

長谷井 嬢

Joe Hasei

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 整形外科学

Department of Orthopaedic Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

プロフィール

昭和56年生まれ

平成19年3月 杏林大学医学部医学科卒業

平成19年4月 社会医療法人水と会水島中央病院 初期研修医

平成21年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学

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25年4月 岡山大学病院 整形外科 医員

平成25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26年2月 The Scripps Research Institute (California, USA) Research Associate

受賞対象論文

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) 12, 314-325.

研究の背景と経緯

骨肉腫の一部は、化学放射線療法に治療抵抗性を示す為予後不良である事から、治療抵抗性の骨肉腫に対する新たな治療法の確立が重要となっている。我々は、5型アデノウイルスを基本骨格として、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子プロモーター下に E1A と E1B 遺伝子の発現制御が行われるように改変された制限増殖型アデノウイルス (OBP-301) を開発し、骨・軟部肉腫細胞株に対する有効性を報告した¹⁾ (図1)。ウイルス製剤は局所投与が基本となるが、原発性骨・軟部肉腫では上皮系癌と比較して投与が容易であり臨床上的メリットは大きい。テロメラーゼ活性特異的腫瘍融解アデノウイルス製剤である OBP-301 は、アメリカでの第 I 相臨床試験が終了し、現在岡山大学病院でも「頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究」が開始されている。しかし、骨・軟部肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討結果では OBP-301 に抵抗性を示す骨肉腫細胞株が存在することもまた明らかとなり、ウイルスによる抗腫瘍効果の更なる増強が望まれている。近年、腫瘍抑制遺伝子 p53 の誘導がウイルスの抗腫瘍効果を増強する報告がある²⁾が、増強メカニズムは未だ不明である。そこで、我々は OBP-301 の E3 領域に p53 の発現カセ

ットを挿入した腫瘍融解アデノウイルス (OBP-702) を開発した (図1)。本研究では、OBP-301 抵抗性骨肉腫細胞株を中心として、OBP-702 の抗腫瘍効果と細胞死誘導メカニズムの検討を行った。

研究成果の内容

1. 骨肉腫細胞株に対する OBP-702 の細胞障害活性

2種類 OBP-301 感受性骨肉腫細胞株 (HOS, U2OS) と 2種類 OBP-301 抵抗性骨肉腫細胞株 (SaOS-2, MNNG/HOS) に加え、ヒト正常肺線維芽細胞株 (NHLF) を用いて、OBP-702 の細胞障害活性を XTT アッセイで測定した。OBP-301 感受性株と OBP-301 抵抗株の双方に対して、OBP-702 は用量依存的に抗腫瘍効果を示し (図2 a)、感染後5日目に算出した OBP-702 の ID50 (50%抑制量) は、全ての細胞株において OBP-301 の ID50 より低値を示し、OBP-702 は OBP-301 と比較して非常に良好な抗腫瘍活性を示した。一方、OBP-702 は NHLF に対しては殆ど細胞障害活性が無いことも示された。緑色蛍光タンパク (GFP) を導入した MNNG/HOS 細胞株 (MNNG/HOS-GFP) を樹立し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、MNNG/HOS-GFP と NHLF の共培養下に OBP-702 を感染させ、感染後72時間まで経時的に観察を行った。

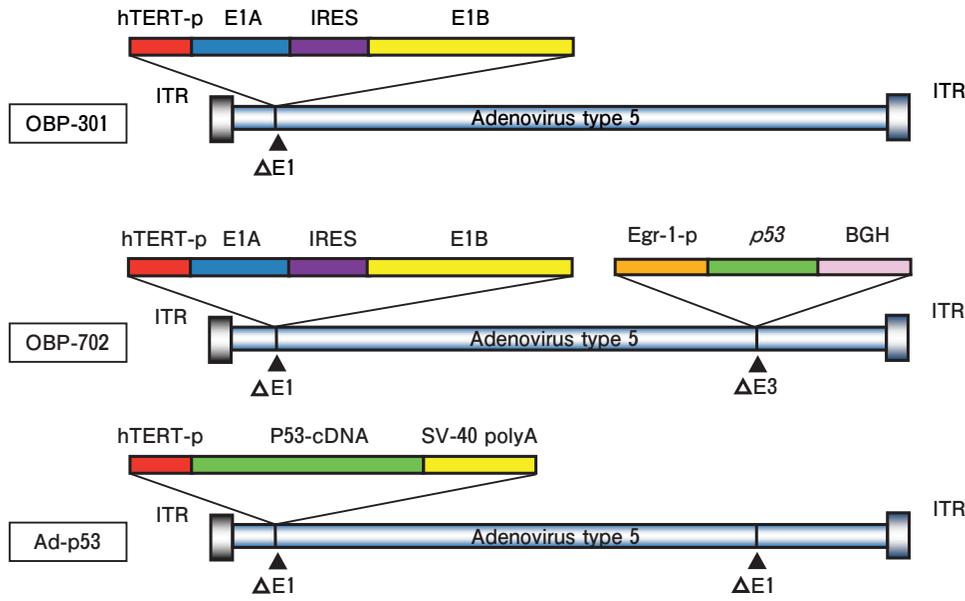


図1 遺伝子改変アデノウイルスの構造 (転載許諾を得て, 受賞論文より改変引用)

