

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22814

研究課題名(和文) 骨軟部肉腫の免疫療法抵抗性を打破する腫瘍融解アデノウイルスの可能性

研究課題名(英文) Tumor-Specific Oncolytic Adenovirus Breaks Through Immunotherapy Resistance in Bone and Soft Tissue Sarcomas

研究代表者

久禮 美穂 (KURE, MIHO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・非常勤研究員

研究者番号：30884647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部肉腫において化学療法抵抗例や遠隔転移例は予後不良であり、新規の治療法として免疫療法が注目されている。しかし、骨肉腫は免疫療法に反応が乏しく、いかに免疫応答効果を増強するかが検討されている。我々が開発した腫瘍融解アデノウイルスOBP-702を用い、OBP-702と抗PD-1抗体との併用療法の治療効果を検討した。まずは骨肉腫細胞株にOBP-702を感染させるとPD-L1、PD-L2の発現が増加し、免疫療法に有利な環境を形成していた。続いて、高肺転移株を作成し、サイトカインを調べた結果、OBP-702により転移が抑制される可能性を認めた。今後、マウスによる治療実験を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は骨軟部腫瘍に関し、OBP-702の免疫原性細胞死誘導による免疫チェックポイント阻害剤の有効性増幅効果について検討するものであり、遠隔転移難治例に対する有効な治療法としての発展が期待される。本研究は、骨軟部肉腫において免疫療法の効果が乏しい現状を打破できる可能性のあるものであり、その他の免疫治療との併用への発展性をも秘めている。OBP-702は我々が開発したものであり、本研究開発は我々にしか行えず、臨床的に有意義な研究である。

研究成果の概要(英文)：Cases of bone and soft tissue sarcoma that are refractory to chemotherapy or have distant metastases have a poor prognosis. Immunotherapy is attracting attention as a new treatment option, but osteosarcoma is not responsive to immunotherapy. How to enhance the effect of immune response is under investigation. Using our tumor-specific replication-competent oncolytic adenovirus OBP-702, we investigated the therapeutic effect of combination therapy with OBP-702 and anti-PD-1 antibody. First, infection of osteosarcoma cell lines with OBP-702 increased PD-L1 and PD-L2 expression, indicating that OBP-702 formed a favorable environment for immunotherapy. A high lung metastasis strain was then created. Cytokines were examined, and the possibility that metastasis could be suppressed by OBP-702 was observed. We are planning to conduct therapeutic experiments using mice.

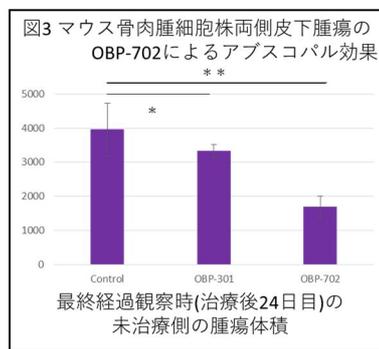
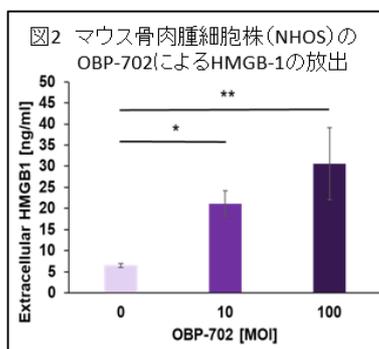
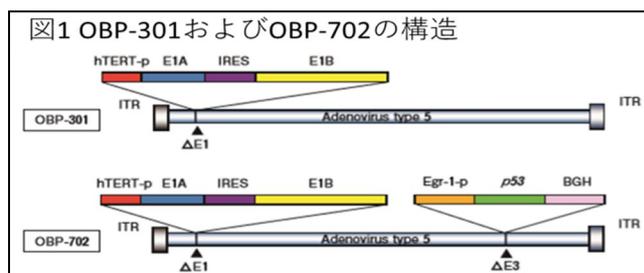
研究分野：整形外科

