

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462333

研究課題名(和文) 悪性骨軟部腫瘍患者への腫瘍融解アデノウイルス「テロメライン」の臨床応用

研究課題名(英文) New treatment strategy against bone and soft tissue sarcoma by combination of telomerase-specific oncolytic adenovirus

研究代表者

國定 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はテロメラーゼ活性に依存して増殖する腫瘍融解アデノウイルス(OBP-301)を用いて、骨・軟部肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を報告してきた。今回の研究では、肉腫に対しするOBP-301と化学療法、およびゾレドロン酸の併用効果を検討した。骨肉腫培養細胞に対し、OBP-301と化学療法を併用すると、化学療法の効果を増強させ、相乗効果を認めた。また、肉腫細胞を皮下に移植した動物モデルでも同様に化学療法の感受性を増強させた。ただ骨破壊を抑えることはできなかった。そこで、ゾレドロン酸と併用すると、腫瘍増殖抑制が増強されるとともに、骨破壊が抑制された。今後、臨床応用へ向けたプロトコールを作成したい。

研究成果の概要(英文)：We previously developed an oncolytic adenovirus, OBP-301, in which the hTERT gene promoter drives the expression of the E1A and E1B genes. A phase I clinical trial of OBP-301 was conducted in the United States on patients with advanced solid tumors, and a phase II clinical trial is being conducted in our hospital on patients with advanced esophageal cancer. In this study, we revealed the cytopathic activity of OBP-301 in bone and soft tissue sarcoma cells. Moreover, OBP-301 enhanced chemosensitivity to doxorubicin and cisplatin in human osteosarcoma cells. The antitumor effect of OBP-301 was remarkable on human osteosarcoma orthotopic xenograft model; however, bone destruction could not be prevented by OBP-301 monotherapy. Combination treatment with OBP-301 and zoledronic acid showed a synergistic antitumor effect, and prevented bone destruction. Our data indicates that OBP-301 is a promising antitumor reagent for the treatment of bone and soft tissue sarcomas

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：ウイルス治療 肉腫

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍の術後機能を向上させるため、新規治療法の開発が望まれる。悪性骨軟部腫瘍の標準治療は、腫瘍周囲に存在する正常な筋肉、骨、神経、血管を合併切除する広範切除術である。腫瘍周囲の正常な組織を合併切除しなければ高率に再発し、さらに遠隔転移を生じる可能性も高くなり、生命の危険性が生じる。

しかし、正常組織を切除するため、切除した正常組織によっては重大な機能障害が問題となる。正常な骨、筋肉、神経を合併切除すると、大きな機能障害が出現し、患者の QOL を低下させる。腫瘍細胞の活性を低下させることができれば、周囲の正常組織の切除量を縮小できる可能性がある。

これまでに腫瘍融解アデノウイルス (テロメライシン) が、骨軟部肉腫に強力な抗腫瘍活性を有する事を明らかにしてきた。そこで、他のがんの治療に用いられているテロメライシンを悪性骨軟部腫瘍の補助治療として臨床応用できれば、正常組織の切除を最小限にすることができ、安全な縮小切除術が可能となる。術後の機能障害を防ぎ、筋骨格の機能を維持した新たな治療法が開発できる。

2. 研究の目的

本試験では、肉腫に対するテロメライシンと放射線療法の併用療法の有効性を検討する。さらに、骨軟部肉腫患者におけるテロメライシンの臨床応用へ向けた基礎的研究を行う。

上皮系がん細胞での研究から、テロメライシン単独よりも、放射線治療と併用した方が、より強い抗腫瘍効果を認めることが証明されている。そこで、悪性骨軟部腫瘍に対する放射線治療の増強効果について、種々の肉腫細胞株を用いて検討する。テロメライシン処理を行った骨軟部肉腫細胞株

に放射線照射を行い、抗腫瘍効果の増強の有無を確認し、最適な線量や回数について検討する。

当院では、食道癌患者に対するテロメライシンの臨床試験が開始されている。悪性骨軟部腫瘍でも、同様に臨床応用を目標とする。患者選択としては、重要な血管や神経を合併切除する必要がある、切除することで術後に重大な機能障害が予想される症例を考えている。テロメライシン治療により、腫瘍死を引き起こすことができれば、標準治療では切除する必要がある重要な血管や神経を温存することが可能となり、安全な縮小手術が可能となる。血管や神経などの重要な組織が温存可能となれば、骨・筋肉の術後機能障害が回避でき、QOL 向上を達成できる。さらに、放射線治療併用により、抗腫瘍効果の増強を期待できる。

