンによるがん細胞へのオートファジー細胞死の誘導

テロメライシンに対する感受性の異なる 3 種類のヒトがん細胞株（高感受性：H1299, 低感受性：A549, 抵抗性：T.Tn）と 1 種類のヒト正常線維芽細胞株 NHLF を用いて、テロメライシンの細胞障害活性とオートファジー誘導能の関連性を検討した（図 1 B, 1 C）。テロメライシンに感受性を示す H1299 細胞と A

549 細胞は、テロメライシンによる細胞生存率の低下に一致してオートファジー関連因子の変化（LC3-II/LC3-I 比の増加, Atg5 の増加, p62 の低下）を認めた。一方、テロメライシンに抵抗性を示す T.Tn 細胞や NHLF 細胞は、テロメライシンによる細胞生存率の低下やオートファジー関連因子の変化を認めなかった。以上の結果から、テロメライシンはがん細胞にオートファジー細胞死を誘導する事が示唆された。

## 転写因子 E2F1 によるマイクロ RNA-7 の誘導

テロメライシンによるオートファジー細胞死の誘導におけるマイクロ RNA の関与を検討するために、テロメライシンと正常 5 型アデノウイルス感染後の H1299 細胞におけるマイクロ RNA の発現変化についてマイクロ RNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。さらにリアルタイム RT-PCR による検証を行

