

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10446

研究課題名(和文) 腫瘍融解ウイルス治療と放射線治療の併用による骨軟部肉腫に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment strategy against bone and soft tissue sarcoma by combination of tumor-specific oncolytic adenovirus and radiotherapy

研究代表者

杉生 和久 (Sugiu, Kazuhisa)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10708340

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)：骨軟部肉腫は治療抵抗性を示すものがあり、現行の標準治療でも未だ予後不良の転帰をたどる症例も多いことから新規治療法の開発が望まれている。腫瘍融解ウイルス(Telomelysin、OBP-301)は骨軟部肉腫に対して強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかにされている。本研究では、骨軟部肉腫に対するTelomelysinと放射線治療の併用治療効果について検討した。Telomelysinと放射線治療の併用治療は、骨軟部肉腫に対して強力な抗腫瘍効果を認め、有用な新規治療法となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Despite major advances in the treatment of bone and soft tissue sarcoma, those patients often show the refractory to conventional treatment, leading to poor prognosis. Therefore, the enhancement of sensitivity to radiotherapy is needed to improve the clinical outcome of bone and soft tissue sarcoma patients. We recently revealed that a tumor-specific, replication-competent oncolytic adenovirus Telomelysin (OBP-301) kills human sarcoma cells. In this study, we investigated the combination effect of Telomelysin and radiotherapy against human bone and soft tissue sarcoma cells. Combination with Telomelysin and radiotherapy showed more profound antitumor effect compared to monotherapy in vitro and in vivo. These results suggest that combination with Telomelysin and radiotherapy provides a novel therapeutic strategy for bone and soft tissue sarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：腫瘍融解アデノウイルス 骨・軟部肉腫 放射線治療 併用療法

#### 1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は治療抵抗性を示すものがあり、現行の標準治療でも未だ予後不良の転帰をたどる症例も多いことから新規治療法の開発が望まれている。腫瘍融解ウイルス (Telomelysin, OBP-301) は骨軟部肉腫に対して強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかにされている。骨軟部肉腫に対する Telomelysin と放射線治療の併用効果は未だ明らかになっておらず、本研究により、骨軟部肉腫でも上皮系腫瘍と同様に併用効果がもたらされれば、放射線感受性のある骨軟部肉腫の治療をさらに効果的にするとともに、従来は放射線治療による効果が期待できないとされてきた骨軟部肉腫に対しても有効な治療戦略となる可能性がある。

#### 2. 研究の目的

骨軟部肉腫に対する Telomelysin と放射線治療の併用による抗腫瘍効果を検討し、骨軟部肉腫に対する新規の治療となりうるかどうかを明らかにすること

#### 3. 研究の方法

単独治療と併用治療による細胞障害活性やアポトーシス増加の比較、併用によって得られる相乗効果のメカニズム解析などを *in vitro* で検討する。

腫瘍移植マウスモデルを作成し、単独治療と併用治療での腫瘍増殖抑制効果を比較検討し、細胞増殖や細胞死に関する組織学的評価を行う。

#### 4. 研究成果

*in vitro* において、Ewing 肉腫 (SK-ES-1、RD-ES)、滑膜肉腫 (SYO-1)、骨肉腫 (HOS、U2OS)、悪性末梢神経鞘腫瘍 (NMS-2)、線維肉腫 (HT1080) の細胞株を用いて放射線治療単独による細胞障害活性を XTT assay で評価した。NMS-2、HT1080 は放射線治療に対して比較的抵抗性を示した。無治療群、腫瘍融解ウイルス (Telomelysin, OBP-301) 単独治療、放射線治療単独、Telomelysin と放射線治療との併用で XTT assay を行い、細胞障害活性を比較検討した。また、CalcuSyn software (BioSoft) を用いて combination index を算出し、Telomelysin と放射線治療の併用による相乗効果を検討した。用いた 7 種類の腫瘍細胞すべてにおいて、Telomelysin、放射線治療単独と比較して Telomelysin と放射線治療の併用では抗腫瘍効果の増強を認め、併用治療による相乗効果を示した。

併用療法における腫瘍細胞のアポトーシスを SK-ES-1・SYO-1・HT1080・HOS を用いて Western blot で cleaved PARP の発現を確認することにより評価した。いずれの細胞株においても、Telomelysin と放射線治療の併用群では放射線単独治療群と比較して cleaved PARP 発現の増強を認めた。この結果より、Telomelysin は放射線治療によるアポトーシスを増強させることが示唆された。

