

令和元年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10862

研究課題名(和文) 悪性骨軟部腫瘍に対する放射線治療を併用したテロメライシン局所投与療法の開発

研究課題名(英文) Local adjuvant therapy on bone and soft tissue sarcoma by combination of telomerase-specific oncolytic adenovirus with radiotherapy

研究代表者

國定 俊之 (Kunisada, Toshiyuki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80346428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：テロメラーゼ活性依存性に癌細胞内で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルスを利用した治療は、単独で投与するよりも、放射線治療や化学療法と併用することで、より強力な抗腫瘍効果を認めた。さらに、相乗効果も確認でき、肉腫に対する新規療法となる可能性が示された。そこで、これらのウイルス治療を利用した実際の臨床応用では、単独投与ではなく、放射線治療との併用療法を考えていく。

臨床応用へ向けた基礎研究は、ほぼ予定どおり行うことができた。肉腫患者へのウイルス治療の臨床試験が食道癌ですでに開始されており、今後は肉腫で早期臨床応用を開始できるように、プロトコルを作成していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テロメラーゼ活性依存性に癌細胞内で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルスは当大学で開発され、食道癌ですでに臨床試験が開始されている。今年度までに行った基礎研究から、これらのウイルス治療は単独で投与するよりも、放射線治療や化学療法と併用することで、より強力な抗腫瘍効果を認めた。さらに、相乗効果も確認でき、肉腫に対する新規療法となりうる。そこで、これらのウイルス治療を利用した実際の臨床応用では、単独投与ではなく、放射線治療との併用療法を行うことで、肉腫を安全に切除することが可能となる。また、正常組織を安全に温存できれば、術後の機能が改善され、患者のQOL向上につながる。

研究成果の概要(英文)：Our study demonstrated that OBP-702 has much stronger anti-tumor effect compared to OBP-301, and sensitizes radiotherapy to various types of osteosarcoma cell lines. We recently identified that OBP-702 induces profound apoptosis through p53-dependent BAX upregulation and E1A-dependent p21 and MDM2 downregulation in epithelial malignant cells. This study revealed further molecular mechanisms of synergistic antitumor effect of OBP-702 with radiation; p53-dependent apoptosis, downregulation of the anti-apoptotic BCL-2 family proteins and interruption of the cellular DNA repair mechanism. Currently, a Phase I/II clinical study of OBP-301 in combination with radiation against esophageal cancer patients is underway in Japan, and preclinically OBP-702 provides more profound therapeutic potentials than OBP-301 in various tumors. Thus, OBP-702 would provide a novel treatment strategy for STS and wide application of radiotherapy for localized as well as advanced musculoskeletal sarcoma.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨軟部腫瘍 肉腫 悪性腫瘍 ウイルス治療

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍の術後機能を向上させるため、新規治療法の開発が望まれている。悪性骨軟部腫瘍の標準治療は、腫瘍周囲に存在する正常な筋肉、骨、神経、血管を合併切除する広範切除術である。腫瘍周囲の正常な組織を合併切除しなければ高率に再発し、さらに遠隔転移を生じる可能性も高くなるため、生命の危険性が生じる。しかし、正常組織を広範囲に切除すれば再発の危険性は低下するが、切除した正常組織によっては重大な機能障害が生じることになる。正常な骨、筋肉、神経を合併切除すると、大きな機能障害が出現し、患者の QOL を低下させる。腫瘍サイズを縮小させたり、腫瘍細胞の活性を低下させることができれば、周囲の正常組織の切除量を縮小できる可能性があり、術後機能を温存できることにつながる。

そこで、他のがんの治療に用いられているテロメライシンを悪性骨軟部腫瘍の補助治療として臨床応用することに着目した。テロメライシンが有効な治療となれば、悪性骨軟部腫瘍周囲に存在する正常組織の切除を最小限にすることができ、安全な縮小切除術が可能となることが考えられる。さらに、術後の機能障害を最小限にすることが可能となれば、筋骨格の機能を維持した新たな治療法が開発できる。