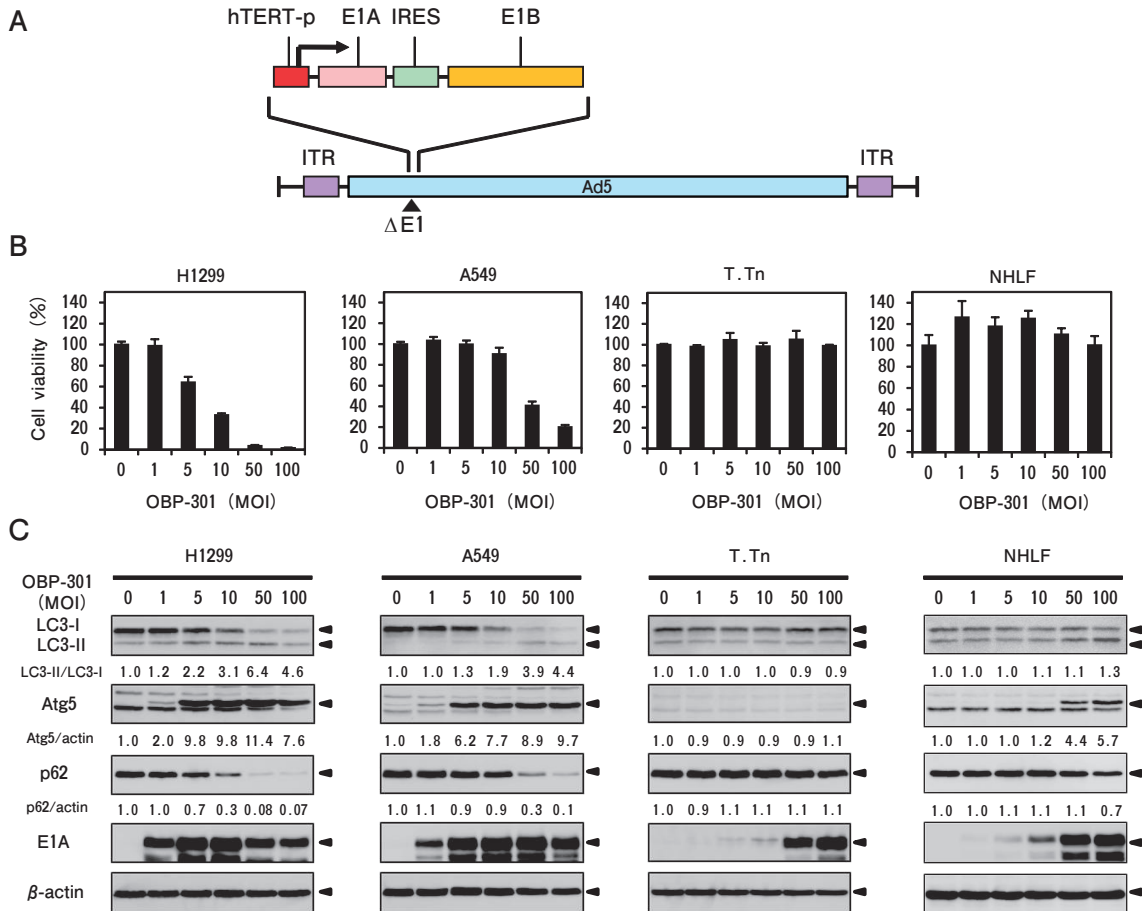


図 1 テロメライシンの構造とオートファジー細胞死の誘導

A : テロメライシンの基本構造。正常 5 型アデノウイルス (Ad5) の E1 領域に IRES 配列で連結した E1A と E1B が hTERT 遺伝子プロモーター (hTERT-p) によって制御されるカセットが挿入されている。B, C : ヒトがん細胞株 (H1299, A549, T.Tn) とヒト正常線維芽細胞株 (NHLF) におけるテロメライシン感染後の細胞生存率の変化 (B) とオートファジー関連因子 (LC3, Atg5, p62) の発現変化 (C)。

い、マイクロ RNA-7の発現上昇がテロメラインシンの細胞障害活性と一致する事を確認した(図2A)。テロメラインシン感染後のE1Aタンパク質の蓄積に伴い転写因子E2F1が活性化する<sup>12)</sup>事から、E2F1とマイクロRNA-7の関連性を検証したところ、E2F1の活性化に伴うマイクロRNA-7の発現上昇(図2B、2C)やE2F1 siRNAによるマイクロRNA-7発現増強の減弱を認めた(図2D)。以上の結果から、テロメラインシンの感染に伴う転写因子E2F1の活性化がマイクロRNA-7の発現を増強する事が示唆された。

### マイクロRNA-7によるEGFRの抑制とオートファジーの誘導

マイクロRNA-7の発現増強は、がん遺伝子である上皮成長因子受容体(EGFR)の発現低下を介してがん

細胞の増殖を抑制する事が知られている<sup>13)</sup>。そこで、テロメラインシン感染後のEGFRの発現を確認したところ、マイクロRNA-7の発現上昇あるいはテロメラインシンの細胞障害活性とEGFRの発現低下との間に有意な相関関係を認めた(図3A、3B)。さらに、マイクロRNA-7誘導剤を用いてH1299細胞とA549細胞にマイクロRNA-7を強制発現させると、濃度依存的な細胞生存率の低下を認めた(図3C)。マイクロRNA-7の発現増強は、EGFRの発現低下とともにオートファジー関連因子p62の発現を低下させ、オートファジーの誘導を認めた(図3D)。以上の結果から、マイクロRNA-7の発現増強はがん遺伝子EGFRの発現を抑制し、オートファジーを誘導する事が示唆された。

