

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592125

研究課題名(和文)悪性グリオーマに対する腫瘍溶解性ウイルスと抗血管新生薬との併用療法についての検討

研究課題名(英文)Combination therapy of oncolytic virus & antiangiogenic drug for malignant glioma

研究代表者

黒住 和彦(Kurozumi, Kazuhiko)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：20509608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は新規分子標的薬(Cilengitide)と併用によりOV治療の効果を増強することができたが、この結果を発展させるために、抗血管新生作用を持つ、新規腫瘍溶解性ヘルペスウイルスRAMBOを使用した。グリオーマ細胞をRAMBOで治療すると、MOIが高いほど強い殺細胞効果が得られ、これにcilengitideを併用するとその効果がさらに増強された。マウスヒトグリオーマ脳腫瘍モデルにおいて、RAMBO又はCilengitide単独治療群および無治療群に比べ、RAMBOとcilengitideの併用治療群において生存期間が有意差をもって延長した。

研究成果の概要(英文)：Oncolytic viral (OV) therapy has been considered as a promising treatment modality for brain tumors. Vasculostatin, the fragment of brain-specific angiogenesis inhibitor-1, shows anti-angiogenic activity against malignant gliomas. Previously, a vasculostatin-expressing oncolytic herpes simplex virus-1, Rapid Antiangiogenesis Mediated By Oncolytic virus (RAMBO), was reported to have a potent antitumor effect. Here, we investigated the therapeutic efficacy of RAMBO and cilengitide, an integrin inhibitor, combination therapy for malignant glioma. In vitro, RAMBO, combined with cilengitide, induced synergistic cytotoxicity on glioma cells. In vivo, there was a significant increase in the survival of mice treated with combination therapy compared with RAMBO or cilengitide monotherapy. These results indicate that cilengitide enhanced vasculostatin-expressing OV therapy for malignant glioma and provide a rationale for designing future clinical trials combining these two agents.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学 腫瘍溶解性ウイルス

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマの予後は極めて不良であり、近年、悪性グリオーマに対する治療として、様々な新しい治療法が試みられているが、中でも、変異型ウイルスを用いた遺伝子治療は近年注目を集めている。腫瘍溶解性ウイルス(OV)を用いた腫瘍溶解療法はウイルスが腫瘍細胞を選択的に増殖、溶解するが、正常細胞では増殖しない。悪性グリオーマに対して、OVを用いた臨床試験が行われており、比較的安全であることが示されたが、期待していた効果には至っていない。このOVをさらに効果的な治療モダリティーにするために、現在、数々の施設が研究を続けている。戦略とするため悪性グリオーマに対するOVを用いた腫瘍微小環境についての研究を行ってきた。この研究で我々が得た結果では、新規分子標的薬cRGDペプチド(Cilengitide)を用いることにより炎症を抑え、OVによる抗腫瘍効果をより増強し、治療効果を高めることができた。さらに、最近、我々は抗血管新生作用を持つvasculostatinという蛋白を発現する新規OVを作製した。生作用を持つ、brain-specific angiogenesis inhibitor (BAI-1)のfragmentであるvasculostatin (Vstat120)を発現する腫瘍溶解性ヘルペスウイルスRAMBO (for Rapid Antiangiogenesis Mediated By Oncolytic virus)を使用し、ヒト脳腫瘍マウスモデルにおいて有意な生存期間の延長を得ることができた(Hardcastle J, Kurozumi K, et al. Mol ther, 2010)。

以上の結果をもとに、この新規OVと分子標的薬(Cilengitide)の併用により、OV治療がより効果的な治療戦略となり得るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

研究目的1: 新規OV RAMBO の効果について検証し、また、薬剤を全身投与にし、併用効果について同様な結果を得ることができるかさらに強い効果が得られるかについて検討す

