

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462626

研究課題名(和文) 難治性頭頸部癌に対する腫瘍溶解性センダイウイルスによる治療効果

研究課題名(英文) The therapeutic effect of Oncolytic recombinant Sendai Virus against refractory head and neck cancer.

研究代表者

山下 拓 (Yamashita, Taku)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00296683

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)：uPA活性特異的腫瘍溶解性センダイウイルス(バイオナイフ)による甲状腺未分化癌の治療実験を行った。In vitroでヒト甲状腺未分化癌の細胞株においてuPA活性および殺細胞呼効果を測定した。またIn vivoでは、甲状腺未分化癌の同所移植モデルを用いて、局所注射による治療での効果を検討した。その結果すべての癌細胞株で高いuPA活性を示し、またバイオナイフによる強い殺細胞効果を確認した。また同所移植モデルにおいてバイオナイフ治療は強い細胞増殖抑制及び生存期間の延長をもたらした。これらの結果は臨床応用に向けた、本治療法の今後の発展を期待させるものである。

研究成果の概要(英文)：We studied the tumor-surface uPA activity-dependent oncolytic recombinant Sendai virus (SeV), named BioKnife, for the treatment of ATC (anaplastic thyroid carcinoma). In vitro, uPA activity in human ATC and oral cancer cell lines was measured using a colorimetric method. Cytotoxicity of BioKnife against these cell lines was evaluated by cell count reagent. In vivo, Orthotopic models were treated with intratumoral injections of each SeV vector and were observed daily until >20% weight loss developed. All three ATC cell lines showed a high level of uPA activity. BioKnife induced dose-dependent cytotoxicity in all the cell lines. In orthotopic models, treated with BioKnife showed suppression of tumor growth and prolonged survive days. These results encourage further clinical studies for this novel agent to treat this fetal carcinoma.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は稀ではあるが非常に悪性度が高く難治性の疾患である。手術の他に有効な治療法は無いが、急速な増大と周囲臓器への浸潤のため初診時には既に切除不能な場合も多く、新規治療法の開発が望まれている。Urokinase-type plasminogen activator (uPA) は腫瘍の増殖、浸潤に関与するプロテアーゼの一つであり、甲状腺未分化癌においても発現が報告されている。齧歯類の呼吸器感染症起因ウイルスであるセンダイウイルスを改変し、悪性腫瘍が発現する uPA 活性依存的に細胞融合を誘導する腫瘍溶解性ウイルスが開発されている。今回、uPA 活性依存的腫瘍溶解性センダイウイルスによるヒト甲状腺未分化癌細胞株に対する治療効果をマウス移植モデルを用い前臨床的に検討した。

2. 研究の目的

(1) uPA 活性特異的腫瘍溶解性センダイウイルス (バイオナイフ) の甲状腺未分化癌に対する効果を *in vitro* で検討する。細胞融合から殺細胞効果を示すことを形態学的にも証明する

(2) 甲状腺未分化癌細胞株の脇腹への異所移植モデルに対する、局所治療により、バイオナイフの腫瘍増殖抑制効果を検討する。

(3) より臨床的な甲状腺未分化癌同所移植モデルを用いて、生存率の延長効果や、体重減少抑制効果を示し、前臨床試験につなぐ成果とすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト甲状腺未分化癌細胞 3 株 (KHM-5M、8305c、8505c) に対しまず uPA 活性値を測定した。

(2) *In vitro* においてウイルス投与後の甲状腺未分化癌細胞の形態変化を観察し、また感染力価 (MOI 0.25、1、5、10、25) 毎の殺細胞効果を測定した。さらに uPA 阻害薬 PAI-1 を投与し殺細胞効果への影響を検討した。

(3) 5 週齢 BALB/c nu/nu マウスの右脇腹に甲状腺未分化癌細胞 KHM-5M を 5×10^6 個移植し皮下移植モデルを作成した。治療ウイルス投与群、コントロールウイルス投与群、PBS 投与群の 3 群において、腫瘍体積が 200 mm³ 以上となった日から 3 日ごとに 3 回それぞれ腫瘍内投与し、移植後 21 日目まで観察し腫瘍体積を比較検討した。

(4) より臨床的なモデルとしてマウス甲状腺同所移植モデルを作成した (甲状腺右葉へ KHM-5M 2.5×10^5 個移植)。移植後 1、4、7 日目にウイルスまたは PBS を腫瘍内投与し、以後体重減少率 20% をもって犠牲死とし生存曲線を作成した。

(5) 組織学的検討として、同所移植モデルにおいてウイルス投与 48 時間後に犠牲死させ

摘出した腫瘍に対し TUNEL 染色および抗 GFP 抗体免疫蛍光染色を行った。培養細胞に対し治療ウイルスと汎 caspase 阻害薬 z-VAD-FMK を投与し殺細胞効果への影響を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト甲状腺未分化癌細胞株は全て強い uPA 活性を示した (図 1)。