キーワード：腫瘍融解アデノウイルス 抗PD-1抗体 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

化学療法抵抗性や遠隔転移を有する骨軟部肉腫症例は依然として予後不良であり、新規治療法の開発が急務となっている。

近年腫瘍免疫療法の研究が進み、骨軟部肉腫の新規治療としても期待されているが、骨軟部肉腫に対して抗 PD-1 抗体を使用した臨床試験では、Progressive disease が 70%以上、骨肉腫の Partial response はわずか 5%であり (Tawbi HA. 2017) 骨軟部肉腫に対して免疫療法が有効な治療となるためには腫瘍免疫を増幅するための補助療法の開発が重要である。腫瘍融解ウイルス製剤は直接的に腫瘍細胞を死滅させる遺伝子治療であるが、がん免疫に及ぼす影響に関して報告がされてきている (Kaufman HL. 2015)。我々は腫瘍内特異的に活性の高いヒトテロメラーゼ逆転写酵素のプロモーターにより増殖が制御される腫瘍選択的融解アデノウイルス製剤 (OBP-301) を開発した (Kawashima T. 2004) (図 1)。骨軟部肉腫において、我々の研究で、OBP-301 抵抗性細胞株の存在が明らかとなったが、OBP-301 の E3 領域にがん抑制遺伝子である p53 発現カセットを挿入した OBP-702 を開発し (図 1)、OBP-301 抵抗性骨肉腫細胞株に対し非常に高い抗腫瘍効果を発揮する事を明らかにした (Hasei J. 2013)。また、マウス骨肉腫細胞株に対し OBP-702 が免疫原性細胞死を誘導することを、DAMPs (ATP, HMGB-1) を測定することで明らかにした (図 2)。さらに、マウスの両側背部皮下腫瘍を作成し、片側を OBP-702 で治療することで対側の腫瘍縮小を確認した (アブスコパル効果: 複数のがん病巣のうち一つを治療すると治療していない領域のがんも縮小する効果 (Postow MA. 2012)) (図 3)。これにより、免疫原性細胞死の誘導により局所療法とされてきたウイルス療法が遠隔転移に対しても有効である可能性が示された。



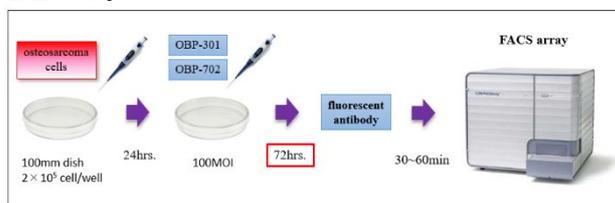
2. 研究の目的

本研究は化学療法抵抗性や遠隔転移を有する症例に対する有効治療を模索するものであり、我々が開発した p53 搭載型腫瘍融解アデノウイルス(OBP-702)と抗 PD-1 抗体を用いた免疫療法の併用治療の有効性を検討することが目的である。OBP-702 が免疫原性細胞死に影響を与え、抗 PD-1 抗体を用いた免疫療法の効果を増幅することができるか、またそのメカニズムはどのようなものであるかを明らかにし、さらには遠隔転移難治例に対する有効性を検討する。

3. 研究の方法

マウス骨肉腫細胞株を用いて実験を行うこととする。

- (1) マウス骨肉腫細胞株である K7M2 および NHOS を用いて、OBP-702 によるウイルス治療を行い、抗 PD-1 抗体治療に与関する表面マーカーである PD-L1 および PD-L2 の変化を FACS を用いて評価する (図 4)。また、DAMPs の一つである Calreticulin の発現の変化も確認する。



- (2) 肺転移に対する併用療法の効果を検証するため、高肺転移マウス細胞株の樹立を試みた。マウス骨肉腫細胞株である NHOS を用いて脛骨に同所性移植腫瘍モデルを作成し、そこから肺に転移した細胞を培養し、その細胞を用いてさらに同所性移植腫瘍モデルを作成する。以上の手順を繰り返し、高確率で肺転移を起こす細胞株を樹立する。
- (3) 樹立した細胞株と親株との変化を検証する。migration assay や invasion assay を用いて、細胞株の遊走能や浸潤能の変化を評価する。また cytokine assay を用いて細胞株の転移能に関する変化を評価する。

(4) 転移を有するマウス同所性移植腫瘍モデルを作成し、OBP-702 と抗 PD-1 抗体の併用治療の効果を検討する。

4. 研究成果

(1) K7M2 および NHOS を OBP-702 で治療した結果、両細胞株ともに PD-L1, PD-L2 の発現が優位に増加した(図5)。また、Calreticulin の発現も優位に増加した(図5)。骨肉腫細胞株に OBP-702 を感染させることで immunogenic cell death を誘導し、calreticulin の発現が増加したと考える。そして、PD-L1, PD-L2 の発現が増加し、免疫寛容の変化を誘導し、免疫療法に有利な環境への変化を生じている。この結果より、OBP-702 には直接的な抗腫瘍効果のみならず免疫療法との相乗効果をもたらす可能性が期待される。

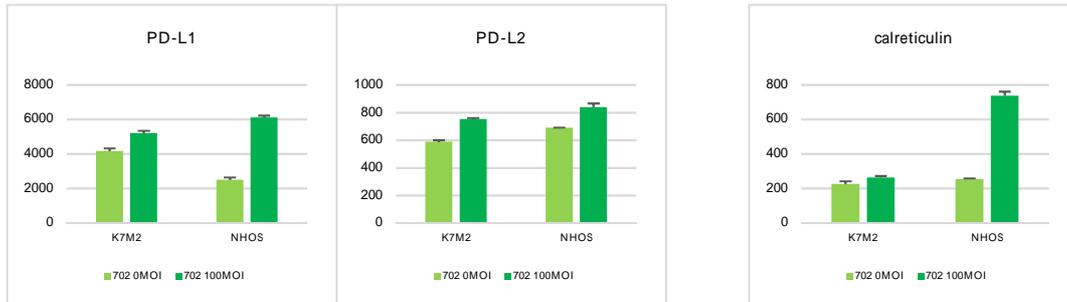
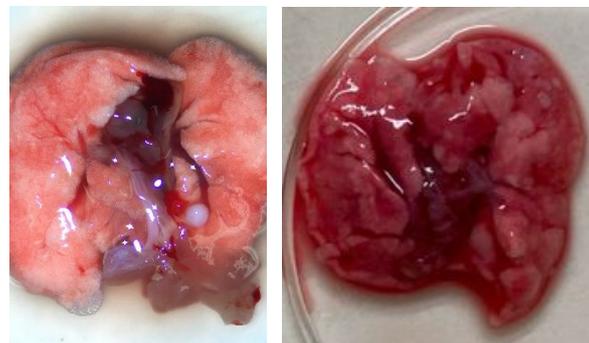


