

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101  
 研究種目：若手研究(A)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22689040  
 研究課題名(和文) テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルスによる骨軟部肉腫に対するウイルス療法  
 研究課題名(英文) Virotherapy for bone and soft tissue sarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus  
 研究代表者  
 川島 寛之 (KAWASHIMA HIROYUKI)  
 新潟大学・医歯学系・助教  
 研究者番号：30361900

研究成果の概要(和文)：骨軟部肉腫に対するテロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルスによるウイルス療法の効果と殺細胞メカニズムの解明を目指した。細胞株を用いた実験では、アデノウイルスレセプターやテロメラーゼ逆転写酵素の発現量に比例し、容量・時間依存性にウイルス増殖が起きると同時に、オートファジー、アポトーシスの両機序を介して殺細胞効果を発揮することがわかった。さらに、マウス骨肉腫モデルでは、本ウイルス療法により骨肉腫の増大が著明に抑制されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Bone and soft tissue sarcoma cells treated by telomerase-specific oncolytic adenovirus showed a dose- and time-dependent viral replication and cytolysis, which were positively associated with the expression levels of coxackie-adenoviral receptor and hTERT. Oncolytic adenoviral infection also induced both apoptotic and autophagic cell death in these cells, and also showed inhibition of tumor growth in osteosarcoma xenograft mouse model.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	6,300,000	1,890,000	8,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学

#### 1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は手術を主体とし放射線治療と化学療法を補助療法とする治療原則と、それによる患者生存率はこの数十年間ほとんど変わらない。近年、悪性腫瘍に対する治療戦略として、ウイルス遺伝子を操作して、腫瘍細胞で選択的に複製する能力を持つ腫瘍治療用の増殖型ウイルスを開発する研究が

注目されている。ウイルスは本来ヒトの細胞に感染、増殖し、その細胞を様々な機序により破壊する。これまでに悪性腫瘍細胞での選択的な増殖により腫瘍細胞を死滅させるアデノウイルスが開発され研究が行われてきた。かぜ症状の原因となる5型アデノウイルスを基本骨格とし、ウイルス増殖に必須のE1遺伝子をテロメラーゼ・プロモーターで制御

するよう改変された制限増殖型の腫瘍殺傷ウイルスであり、テロメラーゼ活性が上昇している悪性腫瘍細胞の中で特異的に増殖し、腫瘍細胞を死滅させるが、正常細胞中での増殖能力はごく弱く、細胞毒性を示さないという特徴を持つ。

アデノウイルスはアデノウイルスレセプターを介することにより、様々な細胞に対して高い感染効率を有すると考えられているが、申請者はこれまでに骨肉腫をはじめとする様々な骨軟部腫瘍におけるアデノウイルスレセプターの発現について検討し、他の癌腫に比べても特に高い発現を認めることを見出している。さらに、アデノウイルスに蛍光緑色タンパク質(GFP)や癌抑制遺伝子、さらに血管新生抑制遺伝子などを組み込み、ベクターとして使用し、骨軟部腫瘍細胞への感染を試みた。その結果、実際にアデノウイルスが骨軟部腫瘍に対して高い感染効率を示し、治療遺伝子の導入により抗腫瘍効果を発現することも証明し、報告してきた。また骨軟部肉腫患者においてテロメラーゼ活性の高さが予後規定因子であるという報告もあり、テロメラーゼによる制限増殖型アデノウイルスを用いたウイルス療法の対象と考えられ、本研究でその有効性を確認する計画とした。

