

主 論 文

Role of zoledronic acid in oncolytic virotherapy : Promotion of antitumor effect and prevention of bone destruction

(腫瘍融解アデノウイルス療法におけるゾレドロン酸の役割：抗腫瘍効果の促進と骨破壊の予防)

【諸言】

骨肉腫は青壮年期に発生するもっとも頻度の高い悪性骨腫瘍である。骨肉腫に対する化学療法や手術による集学的治療が進歩してきたが、局所再発や遠隔転移によりいまだ 20%以上の死亡率がある。骨破壊を伴う骨肉腫は、悪性度が高く予後不良な疾患である。近年、骨破壊を伴う悪性度の高い骨肉腫に対して、腫瘍増殖を抑制する治療法とともに骨破壊を抑制する治療法の併用が提案されている。

我々は、腫瘍細胞をターゲットにした新規治療法として腫瘍融解アデノウイルスである OBP-301 (テロメライシン) を開発している。上皮系や間葉系の悪性腫瘍細胞に対して OBP-301 の単独治療や放射線・化学療法との併用療法を行い、OBP-301 の抗腫瘍効果を明らかにしてきた。しかし、同所性骨肉腫移植モデルにおいて、OBP-301 は骨肉腫の誘導する骨破壊を十分に抑制できないことが判明した。つまり、骨破壊を伴う骨肉腫に対する OBP-301 の治療効果を高めるためには、腫瘍増殖と骨破壊の両者を抑制する新規治療法の開発が必要である。

ゾレドロン酸 (ZOL) は第 3 世代ビスホスホネートであり、転移性骨腫瘍や多発性骨髄腫などの患者の骨破壊を抑制する。さらに ZOL は骨肉腫細胞に対して抗腫瘍効果を発揮し、化学療法との併用は骨肉腫細胞や前立腺癌細胞に対して相乗的な効果を示したと報告されている。ZOL の骨肉腫と骨破壊を抑制するという役割に着目し、骨破壊を伴う悪性度の高い骨肉腫に対して ZOL が OBP-301 の治療効果を増強するという仮説を立てた。

そこで、本研究において、我々は骨破壊を伴う骨肉腫に対して OBP-301 と ZOL の併用療法の治療効果を検討した。

【材料と方法】

細胞株

3 種類の人骨肉腫細胞株(SaOS-2、MNNG/HOS、143B)とルシフェラーゼ遺伝子や GFP 遺伝子をそれぞれ導入した 143B 細胞株(143B-Luc、143B-GFP)を用いた。また破骨細胞の前駆細胞としてマウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) を用い、RANKL を用いて破骨細胞を誘導した。また、ヒト由来の正常骨芽細胞 (NHOst) や正常破骨細胞 (OCP) も用いた。

組み換えアデノウイルス

OBP-301はE1AとE1B遺伝子の発現がヒトテロメラゼ逆転写酵素(hTERT)遺伝子プロモーターにより選択的に発現するように設計された制限増殖型アデノウイルスである。

XTT アッセイ

96 ウェルプレートに 3 種類の骨肉腫細胞株と NHOst は 1×10^3 個/ウェルで、OCP は 1×10^4 個

1 ウェルで播種した。骨肉腫細胞株は 24 時間培養し、NHOst および OCP はプロトコールに基づいて培養した。

骨肉腫細胞株において OBP-301 群は 0-200 multiplicity of infections(MOIs)で感染させ、ZOL 群は 0-10 μ M の濃度で処理し、併用群はそれらの濃度を組み合わせた。ウイルス感染および ZOL 処理の 3 日後および 5 日後に XTT アッセイにて細胞生存率を測定した。NHOst および OCP は OBP-301 を 0-100 MOIs で感染させ、ZOL 群は 0-10 μ M の濃度で処理し、5 日後に XTT アッセイを用いて細胞生存率を測定した。

併用効果は CalcuSyn software を用いて combination index(CI)を算出して評価した。

フローサイトメトリー

100mmディッシュに1 \times 10⁵個の3種類の骨肉腫細胞を播種し、ZOLを0-10 μ Mの濃度で処理した。回収した細胞に一次抗体のマウス抗coxsackie and adenovirus receptor (CAR) 抗体、二次抗体のFITC標識抗マウスIgG抗体を反応させ、FACS arrayを用いてCARのmean fluorescence intensity (MFI) を解析した。MFIは抗CAR抗体により標識された細胞とコントロール抗体で標識された細胞の差の平均により算出した。