次に、SK-ES-1 に放射線治療単独あるいは

放射線治療・Telomelysin の併用処理を行い、DNA2 本鎖障害によって発現する  $\gamma$ H2AX を Western blot で確認した。Telomelysin との併用療法では放射線単独治療と比較して、放射線照射後に  $\gamma$ H2AX が長時間発現することが確認された。また、蛍光免疫染色でも同様の結果が確認された。この結果から、Telomelysin により DNA2 本鎖切断の修復阻害が遷延することが示唆された。

さらに、SK-ES-1 および HT1080 を用いた腫瘍移植マウスモデルを作成し、放射線治療と Telomelysin の併用治療効果を検討した。いずれの細胞株においても、併用治療群はコントロール群、放射線単独治療群と比較して優位に腫瘍増殖を抑制した。また、組織学的検討においては、Ki-67 陽性細胞が有意に減少し、TUNEL 陽性細胞が有意に増加していた。この結果から、Telomelysin はマウスモデルにおいても放射線感受性を増強させることが示唆された。

Telomelysin による放射線感受性増強の分子メカニズムを解明するために、SK-ES-1 と HT1080 における抗アポトーシス BCL2 ファミリー蛋白 (MCL1) の発現を Western blot により検討した。MCL1 は SK-ES-1 および HT1080 のいずれにおいても発現しており、Telomelysin 処理によりその発現が抑制された。放射線治療と Telomelysin の併用療法において、放射線治療によるアポトーシス増強に一致して、Telomelysin は MCL1 の発現を抑制した。さらに、MCL1 siRNA は MCL1 発現を抑制し、Telomelysin と同様に放射線治療によるアポトーシス誘導を増強した。Telomelysin の放射線によるアポトーシス誘導増強において、MCL1 発現の抑制が重要な因子であることが示唆された。

#### 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 1 件)

Yasuaki Yamakawa, Hiroshi Tazawa, Joe Hasei, Shuhei Osaki, Toshinori Omori, Kazuhiisa Sugiu, Tadashi Komatsubara, Kouji Uotani, Tomohiro Fujiwara, Aki Yoshida, Toshiyuki Kunisada, Yasuo Urata, Shunsuke Kagawa, Toshifumi Ozaki and Toshiyoshi Fujiwara: Role of zoledronic acid in oncolytic virotherapy: Promotion of antitumor effect and prevention of bone destruction, *Cancer Science*, 2017, 1870-1880 (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 大森 敏規, 山川 泰明, 長谷井 嬢, 田澤 大, 尾崎 修平, 杉生 和久, 藤原 智洋, 国定 俊之, 浦田 泰生, 藤原 俊義, 尾崎 敏文: 骨・軟部肉腫に対する腫瘍融解アデノウイルスと放射線療法の併用効果, 第 88 回日本整形外科学会学術総会, 神戸, 2015/5/21-24