2. 研究の目的

テロメライシンはヒトアデノウイルス 5 型を基本骨格とし、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞内で増殖し、細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルス (Oncolytic Virus) である。これまでに研究で、テロメライシンが悪性骨軟部腫瘍に対して強力な抗腫瘍活性を有することを明らかにしてきた。テロメライシンは他のがんの治療に用いられており、悪性骨軟部腫瘍の補助治療として臨床応用できれば、正常組織の切除を最小限にすることができ、安全な縮小切除術が可能となる。術後の機能障害を防ぎ、筋骨格の機能を維持した新たな治療法が開発できる。

本研究では、悪性骨軟部腫瘍におけるテロメライシンの臨床応用に向けた基礎的な研究を行うとともに、臨床応用に向けたプロトコル作成と実際の臨床応用を目指す。in vivo, in vitro でのテロメライシンと放射線療法の併用効果の基礎研究と、第 2 相臨床試験へ向けたプロトコル作成を行う。

当院では、食道癌患者に対するテロメライシンの臨床試験が開始されている。悪性骨軟部腫瘍でも、同様に臨床応用を目標とする。患者選択としては、脊椎・骨盤部発生やサイズが巨大な切除不能症例、重要な血管や神経を合併切除する必要があり、切除することで術後に重大な機能障害が予想される症例、再発・転移症例を考えている。テロメライシン治療により、腫瘍死を引き起こすことができれば、標準治療では切除する必要がある重要な血管や神経を温存することが可能となり、安全な縮小手術が可能となる。血管や神経などの重要な組織が温存可能となれば、骨・筋肉の術後機能障害が回避でき、QOL 向上を達成できる。さらに、放射線治療併用により、抗腫瘍効果の増強を期待できる。

3. 研究の方法

上皮系がん細胞での研究から、テロメライシン単独よりも放射線治療と併用した方が、より強い抗腫瘍効果を認めることが証明されている。そこで、悪性骨軟部腫瘍に対する放射線治療の増強効果について、種々の細胞株を用いて検討する。テロメライシン処理を行った骨軟部肉腫細胞株に放射線照射を行い、抗腫瘍効果の増強の有無を確認し、最適な線量や回数について検討した。軟部肉腫に対して、OBP-301 に p53 がん抑制遺伝子の誘導能を導入し、更に抗腫瘍効果を高めた OBP-702 と放射線治療との併用効果に関して検討した。3 種類の軟部肉腫細胞株 HT1080 (線維肉腫)、NMS-2 (悪性末梢神経鞘腫瘍)、SYO-1 (滑膜肉腫) を用いて研究を行った。OBP-702 単独、放射線治療単独、OBP-702 +放射線治療併用に分けて処理し、XTT assay を用いて無治療群と比較検討した。相乗効果に関しては薬物併用効果分析ツールである CalcuSyn software (BioSoft) を用いて combination index を算出し評価した。また、in vivo において HT1080 をヌードマウスの背部皮下に移植し、PBS 群、OBP-702 投与単独群、放射線治療単独群、OBP-702+放射線治療併用群の 4 群に分けて治療を行い、抗腫瘍効果を比較検討した。

OBP-702 を用い、2 種類の骨肉腫細胞株 (U2OS、MNG/HOS) を Doxorubicin (DOX) で持続処理して樹立した DOX 耐性骨肉腫細胞が薬剤排出ポンプ multidrug resistance protein 1 (MDR1) を高発現していることを確認し、DOX 耐性骨肉腫細胞に対する DOX と OBP-702 の併用効果と MDR1 を介した薬剤耐性克服機序を検討した。in vitro において、XTT assay により親株細胞および DOX 耐性細胞に対する抗腫瘍効果を比較し、CalcuSyn software を用いて combination index を算出することにより併用効果を検討した。また、併用治療によるアポトーシス増強効果と薬剤耐性克服機序を検討するために、Western blot で Cleaved PARP と MDR1 の発現を確認した。さらに、MDR1 の抑制が DOX の抗腫瘍効果に与える影響を検討するために siMDR1 と DOX の併用による Cleaved PARP 発現の変化を確認した。in vivo では、DOX 耐性 MNG/HOS 細胞マウス皮下腫瘍移植モデルを作成し、DOX と OBP-702 の併用効果を検討した。