OBP-301とZOLで72時間処理した細胞を回収し、PE標識ウサギ抗active caspase-3抗体と反応させ、FACS arrayにより測定した。

TUNEL 染色

8 ウェルプレートに骨肉腫細胞を播種・培養し、ZOL 10 μ M の濃度で 72 時間処理した。1%パラホルムアルデヒドで固定したのち、TdT 反応試薬で処理した。染色した細胞は蛍光顕微鏡下で観察し、アポトーシス細胞を観察した。

ウェスタンブロッティング

100mm ディッシュに 3 \times 10⁵ 個の 3 種の骨肉腫細胞を播種、OBP-301 と ZOL で処理し、72 時間後に全細胞溶解液を回収した。siRNA を用いた抑制実験では 3 \times 10⁵ 個の細胞を播種し、MCL1 siRNA、コントロール siRNA および ZOL と同時投与した。各蛋白をゲル上に電気泳動にて分離した後、膜に転写して、各種一次抗体(PARP、E1A、E2F1、MCL1)とペルオキシダーゼ標識二次抗体に反応させた後、ECL 化学発光試薬を用いて蛋白質の検出を行った。

143B-GFP 細胞と破骨細胞の共培養

96 ウェルプレートに 1 \times 10⁴ 個の RAW264.7 を播種し、50ng/ml の RANKL を 72 時間作用させ、破骨細胞へ誘導した。その後同ウェル内に 1 \times 10³ 個の 143B-GFP 細胞を播種し、腫瘍環境に近い状況を作成した。OBP-301 と ZOL で 72 時間処理した後、143B-GFP 細胞は蛍光顕微鏡により観察し、破骨細胞に関しては TRAP 染色キットを用いて染色し、陽性細胞を破骨細胞とした。

マウス同所性腫瘍モデル

2 \times 10⁶ 個 の 143B-Luc 細胞を 6 週齢のヌードマウスの左膝から脛骨近位部の骨髄内に移植した。移植後 7 日目から 1 \times 10⁸ PFU の OBP-301 あるいは PBS を腫瘍内に、また 100 μ g/kg を体重換算した ZOL もしくは PBS を腹腔内に、1 週間毎に計 3 回投与した。治療開始日から基質ルシフェリンの腹腔内投与後に IVIS を用いて画像を取得し、腫瘍から放出される光子を定量化して腫瘍の評価を行った。

3次元CT画像

最終評価時にALOKA Latheta LCT-200を用いて3次元CTによる骨定量評価を行った。大腿遠位部から足関節まで48 μ mスライス間隔で撮影を行い、得られたデータをAZE virtual place 99 softwareを用いて再構成し、Housefields Unit (HUs) に基づいて定量評価した。

組織学的評価

腫瘍を含んだ膝関節を骨付きで採取し、10%ホルマリンで固定、パラフィン包埋した。脛骨長軸に切り出し、腫瘍評価目的にHE染色を、破骨細胞評価目的にTRAP染色を行った。腫瘍増殖評価としてKi67染色も行った。

統計学的解析

データは全て平均 \pm 標準偏差で表した。In vivo試験においてはDunnnett multiple-group comparison testを用いて群間評価した。2群間の比較にはStudent's t検定で分析を行い、 $p < 0.05$ を有意差があるとした。

【結果】

ヒト骨肉腫細胞株に対するZOLとOBP-301の細胞障害活性の検討

ZOLとOBP-301の骨肉腫細胞に対する細胞障害活性を検討した。ZOL、OBP-301ともに濃度およびウイルス量依存的に細胞障害活性が認められた。(Fig.1a,b)。ZOLとOBP-301の併用効果を検討し、ZOLとOBP-301の併用療法は単剤治療よりもより効率的に細胞障害活性を認めた(Fig.1c)。Combination Indexの計算によるとすべての骨肉腫細胞株で相乗効果を認めた(Fig.1d)。これらの結果よりZOLおよびOBP-301の併用療法がOBP-301、ZOL単独療法よりも効果的な抗腫瘍療法となることが示唆された。

