



Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA combined with cisplatin inhibits cellular growth and induces apoptosis in HPV-positive head and neck cancer cells

Kojima, Yasutaka

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7286号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007286>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA combined with cisplatin inhibits cellular growth and induces apoptosis in HPV-positive head and neck cancer cells

アデノウィルスを介した HPV16 E6/E7 アンチセンス RNA 導入とシスプラチン併用療法は HPV16 陽性頭頸部癌細胞の腫瘍増殖を抑制しアポトーシスを誘導する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
外科系講座 耳鼻咽喉科頭頸部外科学分野
(指導教員：丹生 健一 主任教授)

小嶋 康隆

【背景と目的】

頭頸部扁平上皮癌の発症原因として従来は喫煙やアルコールが挙げられていたが、近年、ヒトパピローマウィルス (HPV) type16・type18 の関与が報告されている。HPV の E6 および E7 蛋白はそれぞれ p53 および Rb 蛋白を阻害し発がんに寄与するとされる。頭頸部扁平上皮癌の中でも、HPV 陽性例は HPV 陰性例とは臨床的な特徴が異なり、その予後も良好であるため、HPV 陽性例に対してより強度を弱めた治療法が模索されている。シスプラチン (CDDP) を併用した化学放射線療法は喉頭温存を目的とした喉頭および咽頭癌の治療の第一選択であるが、味覚障害、口腔乾燥、嚥下障害といった長期にわたる有害事象を生じうる。

アデノウィルスベクターは真核細胞へ遺伝子を導入する一つの方法であるが、頭頸部扁平上皮癌に対してアデノウィルスを用いた HPV 16 E6/E7 遺伝子のアンチセンス RNA 導入を行った研究はこれまで報告されていない。今回我々はアデノウィルスベクターによる HPV 16 E6/E7 遺伝子のアンチセンス RNA 導入と低用量の CDDP と併用することで、CDDP の副作用を減らしつつ抗腫瘍効果を高めることを目的として研究を行った。

【材料と方法】

HPV 陽性頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、HPV 16 E7 遺伝子のアンチセンス RNA を組み込んだアデノウィルス (Ad-E7-AS) 単独投与または低用量の CDDP 併用による腫瘍増殖抑制、アポトーシス誘導を *in vitro* および *in vivo* で評価した。

(1) 細胞株

対象の腫瘍細胞として、HPV 陽性頭頸部扁平上皮癌細胞株である UM-SCC-47、HPV 陰性頭頸部扁平上皮癌細胞株である YCU-T891 を用いた。

(2) アデノウィルスベクターの作成

HPV16 の E6 遺伝子、E7 遺伝子に相補的な DNA 配列を作成した。E6 をターゲットとする配列 (5'プライマーは TACCACAGTTATGCACAGA、3'プライマーは TAATTGTCAAAAGCCCACTG)、E7 をターゲットとする配列 (5'プライマーは GAAACCCAGCTGTAATCA、3'プライマーは TCTGTTCCAGAAACCATAA) を PCR で増幅し、各々をアデノウィルス pAxCawtit2 に組み込み、E6 または E7 遺伝子に対するアンチセンス RNA アデノウィルスベクター (Ad-E6-AS および Ad-E7-AS) を作成した。

(3) 細胞株間における Ad-E6-AS および Ad-E7-AS による細胞毒性の評価

UM-SCC47、YCU-T891 の各細胞株に 10、30、50MOI の濃度で Ad-E6-AS と Ad-E7-AS を感染させ、感染後 2 日、4 日、6 日で alamar blue assay を用いて細胞数を計測し、細胞毒性を評価した。

(4) UM-SCC47 への Ad-E7-AS と CDDP 併用療法の増殖抑制の評価、細胞形態と免疫染色、ウェスタンブロッティングによる蛋白発現

UM-SCC47 を Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用、CDDP 単独、Ad-LacZ (コントロールのアデノウィルスベクター)、無処理の 5 つの投与方法別に分けた。ウィルスを 20MOI、CDDP を $1\mu\text{M}$ でそれぞれ投与し、4 日目で細胞数を計測した。培養した UM-SCC47 をカバーガラスにのせ、前述の 5 つの投与方法別に分け 96 時間後に洗浄・固定し腫瘍細胞の形態観察と免疫染色による Rb 蛋白、p53 蛋白の発現を評価した。また、前述の 5 つの投与方法別に分け細胞を 48 時間で回収し蛋白を抽出、ウェスタンブロッティングを行い E7 蛋白、Rb 蛋白、p53 蛋白の発現を評価した (内部コントロールとして β アクチンを使用)。

