

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792254

研究課題名(和文) 腺様嚢胞癌細胞に対する新規抗癌ウイルス製剤テロメラインの効果の検討

研究課題名(英文) Antitumor effects of telomerase-specific replication-selective oncolytic viruses for adenoid cystic carcinoma cell lines.

研究代表者

栗原 祐史(kurihara, yuji)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90514969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腺様嚢胞細胞癌に対してテロメラーゼ作動性の癌特異的ウイルス製剤(テロメライン)を用いた新たな治療戦略の早期開発を目指した。その結果、腺様嚢胞癌細胞株において、CARおよびhTERTの発現を認めた。また、両細胞間での効果に差があるものの、テロメライン感染により明らかな抗腫瘍効果を認めた。さらに、両細胞株にGFP作動型テロメラインを感染させたところ、経時的にGFPの発現の増強を認めた。in vivoにおいては、コントロール群と比較したところ、腫瘍の抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We describe the mechanistic basis for synergy of virotherapy. Our data clearly indicate that telomerase-specific replication-selective oncolytic adenoviruses can significantly inhibit ACC cell growth in vitro and in vivo. Moreover, these viruses can be used in an ex vivo diagnostic assay to predict the therapeutic potential of virus in ACC patients.²⁷ This novel technology will affect and contribute to the minimum operative procedure for ACC cancer patients.

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：ウイルス治療

キーワード：ウイルス治療 口腔がん テロメライン 腺様嚢胞細胞癌

1. 研究開始当初の背景

腺様嚢胞癌の発生頻度は頭頸部全腫瘍のわずか 1%未滿とされているが、唾液腺悪性腫瘍としては比較的発生頻度が高く、周囲組織への浸潤傾向が強い腫瘍である。耳下腺、顎下腺のほか口蓋、頬粘膜口唇、口底などの小唾液腺にも生じる。腺様嚢胞癌の治療法は外科的切除が基本であり、その切除域の設定は神経周囲浸潤を考慮して、通常扁平上皮癌を切除する場合よりさらに安全域をとるべきという考えもあるが、発生部位が顎・顔面領域であるという解剖学的制約により十分な安全域が設けられない場合も多い。また、化学療法、放射線療法の感受性が低く、有効な治療法がない。そこで本研究では、テロメラーゼ作動性の癌特異的ウィルス製剤(テロメライシン&テロメスキャン)の腺様嚢胞癌に対する効果の基礎研究に基づいて、ウィルスによる癌細胞融解だけでなく、生存した癌細胞に対しても口腔癌の増殖、浸潤転移を制御させる臨床応用を目指した新たな治療戦略の早期開発を目指した。

2. 研究の目的

(1) テロメラーゼをプロモーターとした癌細胞特異的感染・増殖能力を持つアデノウィルスの腺様嚢胞癌細胞における導入効率、殺細胞効果、癌細胞特異性および検出感度を検討する。

(2) 同所性にヌードマウスの顎下腺に腺様嚢胞癌細胞を移植し、テロメライシンを同様に腫瘍内に投与することによる抗腫瘍効果の検討を行う。

(3) *In vitro* におけるテロメライシンと抗癌剤との併用効果の検討

3. 研究の方法

(1) 腺様嚢胞癌細胞株における SV40 T 抗原発現とテロメラーゼ発現の解析

各種腺様嚢胞癌細胞およびヒト正常細胞(正常ヒト肺線維芽細胞[NHLF]、正常ヒト気管支上皮細胞[NHBE]、WI-38 線維芽細胞、など)における SV40 配列の存在に対して特異的プライマーを用いた DNA-PCR で、また SV40 large T 抗原発現に対しては特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析にて行う。また、hTERT 遺伝子を標的としたリアルタイム RT-PCR により、各種腺様嚢胞癌細胞およびヒト正常細胞におけるテロメラーゼ活性を測定する。腺様嚢胞癌細胞における SV40 発現と hTERT 発現の相関を検討する。

(2) ヒト腺様嚢胞癌細胞株におけるアデノウィルス受容体 (CAR) 発現の解析

フローサイトメトリーを用いて、腺様嚢胞癌細胞および正常細胞におけるアデノウィルス受容体 (coxsackie-adenovirus receptor: CAR) の発現レベルを定量する。

(3) *in vitro* におけるテロメライシンおよびテロメスキャンの選択的増殖と抗腫瘍活

性の検討

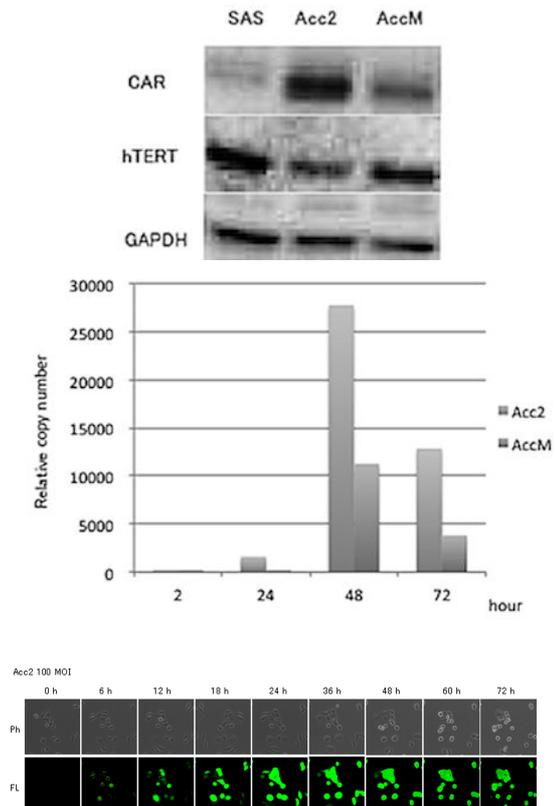
E1A 配列に対するプライマーを用いてリアルタイム DNA-PCR にてウィルス力価を測定する。また、抗 E1A 抗体を用いた免疫組織染色、ウエスタンブロット解析により E1 遺伝子発現とウィルス増殖の相関を確認する。さらに、腺様嚢胞癌細胞にテロメスキャンを感染させ、蛍光顕微鏡下に GFP 蛍光発現を観察して、テロメスキャンの増殖と GFP 遺伝子発現の相関性を検証する。