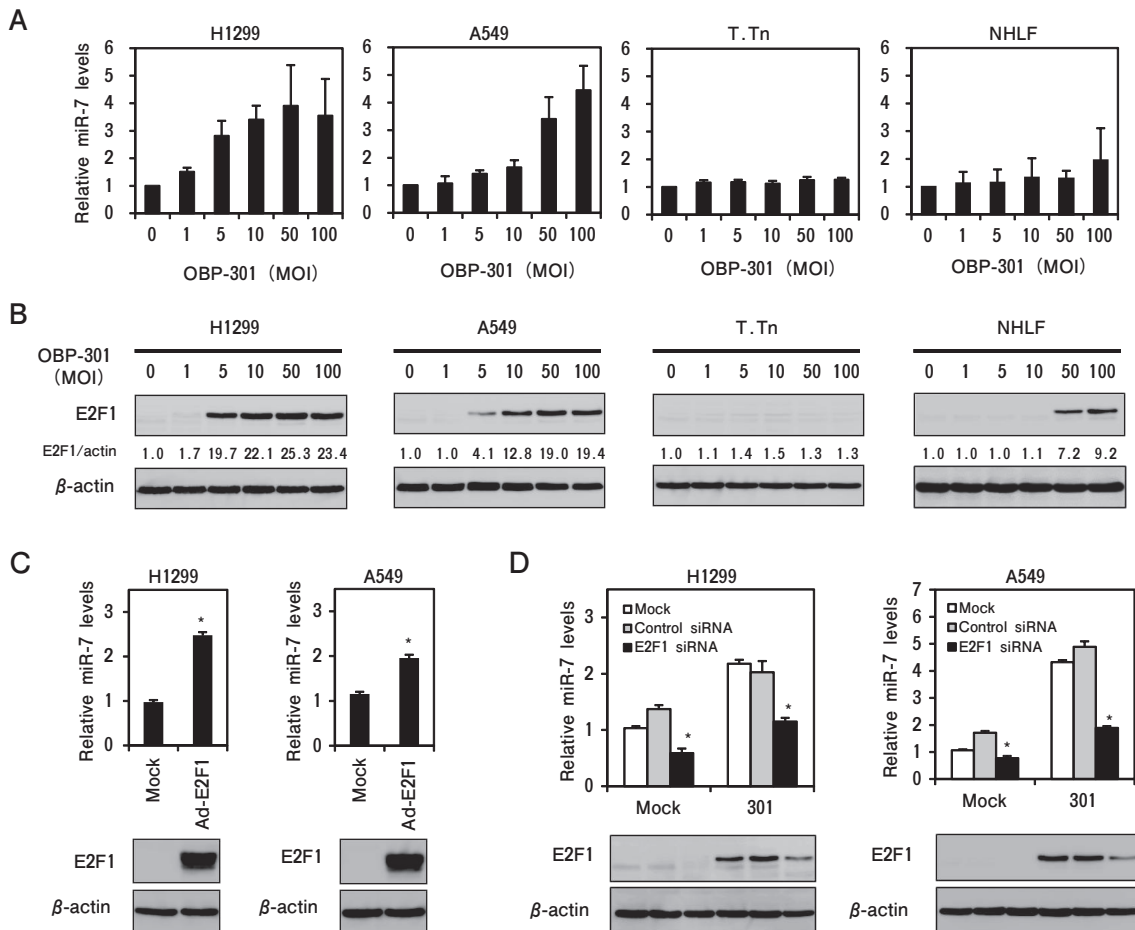


図2 転写因子E2F1の活性化に伴うマイクロRNA-7の発現増強  
 A, B: ヒトがん細胞株とヒト正常線維芽細胞株におけるテロメラインシン感染後のマイクロRNA-7の発現変化(A)と転写因子E2F1の発現変化(B)。C: ヒトがん細胞株におけるE2F1発現性非増殖型アデノウイルス(Ad-E2F1)感染後のマイクロRNA-7(上段)とE2F1(下段)の発現変化。D: E2F1 siRNAあるいはコントロールsiRNA前処理したヒトがん細胞株におけるテロメラインシン感染後のマイクロRNA-7(上段)とE2F1(下段)の発現変化。\*:  $P < 0.05$  (スチューデントt検定)