(5) UM-SCC47 への Ad-E7-AS と CDDP 併用療法のアポトーシスの評価

アポトーシス細胞をアネキシン V-FITC とヨウ化プロピジウムで多重染色し、フローサイトメトリーを用いてアポトーシスした細胞の割合を計測した。

(6) 腫瘍細胞を移植したマウスモデルを用いた毒性、腫瘍体積の変化の評価と摘出標本の免疫染色

UM-SCC47 1×10^6 個を週数 6 の BALB/c(nu/nu) の大腿皮下に播種させて 5 群に分け、Ad-E7-AS、Ad-E7-AS と CDDP、Ad-LacZ、CDDP 単独、PBS をそれぞれ投与した。Ad-E7-AS および Ad-LacZ は週 1 回腫瘍に直接注射し、CDDP は週 1 回腹腔内に投与した。腫瘍径から体積を概算し腫瘍体積の経時的変化を評価した。また摘出した腫瘍に免疫染色を行い、p53 蛋白と Rb 蛋白の発現を評価した。本研究において、アデノウィルスベクターの取り扱いが本学の遺伝子組換え実験実施規則を、実験動物の取扱いは本学の動物実験実施規則をそれぞれ遵守して行った。

【結果と考察】

(1) HPV 陽性細胞株に対する Ad-E6-AS・Ad-E7-AS の効果

HPV 陽性の UM-SCC47 細胞株に Ad-E6-AS と Ad-E7-AS それぞれ感染させ細胞数を計測したところ、濃度依存性に細胞増殖が抑制された。最少量の 10MOI の Ad-E7-AS でも control および Ad-LacZ よりも有意に抑制効果がみられた。この結果から以後の実験には Ad-E7-AS を用いることとした。一方、HPV 陰性の YCU-T891 細胞株においては、Ad-E6-AS、Ad-E7-AS ともに抑制効果が見られなかった。これらアデノウィルスベクターは HPV 陽性細胞に特異的に作用すると考えられた。

(2) UM-SCC47 における Ad-E7-AS と低用量 CDDP の併用による細胞増殖と E7 蛋白、Rb 蛋白、p53 蛋白の発現の評価

UM-SCC47 を Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用、CDDP 単独、Ad-LacZ、無処理の 5 つに分けそれぞれ投与したところ、投与 4 日目の腫瘍細胞数は Ad-E7-AS 単独・Ad-E7-AS と CDDP 併用が他 3 群に比し有意に減少した。しかし Ad-E7-AS 単独と Ad-E7-AS および CDDP 併用との抗腫瘍効果の差は有意ではなかった。細胞形態については、Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用で細胞質の

委縮・変形が高度でアポトーシス初期を思わせる核クロマチンの濃縮がみられた。免疫染色による各蛋白の発現については、Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用で Rb 蛋白・p53 蛋白の発現が強くみられた。ただし CDDP 単独でも Ad-LacZ や無処理に比し Rb 蛋白が濃染された。ウェスタンブロッティングでは Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用で E7 蛋白が抑制されていたが、CDDP 単独でも抑制されていた。同様に Rb 蛋白、p53 蛋白も Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用で発現が増加していた。

(3) アポトーシスの誘導

フローサイトメトリーでアポトーシスした細胞を定量化したところ、Ad-E7-AS 単独で 8.0%、Ad-E7-AS と CDDP 併用で 15.7%、Ad-LacZ で 1.4%、CDDP 単独で 2.6%、無投薬で 1.2% と、Ad-E7-AS と CDDP 併用例においてよりアポトーシスが誘導される傾向がみられた。