## 2. 研究の目的

以上の結果より、骨軟部肉腫は腫瘍細胞特異的増殖を示すアデノウイルスによるウイルス療法の対象であると考えられたため、申請者は準備段階の実験として骨肉腫細胞を対象に開始し、良好な感觸を得ることができた。このため、今後は骨肉腫以外の骨軟部肉腫を研究対象に広げ、それぞれの腫瘍細胞に対するウイルス感染による抗腫瘍作用を検討すると同時に、担癌動物モデルに対してもウイルス療法の有効性を検証していくこととした。ウイルス増殖が悪性腫瘍細胞に対して細胞死を誘導することは明らかになっているが、そのメカニズムについては未だ不明である。申請者自身が行った準備実験においても骨肉腫細胞に対する細胞死の誘導は確実に且つ効率的に起きているが、アポトーシスによると考えられるものとオートファジーによると推測されるものなど、様々な生物学的反応を観察している。本研究を通して、この細胞死誘導の機序を解明することで、より安全な臨床応用に発展することが期待できるものと考えている。

## 3. 研究の方法

骨軟部腫瘍の細胞株を用いて、*in vitro*におけるウイルスによる抗腫瘍作用と、担癌マウスモデルによる *in vivo*における治療効果について検討する。使用する細胞株は、骨肉

腫、軟骨肉腫などの骨悪性腫瘍と悪性線維性組織球腫、滑膜肉腫、脂肪肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍などの軟部悪性腫瘍のうち、現有する 20 株とした。

### (1) *in vitro* 実験系

まず、各細胞株から RNA と蛋白を抽出し、ウイルスの感染に必須のアデノウイルスレセプターの発現と、ウイルス増殖に必須の hTERT (テロメラーゼ) の発現について定量的 RT-PCR 法と Western blot 法で検討した。この際にアデノウイルスレセプターと hTERT の陽性コントロールとして HeLa 細胞を用いて比較した。腫瘍細胞に対する増殖抑制効果については、各細胞株の培養液に様々な濃度のウイルスを添加し、その後は感染の 24, 48, 72, 96 時間後と経時的に細胞数をカウントしてグラフを作成し、検討した。これは XTT assay も併用して客観的データを示すことにより、より信頼性のあるデータとした。一方で、腫瘍細胞に感染したアデノウイルスの細胞内での増殖を評価する指標として、hTERT プロモーターの下流に位置し、ウイルス増殖に必須の遺伝子である E1A, E1B の発現について検討する。具体的には、腫瘍細胞にウイルスを感染後、24, 48, 72 時間後に細胞を回収し、RNA と蛋白を抽出し、定量的 RT-PCR 法と Western Blot 法で E1A, E1B の発現量の変化を定量的に比較した。E1 発現の陽性コントロールとして 293 細胞を用いて比較した。

### (2) *in vivo* 実験系

ヌードマウスの背部皮下に骨肉腫細胞を移植し、担癌動物モデルを作成し、治療効果を検討するための実験を行った。治療の有無による腫瘍の大きさや重量の変化を調べるとともに、治療終了後に腫瘍を摘出し、アポトーシスの有無についても、TUNEL 法や免疫組織染色などの手法により、組織学的な検討を行った。

①腫瘍移植マウスに対して、背部皮下の腫瘍内へ治療用ウイルスを注入する群、非増殖型コントロールウイルスを注入する群、PBS のみ注入する群を作成し、治療効果を検討する。経時的に腫瘍の大きさの変化を測定し、増殖抑制効果について各群を比較検討した。

②ウイルスの感染後、腫瘍を 3 日、7 日、14 日で摘出する群を作成し、培養細胞での実験同様に腫瘍内におけるウイルスの増殖について、E1A, E1B の発現を指標に検討した。

③上記マウスより、アデノウイルスが増殖しやすいとされる、肝臓、肺などの内臓器を摘出し、ウイルスの増殖の有無について、同様に検証した。

④上記標本について同時に TUNEL 染色を行い、ウイルス感染による腫瘍細胞のアポトーシス誘導の有無についても検討した。

(3) 上記、*in vitro*, *in vivo* の両実験系の結果を踏まえて、抗腫瘍効果の発現するメカニ

ズムについて、分子レベルでの検討を行った。これまでにウイルス感染によるアポトーシスまたはオートファジーの誘導や免疫学的反応によるものなど、様々な報告があるが確定できていなかったが。これらについても細胞周期解析、蛋白、遺伝子発現解析などの分子生物学的手法を用いて検討を行った。

