

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861577

研究課題名(和文) テロメラーゼ特異的アデノウイルス製剤による新しい頭頸部癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for head and neck cancer using telomerase-specific adenovirus

研究代表者

榭原 敦子 (Sakakibara, Atsuko)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：10636533

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)：放射線耐性頭頸部扁平上皮癌細胞株におけるテロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルスであるOBP-301と放射線治療の併用効果について検討を行った。OBP-301感染と放射線治療の併用療法は、in vitroおよび同所性頭頸部扁平上皮癌マウスモデルで単独治療と比較して有意に高い抗腫瘍効果を発揮し、相乗効果を認めた。DNA修復機構に関わるMRN複合体の発現がOBP-301によって低下すること、OBP-301と放射線の併用によりアポトーシスが誘導されることが示され、相乗効果の機構と考えられた。OBP-301と放射線治療の併用療法は頭頸部扁平上皮癌に対する新たな治療戦略となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the efficacy of combination treatment with OBP-301, a telomerase-specific replication-selective adenovirus, and radiotherapy in overcoming radioresistance by examining its effect on radiation-resistant head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells. Radiation-resistant HNSCC cells were treated with OBP-301 and radiation in vitro and in an orthotopic nude mouse model in vivo. Infection with OBP-301 was found to enhance the antitumor efficacy of radiation both in vitro and in vivo by inhibiting expression of MRN complex, which plays a key role in DNA repair machinery and increasing apoptosis induction. Combined OBP-301 and radiation therapy may thus be a novel therapeutic strategy for treating HNSCC.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 テロメラーゼ ウイルス治療 放射線感受性

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部扁平上皮癌に対しては臓器温存の観点から放射線治療が広く行われている。しかし、放射線耐性の頭頸部扁平上皮癌の予後は集学的治療の進歩にも関わらず不良であり、放射線の効果を増強する作用を持つ治療法の開発が求められている。

(2) ウイルスを用いた腫瘍融解ウイルス療法は新たな治療戦略として研究が進められている。アデノウイルスの感染によって産生されるタンパク質は宿主細胞の DNA 修復機構を阻害することで放射線感受性を増強させることが知られており、腫瘍特異的に増殖するよう遺伝子改変したアデノウイルスは安全かつ効果的に癌細胞の放射線感受性を増強する可能性がある。

(3) 一方、放射線耐性のメカニズムの研究が進み、染色体の末端に存在するテロメアを伸長するヒトテロメラーゼ逆転写酵素の活性が頭頸部扁平上皮癌を含む多くの癌で上昇し、かつ放射線耐性とも関連することが分かってきた。

(4) 本邦で開発された OBP-301 はヒトテロメラーゼ逆転写酵素のプロモーター活性のある細胞でのみウイルスの増殖を可能にした制限増殖型アデノウイルスである。以前我々は OBP-301 単独療法が頭頸部扁平上皮癌細胞に対して *in vitro* および *in vivo* で抗腫瘍効果を発揮することを報告した。

2. 研究の目的

(1) 放射線耐性の頭頸部扁平上皮癌細胞に対して、OBP-301 の投与と放射線治療の併用療法が相乗効果を示すかどうかを *in vitro* および *in vivo* で検討を行う。

(2) 相乗効果が示された場合にはその機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 13 種類の扁平上皮癌細胞株より放射線耐

性を示す細胞株を選抜した。

(2) 放射線耐性の頭頸部扁平上皮癌細胞に対して、OBP-301 の感染と放射線治療の併用療法の抗腫瘍効果を *in vitro* では clonogenic survival assay 法を用いて、*in vivo* では同所性頭頸部扁平上皮癌マウスモデルを用いて測定し、相乗効果の有無について検討した。

(3) DNA 修復において重要な役割を果たす MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) 複合体の発現量の変化を OBP-301 の感染および放射線治療の前後でウェスタンブロッティング法を用いて比較した。

