

令和 6 年 5 月 30 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：2022～2023

課題番号：22K20942

研究課題名(和文)p53搭載腫瘍融解ウイルスの治療関連バイオマーカー探索と効果予測システムの構築

研究課題名(英文)Exploration of Treatment-Associated Biomarkers and Development of an Efficacy Prediction System for p53-armed Oncolytic Viruses

研究代表者

門脇 大輔(Kadowaki, Daisuke)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：30966255

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):本研究ではOBP-702、OBP-301、Ad-p53を用いて様々な癌腫の細胞株に対する細胞障害活性を検証した。50%阻害濃度を算出しこれを基盤となるデータベースとして、網羅的な解析を行いOBP-702のバイオマーカーの探索を行った。OBP-702の抗腫瘍メカニズムを「ウイルス感染」、「ウイルス複製」、「p53」の要素に分け検討し、それぞれ「CAR」、「Ki67」、「p53遺伝子変異」がOBP-702の抗腫瘍効果に関連する因子であった。これらの3因子をバイオマーカーと見立てOBP-702の治療効果を予測するスコアリングシステムを構築し、in vitroでの治療効果と相関することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんウイルス療法は高い腫瘍特異性を有し、既存の治療法とは異なるメカニズムで細胞死を誘導する新規治療法のひとつである。現段階では、がんウイルス療法における普遍的な、あるいは個々のウイルス治療薬に特異的なバイオマーカーの報告はなく、独自のバイオマーカー探索が必要と考えられる。本研究では、約50種のヒトがん細胞株を使用して、OBP-702(p53搭載腫瘍融解アデノウイルス)の治療関連バイオマーカーの同定を行い、その効果予測システムの構築を行った。

研究成果の概要(英文): In this study, we validated the cytotoxic activity of OBP-702, OBP-301, and Ad-p53 against various cancer cell lines. We calculated the 50% inhibitory concentration and conducted comprehensive analyses based on this data to search for biomarkers of OBP-702. We divided the anti-tumor mechanism of OBP-702 into elements such as "viral infection," "viral replication," and "p53," and examined factors such as "CAR," "Ki67," and "p53 gene mutations" that were associated with the anti-tumor effect of OBP-702. We regarded these three factors as biomarkers and constructed a scoring system to predict the therapeutic effect of OBP-702, confirming its correlation with the therapeutic effect in vitro.

研究分野: Oncolytic Virus

キーワード: Oncolytic Virus がんウイルス療法 OBP-702 腫瘍融解ウイルス バイオマーカー OBP-301 p53

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん治療においては近年、バイオマーカーに基づく個別化医療がますます重要となつてきている。がんウイルス療法は、高い腫瘍特異性を有し、既存の治療法とは異なるメカニズムで細胞死を誘導する新規治療法のひとつである。申請者らは、現在臨床試験段階にあるテロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルス(OBP-301)を基本骨格とし、より強力な治療効果を発揮する次世代型ウイルス治療薬として、p53 がん抑制遺伝子を搭載した腫瘍融解アデノウイルス(OBP-702)を開発した。本研究では、約 50 種のヒトがん細胞株を使用して、OBP-702 の治療関連バイオマーカーの 同定を行い、その効果予測システムの構築を目指す。

2. 研究の目的

当研究室では、OBP-301 の開発段階において分子生物学的特徴や生体内分布に関する解析を行い、またヒト食道がん細胞株に対する放射線との相乗効果に着目し、食道がん患者と対象とした放射線との併用療法に関する臨床試験を行ってきた。OBP-702 は OBP-301 を基本骨格としつつも、細胞の生死に大きな影響を及ぼす p53 遺伝子を有する点でその治療メカニズムは異なる点が存在する。本研究では OBP-702 に関しても同様に、多数のヒトがん細胞株を用いてその有効性を検証し、有効ながん腫や治療関連バイオマーカーを同定し、その効果予測システムを構築することを目的としている。現段階では、がんウイルス療法における普遍的な、あるいは特異的なバイオマーカーの報告はなく、OBP-702 の今後の臨床開発の方向性を示すだけでなく、がんウイルス療法に普遍的なバイオマーカーの同定につながる可能性も秘めている。

3. 研究の方法

今回、OBP-702 の効果予測システムの構築を目指すにあたって、研究全体を、①データベースの作成、②データベースを用いた効果予測因子の特定、③治療効果予測システムの構築、④治療効果予測システムの検証、という 4 つの段階に分け進めていくこととした。