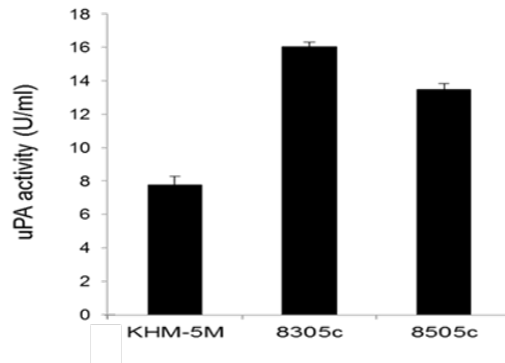


図 1. 各細胞株の uPA 活性

(2) 腫瘍溶解性センダイウイルスにより細胞融合および細胞死が誘導された (図 2)。

殺細胞効果はコントロールウイルスと比較し有意に高く、力価依存的であり、uPA 阻害薬によって抑制された (図 3)。

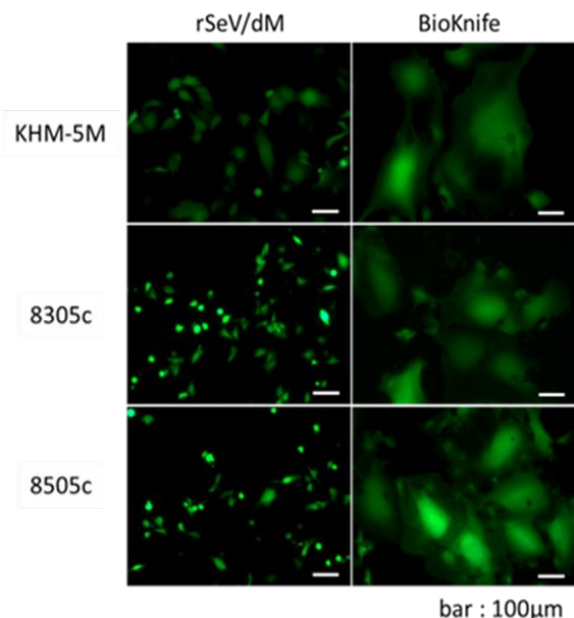


図 2. バイオナイフ投与による細胞形態変化

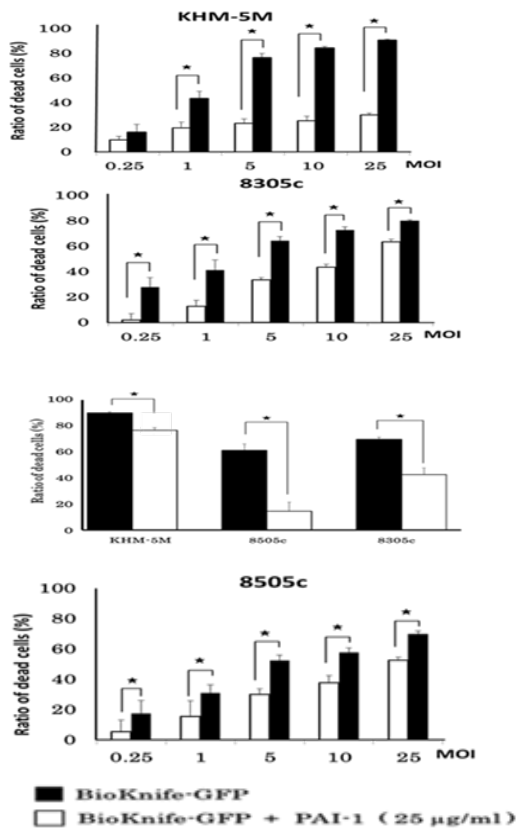


図3. バイオナイフの殺細胞効果

(3) 甲状腺未分化癌皮下移植モデルにおいて治療ウイルスは有意に腫瘍増大を抑制した (図4: PBS 群 1532.0 ± 301.6 、コントロールウイルス群 2032.7 ± 313.8 、治療ウイルス群 $774.6 \pm 354.4 \text{ mm}^3$)。

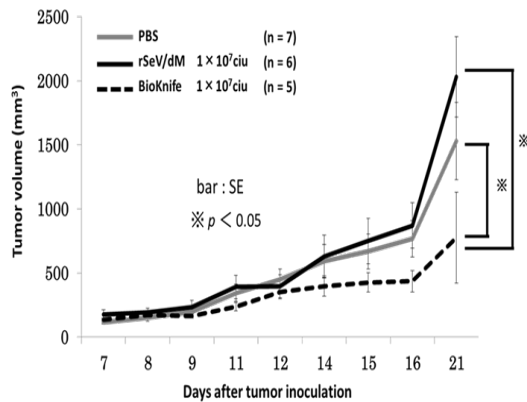


図4. 皮下移植モデルでの抗腫瘍効果

(4) 同所移植モデルにおいて治療ウイルスは有意に生存期間を延長した (図5: PBS 群 17.7 ± 6.3 、コントロールウイルス群 17.0 ± 2.9 、治療ウイルス群 41.6 ± 15.0 日)。