(4) OBP-301 の感染および放射線治療によって頭頸部扁平上皮癌細胞のアポトーシスが誘導されるかどうかを *in vitro* では抗アネキシン V 抗体を用いたフローサイトメトリーを用いて、*in vivo* では TUNEL 法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 13 種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株の Clonogenic survival assay の結果、2 Gy の放射線治療を行った後の生存率 (surviving fraction after irradiation at a dose of 2 Gy: SF2) の値は 0.52 - 0.82 (中央値 0.64) であった (表 1)。OSC-19 および YCU-MS861 細胞株は比較的放射線耐性であり、これらの細胞株はマウスの舌に局所注射した場合に高率に腫瘍を形成することから、この 2 種類の細胞株を以降の実験に用いることとした。

表 1. 頭頸部扁平上皮癌細胞株の放射線感受性

細胞株名	SF2
KCC-T871	0.82
YCU-MS861	0.75
HSC-3	0.71
KCC-TCM903	0.70
YCU-M911	0.69
OSC-19	0.67
YCU-T892	0.64

細胞株名	SF2
KCC-TCM902	0.62
YCU-OR891	0.58
KCC-L871	0.57
KCC-T873	0.56
YCU-M862	0.56
KCC-M871	0.52

(2) OBP-301 の頭頸部扁平上皮癌細胞株に対する放射線増感作用を検証するために clonogenic survival assay を行った．放射線治療単独では用量依存的に OSC-19 および YCU-MS861 細胞の生存率が低下した．この効果は放射線治療の直後に 1000 MOI の OBP-301 に感染させることで増強された．1000 MOI の OBP-301 による放射線増感作用は OSC-19 細胞よりも YCU-MS861 細胞でより強く認められた (図 1, 2) ．

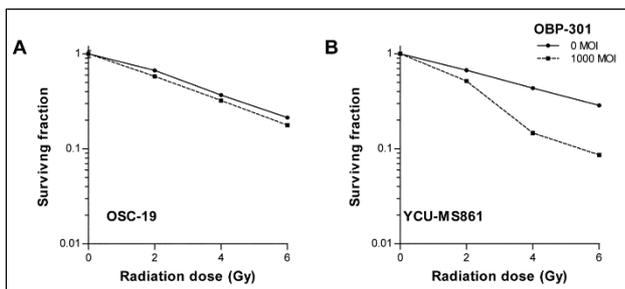


図 1. 頭頸部扁平上皮癌細胞株の放射線感受性に対する OBP-301 の効果

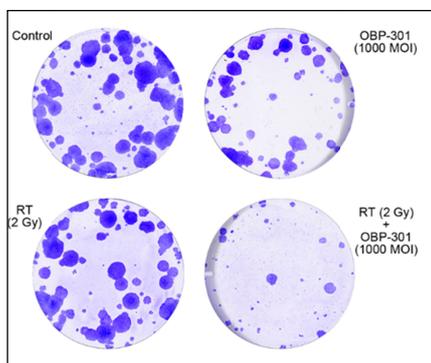


図 2. Clonogenic surviving assay の代表例

OSC-19 細胞を移植してから 21 日後の同所性頭頸部扁平上皮癌マウスの腫瘍容積はコントロール群と比較して OBP-301 群, 放射線群, 併用群で有意に小さく (それぞれ $P < 0.001$, $P = 0.006$, $P = 0.0013$; 図 3), OSC-19 群と放射線群はほぼ同等の結果であった．細胞移植から 26 日後の併用群の抗腫瘍効果は OBP-301 群および放射線群と比較して有意に高かった (それぞれ $P = 0.024$, $P = 0.043$) ．

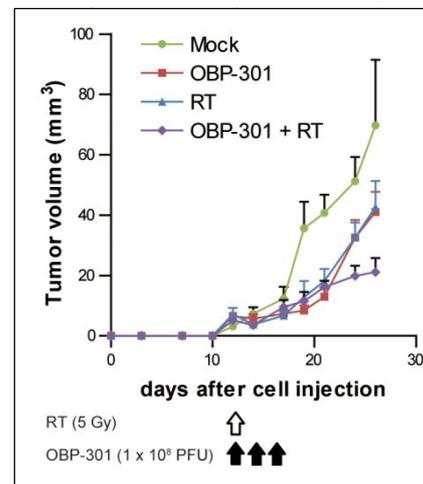


図 3. 同所性モデルにおける OBP-301 感染および放射線治療の併用療法の腫瘍容積に対する効果

コントロール群のマウスの生存期間中央値は 22.4 日であった (図 4) ． OBP-301 群, 放射線群, 併用群の生存期間中央値はそれぞれ 40.7 日, 32.5 日, 42.5 日であり, コントロール群と比較して有意に延長していた ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$) ．併用群の生存期間中央値は放射線群と比較して有意に延長していたが ($P = 0.036$), OBP-301 群の生存期間中央値とは有意な差を認めなかった ($P = 0.17$) ．

