

平成30年6月12日現在

機関番号：86301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10444

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍に対する腫瘍融解ウイルス療法の個別化医療の確立

研究課題名(英文) Preclinical analysis of oncolytic adenovirus infection to patient-derived tumor specimens of bone and soft tissue tumors

研究代表者

魚谷 弘二 (Koji, Uotani)

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター(臨床研究センター)・その他部局等・医師

研究者番号：30708087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本学で開発された腫瘍融解アデノウイルス(テロメライシン)は効果発現にCARやhTERTの存在が必要で、骨軟部腫瘍へのウイルスの臨床応用にむけた適応症例の選別のために簡便にその評価を行う必要がある。今回、本学で開発したテロメライシンにGFP遺伝子を組み込み細胞内のウイルス増殖により緑色蛍光を発するテロメスキャンを骨軟部悪性・中間悪性腫瘍に感染させ蛍光発現を評価した。ウイルス投与24時間後の蛍光陽性数はCARの発現強度との相関が有意に認められ、経時的な蛍光の増強にhTERTの発現が関連する傾向が見られた。テロメライシンの肉腫への適応をウイルスの組織片への投与のみで評価できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The oncolytic adenovirus (Telomelysin) developed at our university replicates under the presence of CAR and hTERT for the expression of its effect, and it is necessary to evaluate the presence for screening of the adaptive case for clinical application of the viral therapy against the bone soft tissue tumor. TelomeScan was also developed at our university, which was integrated with GFP gene and emitted green fluorescence by intracellular virus multiplication. In this study, malignant bone soft malignant / intermediate malignant tumor was infected with TelomeScan and fluorescence expression was evaluated. The correlation between the fluorescence positive number at 24 hours after viral administration and the expression intensity of CAR was significantly observed. The expression of hTERT tended to be related to the enhancement of fluorescence time-dependently. The adaptable cases with sarcoma for Telomelysin could be evaluated only by administration of TelomeScan to clinical specimens.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：肉腫 ウイルス治療 腫瘍融解アデノウイルス

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：86301

研究種目：平成 27 年度 基盤研究 (C)

研究期間：平成 27 年度～平成 29 年度

課題番号：15K10444

研究課題名（和文） 骨軟部腫瘍に対する腫瘍融解ウイルス療法の個別化医療の確立

研究課題名（英文） Development of oncolytic-viral therapy for bone and soft tissue sarcoma.

研究代表者 魚谷 弘二 (Koji Uotani)

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター・レジデント

研究者番号：30708087

研究成果の概要（和文）：本学で開発された腫瘍融解アデノウイルス(テロメライシン)は効果発現に CAR や hTERT の存在が必要で、骨軟部腫瘍へのウイルスの臨床応用にむけた適応症例の選別のために簡便にその評価を行う必要がある。今回、本学で開発したテロメライシンに GFP 遺伝子を組み込み細胞内のウイルス増殖により緑色蛍光を発するテロメスキャンを骨軟部悪性・中間悪性腫瘍に感染させ蛍光発現を評価した。ウイルス投与 24 時間後の蛍光陽性数は CAR の発現強度との相関が有意に認められ、経時的な蛍光の増強に hTERT の発現が関連する傾向が見られた。テロメライシンの肉腫への適応をウイルスの組織片への投与のみで評価できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The oncolytic adenovirus (Telomelysin) developed at our university replicates under the presence of CAR and hTERT for the expression of its effect, and it is necessary to evaluate the presence for screening of the adaptive case for clinical application of the viral therapy against the bone soft tissue tumor. TelomeScan was also developed at our university, which was integrated with GFP gene and emitted green fluorescence by intracellular virus multiplication. In this study, malignant bone soft malignant / intermediate malignant tumor was infected with TelomeScan and fluorescence expression was evaluated. The correlation between the fluorescence positive number at 24 hours after viral administration and the expression intensity of CAR was significantly observed. The expression of hTERT tended to be related to the enhancement of fluorescence time-dependently. The adaptable cases with sarcoma for Telomelysin could be evaluated only by administration of TelomeScan to clinical specimens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：整形外科学 骨軟部腫瘍