データベースの作成

約 50 種のヒトがん細胞株に対する OBP-702 の細胞障害活性を検証し、50%阻害濃度(IC50 値)を算出し、これを OBP-702 の治療効果データベースとした。また OBP-702 に加え、OBP-301(ウイルス増殖により細胞死を引き起こす)、Ad-p53(感染後発現する p53 により治療効果を示す)も同様に細胞障害活性を検証して IC50 値を算出し、効果因子特定のための比較・検証に用いた。

データベースを用いた効果予測因子の特定

OBP-702 の治療メカニズムは、“ウイルスの感染”、“ウイルスの複製”、“p53 の作用”の 3 つに大別される。それぞれに関連する因子について IC50 値との相関性を検証することで効果予測因子の特定を行った。

ウイルスの感染に関連する因子：OBP-702 の基本骨格である 5 型アデノウイルスは、コクサッキー・アデノウイルス受容体 (CAR)やインテグリン α 3、インテグリン α 5 を介して細胞に感染することが知られている。ここでは Ad-GFP を使用し(Ad-GFP は感染後増殖しないため GFP の発現量が感染したウイルス量と相関する)、各細胞株における CAR やインテグリンの発現量と GFP との相関性を検証した。

ウイルスの複製に関連する因子：アデノウイルスの二本鎖 DNA は宿主の核内で転写・複製が行われるため、宿主細胞の細胞増殖に関連する因子(倍加時間[doubling time] や Ki67 など)との関連が想定される。ここでは、OBP-301 を使用し(OBP-301 はウイルス増殖により細胞死を引き起こすため、その治療効果[IC50 値]はウイルス複製能を表す指標となる)、各細胞株における doubling time や Ki67 などの因子と OBP-301 の IC50 値との相関性を検証した。

p53 の作用に関連する因子：p53 遺伝子はヒト腫瘍の約 50~70%で変異または欠失しており、この p53 のステータスによって、p53 遺伝子導入時の治療効果が異なることが想定される。ここでは、Ad-p53 を使用し(Ad-p53 の治療効果は主に感染後発現する p53 による影響である)、各細胞株の p53 ステータスと Ad-p53 の IC50 値との相関性を検証した。

治療効果予測システムの構築

上記で探索した因子の中で、相関性の高い因子を抽出し、OBP-702 の治療効果予測システ

ムの構築を行う。臨床で目にする事の多い、スコアリングシステムやノモグラムの作成を想定した。

4. 研究成果

データベースの作成

34種の消化器癌および13種の非消化器癌の計47種類の細胞株を用いて、OBP-702にOBP-301およびAd-p53を含んだ各ウイルスに対する感受性をXTTアッセイで解析し、IC50値を算出することで基盤となるデータベースの作成を行った。OBP-702は全ての細胞株で他のウイルスより優れた抗腫瘍効果を示した。また、OBP-702のIC50値はOBP-301およびAd-p53のIC50値と相関関係(OBP-301: $r=0.69$ 、Ad-p53: $r=0.58$)を示した。

データベースを用いた効果予測因子の特定

ウイルスの感染に関連する因子: 47種の細胞株に対してflow cytometryを行い、CAR、インテグリン $\alpha 3$ 、インテグリン $\alpha 5$ の発現を検証し、Ad-GFP投与後のGFP発現量との相関性を検証した。GFP発現量とCARの発現には比較的強い相関関係が確認された($r=0.65$)のに対して、インテグリン $\alpha 3$ とインテグリン $\alpha 5$ の発現に対しては相関がほぼ見られなかった(インテグリン $\alpha 3$: $r=0.26$ 、インテグリン $\alpha 5$: $r=0.14$)。またCARが比較的高発現である細胞株SW48と発現の見られない細胞株RKOに対してCAR抗体を投与し発現をblockした後に、OBP-702の細胞障害活性を検証すると、SW48では細胞障害活性の減衰が確認されたが、RKOにおいては抗体投与前後で細胞障害活性に変化が見られなかった。以上の結果より、CARがOBP-702の治療効果予測因子であると考えられた。

ウイルスの複製に関連する因子: で作成したデータベースよりOBP-301が強い細胞障害活性を示した細胞株と障害活性が比較的弱い細胞株を選択し、doubling timeを観察したところ、強い障害活性を示した細胞株においてdoubling timeが短い傾向が確認された。ウイルスの効果が細胞増殖速度に関連すると考え、細胞増殖の指標の一つとされるKi67の発現をflow cytometryにて検証し、OBP-301のIC50値との相関性を検証した。doubling timeとKi67の発現に関しては、 $r=0.76$ と強い相関関係を示すことを確認している。OBP-301のIC50値とKi67の発現には $r=-0.43$ と相関関係が認められ、Ki67の発現が治療効果予測因子となる可能性が示唆された。