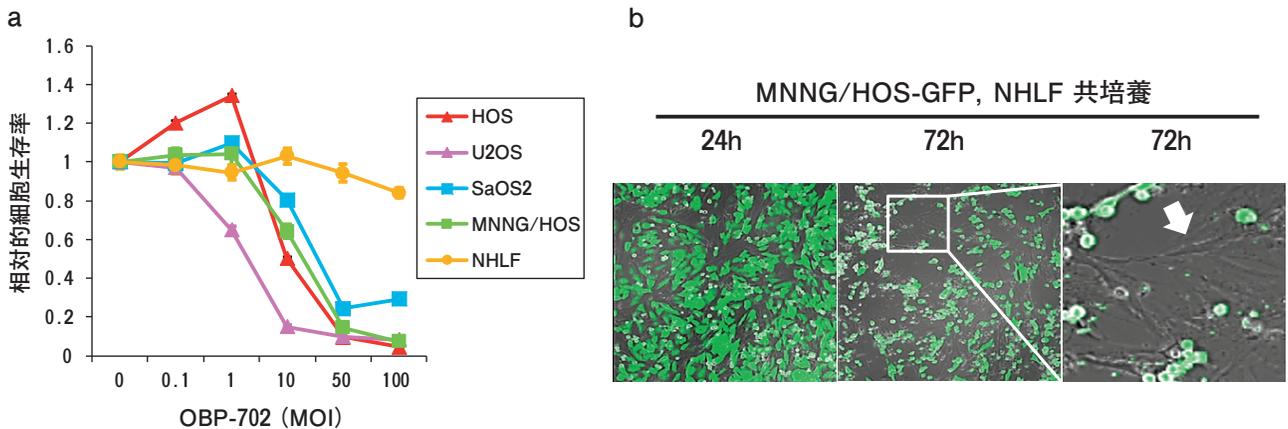


図2 OBP-702の抗腫瘍効果

a: 骨肉腫細胞とヒト正常肺線維芽細胞に対する細胞障害活性をXTTアッセイで計測した。b: 緑色蛍光タンパク (GFP) を導入した骨肉腫 MNNG/HOS 細胞株 (MNNG/HOS-GFP) を樹立し, MNNG/HOS-GFP と正常線維芽細胞株 (NHLF) を 1×10^5 個 / ディッシュずつ共培養を行った。OBP-702を10MOIで感染させ, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて感染後72時間までの経時的な観察を行った。感染後24, 72時間の顕微鏡像を示す。中央72時間後像の白枠部分の拡大図像が右図。丸く形状変化した腫瘍細胞 (緑色) に対し, 紡錘形を保つ NHLF (矢印部) を認める。(転載許諾を得て, 受賞論文より改変引用)

72時間後までにはほぼ全ての MNNG/HOS-GFP 細胞株は丸く形状変化し, 細胞障害が観察されたが, NHLF 細胞株は変化を示さなかった (図2 b)。

2. OBP-702感染後のアポトーシスの誘導効果とメカニズム

OBP-301抵抗性の SaOS-2, MNNG/HOS 細胞株を用いて, OBP-301, OBP-702, Ad-p53 (E1A, E3 領域を欠損し, E1A 領域に p53遺伝子の発現カセットを組み込んだ非増殖型のアデノウイルス) (図1) のアポ

トーシス誘導能について PARP の切断 (C-PARP) 変化をウェスタンブロットで, 活性化 caspase-3 の発現変化や細胞周期をフローサイトメトリーで検討した。OBP-702は, Ad-p53よりも C-PARP を効率的に誘導した。活性化 caspase-3 の発現率は, Ad-p53よりも OBP-702感染で有意に増加した。更に, Ad-p53より OBP-702でアポトーシスを示す sub-G1期の細胞割合が多かった。一方, OBP-301はアポトーシスをほとんど誘導しなかった。以上の結果から, OBP-702は OBP-