ZOLはCAR発現とOBP-301の感染効率を増強させる

OBP-301とZOLの併用療法の相乗効果のメカニズムを探索するために、ZOLが骨肉腫細胞株のCAR発現やウイルス感染もしくは増殖効率を増強させるのかを検証した。ZOLはすべての骨肉腫細胞株でCAR発現を有意に増強させた(Fig.2a,b)、それと一致して、感染後2時間のE1Aの増加が143BとMNNG/HOSにおいて有意に見られたが、SaOS-2においては認められなかった(Fig.2c)。しかし、ZOL処理群と非処理群の比較でOBP-301感染24時間以降のE1Aの増加に有意な差は見られなかった。これらの結果から、ZOLとOBP-301併用療法の相乗効果はZOLによるOBP-301の効果増強によるものではないと考えられた。

OBP-301はZOLによるアポトーシスを増強する

近年、ZOLは骨肉腫細胞にアポトーシスを引き起こすと報告されており、さらに我々はOBP-301がヒト悪性腫瘍細胞において化学療法の感受性を増強させると報告した。ZOLとOBP-301の併用療法における相乗効果のメカニズムを探索するためにOBP-301がZOLによるアポトーシスを増強するのかを検証した。ZOLはすべての骨肉腫細胞にアポトーシスを誘導し、cleaved-PARPを増強していることが確認された(Fig.3a,b, Fig.S1)。次にOBP-301がZOLによるアポトーシス効果を増強しているのかを確認するためにZOLとOBP-301の併用療法と、単

独療法、コントロール群において cleaved-PARP と active caspase-3 を検討したところ、併用療法において有意に cleaved-PARP と active caspase-3 の上昇を認めた (Fig.3c,d)。これらの結果から OBP-301 は ZOL のアポトーシス効果を増強していることが示唆された。

OBP-301 による ZOL のアポトーシス誘導効果の増強は MCL1 の抑制が寄与する

我々は以前に OBP-301 が転写因子である E2F1 の誘導増強を起こし、E2F1 が抗アポトーシスタンパクである MCL1 の抑制を引き起こし、アポトーシスの増強を起こすと報告した。OBP-301 による ZOL のアポトーシス増強効果におけるメカニズムに MCL1 が関与しているかを検討するために、OBP-301 の MCL1 に対する影響を解析した。OBP-301 はすべての骨肉腫細胞株において E1A や E2F1 を増強させ、一方 MCL1 は抑制した (Fig.4a)。さらに 143B と MNNG/HOS 細胞において、ZOL と OBP-301 の併用療法は単独治療に比べてより強く cleaved-PARP の増強を示し、それは E1A や E2F1 の増強、MCL1 の抑制と関連していた (Fig.4b)。MCL1 抑制が与える ZOL のアポトーシス効果に対する影響を調べるために siRNA を用いたノックアウト実験を行ったところ、143B と MNNG/HOS において MCL1 siRNA はコントロール siRNA と比べて MCL1 を抑制し、ZOL によるアポトーシス効果を増強した (Fig.4c)。これらの結果から、OBP-301 は MCL1 抑制を介して ZOL によるアポトーシス効果の誘導増強を引き起こしたと考えられた。

OBP-301 と ZOL の併用療法は腫瘍増殖を抑制し破骨細胞活動を抑制する

骨肉腫による骨破壊の過程で、破骨細胞は骨肉腫により活性化され、維持される。ZOL と OBP-301 の併用療法が腫瘍周囲環境下で破骨細胞を抑制するかを検証するために、RANKL により破骨細胞へ誘導した RAW264.7 と 143B-GFP 細胞を共培養した (Fig.5a)。ZOL と OBP-301 による影響を調べるために 143B-GFP 細胞と RANKL により誘導された TRAP 陽性 RAW264.7 細胞を解析した。ZOL 単剤もしくは併用療法では TRAP 陽性細胞が OBP-301 やコントロール群に比べて有意に少なかった (Fig.5b,c)。次に ZOL と OBP-301 が腫瘍周囲環境下の正常細胞にどのような影響を与えるかを調べるために、ヒト正常骨芽細胞とヒト正常破骨細胞を ZOL および OBP-301 の処理後に 5 日間培養した。ZOL は破骨細胞の細胞生存率を低下させたが、骨芽細胞には影響を及ぼさなかった。OBP-301 はどちらの細胞生存率にも影響を及ぼさなかった (Fig.5d)。これらの結果から、ZOL と OBP-301 の併用療法は腫瘍周囲環境下で骨芽細胞へ影響を及ぼさずに破骨細胞と腫瘍細胞を抑制することが示された。