(4) *in vivo* (ヌードマウス) における移植腫瘍塊と転移巣への併用効果の検討

腺様嚢胞癌細胞の同所性移植モデルにおける腫瘍塊の増殖抑制効果およびリンパ節転移への影響について解析する。

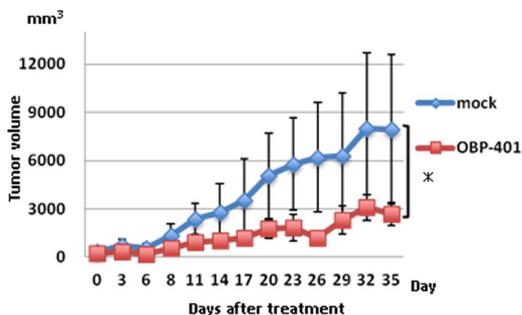
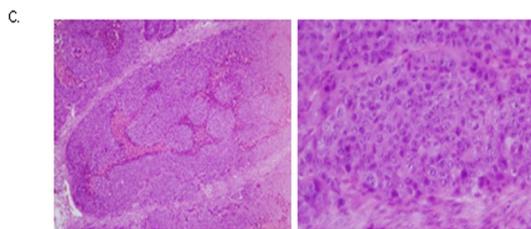
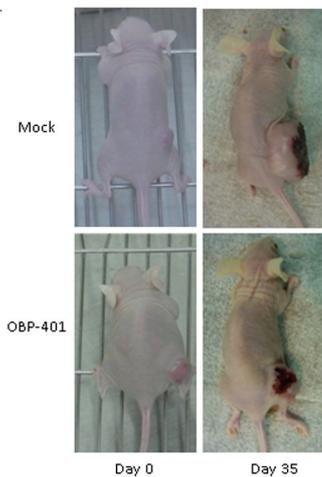
4. 研究成果

(1)(2)(3) ACC2、ACCM 細胞株において、CAR および hTERT の発現を認めた。また、両細胞間での効果に差があるものの、OBP-301 感染により明らかな抗腫瘍効果を認めた。抗腫瘍効果は 24 時間では認められないが、これは感染が成立し、複製が行われる時間が 24 時間程度必要と考えられた。両細胞間の効果の差については複製効率が細胞内因子に影響する可能性も考えられ、今後の検討課題と考える。さらに、両細胞株に OBP-401 を感染させたところ、経時的に GFP の発現の増強を認めた。

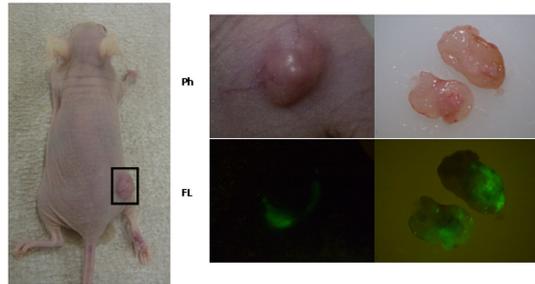


(4) *in vivo*において、マウス背部皮下に腺様嚢胞癌細胞を移植し、腫瘍塊を形成し、コントロール群と比較したところ、腫瘍の抑制効果を認めた。また、同部位にテロメスキャンを移植することで、腫瘍塊のみを蛍光発光することが可能であった。

考察としては、局所注射されたウイルスも腫瘍細胞内への感染および複製にある程度の時間が必要であり、*invitro*のデータと比較しても相関する結果となっている。腫瘍径の測定に対しては二重盲検法を用いており、計測にばらつきが出た可能性もあるが、中央値では明らかな有意差を認めたため、抗腫瘍効果は十分にあると考える。今後は同所性モデルを用いて検討することで、抗腫瘍効果の評価として、口腔癌特異的な障害としての摂食障害についての検討を行う必要もあるかと考える。



*In vivo*でのテロメスキャンによる蛍光発光に対する検討では、明らかに腫瘍組織内での発光を認めた。剖面においても腫瘍内へのウイルスの感染と複製を認めているが、本研究では感染後5日での観察であるため、深部への発光が認められないと推察する。更には、経時的に進むに従い、GFPの発光強度は弱まり、腫瘍全体を蛍光発光により可視化するためには数方向からのウイルスの局所注射が必要な可能性もあり、今後の検討岡大と考える。



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1件)

Oncol Rep. 2013 Dec;30(6):2659-64.

Sato D, Kurihara Y, Kondo S, Shirota T, Urata Y, Fujiwara T, Shintani S

Antitumor effects of telomerase-specific replication-selective oncolytic viruses for adenoid cystic carcinoma cell lines.

[学会発表](計1件)

Daisuke Sato, Yuji Kurihara,

Telomerase-Specific

Replication-Selective oncolytic viruses for adenoid cystic carcinoma cell lines

xxi Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery

[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

栗原 祐史 (YUJI KURIHARA)

昭和大学・歯学部顎口腔疾患制御外科学・助教

研究者番号：90514969

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：