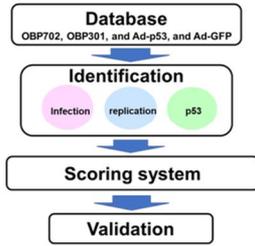
p53の作用に関連する因子: 各細胞株のp53ステータスとAd-p53のIC50値との関係性を検証した。47種の細胞株の内、p53遺伝子変異は13種に認められた。p53遺伝子変異を有する細胞株と有さない細胞株でAd-p53のIC50値を比較したところ、遺伝子変異を有する細胞株において有意にIC50値が低い傾向にあった($p<0.01$)。

治療効果予測システムの構築

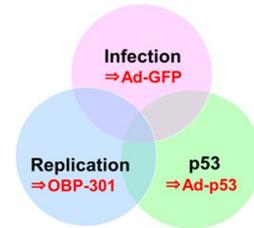
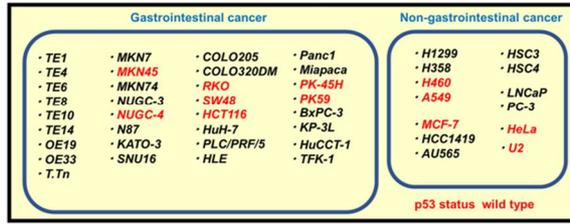
上記で探索した結果、「CAR」、「Ki67」、「p53遺伝子変異」がOBP-702の治療効果予測因子となる可能性が示唆された。この3因子を用いて、OBP-702の治療効果予測システムの構築を行った。最終的にスコアリングシステムを採用し、上記3因子の発現ステータスを基に0~6点の7段階で評価を行った。スコアと既存のデータベースでのIC50値は $r=-0.58$ と相関を示し、低得点(3点以下)と高得点(4点以上)とに分けた場合、高得点群で有意にIC50値が低かった($p<0.01$)。

治療効果予測システムの検証

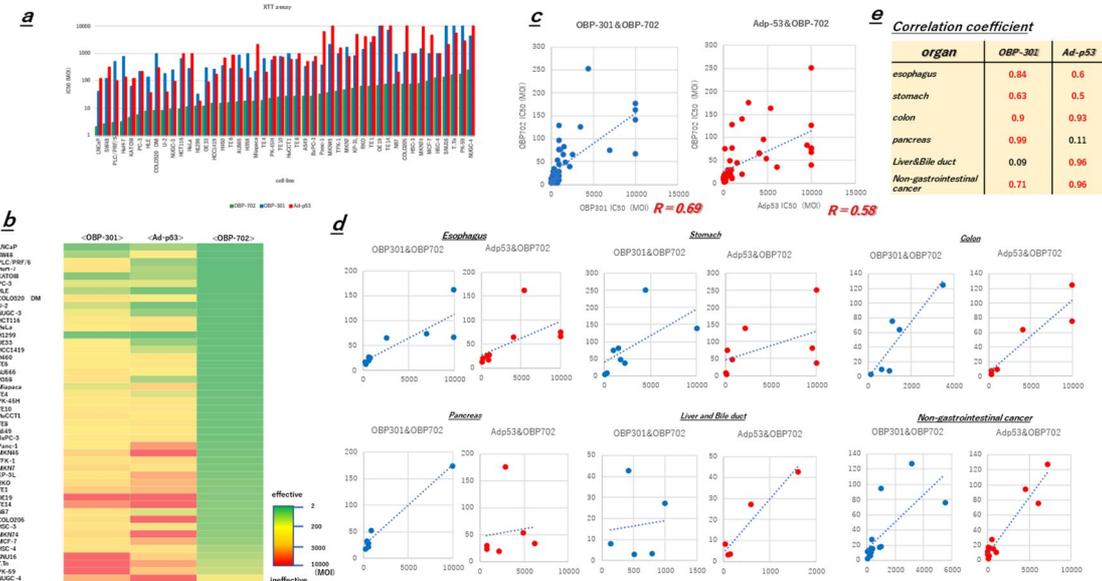
細胞株をmixし、『未知の細胞』と見立てることでin vitroでの効果判定を行った。消化器癌細胞株を用い、同臓器の細胞株2~3種類を共培養することでmix細胞株を作成した。24種のmix細胞株を作成し、「CAR」、「Ki67」、「p53遺伝子変異」に関して評価を行い、前述のスコアリングシステムにて採点した。OBP-702をmix細胞株に投与し、IC50値を算出して、スコアとの相関性を検証したところ、 $r=-0.59$ と相関を示した。また低得点(3点以下)と高得点(4点以上)とに分けた場合、高得点群で有意にIC50値が低かった($p<0.01$)。以上のことより、今回構築したスコアリングシステムがOBP-702の抗腫瘍効果を予測するシステムになりうる可能性が示唆された。