2. 大森 敏規, 山川 泰明, 長谷井 嬢, 田澤大, 尾崎 修平, 杉生 和久, 藤原 智洋, 国定 俊之, 浦田 泰生, 藤原 俊義, 尾崎 敏文: 骨・軟部肉腫に対する腫瘍融解アデノウイルスと放射線療法の併用効果, 第 48 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 高松, 2015/7/9-10
3. Toshinori Omori, Yasuaki Yamakawa, Joe Hasei, Hiroshi Tazawa, Shuhei Osaki, Tsuyoshi Sasaki, Kazuhisa Sugiu, Tomohiro Fujiwara, Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki, Toshiyoshi Fujiwara: Radiosensitization of bone and soft tissue sarcoma cells by tumor-specific oncolytic adenovirus, 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015/10/8-10
4. 大森 敏規, 山川 泰明, 長谷井 嬢, 田澤大, 尾崎 修平, 杉生 和久, 藤原 智洋, 国定 俊之, 浦田 泰生, 藤原 俊義, 尾崎 敏文: 骨・軟部肉腫に対する腫瘍融解アデノウイルスと放射線療法の併用効果, 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 富山, 2015/10/22-23
5. Toshinori Omori, Yasuaki Yamakawa, Joe Hasei, Hiroshi Tazawa, Tomohiro Fujiwara, Tadashi Komatsubara, Shuhei Osaki, Tsuyoshi Sasaki, Kazuhisa Sugiu, Aki Yoshida Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki, Toshiyoshi Fujiwara: A novel treatment strategy for bone and soft tissue sarcomas with combination therapy of tumor-specific oncolytic adenovirus and radiation, Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, Orland, Florida, 2016/3/5-8
6. 大森敏規, 山川泰明, 長谷井 嬢, 田澤大, 尾崎修平, 杉生和久, 藤原智洋, 国定俊之, 浦田泰生, 藤原俊義, 尾崎敏文: 骨・軟部肉腫に対する腫瘍融解ウイルスの放射線増感作用, 第 49 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 東京, 2016/07/14-15
7. Tadashi Komatsubara, Toshinori Omori, Hiroshi Tazawa, Kazuhisa Sugiu, Yusuke Mochizuki, Yasuaki Yamakawa, Syuhei Osaki, Joe Hasei, Kouji Uotani, Tomohiro Fujiwara, Toshiyuki Kunisada, Yasuo Urata, Toshifumi Ozaki, Toshiyoshi Fujiwara: Radiosensitization of telomerase-targeted oncolytic adenovirus against human soft-tissue sarcoma, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016/10/06-08
8. 大森敏規, 山川泰明, 長谷井 嬢, 田澤大, 尾崎修平, 杉生和久, 藤原智洋, 国定俊之, 浦田泰生, 藤原俊義, 尾崎敏文: 放射線抵抗性を示す骨・軟部肉腫に対する腫瘍融解アデノウイルスの放射線増感作用, 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 福岡, 2016/10/13-14
9. 小松原将 大森敏規 杉生和久 森田卓也 魚谷弘二 吉田晶 藤原智洋 武田健 国定俊之 浦田泰生 尾崎敏文: 軟部肉腫に対する腫瘍融解アデノウイルスと放射線治療の併用効果の検討, 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 福岡, 2016/10/13-14
10. Yusuke Mochizuki, Tomohiro Fujiwara, Toshinori Omori, Shuhei Osaki, Joe Hasei, Kazuhisa Sugiu, Tadashi Komatsubara, Tsuyoshi Sasaki, Toshiyuki Kunisada, Hitoshi Tazawa, Yasuo Urata, Shunsuke Kagawa, Toshiyoshi Fujiwara, Toshifumi Ozaki: Telomerase-specific Oncolytic Adenoviral Therapy Reverses Resistance to Chemotherapy and Radiotherapy in Human Osteosarcoma, Orthopaedic Research Society 2017 Annual Meeting, San Diego, California, 2017/3/21
11. Tadashi Komatsubara, Toshinori Omori, Hiroshi Tazawa, Kazuhisa Sugiu, Yusuke Mochizuki, Yasuaki Yamakawa, Syuhei Osaki, Joe Hasei, Tomohiro Fujiwara, Toshiyuki Kunisada, Yasuo Urata, Toshifumi Ozaki, Toshiyoshi Fujiwara: Molecular radiosensitization in soft tissue sarcomas by telomerase-specific oncolytic adenovirus, American Association for Cancer Research 2017 Annual Meeting, Washington, DC, 2017/4/5
12. 小松原将 大森敏規 望月雄介 杉生和久 長谷井嬢 吉田晶 藤原智洋 国定俊之 浦田泰生 田澤大 藤原俊義 尾崎敏文: 軟部肉腫に対する腫瘍融解アデノウイルスによる放射線治療増感効果の検討, 第 50 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 東京, 2017/7/14
13. Tadashi Komatsubara, Hiroshi Tazawa, Yusuke Mochizuki, Kazuhisa Sugiu, Toshinori Omori, Yasuaki Yamakawa, Syuhei Osaki, Joe Hasei, Tomohiro Fujiwara, Toshiyuki Kunisada, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara, Toshifumi Ozaki: TELOMERASE-SPECIFIC ONCOLYTIC ADENOVIRUS ENHANCES RADIATION-INDUCED APOPTOSIS IN SOFT TISSUE SARCOMA CELLS BY ABLATING ANTI-APOPTIC MCL1 EXPRESSION, Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting 2017, Wailea, Hawaii,

2017/11/8-11  
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

杉生 和久 (SUGIU KAZUHISA)  
岡山大学・医学部・客員研究員  
研究者番号：10708340

##### (2)研究分担者

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授  
研究者番号：00304303

##### (3)研究分担者

尾崎 敏文 (OZAKI TOSHIFUMI)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授  
研究者番号：40294459

##### (4)研究分担者

国定 俊之 (KUNISADA TOSHIYUKI)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80346428

##### (5)研究分担者

藤原 智洋 (FUJIWARA TOMOHIRO)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号：80639211