キーワード：整形外科学、骨・軟部腫瘍学、テーラーメイド医療

1. 研究開始当初の背景

本学で開発し、現在食道癌に対して第 II 相臨床試験を行っている腫瘍融解ウイルス(OBP-301:テロメライシン)は、コクサッキー・アデノウイルス受容体(CAR)を通じて細胞へ感染後、腫瘍に特異的に発現しているテロメラーゼ活性に依存的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。一方骨軟部腫瘍は、外科的切除・

化学療法・放射線治療を主体とした治療戦略の進歩により治療予後は改善傾向にあるものの、治療抵抗性を示したり、良性腫瘍であっても再発を繰り返したり、転移を起こしたりする予後不良のものがある。そのため骨軟部腫瘍に対する新たな治療法の確立は、今もなお大きな課題である。

2. 研究の目的

本研究では、再発や切除の困難な骨軟部腫瘍症例を中心とした骨軟部腫瘍に対するテーラーメイド医療を目指し、ウイルス療法の骨軟部腫瘍患者への応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

①ウイルス：本学で開発された OBP-401 (テロメスキャン) を用いた。OBP-401 はテロメラゼ特異的に増殖するアデノウイルスの *hTERT* プロモーター領域に E1A と E1B 遺伝子を組み込んだ OBP-301 (テロメライシン) の E3 領域に GFP 遺伝子を組み込んだウイルスである。

②細胞株：滑膜肉腫細胞株 SYO-1、粘液線維肉腫細胞株 NMFH-1、Ewing 肉腫細胞株 SK-ES-1 を使用した。

③臨床腫瘍検体：本学の倫理委員会に承認を受け、同意の得られた当科で診断・治療した骨軟部腫瘍 73 検体を対象とした (Table 1)。

④細胞株に対するテロメスキャンの感染：96 ウェルプレートに細胞株を 100 個ずつまき、24 時間後にテロメスキャンを投与した。テロメスキャンは 0.1 から 200MOI の濃度で各群を N=3 ずつに分けた。ウイルス増殖を GFP の測定により観察した。

⑤臨床腫瘍検体に対するテロメスキャンの感染：術中に採取した腫瘍検体を細切し、ウイルス投与群、非投与群に分け培養した。培養開始時のウイルス投与後 24 および 48 時間以後に GFP 蛍光発現を確認し、*hTERT* の発現を PCR で、CAR の発現を免疫染色で評価した。

GFP の計測は Extended focus imaging (EFI) を用いてテロメスキャンを感染させた腫瘍組織片を撮影し、腫瘍全体の視野における GFP 陽性部分の面積を算出した。

⑥臨床腫瘍検体からの Patient-derived xenograft (PDX) の作成：本学動物実験委員会の承認を受け、術中に採取し細切した腫瘍組織を 4 週齢メスの BALB/c nu/nu マウスの臀部皮下に移植した。

⑦PDX における腫瘍へのテロメスキャンの感染傾向：PDX の腫瘍内へ経皮的に 1.0×10^8 PFU テロメスキャンを接種した。接種後 48 時間後における腫瘍へのウイルス投与による蛍光発現を観察した。

4. 研究成果

ヒト骨軟部肉腫細胞株へのテロメスキャン感染による蛍光発現と抗腫瘍効果

ヒト骨軟部肉腫細胞株 (SYO-1, NMFH-1, SK-ES-1) に対して、濃度別にテロメスキャンを投与し、接種後 24、48、96 時間後に観察すると、ウイルスの濃度依存的、経時的に蛍光強度は増強した (Fig 1A, 1B)。また、WST-1 を用いた抗腫瘍効果の評価では、テロメスキャンによる抗腫瘍効果は各細胞株で 50MOI 以上で観察されることがわかった (Fig. 1C)。

