

【要約】

Suberoylanilide hydroxamic acid enhances the oncolytic effect of Sindbis virus by promoting the expression of viral proteins

(Suberoylanilide hydroxamic acid はウイルス蛋白質発現を亢進させることによりシンドビスウイルスの腫瘍融解性を増強する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：白澤 浩教授)

馬 雪

緒言

腫瘍融解ウイルス療法は、がん治療に有望な戦略のひとつと考えられている。腫瘍融解ウイルスは、癌細胞で欠損または脆弱となっている phenotype により virus が優位に lytic infection を起こすところが腫瘍融解のメカニズムであると我々は考えている。

トガウイルス科アルファウイルスの Sindbis ウイルス(SINV)は、癌細胞特異的に融解する能力を持つ腫瘍融解ウイルス (Oncolytic virus, OV)である。実験室株は非病原性であると考えられている。SINV は、一本鎖+RNA をゲノムとするウイルスで、ゲノムの上流 2/3 に非構造タンパク (nsp) がコードされ、ポリプロテインの P1234 は、nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 に切断され、ウイルスの RNA polymerase を形成する。この RNA polymerase は、+RNA を鋳型として-RNA を合成し、-RNA に存在する subgenomic promoter より構造タンパク mRNA が RNA polymerase により転写され、最終的に構造タンパクが翻訳される。

SINV は宿主細胞の transcription、translation shutoff 機能により、抗ウイルスやストレス応答を制御していると考えられ、子宮頸がん、卵巣がん、口腔扁平上皮がん、神経芽細胞腫の細胞株に対して腫瘍融解性があると報告されている。

ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) は、ヒストンを脱アセチル化し、ヒストンと DNA の相互作用を強化することにより、遺伝子発現を抑制する。異常な HDAC 発現はいくつかのヒトの疾患に関連しており、HDAC 阻害剤は抗がん剤として使用できる可能性がある。また、HDAC 阻害剤は抗ウイルス応答に関与する遺伝子修飾因子である可能性もある。したがって、HDAC 阻害剤の中にはウイルスの腫瘍融解活性を増強する薬剤が存在する可能性がある。

SINV ウイルス療法の併用薬剤として HDAC 阻害剤の有効性を評価するために、SINV の RNA ポリメラーゼ nsP3 と緑色蛍光蛋白質 GFP との融合蛋白、および subgenomic promoter により構造蛋白と同時に青色蛍光蛋白質 BFP を発現する組換え体 GBFP-SINV を構築し、GFP によりウイルスの複製、BFP によりウイルスの増殖をモニターするウイルスを作成した。本研究では、pan-HDAC 阻害剤である SAHA の SINV ウイルス療法との併用薬剤としての可能性を検討した。

目的

SINV の腫瘍融解性の機構を明らかにし、pan-HDAC 阻害剤の Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)が SINV の腫瘍融解性に与える影響を検討することを目的とした。

方法

がん細胞として HeLa 細胞、正常細胞としてヒト正常細胞 TIG-1-20 細胞をモデル細胞として用いた。ウイルスの複製・増殖をモニターする組み換え体ウイルスである GBFP-SINV を構築し、GFP を SINV の複製マーカー、BFP を SINV の構造蛋白質発現マーカーとして、位相差顕微鏡および FACS により解析した。Survival assay、Caspase 3/7 assay により腫瘍融解性を定量し、抗ウイルス応答として、IFN- β mRNA の転写レベルを real-time qPCR により解析した。pan-HDAC inhibitor である SAHA (Vorinostat) を用いた。GBFP-SINV の細胞への感染は、100%の細胞が同時にウイルス感染を起こす条件 (MOI=25)で行った。

結果

SINV による細胞傷害性が見られない TIG-1-20 細胞においても GBFP-SINV の複製が観察されたことから、正常細胞におけるウイルスのゲノム複製は腫瘍融解性の要因とはならないことが明らかとなった。また、HeLa 細胞における感染後 12h~18h の構造蛋白質発現増強と caspase 3/7 活性上昇が、TIG-1-20 細胞と比較して顕著であった。FACS 解析により、SAHA は HeLa 細胞に感染した SINV の複製および構造蛋白質発現を増強し、腫瘍融解性を増強させていることが明らかとなった。さらに、SAHA および SINV は HeLa 細胞における IFN- β mRNA の転写レベルを非協調的に減少させることから、SAHA による SINV のウイルス蛋白質合成促進と腫瘍融解性の増強作用は、IFN 応答経路以外の経路への作用によるものと考えられた。

考察

本研究において、SINV の腫瘍融解性を解析し、また、pan-HDAC inhibitor である SAHA が SINV の腫瘍融解性を増強したことを明らかにした。

SINV の腫瘍融解性は、HeLa 細胞における構造タンパク質の優先的な発現に起因している可能性が示唆された。根本的なメカニズム

は不明であるが、ごく初期の感染段階で HeLa 細胞における SINV の構造タンパク質の発現が一時的に上昇するのは、*IFN-β* の転写が抑制されるか、*IFN-β* 発現の反応が遅れるためではないかと考えられた。今回、我々は、HeLa 細胞では感染初期に *IFN-β* の転写が抑制されることを発見した。しかし、正常細胞である TIG-1-20 細胞では、*IFN-β* の転写は逆に上昇していたことから、HeLa 細胞では *IFN-β* の応答経路が損なわれている可能性が示唆された。

SAHA は、NF- κ B の活性を阻害することが知られている。今回、HeLa 細胞では、SAHA により *IFN-β* mRNA の転写レベルが抑制されたが、TIG-1-20 細胞で抑制作用は認められなかった。SAHA による HeLa 細胞での *IFN-β* 発現抑制効果は NF- κ B に依存している可能性がある。NF- κ B は HeLa 細胞では、SINV による *IFN-β* の抑制を増強しなかったが、これは NF- κ B が SINV の nsP2 による *IFN-β* 転写抑制効果の上流にあるためと考えられる。また、SAHA による SINV の発現の増強は、*IFN-β* の抑制効果が見られない TIG-1-20 細胞でも観察されたことから、SAHA による *IFN-β* の抑制効果以外による効果によるものと考えられた。

本研究では、感染初期における *IFN-β* 誘導の抑制が SINV による腫瘍溶解性の重要な決定因子である可能性を示した。加えて、SAHA はウイルス複製と構造タンパク質の翻訳を促進することで SINV の腫瘍溶解性を高めることが示された。したがって、SAHA は SINV を用いた腫瘍溶解ウイルス療法を増強する併用療に用いることができると考えられた。

結論

pan-HDAC 阻害剤である SAHA は、Sindbis ウイルスの複製および構造蛋白増加を癌細胞特異的に増強し、SINV の腫瘍融解性を増強することが明らかとなった。