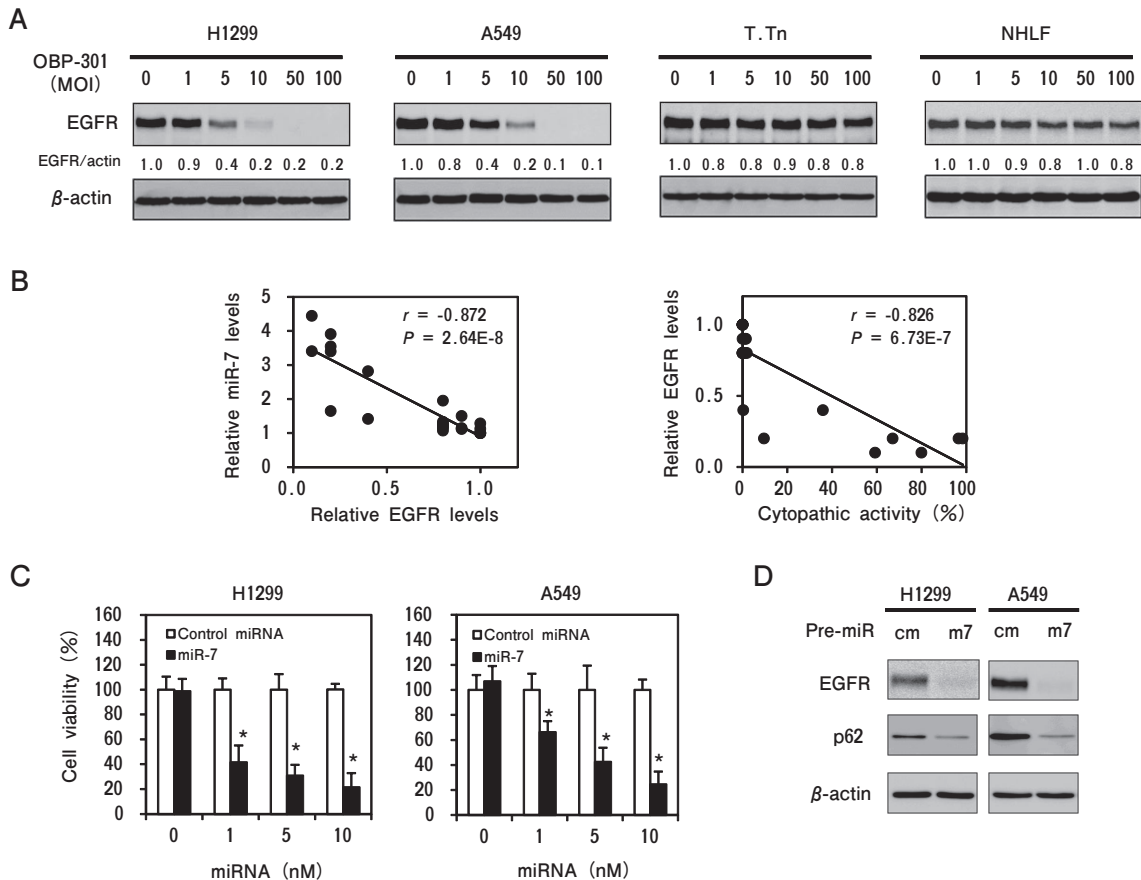


図3 マイクロ RNA-7の発現増強によるがん遺伝子 EGFR の抑制とオートファジーの誘導

A : ヒトがん細胞株とヒト正常線維芽細胞株におけるテロメライシン感染後のがん遺伝子 EGFR の発現変化. B : テロメライシン感染後のマイクロ RNA-7発現と EGFR 発現の相関関係 (左) およびテロメライシンの細胞障害活性と EGFR 発現の相関関係 (右). C, D : マイクロ RNA-7誘導剤あるいはコントロールマイクロ RNA 誘導剤処理後のヒトがん細胞株における細胞生存率の変化 (C) と EGFR, p62の発現変化 (D). \* :  $P < 0.05$  (スチューデント t 検定)

## おわりに

今回、腫瘍融解アデノウイルス製剤テロメライシンがマイクロ RNA による遺伝子制御ネットワークを介してオートファジー細胞死を誘導する分子機構を明らかにした。本研究で解明されたテロメライシンの治療メカニズムにおけるマイクロ RNA-7やがん遺伝子 EGFR は、これまで不明であったがんウイルス療法における治療効果を規定するバイオマーカーとなる可能性がある。また、アデノウイルス由来 E1A タンパク質の蓄積に伴う転写因子 E2F1の活性化による治療メカニズムの解明は、E1A を有する他の腫瘍融解アデノウイルス製剤を用いた治療効果の判定にも応用可能である。さらに、放射線化学療法によるアポトーシス細胞死の誘導分子機構は広く研究が進められている一方、オートファジー細胞死の誘導分子機構は未解明な点が

多く、マイクロ RNA による誘導分子機構の存在は今回初めて明らかとなった。

## 文 献

- 1) Mizushima N, Komatsu M : Autophagy : renovation of cells and tissues. *Cell* (2011) 147, 728-741.
- 2) Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A, Esumi H : Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res* (2007) 67, 9677-9684.
- 3) Azad MB, Chen Y, Henson ES, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Gibson SB : Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* (2008) 4, 195-204.
- 4) Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB : Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* (2005)

- 120, 237-248.
- 5) Ito H, Aoki H, Kuhnel F, Kondo Y, Kubicka S, Wirth T, Iwado E, Iwamaru A, Fujiwara K, Hess KR, Lang FF, Sawaya R, et al. : Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J Natl Cancer Inst* (2006) 98, 625-636.
  - 6) Ulasov IV, Tyler MA, Zhu ZB, Han Y, He TC, Lesniak MS : Oncolytic adenoviral vectors which employ the surviving promoter induce glioma oncolysis via a process of beclin-dependent autophagy. *Int J Oncol* (2009) 34, 729-742.
  - 7) Jiang H, Gomez-Manzano C, Aoki H, Alonso MM, Kondo S, McCormick F, Xu J, Kondo Y, Bekele BN, Colman H, Lang FF, Fueyo J : Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells : role of autophagic cell death. *J Natl Cancer Inst* (2007) 99, 1410-1414.
  - 8) Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY : miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* (2007) 26, 2799-2803.
  - 9) Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H : Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 104, 15472-15477.
  - 10) Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeliani RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, et al. : miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102, 13944-13949.
  - 11) Tazawa H, Yano S, Yoshida R, Yamasaki Y, Sasaki T, Hashimoto Y, Kuroda S, Ouchi M, Onishi T, Uno F, Kagawa S, Urata Y, et al. : Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *Int J Cancer* (2012) 131, 2939-2950.
  - 12) Liu D, Kojima T, Ouchi M, Kuroda S, Watanabe Y, Hashimoto Y, Onimatsu H, Urata Y, Fujiwara T : Preclinical evaluation of synergistic effect of telomerase-specific oncolytic virotherapy and gemcitabine for human lung cancer. *Mol Cancer Ther* (2009) 8, 980-987.
  - 13) Webster RJ, Giles KM, Price KJ : Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem* (2009) 284, 5731-5741.