OBP-301 と ZOL の併用療法は腫瘍増殖および骨破壊を抑制する

最後に腫瘍増殖と骨破壊における ZOL と OBP-301 の影響を調べるために、143B-Luc 腫瘍同所性マウスモデルを作成し検証した。コントロール群に比べて併用群は有意に腫瘍増殖を抑制した (Fig.6a)。一方、マウスの体重には変化はなかった (Fig.S2)。免疫学的組織染色の結果から、併用群はコントロール群に比べて Ki67 陽性細胞が有意に抑制されていた (Fig.6b)。一方、3DCT の結果から、併用群ではコントロール群に対して有意に骨破壊が抑制されていた (Fig.6c)。さらに TRAP 染色によると ZOL 単独群もしくは併用群で有意に TRAP 陽性細胞数が減少していた (Fig.6d)。これらの結果により、OBP-301 と ZOL の併用療法は腫瘍増殖の抑制と破骨細胞の抑制を介して骨破壊を抑制することが示された。

【考察】

本研究で我々は ZOL と OBP-301 の併用療法が相乗的な抗腫瘍効果を導くこと、さらにアポトーシス効果の増強が関与することを明らかにした。骨肉腫細胞において OBP-301 は抗アポトーシスタンパクである MCL1 の抑制を介して ZOL によるアポトーシス効果を増強し、ZOL はさらに破骨細胞の活性を抑制した。このように腫瘍を標的とした OBP-301 と骨を標的とした ZOL の併用療法は骨破壊を伴う骨肉腫治療において効果が期待できる抗腫瘍戦略となる。

我々は近年、OBP-301 と化学療法の併用療法では、OBP-301 により E2F1 が上昇し、E2F1 依存的に miR-29 が上昇することで MCL1 が抑制され、骨肉腫細胞における化学療法によるアポトーシス効果を増強していることを明らかにした。骨肉腫患者において ZOL と化学療法の併用に関する臨床研究がなされているが、本研究で得られたエビデンスに基づいて OBP-301、ZOL、化学療法といった多面的な治療効果をもつ薬剤を併用する集学的な治療戦略は、MCL1 抑制を介したアポトーシス誘導増強による強力な治療法となるかもしれない。

骨肉腫に関与する骨破壊は破骨細胞の活動によって引き起こされるが、悪性度の高い骨肉腫は RANKL やそのほかのサイトカインを産生し、破骨細胞を活性化して骨破壊を引き起こす。RANKL は破骨細胞の誘導、活性、生存に必須であるため、薬剤による RANKL の抑制は悪性度の高い骨肉腫において有効な治療戦略となることが期待される。ZOL は骨肉腫からの RANKL 産生を抑制することが報告され、さらに直接的に破骨細胞を抑制している。一方、OBP-301 は直接的に破骨細胞に関与しないが、腫瘍細胞を破壊することで間接的に RANKL やサイトカインネットワークを制御していると考えられる。このように OBP-301 と ZOL の併用療法は腫瘍依存的な破骨細胞活性の抑制を介して骨破壊を起こす骨肉腫に対する有効な治療戦略となることが期待される。

【結論】

ZOL と OBP-301 の併用療法は OBP-301 により MCL1 を抑制することで ZOL によるアポトーシス効果を増強させ相乗的な抗腫瘍効果を認めることが判明した。さらに ZOL は破骨細胞の抑制により骨破壊を抑制した。これらの結果は骨破壊を伴う悪性度の高い骨肉腫に対して、ZOL と OBP-301 の併用療法が新規の治療法となる可能性が示された。