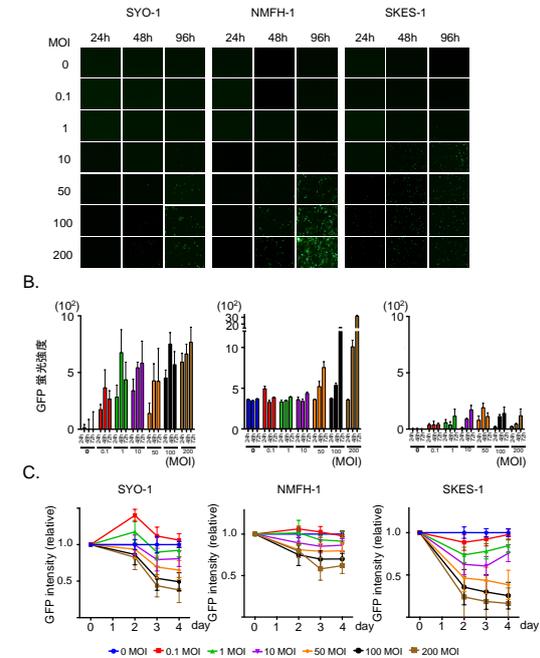


Figure 1. 骨軟部腫瘍細胞株における OBP-401 の抗腫瘍効果。(A) SYO-1, NMFH-1, SK-ES-1 の蛍光顕微鏡像。用量依存的に OBP-401 を感染させ、24、48、96 時間で GFP 蛍光を観察した。(B) GFP 蛍光をマルチプレートリーダーを用いて計測した。データは mean \pm S. D.。(C) 7 種類のウイルス容量における細胞生存能を WST-1 assay でウイルス感染後 2、3、4 日目に計測した。

臨床腫瘍における悪性度とテロメスキャンの増殖能の関連

臨床腫瘍検体 (Table 1) におけるテロメスキャンの感染・増殖が GFP 蛍光により観察可能かを蛍光顕微鏡を用いて評価した (Fig. 2A)。GFP 蛍光強度を感染 24 時間の時点での測定と感染 24 時間後から 48 時間後での変化の測定により評価した。感染 24 時間後時点で GFP 蛍光を認める面積が全体の 0.1%未満を陰性、以上を陽性として評価し、感染 24 時間後から 48 時間後で GFP 傾向を認める面積の割合が 2 倍以上となった場合を増強、未満を不変と評価した。

結果として、良性群と悪性群 (悪性+中間悪性) では感染 24 時間後時点での GFP 蛍光強度に有意差はなく、感染後 24 時間から 48 時間

での GFP 蛍光強度の変化は良性群に比べ悪性群で有意に増強した (Fig 2B, 2C)。

Table 1. Demographics of the tumors evaluated in this study

Malignant	Number (without evaluation of CAR)	Intermediate	Number (without evaluation of CAR)
UPS	9 (0)	DFSP	2 (0)
MFS	8 (1)	GCT	2 (0)
Deedifferentiated LPS	7 (1)	SFT	2 (1)
OS	4 (1)	Total	6
MPNST	6 (0)		
Chondrosarcoma	4 (0)		
LMS	4 (0)	Benign	Number (without evaluation of CAR)
SS	2 (0)	Schwannoma	10 (9)
Myxoid LPS	2 (0)	GCTTS	2 (0)
CCS	1 (0)	Lipoma	2 (2)
Diffuse B-cell lymphoma	1 (0)	Angioleiomyoma	1 (0)
Pleomorphic LPS	1 (0)	Chondroblastoma	1 (1)
ASPS	1 (1)	PVNS	1 (0)
Total	50	Total	17

Abbreviations: UPS: Undifferentiated pleomorphic sarcoma, MFS: Myxofibrosarcoma, LPS: Liposarcoma, OS: Osteosarcoma, MPNST: Malignant peripheral nerve sheath tumor, LMS: Leiomyosarcoma, SS: Synovial sarcoma, CCS: Clear cell sarcoma, ASPS: Alveolar soft part tissue sarcoma, DFSP: Dermatofibrosarcoma protuberans, GCT: Giant cell tumor, SFT: Solitary fibrous tumor, GCTTS: Giant cell tumor of tendon sheath, PVNS: Pigment villonodular synovitis