4. 研究成果

軟部肉腫に対して OBP-301 (テロメライシン) の有用性を報告しており、加えてその化学療法や放射線治療の併用による相乗効果も確認してきた。軟部肉腫に対して、OBP-301 に p53 がん抑制遺伝子の誘導能を導入し、更に抗腫瘍効果を高めた OBP-702 と放射線治療との併用効果に関する研究を行った。

in vitro では、すべての細胞株で放射線治療併用群が OBP-702 単独群よりも抗腫瘍効果が有意に高く、併用による相乗効果も示された。また、western blot では併用により p53 の発現増強、アポトーシス抑制遺伝子 MCL-1 の発現低下や二本鎖 DNA 損傷マーカーである H2AX の発現遷延を認め、OBP-702 は放射線治療誘導性アポトーシスを増強すると考えられた。In vivo においても単独群と比較して、併用群において有意に腫瘍増殖抑制を認め、組織免疫染色でも TUNEL 染色陽性細胞数の増加を認めた。OBP-702 は OBP-301 と比較し強力な抗腫瘍効果を有し、かつ放射線療法との相乗効果を示すことから、軟部肉腫に対する新規療法となる可能性が示された。

化学療法の併用効果については、in vitro で OBP-702 はいずれの DOX 耐性骨肉腫細胞に対しても相乗的な抗腫瘍効果を示した。Western blot では DOX に OBP-702 を併用することにより Cleaved PARP 発現の増強と MDR1 発現の抑制を認めた。また、DOX に siMDR1 処理を併用することにより Cleaved PARP の発現増強を認めた。マウス皮下腫瘍移植モデルにおいて、併用治療群は PBS 治療群と比較して有意に腫瘍増殖を抑制し、DOX および OBP-702 の単独治療群と比較して腫瘍増殖を抑制する傾向を認めた。これらの結果から、OBP-702 は DOX 耐性骨肉腫細胞に対して MDR1 の発現を抑制し、DOX の抗腫瘍効果を増強した。DOX と OBP-702 の併用治療は化学療法抵抗性の骨肉腫に対する有用な治療戦略となり得る。

また、テロメライシンと抗 PDL-1 抗体を使用した免疫療法との併用療法に関する基礎研究も開始しており、preliminary ではあるが有効な結果が得られている。

OBP-301 や OBP-702 などのウイルス治療は単独で投与するよりも、放射線治療や化学療法と併用することで、強力な抗腫瘍効果を認めている。今後行う予定であるテロメライシン臨床応用でも、単独投与ではなく、放射線治療との併用療法を考えて、プロトコールを作成している。

臨床応用へ向けた基礎研究は、ほぼ予定どおり行うことができた。テロメライシンの肉腫患者への臨床応用については、PMDA との相談も行ってきたが、今年度までに当院で開始することができなかった。食道癌での臨床応用はすでに開始されており、肉腫での早期臨床応用に今後とも努力していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamakawa Y, Tazawa H, Hasei J, Osaki S, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Uotani K, Fujiwara T, Yoshida A, Kunisada T, Urata Y, Kagawa S, Ozaki T, Fujiwara T. Role of zoledronic acid in oncolytic virotherapy: Promotion of antitumor effect and prevention of bone destruction. *Cancer Sci.* 2017 Sep;108(9):1870-1880. doi: 10.1111/cas.13316. 査読あり

Osaki S, Tazawa H, Hasei J, Yamakawa Y, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Fujiwara T, Sasaki T, Kunisada T, Yoshida A, Urata Y, Kagawa S, Ozaki T, Fujiwara T. Ablation of MCL1 expression by virally induced microRNA-29 reverses chemoresistance in human osteosarcomas. *Sci Rep.* 2016 Jun 30;6:28953. doi: 10.1038/srep28953. 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

Tadashi Komatsubara, Hiroshi Tazawa, Kouji Demiya, Yusuke Mochizuki, Kazuhisa Sugiu, Toshinori Omori, Yasuaki Yamakawa, Syuhei Osaki, Joe Hasei, Tomohiro Fujiwara, Eiji Nakata, Toshiyuki Kunisada, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara, Toshifumi Ozaki, Molecular radiosensitizing effect of p53-armed telomerase-specific oncolytic adenovirus in soft tissue sarcoma, Orthopaedic Research Society, 2019