(4) in vivo での腫瘍増殖抑制効果

大腿基部に UM-SCC47 を播種させたヌードマウスを 20 匹用意し、Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用、CDDP 単独、Ad-LacZ、PBS 投与と 5 群 (各 4 匹) に分けた。各ウィルス ($1 \times 10^{10}\text{vp}$) と PBS は day0、7、14、21 に腫瘍内注射し、CDDP (2mg/kg) も同日に腹腔内投与した。CDDP 単独群、Ad-LacZ 群、PBS 群では経時的に腫瘍が増大したが、Ad-E7-AS 単独群においても腫瘍の増大が見られた。一方、Ad-E7-AS と CDDP 併用群では day14 以降は腫瘍増大が抑制された (M-W's U test $p < 0.05$)。

(5) 摘出腫瘍の免疫染色

マウスから摘出した標本を固定し免疫染色を行ったところ、Ad-E7-AS と CDDP 併用群において Rb 蛋白の発現が強くみられた。Ad-E7-AS 単独群と CDDP 単独群においてもわずかに Rb 蛋白の発現がみられ、Ad-LacZ 群と PBS 群にはみられなかった。一方、Ad-E7-AS 単独群と Ad-E7-AS と CDDP 併用群において p53 蛋白の発現がわずかにみられた。

アデノウィルスベクターは癌遺伝子治療において遺伝子導入の有用な方法である。本研究では UM-SCC47 において Ad-E6-AS よりも Ad-E7-AS の方が腫瘍増殖抑制効果があったが、同じく HPV 陽性子宮頸癌細胞株である CaSki では Ad-E6-AS も同様の腫瘍増殖抑制効果があった (論文未記載)。これらはウィルスの効果というよりは細胞株の性質自体の違いが考えられる。HPV 陽性子宮頸癌には E6・E7 遺伝子発現が多いためアンチセンス RNA を用いた治療の対象にしやすい、実際に E6 や E7 遺伝子に対する siRNA により腫瘍増殖が抑制されたとする多くの文献がある。UM-SCC47 において、E7 のアンチセンス RNA が含まれていない Ad-LacZ を感染

させたものよりも Ad-E7-AS を感染させたものの方が細胞増殖が抑制された。これはアデノウイルス感染そのものの影響ではないことを示している。また HPV 陰性細胞株である YCU-T891 では効果が認められなかった。

UM-SCC47 に対する Ad-E7-AS と CDDP の併用療法は、in vitro および in vivo いずれにおいても Ad-E7-AS 単独より腫瘍増殖抑制効果が認められた。E6 と E7 の mRNA は同じプロモーターから転写されており、E7 は E6 と同時に効率良く翻訳されている。そのため、E7 遺伝子に対するアンチセンス RNA により E6 および E7 の mRNA がともに阻害される。この結果、Ad-E7-AS が E7 蛋白だけでなく E6 蛋白の発現も阻害し Rb 蛋白とともに p53 蛋白の機能が回復し腫瘍増殖を抑制したと考えられる。子宮頸癌においては、CDDP と HPV E6 E7 の siRNA 併用療法の効果が in vitro および in vivo ですでに報告されており、E6/E7 蛋白合成が減少することで、p53 蛋白発現が増強され、CDDP の感受性が高まると考えられている。

アデノウイルスを介した HPV16 E6/E7 アンチセンス RNA 導入は HPV 関連頭頸部扁平上皮癌に対する化学療法増感剤としての可能性を秘めている。ほとんどの頭頸部扁平上皮癌は直接または内視鏡下での観察が容易であり、腫瘍に直接かつ反復投与可能である。

【結論】

HPV16 陽性頭頸部扁平上皮癌への Ad-E7-AS と低用量 CDDP の併用療法は、E7 蛋白だけでなく E6 蛋白の発現を抑制し、in vitro、in vivo いずれにおいても腫瘍細胞の増殖を抑制した。アデノウイルスを介した HPV16 E7 アンチセンス RNA の導入と CDDP の併用投与は HPV16 陽性頭頸部扁平上皮癌の治療として有望である。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2808 号	氏 名	小嶋 康隆
論 文 題 目 Title of Dissertation	Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA combined with cisplatin inhibits cellular growth and induces apoptosis in HPV-positive head and neck cancer cells アデノウィルスを紹介した HPV16 E6/E7 アンチセンス RNA 導入とシスプラチン併用療法は HPV16 陽性頭頸部癌細胞の腫瘍増殖を抑制しアポトーシスを誘導する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 佐々木 良平 Chief Examiner 副 査 古森 孝英 Vice-examiner 副 査 南 博信 Vice-examiner		