図5 OBP-702 感染による PD-L1, PD-L2, calreticulin の発現の変化

(2) 高肺転移株の作成を試みた。初めにマウスの両側脛骨に NHOS 細胞を注入し、同所性移植腫瘍モデルを作成した。6 週後に sacrifice し、唯一確認できた肉眼的転移性肺腫瘍をシャーレの上で培養した。3 度継代し、細胞数がある程度増えたところで再度同所性移植腫瘍モデルを作成し、残りの細胞は保存した。同様の操作を繰り返して、3 度目からは治療実験に合わせて 4 週で sacrifice を行った。以上の操作を 4 度繰り返した細胞株で、片側の同所性移植腫瘍モデルを作成し、顕微鏡的転移性腫瘍を含めると 8 割以上の確率で肺転移を起こすことを確認した。



NHOS

NHOSLM4

図6 NHOS, NHOSLM4 の肉眼的所見

(3) 作成した細胞株(NHOSLM4)と親株(NHOS)の性質の違いについて検討した。増殖スピードに関しては NHOSLM4 がやや速い傾向にあったが、有意差はなかった。migration assay と invasion assay ではどちらも NHOSLM4 株で優位に migration および invasion が亢進していた。また、OBP-702 を共培養することで優位に migration と invasion が抑制された。cytokine assay では転移能や浸潤能に関与する cytokine が増加したり、また転移を抑制する因子が減少していた。また、各々のサイトカインを ELISA kit を用いて測定した結果、転移能や浸潤能に関与するサイトカインは OBP-702 の感染させることにより抑制されていた。以上のことより、作成した細胞株は親株と比較し転移能が上昇しており、また OBP-702 には転移を抑制する作用を有していることが期待される。

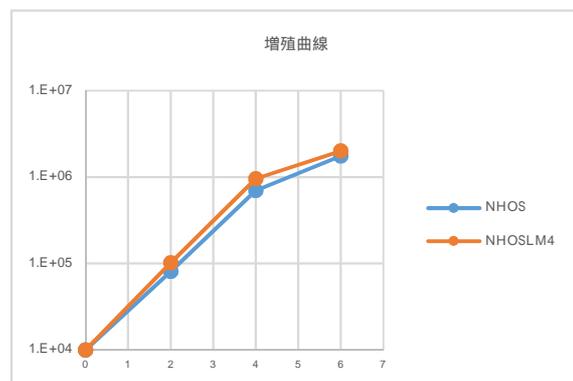


図7 NHOS, NHOSLM4 の増殖曲線

(4) 治療実験を行うにあたり最適な条件を検討するため、移植する細胞数を変更し、腫瘍サイズを計測しつつ、数度予備実験を繰り返した。治療実験を検討しているが、Covid-19 の影響で治療に必要な材料が手に入らず、まだ治療実験は開始できていない。今後、準備が整い次第治療実験を行う予定である。そして、得られた検体から治療効果に関与する因子について検討し、転移や免疫療法に関するメカニズムについて新しい知見が得られるようにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mochizuki Yusuke, Tazawa Hiroshi, Demiya Koji, Kure Miho, Kondo Hiroya, Komatsubara Tadashi, Sugiu Kazuhisa, Hasei Joe, Yoshida Aki, Kunisada Toshiyuki, Urata Yasuo, Kagawa Shunsuke, Ozaki Toshifumi, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Telomerase-specific oncolytic immunotherapy for promoting efficacy of PD-1 blockade in osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 1405 ~ 1417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02774-7	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroya Kondo, Eiji Nakata, Shota Takihira, Miho Kure, Ryoji Joko, Joe Hasei, Tomohiro Fujiwara, Aki Yoshida, Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki
2. 発表標題 Caosular repair with a polypropylene mesh in prosthetic reconstruction following resection of bone sarcoma arising from the proximal femur : a case series
3. 学会等名 APMSTS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Demiya, Hiroshi Tazawa, Hiroya Kondo, Miho Kure, Joe Hasei, Toshiyuki Kunisada, Toshiyoshi Fujiwara, Toshifumi Ozaki
2. 発表標題 Immunovirotherapy with telomerase-specific oncolytic adenovirus for osteosarcoma
3. 学会等名 APMSTS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------