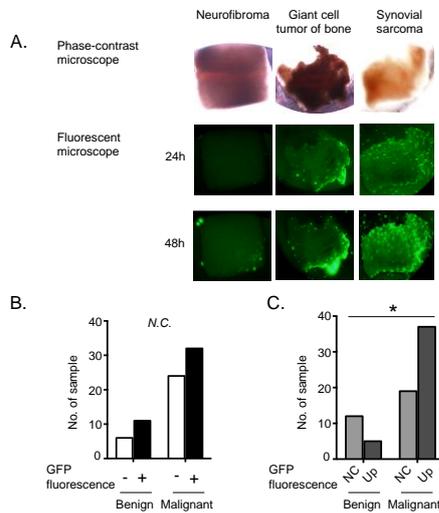


Figure 2. 臨床腫瘍検体に対する OBP-401 の感染。 (A) OBP-401 感染後 24、48 時間後の写真。上段は位相差顕微鏡像、中下段は蛍光顕微鏡像。(B) 24 時間後の良性群、悪性群における GFP 蛍光を示すサンプル数の比較。(C) ウイルス感染後 24 時間後から 48 時間後における良性群、悪性群の GFP 蛍光強度の増加を示すサンプル数の比較。* $p < 0.05$; Fisher's exact test

臨床腫瘍検体における CAR および *hTERT* の発現

良性群と悪性群における CAR と *hTERT* の発現の違いを評価するために、臨床腫瘍組織に対して CAR を免疫染色で、*hTERT* を PCR で測定した。すべての CAR 陽性症例では細胞質性および細胞膜性の分布を示した (Figure 3A)。CAR の発現は negative もしくは weak が 8/67 例 (11.9%)、strong が 59/67 (88.1%) であった (Figure 3B, $p < 0.05$)。一方で、CAR の発

現は患者の年齢や性別とは関連がなかった (Table 2)。

hTERT の発現に関しては PCR における *hTERT* と *HPRT* の Ct 値の差 (ΔCt) を計算し、0: No Ct, 1: $\Delta Ct \geq 10$, 2: $10 \geq \Delta Ct \geq 0$, 3: $0 \geq \Delta Ct$ とスコアリングを行った。さらにスコアに従い、0,1 = negative、2,3 = positive とすると、negative は 59/77 (77.6%)、positive は 18/77 (23.4%) であった。悪性群では良性群よりも有意に *hTERT* の発現が高かった (Figure 3C, $p < 0.05$)。一方で、*hTERT* の発現は年齢や性別とは関連がなかった (Table 2)。

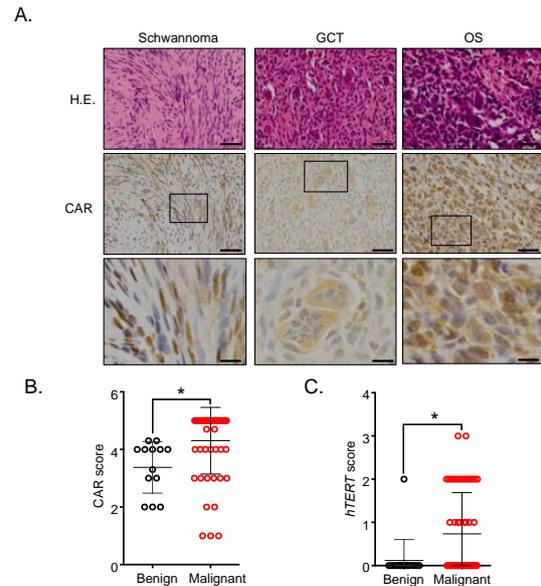


Figure 3. 臨床腫瘍検体における CAR と *hTERT* の発現の評価。 (A) CAR に対する免疫組織染色。上段: H.E. bar:50 μ m、中段: CAR bar:50 μ m、下段 CAR 強拡大 bar:10 μ m。(B) 良性群と悪性群における CAR スコアの比較。* $p < 0.05$; unpaired *t*-test (C) 良性群と悪性群における *hTERT* の発現の比較。* $p < 0.05$; unpaired *t*-test

Table 2. Characteristics of patients in each group

	CAR expression			<i>hTERT</i> expression		
	Weak (N = 16)	Strong (N = 51)	<i>P</i>	Negative (N = 59)	Positive (N = 18)	<i>P</i>
Age (yrs.)	54.3 \pm 5.5	58.0 \pm 3.0	0.566	54.4 \pm 2.9	59.4 \pm 5.4	0.415
Gender						
Male	7	28	0.623	29	11	0.536
Female	9	23		30	7	

悪性群の臨床腫瘍検体における OBP-401 感染後の GFP 蛍光の変化と CAR および *hTERT* の発現の関連

OBP-401 感染後 24 時間での GFP 蛍光発現の程度は CAR が強発現であることと有意に関連していた。また OBP-401 感染後 24-48 時間での GFP 蛍光強度の変化は hTERT 発現が positive であることと有意に関連していた (Fig 4A-4D)。

