

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 21 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：2012～2013

課題番号：24890132

研究課題名(和文) 骨肉腫に対する化学療法増感剤としてのウイルス製剤の検証

研究課題名(英文) Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-301 with chemotherapy in osteosarcoma.

研究代表者

佐々木 剛 (SASAKI, TSUYOSHI)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90594812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫に対する化学療法の効果増強を目指し、テロメラーゼ依存性腫瘍融解アデノウイルス(OBP-301)と抗がん剤の併用効果とその分子機序の解析を行った。用いた4種類すべてのヒト骨肉腫細胞株において併用により相加相乗効果を認めた。また、OBP-301は抗アポトーシス蛋白Mcl-1の発現抑制を介して抗がん剤によるアポトーシス誘導を増強した。さらに、マウス背部移植腫瘍モデルでは併用治療群は有意に腫瘍増殖を抑制した。本研究によりOBP-301と化学療法の併用療法が骨肉腫に対する新しい治療戦略となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the chemosensitizing effect of a telomerase-specific replication-competent oncolytic adenovirus, OBP-301, in human osteosarcoma cells. OBP-301 infection enhanced the cytotoxic effect of chemotherapy and increased chemotherapy-mediated apoptosis through downregulation of Mcl-1 expression. Combination therapy significantly suppressed tumor growth in a subcutaneous xenograft model. These results suggest that combination therapy provides a novel therapeutic strategy for human osteosarcomas.

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：テロメラーゼ ウイルス療法 骨肉腫

1．研究開始当初の背景

骨肉腫は 10 歳代後半の若年者に発症する骨に最も高頻度に発生する悪性腫瘍である。1970 年代以前は、診断確定後ただちに患肢の離断が行われていたが、続発する肺転移のために 5 年生存率は 10-15%にすぎなかった。系統的化学療法導入、画像診断技術の進歩や適切な切除縁での腫瘍切除手術の実施により 5 年生存率は次第に改善し、現在では 70%以上の症例を救命し、患肢も温存できるようになった。しかし、根治切除不能症例や化学療法抵抗症例における予後は依然として悪く、新しい分子標的治療薬の開発も上皮系悪性腫瘍に比べてあまり進んでいないのが現状である。つまり、化学療法に対する抵抗性獲得は重要な予後規定因子であり、化学療法感受性の改善は重要な課題である。骨肉腫細胞に対する有効性を確認したテロメラーゼ依存性腫瘍融解アデノウイルス(OBP-301)は、上皮系腫瘍において抗がん剤の効果増強作用が指摘されている。これらから、骨肉腫に対するウイルス製剤と抗がん剤の併用による強力な治療戦略の開発が期待できる。

2．研究の目的

本研究では骨肉腫に対する化学療法の効果増強を目指し、ヒト骨肉腫細胞株を用いてテロメラーゼ依存性腫瘍融解アデノウイルス(OBP-301)と抗がん剤(シスプラチン及びドキシソルビシン)の併用による増強効果について検討する。

(1)*in vitro*において、OBP-301 と抗がん剤の併用による抗腫瘍効果を検討し、細胞死の形態や分子機序の解析を行う。

(2)*in vivo*において、OBP-301 と抗がん剤の併用による抗腫瘍効果について検討する。

3．研究の方法

4 種類のヒト骨肉腫細胞株(HOS、MNNG/HOS、

143B、SaOS-2)を用いて検討を行い、抗がん剤はシスプラチン及びドキシソルビシンを使用した。

(1)XTT アッセイを用いて OBP-301 および抗がん剤の抗腫瘍効果を評価した。

(2)リアルタイム PCR を用いて抗がん剤が OBP-301 の増殖に与える影響を評価した。

(3)アポトーシスとオートファジーの誘導について、ウエスタンブロット法及びフローサイトメトリーにより評価した。

(4)アポトーシスの制御因子である Bcl-2 ファミリー蛋白(Bax、Bak、Bim、Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xL)の発現をウエスタンブロット法により評価した。