301や Ad-p53より強力にアポトーシスを誘導する事が明らかとなった。

OBP-702によるアポトーシスの誘導機構を解明するために、SaOS-2, MNNG/HOS細胞株におけるOBP-702感染後のp53やp21の発現誘導をAd-p53と比較検討した。OBP-702は、Ad-p53より効率的にp53発現を誘導したが、下流因子であるp21は全く誘導しなかった。Ad-p53ではp53とp21が誘導された事から、OBP-702のアポトーシス誘導にはp53の強力な誘導に加え、抗アポトーシス因子であるp21の抑制が関与している事が示唆された。更に、E1A欠損Ad-p53がp21を誘導した事から、p21の発現抑制にはE1Aの関与が考えられた。

E1Aによるp21の発現抑制メカニズムを解明するために、E1Aに誘導される転写因子E2F1がp21抑制性マイクロRNAを誘導してp21を抑制する仮説を立てて検証を行った。OBP-702感染後にE1Aの増加に一致してE2F1が増強した。OBP-702感染後にE2F1誘導型p21抑制性マイクロRNA(miR-93, miR-106b)の発現がE2F1の増強に一致して増加した。更に、SaOS-2細胞株にmiR-93やmiR-106bを強制誘導した後のAd-p53感染によるC-PARPの誘導を検討した。miR-93とmiR-106bを同時に誘導した場合にp21発現が著明に低下し、C-PARPが増加した。以上の結果から、OBP-702によるアポトーシスの誘導にE1A依存的なmiR-93/106b誘導を介したp21の発現抑制の関与が示唆された。

3. OBP-702感染後のオートファジーの誘導効果とp21抑制性マイクロRNAの関与

OBP-301抵抗性MNNG/HOS細胞株におけるOBP-702, OBP-301感染後のオートファジーの誘導能について、LC3-II/I, p62, DRAMの発現変化をウェスタンブロットで検討した。OBP-702は、同濃度で感染したOBP-301と比較してLC3-II/LC3-I比が高値を示し、より低い感染濃度でp62が低下した。一方、DRAMはOBP-301の感染によって著明に抑制されたが、OBP-702感染後もDRAMの発現は維持された。更に、SaOS-2細胞株にmiR-93やmiR-106bを強制誘導した場合のAd-p53感染によるオートファジーの誘導能を検討した。miR-93やmiR-106bの強制発現により、LC3-II/LC3-I比は上昇し、p62の発現は消褪したが、DRAMの発現に変化は認めなかった。以上の結果から、OBP-702はp53によるDRAMの誘導とmiR-

93/106bによるp21の抑制を介してOBP-301よりもオートファジーを誘導する可能性が示唆された。

4. MNNG/HOS同所性移植腫瘍マウスモデルに対するOBP-702の抗腫瘍効果

5×10^6 個のOBP-301抵抗性骨肉腫細胞株MNNG/HOSを6週齢のヌードマウスの脛骨に移植し、脛骨同所性移植腫瘍モデルを作成した。移植後21日目に腫瘍が触知可能となった時点で、 1×10^8 PFUのAd-p53, OBP-301, OBP-702を1日おきに3回腫瘍内投与した。腫瘍径の計測はCTを用いて3D画像構築を行い、腫瘍体積を算出した。骨破壊に関しても3D画像による評価を行った。OBP-702は、OBP-301やAd-p53と比較して有意に腫瘍増殖を抑制(図3a)し、腫瘍浸潤に伴う骨破壊もOBP-702は抑制した。OBP-702治療群の腫瘍は、他治療群の腫瘍に比べて、病理組織学的検討によって広範な壊死領域が観察された。以上の結果から、OBP-702はOBP-301やAd-p53に比べて強力な細胞増殖の抑制と細胞死の誘導を行う事が明らかとなった。

研究成果の意義

今回、我々はOBP-301に抵抗性を示す骨肉腫細胞株に対してOBP-702がp53の発現誘導とともにE2F1によるp21抑制性マイクロRNAの誘導を介してp21を抑制する事によってアポトーシスやオートファジーの細胞死を誘導して抗腫瘍効果を発揮する事を明らかにした。p53の強制発現は下流因子であるp21の発現を強く誘導するが、p21は細胞周期を停止させるだけでなく、アポトーシスやオートファジーの抑制に働く事が報告されている³⁾。OBP-702は、p53を強力に誘導する一方、E1A依存的なE2F1の増強に伴うmiR-93とmiR-106bの誘導を介してp21の発現を抑制した。このp21の発現抑制により、OBP-702はより効率的にp53の発現増強に伴うアポトーシスやオートファジーを誘導すると考えられた。更に、p53の誘導によるDRAMの発現維持もオートファジーの誘導に関与していた。OBP-702は、p53の転写活性化に伴うアポトーシスやオートファジーの2種類のプログラム細胞死を誘導する事で、OBP-301抵抗性の骨肉腫細胞株に強い抗腫瘍効果を示したと考えられた(図3b)。