る。

研究目的2: 分子標的薬により新規OV の腫瘍溶解を増強するメカニズムを調べる。

3. 研究の方法

1. オンコリティックウイルスや薬剤について、本研究のセットアップを行う。RAMBO 単独での効果を確認する。

2. 薬剤投与方法を全身投与により、同様な結果を得ることができるか、さらに強い効果を得ることができるか、について検討する。

3. 分子標的薬Cilengitide によりOV の腫瘍溶解を増強するメカニズムをさらに調べるために、gene microarray とプロテオミクスを行う。

4. In vivo において、ターゲット因子を強発現または抑制することにより、OV に対してどのような影響をあたえられるかについて検討する。

5. 統計学的データ解析を行い、学会発表・論文投稿する。

4. 研究成果

我々は新規分子標的薬(Cilengitide)との併用によりOV治療の効果を増強することができたが、この結果を発展させるために、抗血管新生作用を持つ、新規腫瘍溶解性ヘルペスウイルスRAMBO を使用した。cRGDペプチド(Cilengitide)の投与方法を全身性投与方法に変えたところ、局所投与と同様にRAMBOとcRGDペプチドの併用効果が得られた。腫瘍はU87dEGFRなどのヒト脳腫瘍細胞系列を使用し、生存曲線にて有意な生存期間の延長が認められた。

Cilengitide により OV の腫瘍溶解を増強するメカニズムをさらに調べるために、gene microarray を行った。OV とOV + Cilengitide の検討の前にGene microarray は薬剤非処理の悪性グリオーマ細胞株とCilengitide 処理された細胞株を比較した。DNA マイクロアレイは CodeLink™ Human Whole Genome Bioarray を用い、発現解析、

遺伝子オントロジー解析、パスウェイ解析を行った。Cilengitide 処理 16 時間後に 265 遺伝子の発現変化を認めた。遺伝子オントロジー解析では、activation of pro-apoptotic gene products に関連する遺伝子群が over-represent されていた。パスウェイ解析においては、Apoptotic cleavage of cellular proteins や TNF receptor signaling pathway が over-represent されており関連遺伝子である caspase 8 等が upregulate されていた。

グリオーマ細胞を RAMBO で治療すると、MOI が高いほど強い殺細胞効果が得られ、これに cilengitide を併用するとその効果がさらに増強された。この結果から、RAMBO と cilengitide の併用により相加ないし相乗的なグリオーマ細胞の殺細胞効果が得られることが示された。

U87 EGFR グリオーマ細胞を cilengitide と RAMBO で治療し、カスパーゼ活性を評価した。カスパーゼ 8 アッセイでは、コントロールに比べ cilengitide 治療群において有意に活性が上昇していた。カスパーゼ 9 アッセイでは、コントロールに比べ、RAMBO 治療群において有意に活性が上昇していた。カスパーゼ 3/7 アッセイでは、RAMBO および cilengitide 併用治療群において、コントロール、cilengitide または RAMBO 単独治療群と比較し、いずれも有意な活性の上昇を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- Gene expression profiling of the anti-glioma effect of cilengitide Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Michiue H, Fujii K, Ishida J, Shimazu Y, Chiocca EA, Kaur B, Date I SpringerPlus 2:160: doi:10.1186/2193-1801-2-160, 2013 (査読有)
- The integrin inhibitor cilengitide enhances the anti-glioma efficacy of vasculostatin-expressing oncolytic virus Fujii K, Kurozumi K, Ichikawa T, Onishi M, Shimazu Y, Ishida J, Chiocca EA, Kaur B, Date I Cacer Gene Therapy 20(8): 437-444, 2013 doi: 10.1038/cgt.2013.38. (査読有)
- Mecanisms of tumor development and anti-angiogenic therapy in glioblastoma multiforme Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Date I Neurologia medico-chirurgica 53(11): 755-763, 2013 (査読有)
- 脳幹部海綿状血管腫に対する直達手術 9 例の検討 黒住和彦、小野成紀、市川智継、三好康之、石田穰治、春間 純、徳永浩司、伊達 勲 脳卒中の外科 41(3): 213-218, 2013 (査読有)
- グリオーマの浸潤の機序とその治療 黒住和彦、伊達 勲 Clinical Neuroscience 31(10): 1140-1142, 2013 (査読有)
- 小児テント上悪性星細胞腫における分子生物学的検討 血管新生因子 cystein rich protein 61 (CYR61) に着目して 石田穰治、黒住和彦、市川智継、大西 学、伊達 勲 小児の脳神経 38(2): 220-226, 2013 (査読有)
- Tang CT, Kurozumi K, Pillai P, Filipce V, Chiocca EA, Ammirati M. Quantitative analysis of surgical exposure and maneuverability associated with the endoscope and the microscope in the retrosigmoid and various posterior petrosectomy approaches to the petroclival region using computer tomography-based frameless stereotaxy. A cadaveric study. Clin Neurol Neurosurg. 2013 Jul;115(7):1058-62. doi: 10.1016/j.clineuro.2012.10.023. Epub 2012 Nov 21. (査読有)
- Cilengitide treatment of for malignant glioma: Current status and future direction Kurozumi K, Ichikawa T, Onishi M, Fujii K, Date I Neurologica medico-chirurgica 52(8): 539-547, 2012 (査読有)
- 小児テント上悪性星細胞腫瘍に対する外科治療を含めた集学的治療の成績 黒住和彦、市川智継、小野成紀、伊達 勲 小児の脳神経 36(5): 467-472, 2011 (査読有)