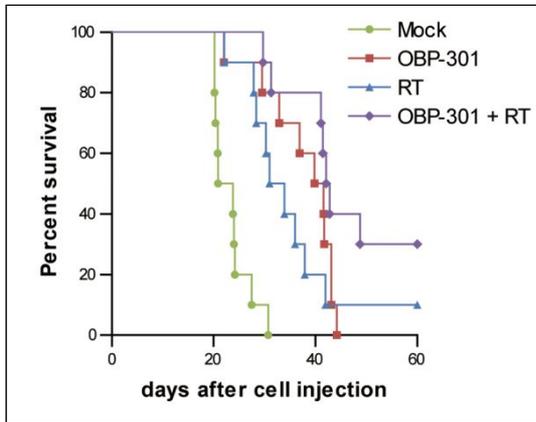


図 4. 同所性モデルマウスの生存期間に対する OBP-301 感染および放射線治療の併用療法の効果

OSC-19 細胞を用いて作製した同所性頭頸部扁平上皮癌の腫瘍容積が 30 mm³ に達するまでの増殖遅延 (growth delay) で OBP-301 感染, 放射線治療および併用療法の抗腫瘍効果を評価した結果を表 2 に示す. OBP-301 感染単独および放射線治療単独ではそれぞれ 5.1 日, 4.8 日の増殖遅延効果を確認した. OBP-301 感染および放射線治療の併用療法は 11.9 日の増殖遅延効果を確認し, それぞれ単独療法の増殖遅延の合計 (9.9 日) よりも長かった. 増強係数 (the treatment enhancement factor; EF) は 1.39 であり, OBP-301 が腫瘍の放射線感受性を増大することが示唆された.

表 2. 同所性モデルにおける OBP-301 感染および放射線治療の腫瘍増殖抑制効果

群の名称	30 mm ³ まで増大するの に要する時間(日)	AGD (日)	NGD (日)	EF
Mock	18.1			
RT	22.9	4.8		
OBP-301	23.2	5.1	0.3	
併用群	30.0	11.9	7.1	1.39

AGD, the absolute growth delay; NGD, the normalized growth delay

(3) MRN 複合体を構成する Mre11, Rad50, Nbs1 タンパク質の発現をウェスタンブロッティン

グで検討した. OBP-301 感染によって用量依存的に Mre11 および Rad50 の発現は減少したが, Nbs1 の発現はほとんど変化しなかった (図 5A). 放射線照射のみを行った細胞では Mre11, Rad50 および Nbs1 の過剰発現を認めたが, 放射線治療の直後に OBP-301 を感染させた細胞においては Mre11, Rad50 および Nbs1 の発現は著明に低下しており (図 5A), OBP-301 感染によって放射線治療を受けた細胞の MRN 複合体の発現を抑制できることが示された. Mre11 タンパク質の発現レベルは 100 MOI の OBP-301 に感染後, およそ 42 時間後から減少し始めた (図 5B).

