

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591920

研究課題名（和文）：骨軟部肉腫に対する新規遺伝子治療法—腫瘍内ウイルス拡散をターゲットとして

研究課題名（英文）：Novel Strategy of Gene Therapy for Musculoskeletal Sarcoma—Targeting Intratumoral Spread of Viral Vectors.

研究代表者：永野 聡 (NAGANO SATOSHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50373139

研究成果の概要（和文）：

癌特異性の高い Survivin プロモーターに依存して増殖するアデノウイルスベクターを、Osteocalcin プロモーターを用いて骨腫瘍をターゲットとして改良した。このベクターは骨肉腫への治療効果を維持しながら、正常組織への副作用軽減を可能とした。細胞外マトリックスを制御する Matrix Metalloproteinase (MMP) の癌細胞浸潤・転移における役割を明らかにした。骨肉腫におけるヘッジホッグ経路の解析を行い、将来的な骨肉腫の遺伝子治療のターゲットとなることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We generated a novel survivin-responsive Surv.m-CRA-OCp, which is regulated by the survivin promoter and cancer/tissue-specific osteocalcin promoter, and demonstrated reduced toxicity to normal tissues, while maintaining its anticancer effects. Significant contribution of matrix-metalloproteinase-14 on vascular invasion and metastasis of breast cancer is shown. We analyzed hedgehog pathway in osteosarcoma and showed that inhibition of GLI2 may represent an effective therapeutic approach for patients with osteosarcoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・7305

キーワード：癌、遺伝子治療、ウイルスベクター、骨軟部腫瘍

1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍は化学療法の進歩により生存率が改善しているが、依然難治性の疾患である。

なかでも骨肉腫患者の死因の多くは肺転移であり、肺転移症例では外科的切除などの治療を行っても再発率が高く、予後不良である

ため、新しい治療法の開発が急務である。我々は以前、固形腫瘍内ではウイルスベクター液の拡散が注入部の周囲に限定されてしまい、腫瘍全体にベクターが行きわたらないという問題を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外マトリックスが豊富、または細胞密度が高く、遺伝子治療の効果が得にくいと考えられる骨軟部悪性腫瘍に対して、アポトーシス誘導型の前治療または細胞外マトリックスを分解する前治療と組み合わせることにより、増殖制御型ウイルスの腫瘍内拡散を向上させることができるかを明らかにする。

また、新たな遺伝子治療のターゲットとなる、骨軟部肉腫に特異的な分子の探索と機能解析を行う。

3. 研究の方法

細胞外マトリックスが豊富な環境（肉腫、またはそれを模倣する *in vitro* モデル）でのより効果の高いウイルスベクターの開発、効果の検証を行う。

遺伝子治療のターゲット分子の探索として、ヘッジホッグ経路に着目し、GLI2 や Smo などの遺伝子の骨肉腫患者検体、細胞株における発現を観察、および遺伝子発現の制御による治療の可能性を検討した。

4. 研究成果

骨軟部肉腫をターゲットした、副作用の軽減と治療効果の増強を可能とする新しい Oncolytic Virus (OV) を開発し論文発表した。非常に癌特異性の高い分子である Survivin のプロモーターを E1A、骨芽細胞系の細胞をターゲットする osteocalcin プロモーターを E1B プロモーター部位に挿入し、Survivin と osteocalcin プロモーターのダブルの制御を可能とした新しい増殖制御型アデノウイルス CRA. Surv-OC を作成した。Survivin プロモーターに非特異的な CMV プロモーターを組み合わせた CRA. Surv-CMV と比較して、CRA. Surv-OC は、OC プロモーター活性が非常に低いにも関わらず、同等の治療効果を維持しながら、骨芽細胞を含む複数の正常細胞に対して、CRA. Surv-OC は CRA. Surv-CMV と比較して低い細胞毒性を示した（論文 1）。