#### 4. 研究成果

はじめに、骨肉腫を対象を絞り、テロメラゼ特異的制限増殖型アデノウイルスによるウイルス療法の可能性を *in vitro*, *in vivo* 両者の実験系で検討し、骨肉腫細胞に対する細胞死の誘導や、腫瘍増大の抑制など、殺細胞ウイルスによる抗腫瘍効果を確認した。また、正常細胞、正常組織に対する安全性についても確認できた。

次に対象を軟部肉腫に広げると同時に、本ウイルス療法による悪性腫瘍細胞の殺細胞メカニズムの解明を目指した。軟部肉腫の細胞株を用いた実験では、アデノウイルスレセプターやヒトテロメラゼ逆転写酵素の発現量に比例し、容量・時間依存性にウイルス増殖を起こすと同時に、オートファジー、アポトーシスの両者を介して殺細胞効果を発揮することがわかった。一方で、オートファジーを抑制すると、アポトーシスの誘導は増強され、殺細胞効果も増強されることが分かった。つまり、本ウイルス療法によって軟部肉腫細胞に起こるオートファジーは細胞死を誘導するものではなく、保護するものであると考えられた。さらに、アポトーシスを抑制すると、肉腫細胞内におけるアデノシン三リン酸が減少し、細胞死のメカニズムとしてアポトーシスからネクローシスに変化することも分かった。以上より、肉腫に対する本ウイルス療法による殺細胞メカニズムはオートファジー、アポトーシス、ネクローシスが複雑に絡み合っていて作用していると考えられ、殺細胞に抵抗性の細胞に対しては、逆にオートファジーを抑制しアポトーシスを誘導したり、アポトーシスを抑制しネクローシスを誘導したりすることによる殺細胞効果の増強を図ることも可能であると推測された。

骨軟部肉腫に対する、本ウイルス療法の有効性に関する報告はこれまでになく、以上の研究成果は他の固形癌で先行する臨床応用への布石として、非常に価値のある研究結果と考えられる。さらに、細胞死の誘導メカニズムについては、他の癌腫を含め、これまでにこのような詳細な検討や報告はなく、より安全性や治療効率の高い、ウイルス療法の開発へ結びつくものであると期待される。本ウイルスと他の薬物の併用などによる、治療効率

のさらなる改善を確認する研究が今後も進められるように現在計画中である。

#### 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 2 件)

- ① Guidong Li, Hiroyuki Kawashima, et al. Telomelysin exhibits potent anti-tumor activity via apoptotic and non-apoptotic cell death in soft tissue sarcoma cells. *Cancer Sci.*, 査読有、2013; in press
- ② Guidong Li, Hiroyuki Kawashima, et al., Efficient virotherapy for osteosarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 査読有、2011; 137:1037-1051. DOI 10.1007/s00432-010-0969-6

[学会発表] (計 4 件)

- ① Guidong Li, Hiroyuki Kawashima, et al., Telomerase-specific oncolytic adenovirus exhibits potent anti-tumor activity, via induction of both apoptotic and non-apoptotic cell death in soft tissue sarcoma cells, 16<sup>th</sup> ISOLS general meeting, 2011.9.17, Beijing, China
- ② 李貴東、川島寛之ほか、ヒト軟部肉腫におけるテロメラゼ特異的制限増殖型アデノウイルス、テロメライシン(OBP-301)の抗腫瘍効果、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
- ③ 李貴東、川島寛之ほか、ヒト骨肉腫細胞株およびマウス移植モデルにおけるテロメラゼ特異的制限増殖型ウイルスの抗腫瘍効果、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、東京
- ④ Hiroyuki Kawashima, et al., Telomerase-specific oncolytic virotherapy for osteosarcoma, 101<sup>st</sup> AACR annual meeting, 2010.4.19 Washington, DC, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 寛之 (KAWASHIMA HIROYUKI)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：30361900

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし