

テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス療法の骨・軟部肉腫に対する前臨床的検討

佐々木 剛^{a*}, 田澤 大^{b,c}, 長谷井 嬢^a, 国定 俊之^{a,d}, 吉田 晶^a, 橋本 悠里^c, 矢野 修也^c, 吉田 亮介^c, 宇野 太^c, 香川 俊輔^c, 森本 裕樹^a, 浦田 泰生^e, 藤原 俊義^c, 尾崎 敏文^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a整形外科学, ^c消化器外科学, ^d運動器医療材料開発, ^b岡山大学病院 新医療研究開発センター, ^eオンコリスバイオファーマ

キーワード: アデノウイルス, 肉腫, ALT, ヒトテロメラーゼ逆転写酵素

Preclinical evaluation of telomerase-specific oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas

Tsuyoshi Sasaki^{a*}, Hiroshi Tazawa^{b,c}, Jo Hasei^a, Toshiyuki Kunisada^{a,d}, Aki Yoshida^a, Yuuri Hashimoto^c, Shuya Yano^c, Ryosuke Yoshida^c, Futoshi Uno^c, Shunsuke Kagawa^c, Yuki Morimoto^a, Yasuo Urata^e, Toshiyoshi Fujiwara^c, Toshifumi Ozaki^a

Departments of ^aOrthopaedic Surgery, ^cGastroenterological Surgery, ^dMedical Materials for Musculoskeletal Reconstruction, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^bCenter for Innovative Clinical Medicine, Okayama University Hospital, ^eOncolys BioPharma, Inc.

要 約

骨・軟部肉腫は、一部に治療抵抗性で予後の悪い症例が存在するため、新たな治療法の確立が重要な課題である。我々は、5型アデノウイルスを基本骨格として、テロメラーゼ活性に依存して増殖する腫瘍融解ウイルス (OBP-301) や、coxsackie and adenovirus receptor (CAR) 陰性の腫瘍細胞に感染するファイバー変型ウイルス (OBP-405) を用い、骨・軟部肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。

14種類の骨・軟部肉腫細胞株に対して OBP-301の細胞障害活性を検討し、12種類の細胞株で OBP-301に感受性を認めた。また、OBP-301の細胞障害活性は CAR の発現と相関していた。さらに、テロメラーゼ活性の低い細胞に対しても、5型アデノウイルスの複製に必須の E1A によりテロメラーゼ活性の増強効果がおこり、強い抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。次に、骨肉腫脛骨同所性移植動物モデルを作成し OBP-301を投与したところ、OBP-301投与群では対象群と比べて有意に腫瘍増殖を抑制した。最後に、OBP-301に感受性を認めなかった CAR 陰性細胞株に対して OBP-405を用いて検討し、OBP-405が有効に作用することを確認した。

OBP-301や OBP-405を用いたウイルス療法は、骨・軟部肉腫に対する新たな治療法となる可能性がある。

平成24年4月受理

*〒718-0003 岡山県新見市高尾793-6

長谷川記念病院整形外科

電話: 0867-72-3105 FAX: 0867-72-7758

E-mail: babon_78@hotmail.co.jp

プロフィール



佐々木 剛

1978年8月17日生

平成17年3月 岡山大学医学部卒業

平成23年6月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了

平成19年4月 岡山大学医学部・歯学部附属病院 整形外科 レジデント

平成22年4月 岡山大学病院 整形外科 医員

平成23年4月 長谷川記念病院 整形外科 医員

現在に至る

はじめに

骨・軟部肉腫は、手術や化学放射線療法の進歩にもかかわらず、腫瘍切除不能例や化学・放射線療法抵抗性の予後の悪い症例が存在しており、5年生存率は60～70%である^{1,2)}。そのため、治療抵抗性を示す骨・軟部肉腫に対する新たな治療法の確立は重要な課題である。近年、腫瘍選択的に増殖する遺伝子改変アデノウイルスを用いたがんウイルス療法が新規治療法として注目されている。我々は、正常5型アデノウイルス(Ad5)を基本骨格として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)を開発した³⁾。さらに、coxsackie and adenovirus receptor (CAR) 陰性の腫瘍細胞にも感染するファイバー改変型 OBP-301 (OBP-405) を開発した⁴⁾。これまで、上皮系のがん細胞に対する OBP-301 や OBP-405 の抗腫瘍活性を明らかにし、米国で OBP-301 の第 I 相臨床試験を終了し、ヒトへの安全性を確認した⁵⁾。上皮系悪性腫瘍の高いテロメラーゼ活性に比べ、非上皮系の骨・軟部肉腫の一部は低いテロメラーゼ活性にも関わらず alternative lengthening of telomere (ALT) 経路を介して不死化を維持する事が近年明らかとなった⁶⁾。つまり、テロメラーゼ活性が低い ALT 細胞はテロメラーゼ活性依存的に増殖する OBP-301 や OBP-405 に抵抗性である可能性が示唆されるが、骨・軟部肉腫に対する OBP-301 や OBP-405 の抗腫瘍活性は未だ不明である。

テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス療法の骨・軟部肉腫への検討

今回、我々は、14種類の骨・軟部肉腫細胞株を用いて、ALT 細胞と非 ALT 細胞に対する OBP-301 の抗腫瘍活性、CAR 陰性細胞に対する OBP-405 の抗腫瘍活性の検討を行った⁷⁾。

1. 骨・軟部肉腫細胞株に対する OBP-301 の細胞障害活性の検討

ヒト骨肉腫細胞株 (OST, U2OS, HOS, HuO9, MNNG/HOS, SaOS-2, NOS-2, NOS-10)、ヒト軟骨肉腫細胞株 (NDCS-1, OUMS-27)、ヒト明細胞肉腫 (CCS)、ヒト悪性神経鞘腫 (NMS-2)、ヒト滑膜肉腫 (SYO-1)、ヒト悪性線維性組織球腫 (NMFH-1) の14種類の骨・軟部肉腫細胞株を用いて、OBP-301 の細胞障害活性を検討した。12種類の骨・軟部肉腫細胞株は OBP-301 に感受性を示したが、2種類の細胞株 (OUMS27, NMFH-1) は抵抗性を示した。OBP-301 に感受性を示す細胞株の50% inhibitory dose (ID50) において、MNNG/HOS と SaOS-2 は高値を示し、低感受性であった (図1)。

2. 骨・軟部肉腫細胞株における CAR 発現, *hTERT* mRNA 発現と OBP-301 感受性の関係

アデノウイルス感染には、細胞表面の CAR の発現が必須である。細胞株の CAR 発現をフローサイトメトリー法で解析すると、OBP-301 に感受性を示す細胞株は全て CAR 陽性、OBP-301 抵抗性の細胞株は CAR

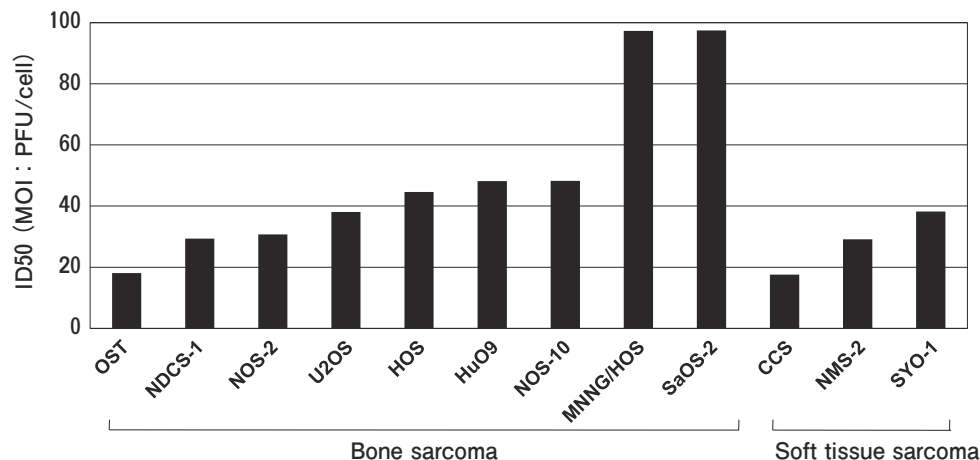


図1 OBP-301の骨・軟部肉腫細胞に対する細胞障害活性
細胞を96ウェルプレートに 10^3 個/ウェルで播種し、OBP-301を0-100 multiplicity of infection (MOI) で感染させ、5日後にXTTアッセイにて細胞生存率を検討した。OBP-301を投与後5日目での骨・軟部肉腫細胞株の50% inhibitory dose (ID50) を示す。

陰性であった。一方、*hTERT* mRNA は13種類の細胞株で検出されたが、OBP-301低感受性の SaOS-2は検出されなかった。次に、CAR/*hTERT* mRNA 共陽性の8種類の骨肉腫細胞株と3種類の軟部肉腫細胞株において、ID50とCARもしくは*hTERT* mRNA レベルとの相関関係を検討したところ、骨腫瘍細胞株でのCARとID50は有意差を認めた ($r = -0.834$, $P = 0.01$)。しかし、軟部肉腫細胞株は3種類のみで有意差はなかった ($r = -0.99$, $P = 0.1$) が、強い相関関係を認めた (図2 a)。また、*hTERT* mRNA とID50の相関関係は認めなかった (図2 b)。以上の結果から、OBP-301の感受性はCARの発現に依存する事が示唆された。

3. OBP-301感染後の *hTERT* mRNA の発現増強

SaOS-2とU2OSはテロメラーゼ活性の低いALT細胞として知られている⁸⁾。しかし、今回の検討では、SaOS-2の*hTERT* mRNA 発現がなくOBP-301低感受性であったが、U2OSは低い*hTERT* mRNA 発現にも関わらずOBP-301高感受性であった (図1)。そこで、我々はOBP-301が*hTERT* mRNA 発現を増強することで、ALT細胞に非ALT細胞と同等の細胞障害を起こす仮説を立てた。まず、ALT細胞のU2OS細胞にOBP-301, Ad5, E1A欠損型Ad5のdl312を10, 100MOIで感染させたところ、OBP-301とAd5を感染させたU2OS細胞では48時間後の*hTERT* mRNA 発現を増

強したが、dl312を感染させたU2OS細胞では*hTERT* mRNA は増強しなかった (図3 a)。さらに、OBP-301は複製能や細胞障害活性においてもAd5より強い結果であった (図3 b, c)。また、テロメラーゼ活性の高い非ALT細胞でも、U2OSと同様にOBP-301による*hTERT* mRNA の発現増強を認めた。以上の結果から、OBP-301はE1Aによるテロメラーゼ活性の増強効果があり、ウイルスの複製能が上昇し、ALT細胞を非ALT細胞と同等に殺傷する事が示唆された。

4. 骨肉腫同所性移植モデル動物に対する OBP-301 の抗腫瘍効果

骨・軟部肉腫に対するOBP-301の抗腫瘍効果を検討するために、骨肉腫同所性移植モデル動物を作成した。マウス脛骨にOSTに移植し、移植後21日目にOBP-301, dl312, PBSをそれぞれ隔日に3回投与した。OBP-301治療群はdl312やPBS治療群に比べて腫瘍増殖を有意に抑制した (図4 a, b)。OBP-301治療群の腫瘍は、他治療群の腫瘍に比べて、X線検査と病理組織学的検討において腫瘍浸潤による骨破壊の低下が観察された。以上の結果から、*in vitro*でのOBP-301の有効性が*in vivo*においても認められた。

5. OBP-301 抵抗性肉腫細胞株に対する OBP-405 の抗腫瘍効果

OBP-301抵抗性のOUMS-27, NMFH-1細胞はCAR陰性であったが、インテグリン $\alpha v \beta 3$ と $\alpha v \beta 5$ が陽性で

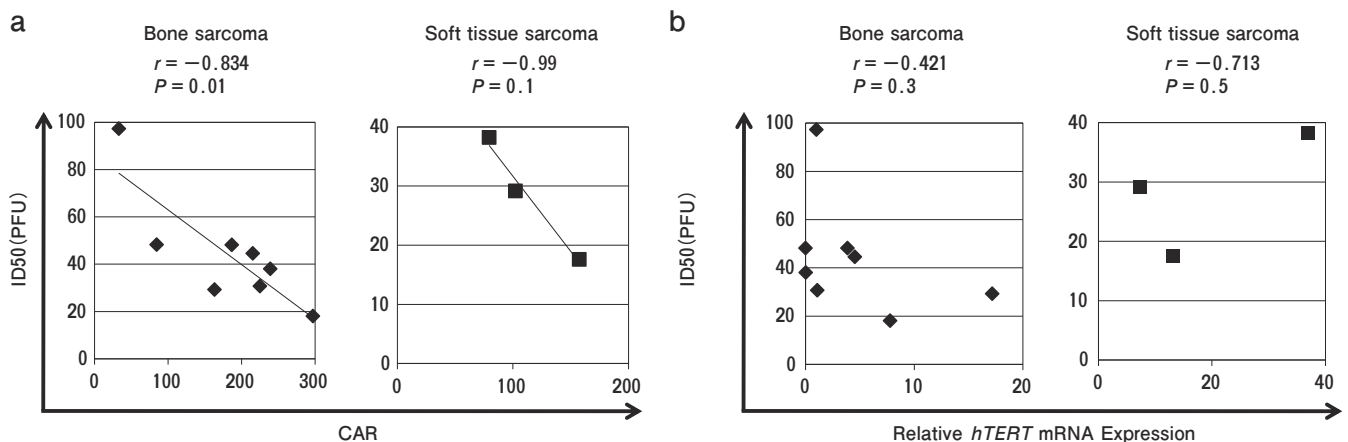


図2 OBP-301の細胞障害活性とCAR, *hTERT*mRNA の相関関係の検討

a : CARの発現はフローサイトメトリー解析にて行った。骨・軟部肉腫細胞株に抗CAR抗体、引き続きFITC標識した2次抗体を処理し、フローサイトメトリーでFITC標識細胞を測定しCARの発現を解析した。フローサイトメトリー法の発現量はmean fluorescence intensity (MFI) = 一次抗原処理した細胞のMFI - 一次抗原処理しなかった細胞のMFIの計算式にて算出した。CARのMFIとID50との相関関係を骨、軟部にわけて検討した。b : *hTERT*mRNA とID50との相関関係を骨、軟部にわけて検討した。相関関係の検討にはピアソンの相関係数を用いた。 $P < 0.05$ で統計的有意差があると定義した。

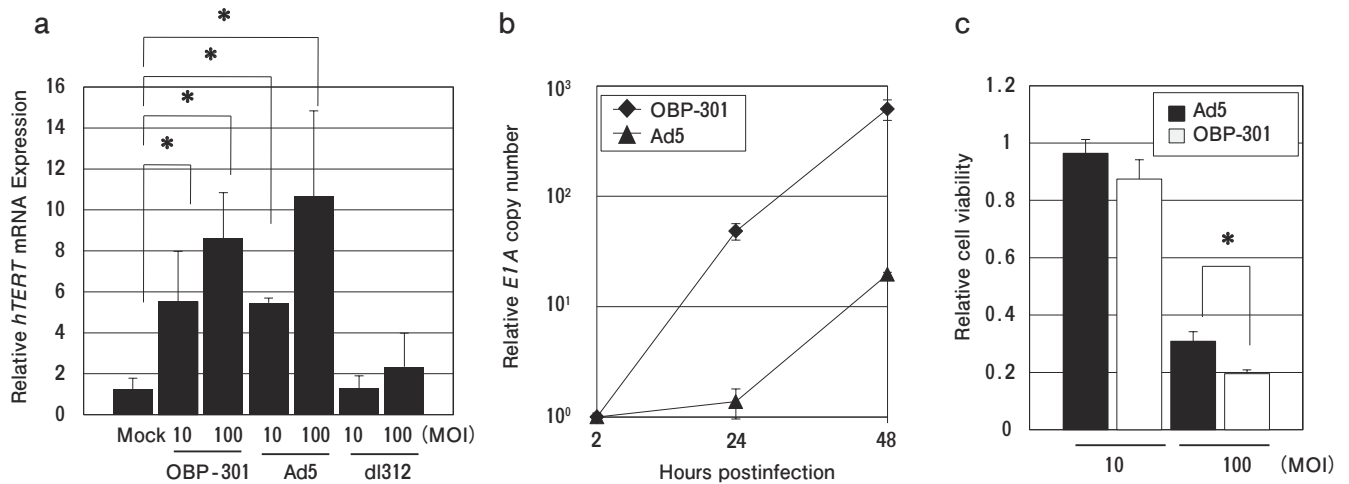


図3 OBP-301感染によるU2OS細胞株の*hTERT*遺伝子発現の増強とその影響
 a: U2OS細胞にOBP-301, Ad5, dl312をそれぞれ10,100MOI感染させ48時間後に*hTERT*mRNAを計測した。U2OSのアデノウイルス非感染細胞を1.0として比較している。b: U2OS細胞にOBP-301, Ad5をそれぞれ10MOIずつ感染させ、2時間後に培地を洗い経時的にE1Aの計測をリアルタイムPCR法にて計測した。感染後2時間での値を1.0として検討している。c: U2OS細胞のAd5, OBP-301の細胞障害活性を感染後5日目にXTT assayを用いて検討した。 $P < 0.05$ で統計的有意差があると定義した。(Student's *t* test)

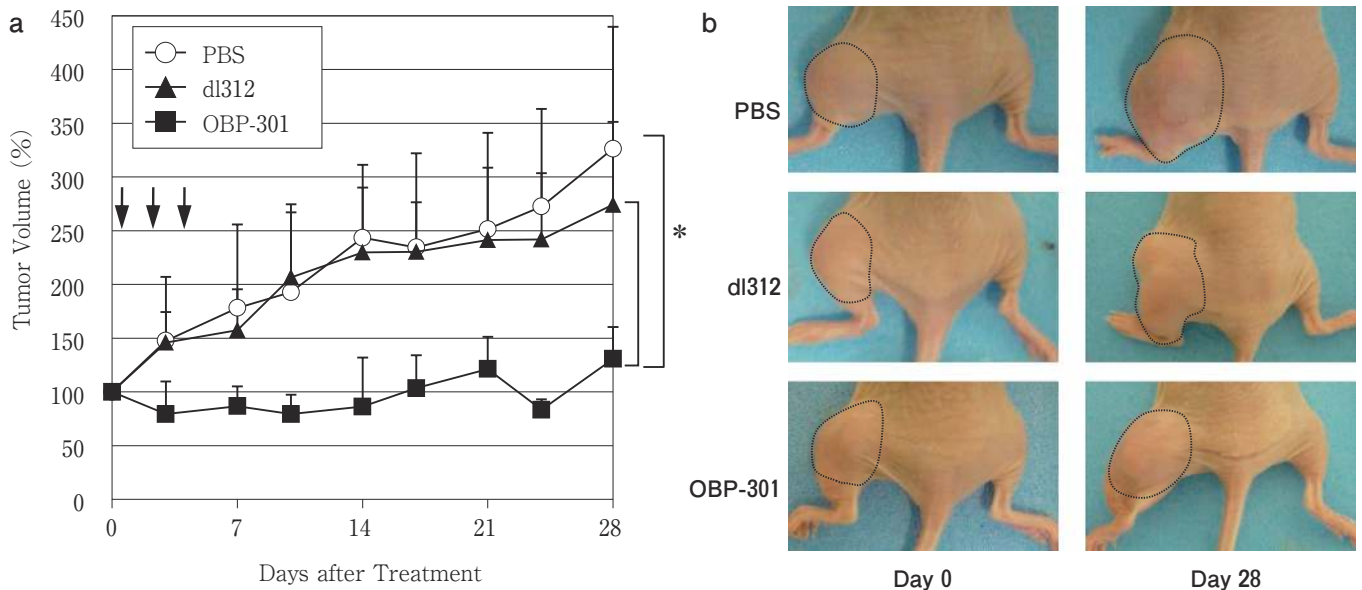


図4 骨肉腫同所性移植モデル動物に対するOBP-301の抗腫瘍効果
 a: 5×10^6 個の骨肉腫細胞株OSTを7週齢のヌードマウスの脛骨移植した。移植後21日目に腫瘍が触知可能となった時点で、 10^8 PFUのOBP-301 (■), dl312 (▲),あるいはPBS (○)をそれぞれ1日おきに3回腫瘍内投与した。腫瘍径の計測はノギスを用いて行い、脛骨内の腫瘍体積は(長径 + 短径) × 長径 × 短径 × 0.2618の計算式にて算出した。b: 治療開始0日目と28日目の肉眼写真を示す。

あった。そこで、OUMS-27, NMFH-1細胞に対してOBP-301のファイバーにRGDモチーフを挿入しCARの発現がない細胞に対して、インテグリンを介して感染することができるOBP-405を用いて細胞障害活性を検討した。OBP-301では細胞障害活性を示さなかったが、OUMS-27, NMFH-1ともにOBP-405使用群では細胞生存率を抑制した。さらに、皮下移植したOUMS-27腫瘍において、OBP-405はOBP-301やPBSに比べて腫瘍増殖を有意に抑制した。以上の結果から、OBP-405はCAR陰性、インテグリン陽性肉腫細胞に対して有効であると考えられた。

骨・軟部肉腫に対するテロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス療法の期待と展望

今回の結果を踏まえて、テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス療法の骨・軟部肉腫に対する治療戦略チャートを作成した(図5)。治療戦略チャートを用いることで肉腫細胞のCAR, *hTERT*, インテグリンをそれぞれ計測し、容易に最適なテロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルスが選択できる。また、OBP-301は放射線⁹⁾や抗がん剤^{10,11)}との併用により、抗腫瘍効果の増強を示すことが上皮系腫瘍では証明されており、肉腫細胞でもOBP-301との併用効果を確認することで、今回作成した治療戦略チャートの変更が考えられる。

OBP-301の抗腫瘍活性は、テロメラーゼ活性ではなく、CARの発現と強く相関する事が今回明らかになっ

た。多くの上皮系・非上皮系悪性腫瘍ではCARの発現を認めるが、がんの悪性化¹²⁾や低酸素環境¹³⁾によって、CARの発現が低下する事が知られており、OBP-301の治療抵抗性を引き起こす可能性がある。CARの発現低下に起因するOBP-301の治療抵抗性獲得に対しては、OBP-301とCARの発現を増強させる薬剤との併用療法¹⁴⁾や、OBP-301からOBP-405への治療変更が重要となると考えられる。そのためには、治療前や治療中にも腫瘍細胞のCAR発現を的確に把握して治療戦略を立てる事が重要となる。そこで我々は、CARの発現をOBP-301にGFP遺伝子を組み込んだOBP-401を用いて、容易に測定する手法の開発を行っており¹⁵⁾、今後臨床で使用できるようにさらなる検討を行っていく必要がある。

おわりに

今回、我々は、テロメラーゼ活性の低いALT肉腫細胞に対して、OBP-301がE1Aによるテロメラーゼ活性の増強効果によって、非ALT肉腫細胞と同等に抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。また、OBP-301抵抗性のCAR陰性肉腫細胞に対して、OBP-405が抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。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, OBP-405)を用いたウイルス療法は、骨・軟部肉腫に対する新たな治療法となる可能性がある。