3. 研究の方法

(1) In vitro でヒト骨軟部肉腫細胞に対するテロメライシンと放射線併用効果を検討する。

in vitro において Ewing 肉腫、骨肉腫、滑膜肉腫、未分化多形肉腫、類上皮肉腫、平滑筋肉腫の細胞株を用い、テロメライシン単独投与、放射線治療単独、テロメライシン + 放射線治療併用にわけて細胞障害活性を XTT assay を用いて比較検討した。相乗効果については薬物併用効果分析ツールである CalcuSyn® software (BioSoft) を用いた combination index の算出により評価した。併用療法における腫瘍細胞のアポトーシス、DNA2 本鎖切断、放射線感受性の増加を Western blot 解析及び蛍光免疫染色法で確認した。

(2) In vivo でのヒト骨軟部肉腫細胞に対するテロメライシンと放射線併用効果を検討する。

in vivo ではヌードマウスを用い、Ewing

肉腫細胞株を皮下注射し、背部皮下腫瘍モデルを作成した。PBS 群、テロメライシン単独投与群、放射線治療単独群、テロメライシン+放射線治療併用群の4群に分けて治療を行い、腫瘍サイズを腫瘍移植後5週までに測定し、各群を比較検討した。

(3) In vitro でテロメライシンと放射線処理後の細胞死形態について解析を行う。

4. 研究成果

in vitro で類上皮肉腫、平滑筋肉腫以外の細胞株では単独群と比較して併用群で有意に抗腫瘍効果の増強を認め、combination index の算出結果では治療の併用による相乗効果が示された。肉腫培養細胞を用いた in vitro の実験では、テロメライシンと放射線治療の併用により、抗腫瘍効果の増強が明らかとなった。また、Western blot 解析及び蛍光免疫染色法によって併用群ではアポトーシスの増加と DNA 障害の遷延、及び放射線感受性の増加を認めた。

in vivo では単独群と比較して、併用群において有意に強い腫瘍増殖抑制効果を認めた。in vivo の実験でも、テロメライシンと放射線治療の併用療法により強い抗腫瘍効果を認めた。

放射線治療によるテロメライシンの感染高率増強やテロメライシンによる DNA 損傷修復阻害を介した放射線感受性の増強が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Fujiwara T, Kunisada T, Takeda K, Ozaki T. microRNAs and Soft Tissue Sarcomas. Adv Exp Med Biol. 2015 doi: 10.1007/978-3-319-23730-5_10, 査読有

Uehara T, Fujiwara T, Takeda K, Kunisada T, Ozaki T, Udono H.

Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas. Biomed Res Int. 2015、doi: 10.1155/2015/820813, 査読有

Fujiwara T, Kunisada T, Takeda K, Uotani K, Yoshida A, Ochiya T, Ozaki T. MicroRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers. Biomed Res Int. 2014、doi: 10.1155/2014/592868, 査読有

Yoneda Y, Kunisada T, Naka N, Nishida Y, Kawai A, Morii T, Takeda K, Hasei J, Yamakawa Y, Ozaki T. Favorable outcome after complete resection in elderly soft tissue sarcoma patients: Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. Eur J Surg Oncol. 2014 Jan;40(1):49-54. doi: 10.1016/j.ejso.2013.09.004, 査読有

Hasei J, Sasaki T, Tazawa H, Osaki S, Yamakawa Y, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Onishi T, Uno F, Kagawa S, Urata Y, Ozaki T, Fujiwara T. Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. Mol Cancer Ther. 2013 Mar;12(3):314-25. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0869, 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

大森敏規、国定俊之、尾崎敏文他、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、日本整形外科学会基礎学術集会、2015年10月22日~23日、富山国際会議場(富山市)

Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki 他、THERAPEUTIC EFFECT OF TUMOR-SPECIFIC ONCOLYTIC

ADENOVIRUS IN COMBINATION WITH SYSTEMIC CHEMOTHERAPY FOR OSTEOSARCOMA, Connective Tissue Oncology Society, 2015/11/4-7, Salt Lake City (USA)

山川泰明、国定俊之、尾崎敏文他、骨肉腫におけるゾレドロン酸とテロメラゼ遺伝子発現腫瘍融解アデノウイルスの併用療法、日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2014年7月17日～18日、大阪国際会議場（大阪市）

杉生和久、国定俊之、尾崎敏文他、骨肉腫に対する化学療法とp53発現腫瘍融解アデノウイルス治療の併用効果、日本整形外科学会基礎学術集会、2014年10月9日～10日、城山観光ホテル（鹿児島市）

Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki 他、A detection system for circulating tumor cells (CTCs) using GFP expressing telomerase-specific replication-competent adenovirus in bone and soft tissue sarcoma European Society of Medical Oncology、2014/9/26-30, Madrid (Spain)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

○出願状況

なし

○取得状況

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)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