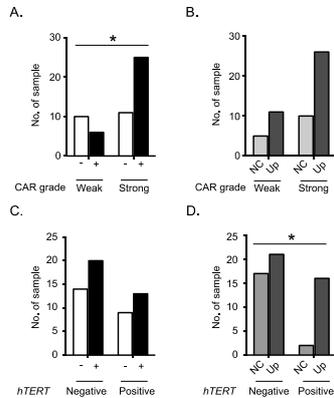


Figure 4. 悪性群の臨床検体における OBP-401 感染後の GFP 蛍光発現と CAR と hTERT 発現の関連。 (A) CAR grade と OBP-401 感染 24 時間後の GFP 蛍光を示す症例数の関連。 (B) CAR grade と OBP-401 感染 24 時間後から 48 時間後の GFP 蛍光の増強を示す症例の関連。 (C) hTERT の発現の有無と OBP-401 感染 24 時間後の GFP 蛍光を示す症例数の関連。 (D) hTERT の発現の有無と OBP-401 感染 24 時間後から 48 時間後の GFP 蛍光の増強を示す症例の関連。 * $p < 0.05$; Fisher's exact test

臨床腫瘍検体からの Patient-derived xenograft (PDX) の作成

19 症例の臨床腫瘍検体をマウス臀部に接種し、PDX として確立できてものは 3 例 (15.8%) であった。

PDX における腫瘍へのテロメスキャンの感染傾向

PDX の腫瘍部への OBP-401 注射および PBS 注射群にわけ投与後 48 時間後に蛍光顕微鏡で観察すると、OBP-401 注射群では蛍光像を得ることができ、組織切片の GFP に対する免疫染色では穿刺部に沿って GFP 陽性となっていた (Figure 5)。

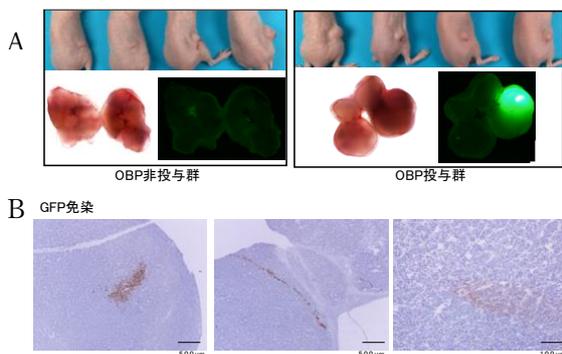


Figure 5 PDX の腫瘍部に対する OBP-401 の投与。 (A) PDX への OBP-401 投与および非投与 (PBS) 群の投与 48 時間後のマクロ像および腫瘍断面の位相差像と蛍光顕微鏡像。 (B) 腫瘍組織切片の GFP 免疫染色像。

今回の我々の研究から、骨軟部悪性腫瘍に対して OBP-401 感染による GFP 蛍光発現を評価することで、CAR および hTERT の発現を間接的に評価できる可能性が示唆された。OBP-301 による術前の腫瘍ボリュームの減少や局所再発の減少、集学的治療における併用効果を目指したウイルス治療を行うために、OBP-401 を用いることで適切な症例を選別できる可能性が示された。

PDX への OBP-401 投与とウイルスの増加は蛍光顕微鏡で確認でき、ウイルスの増殖は穿刺部周辺から大きくは広がらない印象であった。このことから臨床での腫瘍へのウイルス投与の際には多数箇所から行うなど、投与方法に対する検討を行うことが重要であると思われた。今後も OBP-301 の臨床応用に向けて PDX を用いたウイルスの抗腫瘍効果などを検討していく必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会

吉田 晶、魚谷弘二、藤原智洋、長谷井嬢、森田卓也、清野正普、杉生和久、小松原将、望月雄介、国定俊之、藤原俊義、尾崎敏文

〔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〕

ホームページ等

特記なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

魚谷 弘二 (Koji Uotani)

独立行政法人国立病院機構四国がんセンター・レジデント

研究者番号：30708087

(2) 研究分担者

尾崎 敏文 (Toshifumi Ozaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40294459

藤原 俊義 (Toshiyoshi Fujiwara)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00304303