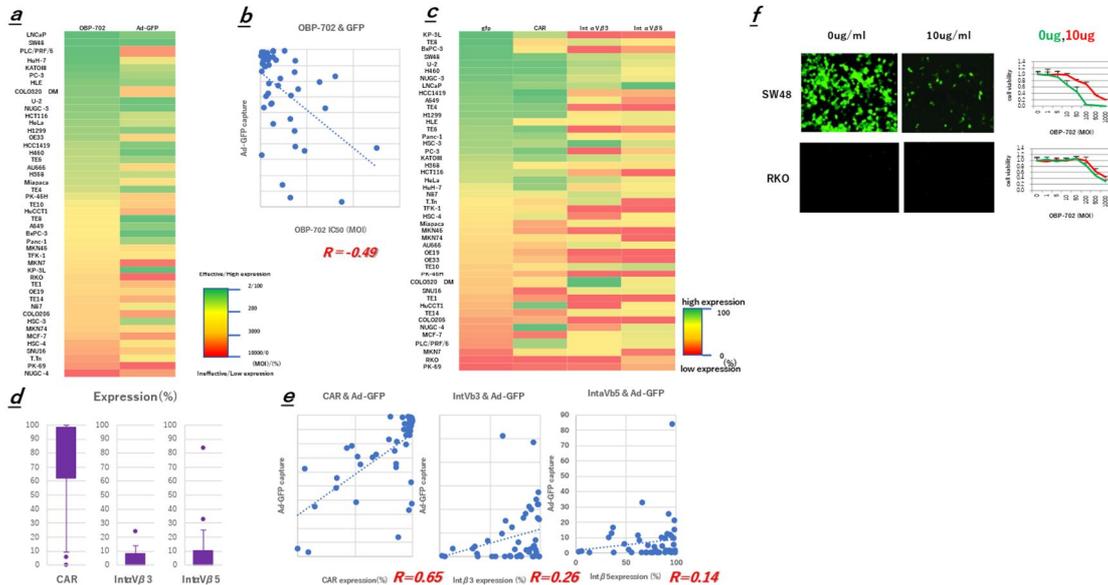
We used 46 cancer cell lines from various organs



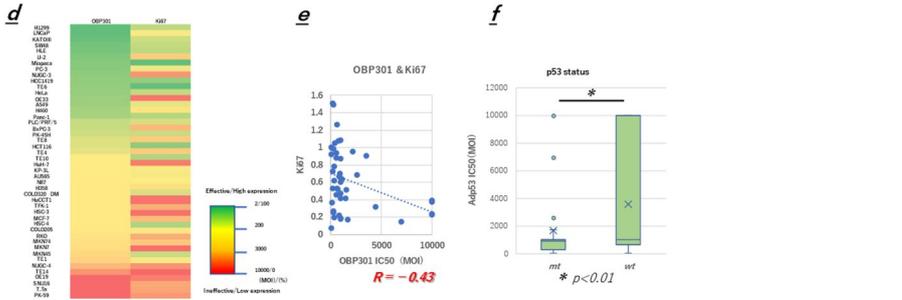
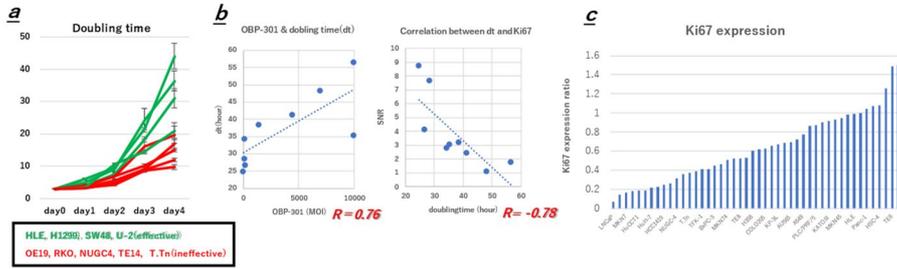
I. OBP-702 shows better antitumor effect and correlates with the effects of other viruses.