また、細胞外マトリックスを制御する Matrix Metalloproteinase (MMP) の癌細胞における役割を検討し発表した。MT1-MMP が乳癌細胞の血管浸潤と転移を促進することが明らかとなり、細胞外マトリックスをターゲットとする新しい治療につながると考えられる（論文 2）。

遺伝子治療のターゲットとしての骨肉腫細

胞内シグナルの研究をいくつか行った。前初期遺伝子群に属する転写調節因子である early growth response-1 (EGR-1) 遺伝子が、正常細胞に比べて骨肉腫細胞での発現が低いことを見出した。骨肉腫細胞に抗癌剤を添加すると、EGR-1 の発現が亢進した。骨肉腫細胞に EGR-1 を強発現した細胞は、*in vitro* での浸潤能が低下しており、動物モデルにおいては、原発巣からの血管内への浸潤が抑制されていた。EGR-1 は、骨肉腫の転移・浸潤を抑制する新たな治療遺伝子として期待できる（論文 3）。

ヘッジホッグは胎生期において重要な分子で中枢神経系・肺・胃腸系、骨・軟骨などの形態形成に関与していることが知られている。一方でヘッジホッグの異常活性化が B cell lymphoma、基底細胞癌、髄芽腫、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、消化器癌、横紋筋肉腫などの多くの悪性腫瘍に関連していることも報告されている。我々は骨肉腫細胞でヘッジホッグ経路が細胞増殖に促進的に働いており、GLI2 を knockdown すると細胞死を誘導し、マウス骨肉腫モデルでも腫瘍増殖を優位に抑制した。遺伝子治療において GLI2 が有用なターゲットとなると考えられた（論文 4）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 17 件）

1. Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses: implications for the generation of ideal m-CRAs.

Horikawa Y, Wang Y, Nagano S, Kamizono J, Ikeda M, Komiya S, Kosai KI.

Cancer Gene Ther. 2011 Oct;18(10):724-33. doi: 10.1038/cgt.2011.44. 査読有

2. Cancer cell-associated MT1-MMP promotes blood vessel invasion and distant metastasis in triple-negative mammary tumors.

Perentes JY, Kirkpatrick ND, Nagano S, Smith EY, Shaver CM, Sgroi D, Garkavtsev I, Munn LL, Jain RK, Boucher Y.

Cancer Res. 2011 Jul 1;71(13):4527-38. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/13/4527.long>. 査読有

3. Suppression of osteosarcoma cell invasion by chemotherapy is mediated by urokinase plasminogen activator activity

via up-regulation of EGR1.

Matsunoshita Y, Ijiri K, Ishidou Y, Nagano S, Yamamoto T, Nagao H, Komiya S, Setoguchi T.

PLoS One. 2011 Jan 20;6(1):e16234.

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016234>. 査読有

4. Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma.

Nagao H, Ijiri K, Hirotsu M, Ishidou Y, Yamamoto T, Nagano S, Takizawa T, Nakashima K, Komiya S, Setoguchi T.

J Pathol. 2011 Jun;224(2):169-79.

doi: 10.1002/path.2880. 査読有

5. Pharmacological inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth.

Kawabata N, Ijiri K, Ishidou Y, Yamamoto T, Nagao H, Nagano S, Maeda S, Komiya S, Setoguchi T.

Int J Oncol. 2011 Oct;39(4):899-906.

doi: 10.3892/ijo.2011.1076. 査読有

6. Role of GOLPH3 and GOLPH3L in the proliferation of human rhabdomyosarcoma.

Kunigou O, Nagao H, Kawabata N, Ishidou Y, Nagano S, Maeda S, Komiya S, Setoguchi T.

Oncol Rep. 2011 Nov;26(5):1337-42.

doi: 10.3892/or.2011.1413. 査読有

7. Clinical implications of determination of safe surgical margins by using a combination of CT and 18FDG-positron emission tomography in soft tissue sarcoma.