〔学会発表〕(計 40 件)

- 第 43 回日本脳卒中の外科学会学術集会: STROKE 2014: 大阪, 2014.03.13 海綿状血管腫手術における術中画像支援の有用性 黒住和彦、徳永浩司、菱川朋人、上利 崇、亀田雅博、市川智継、伊達 勲
- 第 24 回日本間脳下垂体腫瘍学会: 福岡,

- 2014.02.22 成長ホルモン産生性下垂体腫瘍に対する神経内視鏡単独手術と術中画像支援の有用性 黒住和彦、亀田雅博、安原隆雄、稲垣兼一、大塚文男、伊達 勲
3. 第 76 回岡山内分泌同好会：岡山，2014.02.12 成長ホルモン産生性下垂体腺腫手術における術中画像支援の有用性 黒住和彦、亀田雅博、安原隆雄、伊達 勲、稲垣兼一、大塚文男
 4. 岡山脳腫瘍治療カンファランス：岡山，2014.01.22 当院のアバスチン使用経験 黒住和彦
 5. 第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会：宮崎，2013.12.08 悪性神経膠腫成人例と小児例における血管新生因子 cystein rich protein 61 の発現解析 黒住和彦、石田穰治、市川智継、大西 学、藤井謙太郎、島津洋介、岡 哲生、伊達 勲
 6. 18th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology：San Francisco, U.S.A., 2013.11.22 Gene expression profiling of the anti-glioma effect of Cilengitide Kurozumi K, Onishi M, Ichikawa T, Fujii K, Ishida J, Shimazu Y, Chiocca EA, Kaur B, Date I
 7. 第 20 回日本神経内視鏡学会：甲府，2013.11.08 術中画像支援併用による経鼻的神経内視鏡単独手術（シンポジウム）黒住和彦、亀田雅博、安原隆雄、市川智継、小野成紀、伊達 勲
 8. 第 20 回日本神経内視鏡学会：甲府，2013.11.08 内視鏡手術における磁場式ナビゲーションの有用性（LS）黒住和彦
 9. （一社）日本脳神経外科学会第 72 回学術総会：横浜，2013.10.16 多視点 3D 解剖システムによる頭蓋底手術シミュレーション黒住和彦、菱川朋人、亀田雅博、安原隆雄、徳永浩司、武田吉正、大塚愛二、眞鍋博明、伊達 勲
 10. 第 18 回日本脳腫瘍の外科学会：大津，2013.09.20 多視点 3D 解剖システムによる頭蓋底手術シミュレーション黒住和彦、菱川朋人、亀田雅博、安原隆雄、徳永浩司、武田吉正、大塚愛二、伊達 勲
 11. 第 18 回日本脳腫瘍の外科学会：大津，2013.09.20 経鼻的神経内視鏡単独手術の現状と画像支援の有用性（シンポジウム）黒住和彦、亀田雅博、安原隆雄、市川智継、小野成紀、伊達 勲
 12. XV WFNS World Congress of Neurosurgery (WFNS 2013)：Seoul, Korea, 2013.09.10 Omics analysis of the anti-glioma effect by vasculostatin expressing oncolytic viral therapy combined with cilengitide Kurozumi K, Fujii K, Ichikawa T, Onishi M, Ishida J, Shimazu Y, Chiocca EA, Kaur B, Date I