(5)siRNA を用いて OBP-301 による抗がん剤感受性増強効果の分子機構を解析した。

(6)最後にマウス背部皮下移植腫瘍モデルを作成し、OBP-301 と抗がん剤の併用による抗腫瘍効果について検討した。

4．研究成果

(1)すべての骨肉腫細胞株において OBP-301 と抗がん剤の併用投与にて相加・相乗効果を認めた。

(2)抗がん剤による OBP-301 の増殖抑制は認めなかった。

(3)OBP-301 は抗がん剤によるアポトーシスの誘導を増強した。

(4)OBP-301 は抗アポトーシス蛋白である Mcl-1 の発現を著明に抑制したが、他の Bcl-2 ファミリー蛋白の発現に明らかな変化は認めなかった。

(5)Mcl-1 siRNA により Mcl-1 発現を抑制すると、OBP-301 と同様にアポトーシスの誘導が増強された。

(6)マウス背部移植腫瘍モデルでは、OBP-301 と抗がん剤の併用群は単独群と比較して有意に腫瘍増殖を抑制した。

悪性腫瘍において抗アポトーシス蛋白の発現増強と化学療法抵抗性との関連も指摘されているが、骨肉腫細胞においてOBP-301は抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 の発現抑制を介して抗がん剤の感受性を亢進させる可能性が示唆された。本研究により OBP-301 と化学療法の併用療法が骨肉腫に対する新しい治療戦略となることが期待される。

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 4 件)

Hasei J, Sasaki T(他 12 名、2 番目). Dual Programmed Cell Death Pathways Induced by p53 Transactivation Overcome Resistance to Oncolytic Adenovirus in Human Osteosarcoma Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 査読有、12 巻、2013、314-325、10.1158/1535-7163.MCT-12-0869.

Sasaki T(他 10 名、1 番目). A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *Gene therapy*, 査読有、20 巻、2013、112-118、10.1038/gt.2011.213

Tazawa H, Sasaki T(他 13 名、5 番目). Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *International Journal of Cancer*, 査読有、131 巻、2012、2939-2950、10.1002/ijc.27589

Yoshida R, Sasaki T(他 12 名、6 番目). Mechanism of resistance to trastuzumab and molecular sensitization via ADCC activation by exogenous expression of HER2-extracellular domain in human cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 査読有、61 巻、2012、1905-1916、10.1007/s00262-012-1249-x

〔学会発表〕(計 7 件)

Osaki S, 他、Enhanced Chemosensitivity of Osteosarcoma Cells by Oncolytic Adenovirus-mediated Mcl-1 Downregulation. 60th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2014/3/15-18, New Orleans, USA

国定俊之, 他、骨・軟部肉腫細胞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療法、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 ~ 2013 年 10 月 5 日、横浜

尾崎修平, 他、骨肉腫に対する腫瘍融解アデノウイルスの抗がん剤感受性亢進作用、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 ~ 2013 年 10 月 5 日、横浜

Hasei J, 他、Oncolytic adenovirus-armed p53 induces apoptosis significantly through upregulating miR-93 and 106b in human osteosarcoma cells. 104th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2013/4/6-10, Washington DC, USA

Osaki S, 他、Chemosensitizing Effect of Telomerase-specific Oncolytic Adenovirus for Human Osteosarcomas via Induction of Apoptosis and Autophagy. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society、2013/1/26-29, San Antonio, USA

Hasei J, 他、Oncolytic adenovirus-mediated p53 gene transfer induces antitumor effect in human osteosarcoma cells. 9th Asia Pacific Musculoskeletal Tumour Society Meeting、2012/9/6-9, Kuala Lumpur, Malaysia

尾崎修平, 他、骨肉腫に対するテロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤と化学療法の併用療法、第 71 回日本癌学会学術総会、2012/9/19-21、札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木剛 (SASAKI TSUYOSHI)

岡山大学医学部 客員研究員

研究者番号：90594812