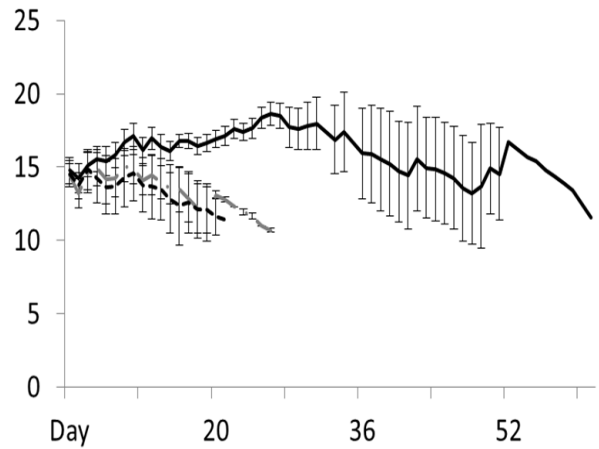


図5. 同所移植モデルにおける体重変化
縦軸 体重 (g) 実線: バイオナイフ群、点線: コントロール群

(5) 組織学的検討では、治療ウイルス群において TUNEL 陽性細胞が増加し (図6) *in vitro* において汎カスパーゼ阻害薬の投与は治療ウイルスの殺細胞効果を有意に抑制した (図7)。

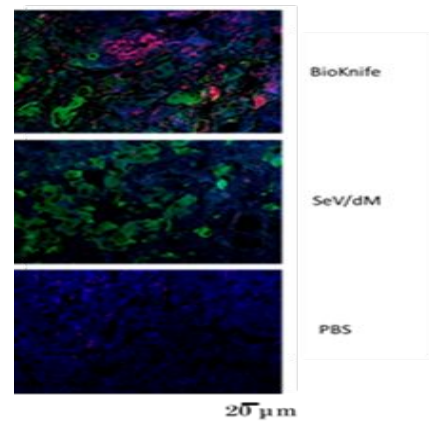


図6. TUNEL 染色

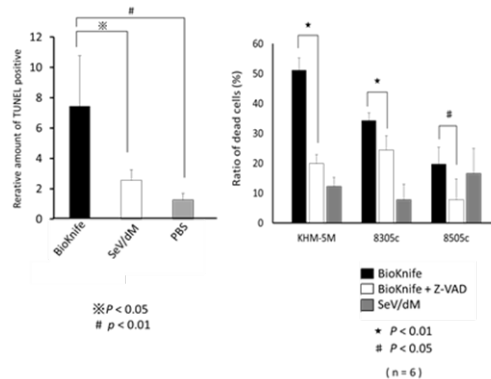


図7. 汎カスパーゼ阻害薬による殺細胞抑制効果

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 5 件)

Yamashita T, Araki K, Tomifuji M, Tanaka Y, Harada E, Suzuki T, Miyamoto S, Shiotani A. Clinical features and treatment outcomes of Japanese head and neck cancer patients with a second primary cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.*, 13:172-178, 2017.

Tomifuji M, Araki K, Yamashita T, Shiotani A. Salvage Transoral. Videolaryngoscopic Surgery for radiorecurrent hypopharyngeal and supraglottic cancer. *Auris Nasus Larynx.*, 44:464-471, 2017.

Yamashita T, Shimada H, Tanaka S, Araki K, Tomifuji M, Mizokami D, Tanaka N, Kamide D, Miyagawa Y, Suzuki H, Tanaka Y, Shiotani A. Serum midkine as a biomarker for malignancy, prognosis, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 5:415-25, 2016.

Kamide D, Yamashita T, Araki K, Tomifuji M, Tanaka Y, Tanaka S, Shiozawa S, Shiotani A. Selective activator protein-1 inhibitor T-5224 prevents lymph node metastasis in an oral cancer model. *Cancer Sci.* 107:666-73, 2016.

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Ueda Y, Shimada H, Matsushita K, Shiotani A. Gene therapy of c-myc suppressor FUSE-binding protein interacting repressor by Sendai virus delivery prevents tracheal stenosis. *Plos One* 2015 DOI:10.1371/journal.pone.0116269

〔学会発表〕(計 3 件)

Yamashita T, Miyagawa Y, Shiotani A. Symposium 3 Anaplastic Thyroid Cancer/Challenge to Refractory Cancer. A novel treatment strategy for anaplastic thyroid carcinoma using urokinase-type plasminogen activator-dependent oncolytic recombinant Sendai virus. 2nd Congress of Asia-Pacific Society of Thyroid Surgery, 2017.11.2, Naha Okinawa.

Tanaka S, Araki K, Yamaashita T,

Tanaka Y, Ueda Y, Shiotani A. Oncolytic Sendai Virus Therapy for Head and Neck Cancer. AAO-HNSF 2017.09 Chicago, USA

Miyagawa Y, Yamashita T, Araki K, Tomifuji M, Ueda Y, Yonemitsu Y, Shiotani A. BioKnife, a Urokinase-type Plasminogen Activator-dependent Oncolytic Sendai Virus, Exterminate Orthotopic Anaplastic Thyroid Carcinoma. 2014.7.29. New York, USA.

〔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

山下 拓 (YAMASHITA Taku)
北里大学・医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授
研究者番号：00296683

(2)研究分担者

富藤 雅之 (TOMIFUJI Masayuki)
防衛医科大学校 耳鼻咽喉科学 講師
研究者番号：80327626