 13. 岡山大学機能強化戦略プロジェクト 難治固形がんの遺伝子治療 キックオフシンポジウム：岡山，2013.09.01 難治固形がんに対する Ad-REIC の位置づけ 悪性グリオーマ（基調報告）黒住和彦
 14. 第 19 回日本遺伝子治療学会年次学術集会 (The 19th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy)：岡山，2013.07.05 Induction of an angiogenic factor, CYR61, in oncolytic viral therapy for malignant gliomas Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Shimazu Y, Onishi M, Ishida J, Chiocca EA, Kaur B, Date I
 15. 第 25 回日本頭蓋底外科学会：名古屋，2013.06.26 Cadaver を用いた多視点 3D 解剖システムによる頭蓋底手術シミュレーション（シンポジウム）黒住和彦、菱川朋人、亀田雅博、安原隆雄、徳永浩司、武田吉正、大塚愛二、伊達 勲
 16. 第 41 回日本小児神経外科学会：大阪，2013.06.08 小児脳室近傍腫瘍に対する神経内視鏡的アプローチの有用性 黒住和彦、市川智継、亀田雅博、小野成紀、大西 学、藤井謙太郎、石田穰治、島津洋介、伊達 勲
 17. 第 31 回日本脳腫瘍病理学会：東京，2013.05.25 小児テント上悪性星細胞腫における血管新生因子 cysteine rich protein 61 の分子生物学的検討 黒住和彦、石田穰治、市川智継、大西 学、藤井謙太郎、島津洋介、柳井広之、伊達 勲
 18. 第 22 回脳神経外科手術と機器学会：松本，2013.04.13 頭蓋底手術シミュレーションにおける cadaver を用いた 3D display system の有用性 黒住和彦、菱川朋人、亀田雅博、安原隆雄、石田穰治、徳永浩司、武田吉正、大塚愛二、伊達 勲
 19. 第 42 回日本脳卒中の外科学会：STROKE 2013：東京，2013.03.21-23 後頭蓋窩海綿状血管腫に対する治療戦略 黒住和彦、徳永浩司、菱川朋人、市川智継、三好康之、石田穰治、春間 純、伊達 勲
 20. 第 23 回日本間脳下垂体腫瘍学会：鹿児島，2013.03.15-16 下垂体腺腫に対する神経内視鏡単独経鼻的摘出術の現状と展望 黒住和彦、小野成紀、亀田雅博、安原隆雄、伊達 勲
 21. 第 74 回岡山内分泌同好会：岡山，2013.02.06 下垂体腺腫に対する神経内視鏡単独経鼻的摘出術 黒住和彦、亀田雅博、伊達 勲、小野成紀
 22. 第 17 回関西脳神経外科手術研究会：大阪，2012.12.15 当施設におけるデュラシール TM ブルースプレーの使用経験 黒住和彦、三好康之、市川智継、亀田雅博、伊達 勲
 23. 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会：広島，