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

(要旨は1,000字～2,000字程度)

諸言

頭頸部扁平上皮癌の発症原因としてヒトパピローマウィルス (HPV) type16・type18 の関与が報告され HPV の E6 蛋白は p53 蛋白、E7 蛋白は Rb 蛋白をそれぞれ阻害し発がんに寄与する。頭頸部扁平上皮癌に対してアデノウィルスを用いた HPV 16 E6/E7 遺伝子のアンチセンス RNA 導入を報告した文献は過去にない。HPV 16 E7 遺伝子のアンチセンス RNA を組み込んだアデノウィルス (Ad-E7-AS) 単独投与または CDDP 併用による腫瘍増殖抑制、アポトーシス誘導を評価した。

対象と方法

(1) 細胞株

対象の腫瘍細胞として、HPV 陽性頭頸部扁平上皮癌細胞株である UM-SCC-47、HPV 陰性頭頸部扁平上皮癌細胞株である YCU-T891 を用いた。

(2) アデノウィルスベクターの作成

HPV16 の E6 遺伝子、E7 遺伝子に相補的な DNA 配列を作成した。E6 をターゲットとする配列 (5'プライマーは TACCACAGTTATGCACAGA、3'プライマーは TAATTGTCAAAAAGCCCACTG)、E7 をターゲットとする配列 (5'プライマーは GAAACCCAGCTGTAATCA、3'プライマーは TCTGTTCCCAGAAACCATAA) を PCR で増幅し、各々をアデノウィルス pAxCawtit2 に組み込んだ (Ad-E6-AS、Ad-E7-AS と命名)。

(3) 細胞株間におけるアデノウィルスの細胞毒性の評価

UM-SCC47、YCU-T891 の各細胞株に 10、30、50MOI の濃度で Ad-E6-AS と Ad-E7-AS を感染させ、感染後 2 日、4 日、6 日で alamar blue assay を用いて細胞数を計測した。

(4) UM-SCC47 へのアデノウィルスと CDDP 併用療法の増殖抑制の評価、細胞形態と免疫染色、Immunoblotting

UM-SCC47 を Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用、CDDP 単独、Ad-LacZ (アデノウィルスベクターのみの control)、無投薬の 5 つの投与方法別に分けた。ウィルスを 20MOI、CDDP を 1μM でそれぞれ投与し、4 日目まで細胞数を計測した。westernblotting を行い E7 蛋白、Rb 蛋白、p53 蛋白の発現を評価した。

(5) UM-SCC47 へのアデノウィルスと CDDP 併用療法のアポトーシスの評価

アポトーシス細胞をアネキシン V-FITC とヨウ化プロピジウムで多重染色し、フローサイトメトリーを用いてアポトーシスした細胞の割合を調べた。

(6) モデルヌードマウスを用いた毒性、腫瘍堆積の評価と摘出標本の免疫染色

UM-SCC47 1×10⁶個を週数 6 の BALB/c(nu/nu)の大腿皮下に播種させて 5 群に分け、Ad-E7-AS、Ad-E7 と CDDP、Ad-LacZ、CDDP 単独、PBS をそれぞれ投与した。各ウィルスは週 1 回腫瘍に直接注射し、CDDP は週 1 回腹腔内に投与した。また摘出した腫瘍に

免疫染色を行い、p53 蛋白と Rb 蛋白の発現を評価した。

結果

(1) HPV 陽性細胞株に対する Ad-E6-AS・Ad-E7-AS の効果

UM-SCC47 細胞株に Ad-E6-AS と Ad-E7-AS では、濃度依存性に細胞増殖が抑制された。HPV 陰性の YCU-T891 細胞株においては、Ad-E6-AS、Ad-E7-AS とともに抑制効果が見られなかった。アデノウィルスベクターは HPV 陽性細胞に特異的に作用すると考えた。