OBP-702はOBP-301感受性株、抵抗株の双方に強力な抗腫瘍効果を示し、マイクロRNAやDRAMを介し

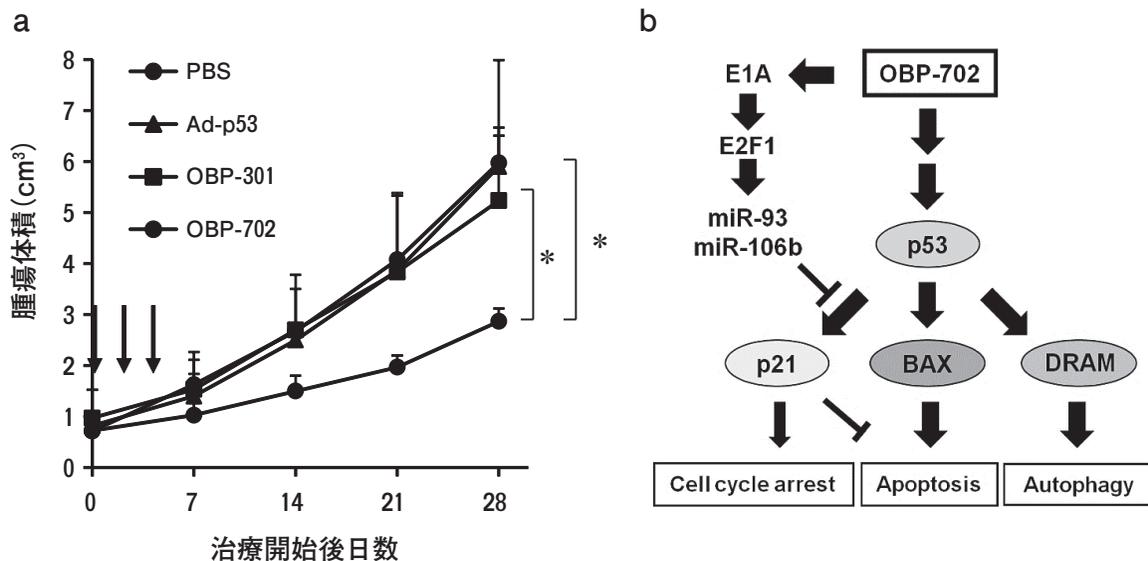


図3 マウス脛骨同所性モデルに対する OBP-702の抗腫瘍効果
 a: ノードマウス脛骨に MNNG/HOS 細胞株を移植し (5×10^6 cells/site), 21日目を治療開始日として Ad-p53, OBP-301, OBP-702 の3群にわけて 0, 2, 4日に局所投与を行った (1×10^8 PFU). PBSはコントロールとした。腫瘍体積は3DCTで撮影し計測した。(Student's *t* test. * $P < 0.05$.) b: 抗腫瘍効果のメカニズム。(転載許諾を得て, 受賞論文より改変引用)

たそのメカニズムについても本研究で初めて明らかとなった。化学療法抵抗性を有し予後不良の患者, また血管神経に腫瘍が近接し, 腫瘍切除により著しいADL障害をきたす患者に対し OBP-702は治療成績を向上させる新規治療薬となる可能性がある。

今後の展開や展望

p53は化学療法や放射線療法の感受性を上昇させるとする報告が散見されていることから, 今後, OBP-702と化学療法・放射線療法併用の有効性とメカニズムの検討が必要である。有効性が確認できれば, 現在の臨床治療プロトコルへの組み込みも可能であると考えられ, 臨床への応用が期待される。

文 献

1) 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.
- 2) Sakai R, Kagawa S, Yamasaki Y, Kojima T, Uno F, Hashimoto Y, Watanabe Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T: Preclinical evaluation of differentially targeting dual virotherapy for human solid cancer. *Mol Cancer Ther* (2010) 9, 1884-1893.
- 3) Fujiwara K, Daido S, Yamamoto A, Kobayashi R, Yokoyama T, Aoki H, Iwado E, Shinojima N, Kondo Y, et al.: Pivotal role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in apoptosis and autophagy. *J Biol Chem* (2008) 283, 388-397.

平成26年4月受理
 〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
 電話: 086-235-7273 FAX: 086-223-9727
 E-mail: joe@md.okayama-u.ac.jp