- 2012.11.25-27 分子標的薬 cilengitide による抗グリオーマ効果のメカニズム 黒住和彦、市川智継、大西 学、藤井謙太郎、島津洋介、石田穰治、伊達 勲
24. 第 19 回日本神経内視鏡学会：東京，2012.11.02-03 下垂体およびトルコ鞍近傍腫瘍に対する神経内視鏡単独経鼻的摘出術と今後の展望 黒住和彦、小野成紀、亀田雅博、伊達 勲
25. 社)日本脳神経外科学会第 71 回学術総会：大阪，2012.10.17-19 分子標的薬 cilengitide における多様な抗グリオーマ効果のメカニズム 黒住和彦、大西学、市川智継、藤井謙太郎、島津洋介、石田穰治、伊達 勲
26. 第 39 回日本脳科学学会：北九州，2012.10.06 分子標的薬 cilengitide における多様な抗グリオーマ効果のメカニズム 黒住和彦、大西学、市川智継、藤井謙太郎、島津洋介、石田穰治、伊達 勲
27. 第 13 回日本分子脳神経外科学会：熊本，2012.09.20-21 グリオーマに対する腫瘍溶解ウイルス療法における Cysteine-rich 61 (CYR61) の発現 黒住和彦、市川智継、大西学、藤井謙太郎、島津洋介、石田穰治、E Antonio Chiocca、Balveen Kaur、伊達 勲
28. 第 17 回日本脳腫瘍の外科学会：横浜，2012.09.07-08 脳室内・脳室近傍腫瘍に対する神経内視鏡的アプローチによる治療戦略 黒住和彦、市川智継、小野成紀、亀田雅博、大西学、伊達 勲
29. 第 24 回日本頭蓋底外科学会：東京，2012.07.11-12 頭蓋底手術における cadaver を用いた 3D display system の有用性 黒住和彦、菱川朋人、亀田雅博、徳永浩司、眞鍋博明、武田吉正、大塚愛二、伊達 勲
30. 第 18 回日本遺伝子治療学会年次学術集会：熊本，2012.06.28-30 Integrin inhibitor cilengitide enhances anti-glioma efficacy of oncolytic viral therapy Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Shimazu Y, Onishi M, Ishida J, Chiocca EA, Kaur B, Date I
31. 第 40 回日本小児神経外科学会：岡山，2012.06.07-08 小児テント上悪性星細胞腫の集学的治療における手術の意義 黒住和彦、市川智継、小野成紀、石田穰治、大西学、三好康之、伊達 勲
32. 第 41 回日本脳卒中の外科学会：STROKE2012：福岡，2012.04.26-28 脳幹部海綿状血管腫出血例における直達手術 9 例の検討 黒住和彦、小野成紀、市川智継、三好康之、石田穰治、春間 純、徳永浩司、伊達 勲
33. The 9th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology：Taipei, Taiwan, 2012.04.20-22 Multiple mechanisms of cilengitide treatment for malignant glioma Kurozumi K, Ichikawa T, Onishi M, Fujii K, Shimazu Y, Ishida J, Chiocca EA, Kaur B, Date I
34. 第 21 回脳神経外科手術と機器学会：大阪，2012.03.30 経蝶形骨洞手術におけるデュラシール™ プルースプレーの使用経験 黒住和彦、小野成紀、亀田雅博、伊達 勲
35. 第 22 回日本間脳下垂体腫瘍学会：東京，2012.02.25 小児間脳近傍腫瘍に対する神経内視鏡的アプローチの有用性 黒住和彦、小野成紀、市川智継、大西学、島津洋介、石田穰治、伊達 勲
36. 第 72 回(社)日本脳神経外科学会中国四国支部学術集会：高知，2011.12.03 鞍上部胚細胞腫に対する集学的治療の成績 黒住和彦、市川智継、小野成紀、三好康之、伊達 勲
37. 第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会：下呂，2011.11.27 悪性グリオーマにおける分子標的薬 cilengitide 感受性と血管新生関連因子の発現 黒住和彦、市川智継、大西学、藤井謙太郎、島津洋介、石田穰治、大谷理浩、清水俊彦、柳井広之、古田知久、E. Antonio Chiocca、Balveen Kaur、伊達 勲
38. 第 18 回日本神経内視鏡学会：岡山，2011.11.17 成長ホルモン産生下垂体腺腫に対する神経内視鏡単独経鼻的摘出術と成長ホルモンの推移 黒住和彦、小野成紀、伊達 勲
39. (社)日本脳神経外科学会第 70 回学術総会：横浜，2011.10.12 悪性グリオーマに対する分子標的薬 cilengitide 療法の現状と展望 黒住和彦、市川智継、大西学、島津洋介、藤井謙太郎、石田穰治、大谷理浩、清水俊彦、柳井広之、古田知久、Balveen Kaur、Antonio Chiocca、伊達 勲
40. 第 16 回日本脳腫瘍の外科学会：横浜，2011.09.09 脳幹部海綿状血管腫に対する手術アプローチ 黒住和彦、市川智継、小野成紀、石田穰治、三好康之、徳永浩司、伊達 勲

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒住和彦 (KUROZUMI KAZUHIKO)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：20509608

(2) 研究分担者

徳永浩司 (TOKUNAGA KOJI)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：40294467

(3) 連携研究者

伊達 勲 (DATE ISAO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70236785

以上