(2) UM-SCC47 における Ad-E7-AS と低用量 CDDP の併用による細胞増殖や E7 蛋白、Rb 蛋白、p53 蛋白の発現の評価

投与 4 日目の腫瘍細胞数は Ad-E7 単独・Ad-E7-AS と CDDP 併用が他 3 群に比し有意に減少した。Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用で細胞質の委縮・変形が高度でアポトーシス初期を思わせる核クロマチンの濃縮がみられた。免 Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用で Rb 蛋白・p53 蛋白の発現が強くみられた。

(3) アポトーシスの誘導

フローサイトメトリーでアポトーシスした細胞を定量化したところ、Ad-E7-AS 単独で 8.0%、Ad-E7-AS と CDDP 併用で 15.7%、Ad-LacZ で 1.4%、CDDP 単独で 2.6%、無投薬で 1.2%と、Ad-E7-AS と CDDP 併用例においてアポトーシス誘導が多い傾向にあった。

(4) in vivo での腫瘍増殖抑制効果

Ad-E7-AS 単独、Ad-E7-AS と CDDP 併用、CDDP 単独、Ad-LacZ、PBS 投与と 5 群 (各 4 匹) に分けた。各ウィルス (1×10^{10} vp) と PBS は day0、7、14、21 に腫瘍内注射し、CDDP (2mg/kg) も同日に腹腔内投与。Ad-LacZ 群と PBS 群で急激に腫瘍が増大したが、Ad-E7-AS 単独群においても腫瘍は増大した。Ad-E7-AS と CDDP 併用群で day14 以降は腫瘍増大が抑制された (M-W's U test $p < 0.05$)。

(5) 摘出腫瘍の免疫染色

Ad-E7-AS と CDDP 併用群において Rb 蛋白の発現が強くみられた。Ad-E7-AS 単独群と CDDP 単独群においてもわずかに発現がみられ、Ad-LacZ 群と PBS 群にはなかった。

考察

本研究では UM-SCC47 において Ad-E6-AS よりも Ad-E7-AS の方が腫瘍増殖抑制効果があり、同じく HPV 陽性細胞株である CaSki では Ad-E6-AS も同様の腫瘍増殖抑制効果があった。また HPV 陰性細胞株である YCU-T891 では効果が無かった。

UM-SCC47 に対する Ad-E7-AS と CDDP の併用療法については、in vitro・in vivo いずれにおいても Ad-E7-AS 単独より腫瘍増殖抑制効果があった。E6 と E7 の mRNA は同じプロモーターから転写されており、E7 は E6 と同時に効率良く翻訳されている。E7 遺伝子に対するアンチセンス RNA により E6・E7 の mRNA がともに阻害されるため、Ad-E7-AS が E7 蛋白だけでなく E6 蛋白の発現も阻害し Rb 蛋白とともに p53 蛋白の機能

が回復し腫瘍増殖を抑制したと考えられる。子宮頸癌を対象とした CDDP と HPV E6 E7 の siRNA 併用療法の効果については in vitro・in vivo いずれにおいてもすでに報告されており、E6/E7 蛋白が減じることで p53 蛋白発現が維持され、CDDP の感受性が高まるとされる。

アデノウィルスを介した HPV16 E6/E7 アンチセンス RNA 導入は HPV 関連頭頸部扁平上皮癌に対する化学療法増感剤としての可能性を秘めている。ほとんどの頭頸部扁平上皮癌は直接または内視鏡下での観察が容易であり、腫瘍に直接かつ反復投与可能である。

本研究は HPV16 陽性頭頸部扁平上皮癌への Ad-E7-AS と CDDP の併用投与は、E7 蛋白だけでなく E6 蛋白の発現を抑制し、in vitro・in vivo いずれにおいても腫瘍増殖を抑制した。HPV16 E7 アンチセンス RNA の導入と CDDP の併用投与は HPV16 陽性頭頸部扁平上皮癌の治療に有用と考えられ、価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。