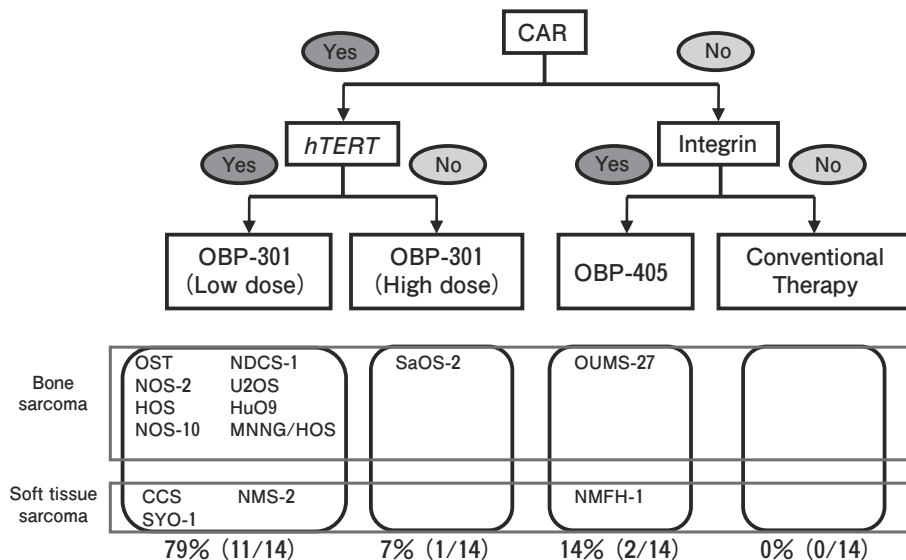


図5 骨・軟部肉腫細胞に対するテロメラーゼ依存性腫瘍融解アデノウイルスの治療戦略

文 献

- 1) Hameed M, Dorfman H : Primary malignant bone tumors-recent developments. *Semin Diagn Pathol* (2011) 28, 86-101.
- 2) Mendenhall WM, Indelicato DJ, Scarborough MT, Zlotecki RA, Gibbs CP, Mendenhall NP, Mendenhall CM, Enneking WF : The management of adult soft tissue sarcomas. *Am J Clin Oncol* (2009) 32, 436-442.
- 3) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N, Fujiwara T : Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* (2004) 10, 285-292.
- 4) Taki M, Kagawa S, Nishizaki M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kyo S, Nagai K, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T : Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD'). *Oncogene* (2005) 24, 3130-3140.
- 5) Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, Senzer N, Phadke AP, Bedell C, Adams N, Zhang YA, Maples PB, Chen S, Pappen B, Burke J, et al. : A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol Ther* (2009) 18, 429-434.
- 6) Reddel RR : Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett* (2003) 194, 155-162.
- 7) Sasaki T, Tazawa H, Hasei J, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Yano S, Yoshida R, Uno F, Kagawa S, Morimoto Y, Urata Y, et al. : Preclinical evaluation of telomerase-specific oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* (2011) 17, 1828-1838.
- 8) Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR : Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* (1997) 3, 1271-1274.
- 9) Kuroda S, Fujiwara T, Shirakawa Y, Yamasaki Y, Yano S, Uno F, Tazawa H, Hashimoto Y, Watanabe Y, Noma K, Urata Y, Kagawa S : Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery. *Cancer Res* (2010) 70, 9339-9348.
- 10) Takakura M, Nakamura M, Kyo S, Hashimoto M, Mori N, Ikoma T, Mizumoto Y, Fujiwara T, Urata Y, Inoue M : Intraperitoneal administration of telomerase-specific oncolytic adenovirus sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin and affects survival in a xenograft model with peritoneal dissemination. *Cancer Gene Ther* (2010) 17, 11-19.
- 11) Liu D, Kojima T, Ouchi M, Kuroda S, Watanabe Y, Hashimoto Y, Onimatsu H, Urata Y, Fujiwara T : Preclinical evaluation of synergistic effect of telomerase-specific oncolytic virotherapy and gemcitabine for human lung cancer. *Mol Cancer Ther* (2009) 8, 980-987.
- 12) Anders M, Vieth M, Rocken C, Ebert M, Pross M, Gretschel S, Schlag PM, Wiedenmann B, Kemmner W, Hocker M : Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression. *Br J Cancer* (2009) 100, 352-359.
- 13) Kuster K, Koschel A, Rohwer N, Fischer A, Wiedenmann B, Anders M : Downregulation of the coxsackie and adenovirus receptor in cancer cells by hypoxia depends on HIF-1alpha. *Cancer Gene Ther* (2010) 17, 141-146.
- 14) Watanabe T, Hioki M, Fujiwara T, Nishizaki M, Kagawa S, Taki M, Kishimoto H, Endo Y, Urata Y, Tanaka N : Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-301 in human lung cancer cells. *Exp Cell Res* (2006) 312, 256-265.
- 15) Sasaki T, Tazawa H, Hasei J, Osaki S, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Yano S, Yoshida R, Kagawa S, Uno F, Urata Y, et al. : A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *Gene Ther* (in press).