Yusuke Mochizuki, Hiroshi Tazawa, Miho Kure, Koji Demiya, Joe Hasei, Toshiyuki Kunisada, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara, Toshifumi Ozaki, Combination of PD-1 blockade Immunotherapy and Telomerase-Specific Oncolytic Virotherapy in Osteosarcoma, Orthopaedic Research Society, 2019

Koji Demiya, Joe Hasei, Suguru Yokoo, Yusuke Mochizuki, Masahiro Kiyono, Tadashi Komatsubara, Takuya Morita, Aki Yoshida, Eiji Nakata, Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki, Programmed Cell Death Ligand 1 Expression and Clinical Prognosis in Human Osteosarcoma, Orthopaedic Research Society, 2019

Koji Demiya, Hiroshi Tazawa, Miho Kure, Yusuke Mochizuki, Joe Hasei, Toshiyuki Kunisada, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara, Toshifumi Ozaki, p53-armed oncolytic virotherapy promotes immunogenic cell death in human osteosarcoma, Orthopaedic Research Society, 2019

小松原将、出宮光二、田澤大、望月雄介、長谷井嬢、中田英二、国定 俊之、浦田泰生、藤原俊義、尾崎敏文、軟部肉腫に対する p53 発現腫瘍融解アデノウイルスによるアポトーシス抑制遺伝子発現の制御を介した放射線感受性増感作用の検討、日本整形外科学会基礎学術集会、2018 年

出宮光二、田澤大、望月雄介、小松原将、長谷井嬢、中田英二、国定 俊之、浦田泰生、藤原俊義、尾崎敏文、骨肉腫に対する p53 誘導性腫瘍融解ウイルス療法による免疫原性細胞死の誘導効果、日本整形外科学会基礎学術集会、2018 年

望月雄介、田澤大、出宮光二、小松原将、長谷井嬢、中田英二、国定 俊之、浦田泰生、藤原俊義、尾崎敏文、骨肉腫に対する抗 PD-1 抗体の効果増強を目指した腫瘍融解アデノウイルスを用いた複合免疫療法、日本整形外科学会基礎学術集会、2018 年

小松原将、望月雄介、杉生和久、大森敏規、長谷井嬢、吉田晶、藤原智洋、国定俊之、浦田泰生、田澤大、藤原俊義、尾崎敏文、p53 発現腫瘍融解アデノウイルスによる軟部肉腫に対する放射線治療併用効果の検討、日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年

杉生和久、田澤大、望月雄介、小松原将、大森敏規、山川泰明、吉田晶、長谷井嬢、藤原智洋、国定俊之、浦田泰生、藤原俊義、尾崎敏文、ドキシソルピシン耐性骨肉腫細胞に対する p53 発現腫瘍融解アデノウイルスによる MDR1 発現抑制を介した薬剤耐性克服機序の検討、日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年

大森敏規、山川泰明、長谷井嬢、田澤大、尾崎修平、杉生和久、藤原智洋、国定俊之、浦田泰生、藤原俊義、尾崎敏文、放射線抵抗性を示す骨・軟部肉腫におけるに対する腫瘍融解アデノウイルスの放射線増感作用、日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年

Tadashi Komatsubara, Toshinori Omori, Hiroshi Tazawa, Kazuhisa Sugi, Yusuke Mochizuki, Yasuaki Yamakawa, Syuhei Osaki, Joe Hasei, Kouji Uotani, Tomohiro Fujiwara, Toshiyuki Kunisada, Yasuo Urata, Toshifumi Ozaki, Toshiyoshi Fujiwara, Radiosensitization of telomerase-targeted oncolytic adenovirus against human soft-tissue sarcoma, 日本癌学会学術集会、2016 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：尾崎 敏文

ローマ字氏名：(OZAKI, Toshifumi)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40294459

研究分担者氏名：藤原 智洋

ローマ字氏名：(FUJIWARA, Tomohiro)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：80639211

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。