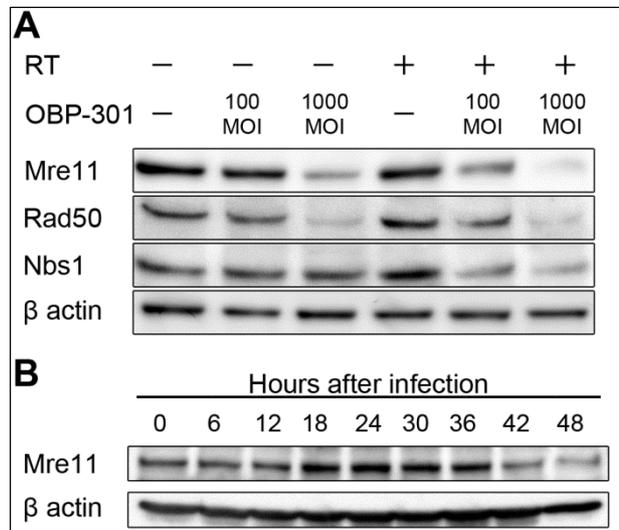


図 5. in vitro での Mre11, Rad50 および Nbs1 タンパク質の発現のウェスタンブロッティング解析

OSC-19 および YCU-MS861 細胞において, 100 MOI の OBP-301 感染と放射線治療はそれぞれ早期アポトーシス細胞 (アネキシン V 陽性, PI 陰性の細胞) の割合をコントロールの細胞と比較して増加させた (図 6). OBP-301 感染と放射線治療を併用した場合, コントロール, OBP-301 感染単独, 放射線治療単独と比較して早期アポトーシス細胞の割合が OSC-19 および YCU-MS861 細胞それぞれで増加していた.

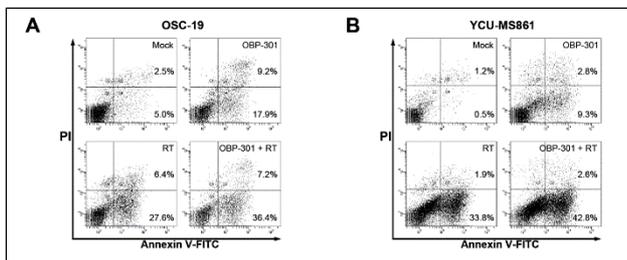


図 6. OBP-301 感染と放射線治療による in vitro でのアポトーシスの誘導

癌組織中の TUNEL 陽性細胞の割合は OBP-301 群 (26.6% ± 6.5%) , 放射線群 (30.8% ± 8.0%) , 併用群 (59.0% ± 4.3%) でコントロール群 (9.5% ± 1.1%) と比較して有意に増加していた (それぞれ P = 0.012 , P < 0.001 , P < 0.001; 図 7) . また , 併用群では OBP-301 群および放射線群と比較して有意にアポトーシスが増加していた (それぞれ P = 0.003 , P < 0.001) .

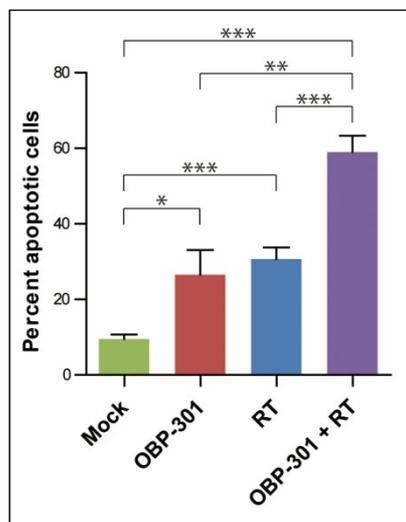


図 7. OBP-301 感染および放射線治療後の同所性頭頸部扁平上皮癌組織におけるアポトーシス細胞の割合

<引用文献>

Atsuko Sakakibara, Mamoru Tsukuda, Norio Kondo, Kaori Ishiguro, Machiko Kimura, Kyoko Fujita, Hideaki Takahashi, Hideki Matsuda. Examination of the optimal condition on the in

vitro sensitivity to telomelysin in head and neck cancer cell lines, *Auris Nasus Larynx*, Vol 38, 2011, pp. 589-599

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Hideaki Takahashi, Hiroshi Hyakusoku, Choichi Horiuchi, Masahiro Takahashi, Goshi Nishimura, Takahide Taguchi, Norio Kondo, Atsuko Sakakibara, Yusuke Urata, Daisuke Sano. Telomerase-specific oncolytic adenovirus: Antitumor effects on radiation resistant head and neck squamous cell carcinoma cells, *Head & Neck*, 査読有, Vol 36, 2014, pp. 411-418 DOI: 10.1002/hed.23309

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 敦子 (SAKAKIBARA, Atsuko)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号 : 10636533