Yokouchi M, Terahara M, Nagano S, Arishima Y, Zemmyo M, Yoshioka T, Tanimoto A, Komiya S.

BMC Musculoskelet Disord. 2011 Jul 21;12:166.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/12/166>. 査読有

8. Combination of ultrasound and bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth.

Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K, Sakamoto T, Komiya S.

Cancer Biol Ther. 2011 Aug 15;12(4):270-7.

<http://www.landesbioscience.com/journals/cbt/article/16259/>. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

1. ヒト骨肉腫における GLI2 の機能解析
中村俊介、瀬戸口啓夫、永尾宗子、永野 聡、小宮節郎

第 122 回西日本整形・災害外科学会 2011 年 11 月 26 日 熊本市

2. ヒト骨肉腫における GLI2 の強発現と GLI2 をターゲットにした骨肉腫治療の可能性
永尾宗子、小宮節郎、瀬戸口啓夫

第 29 回日本骨代謝学会学術集会 2011 年 7 月 28 日 大阪市 (優秀演題賞)

3. 三次元細胞培養を用いた腫瘍内遺伝子治療ベクター感染効率の解析

永野 聡、Boucher Y、小宮節郎

第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010 年 10 月 14 日、京都市、京都府

4. 骨肉腫を多因子で特異標的かつ効果的に治療する革新的な増殖制御型アデノウイルス薬の開発

堀川良治、永野 聡、神園純一、池田美奈子、小宮節郎、小賤健一郎

第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010 年 10 月 14 日、京都市、京都府

5. 骨肉腫における切断術症例の検討

永野 聡、横内雅博、寺原幹雄、中島隆之、善明美千久、有島善也、小宮節郎

第 43 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2010 年、7 月 15 日、新宿区、東京都

6. Tumor cell death-inducing Pretreatments Improves Distribution and Efficacy of Oncolytic Virus in Solid tumors
Nagano S, Komiya S, Boucher Y

The 20th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium, 2010 年 6 月 4 日、指宿市、鹿児島県

7. Functional analysis of EGR1 and its up-regulation using anti-tumor agents.
Matsunoshita Y., Setoguchi T., Kunigou O., Hirotsu M., Komiya S.

56th Annual Meeting of Orthopedic Research Society, 2010 年 3 月 7 日, New Orleans, USA

8. アポトーシス誘導型の前治療は oncolytic virus の腫瘍内拡散と抗腫瘍効果を向上させる

永野 聡、小宮節郎、Boucher Y

第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 2 日、横浜市

研究者番号：40423727

神園純一 (KAMIZONO JUNICHI)

9. Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by regulation of cell cycle.

Setoguchi T., Tanaka M., Komiya S.,
15 th meeting of European CanCer
Organisation (ECCO), 2 0 0 9年9月2 3
日, Berlin, Germany

10. Improved distribution and efficacy of oncolytic virus in solid tumors by apoptosis-inducing pretreatments.

Nagano S., Komiya S., Boucher Y.
15 th meeting of European CanCer
Organisation (ECCO), 2 0 0 9年9月2 1
日, Berlin, Germany

11. 固形腫瘍の細胞密度と細胞外マトリックスの制御による新しい oncolytic 遺伝子治療

永野 聡, Boucher Y., 小宮節郎
第 42 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術
集会, 2 0 0 9年7月1 6日, 横浜市

[図書] (計 1 件)

1. 永野 聡, 小宮節郎, 文光堂、バイオプシーの進め方、整形外科基本手技 編集 吉田宗人ほか、2011, 90~94

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~orthop/intern/basic/kotsunan.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 聡 (NAGANO SATOSHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50373139

(2) 研究分担者

小宮節郎 (KOMIYA SETSURO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

瀬戸口啓夫 (SETOGUCHI TAKAO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

鹿児島大学・医学部歯学部付病院・医員

研究者番号：30444897