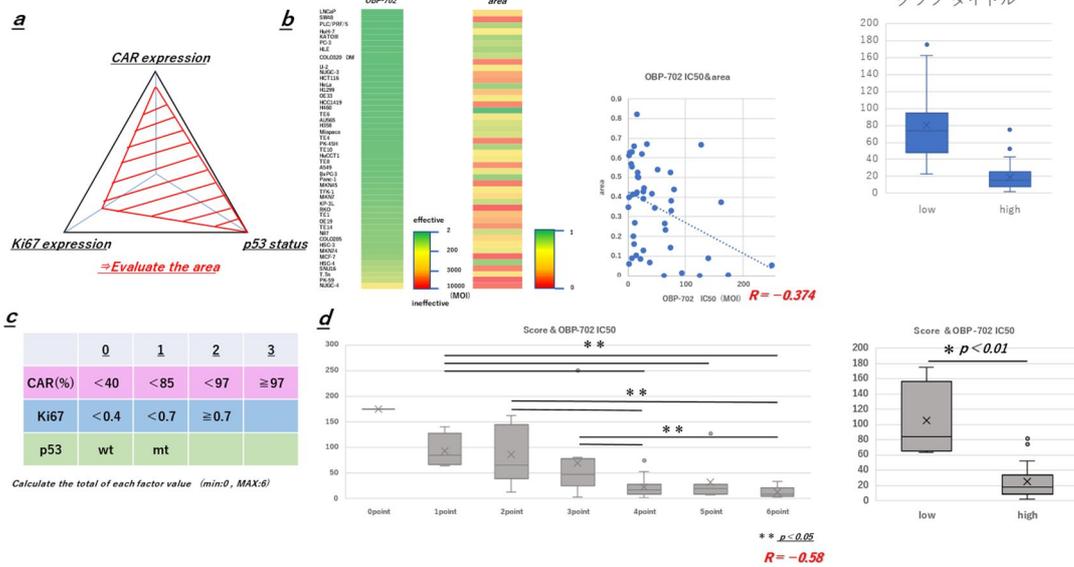
II. The expression of CAR and the uptake of Ad -GFP show a correlation.



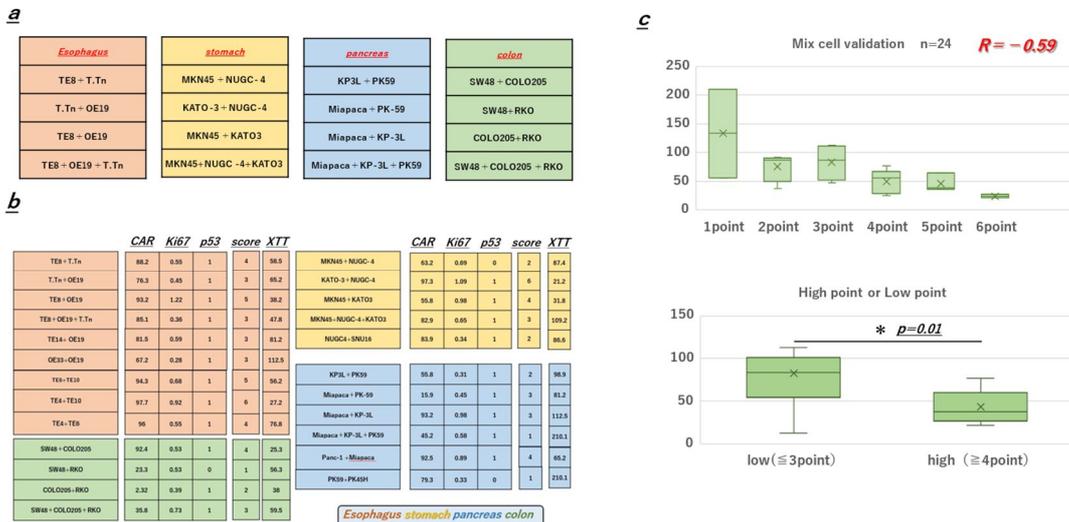
III. Ki67 expression and p53 status can be predictors of OBP -702 effect.



IV. A scoring system was the most suitable evaluation system.



V. The scoring system makes it possible to predict the effect of OBP -702.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryoma Sugimoto
2. 発表標題 Biomarkers predicting the antitumor effect of p53-armed telomerase specific oncolytic adenovirus
3. 学会等名 遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryoma Sugimoto
2. 発表標題 Scoring system to predict antitumor effects of p53-armed telomerase-specific oncolytic adenovirus
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2022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
---------	---------