

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09060

研究課題名(和文) 消化管腫瘍に対する腫瘍溶解性レオウイルスによる新規内視鏡的治療法の開発

研究課題名(英文) Antitumor efficacy of oncolytic reovirus against gastrointestinal tumor

研究代表者

森 義徳 (Mori, Yoshinori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：80468248

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)：進行再発手術不能の消化管間葉系腫瘍(Gastrointestinal stromal tumor: GIST)に対する治療には薬物療法が選択されるが、その効果は限定的で、薬剤耐性獲得などの問題もあり、新規治療の開発が望まれている。本研究では、腫瘍溶解性ウイルス、レオウイルスのGISTに対する有効性を分子生物学的手法を用い検証した。レオウイルスはGIST細胞に殺細胞効果を示し、またGISTの標準治療薬であるイマチニブへの耐性を獲得したGIST細胞に対しても有効性を示した。われわれの研究結果は、レオウイルスがGISTの新たな治療薬として期待しうるものであることを示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether reovirus has antitumor activity against GIST cells in the setting of imatinib sensitivity. Cell proliferation and apoptosis assays were performed using a human GIST cell line, GIST-T1, and imatinib-resistant GIST (GIST-IR) cells that we established. The molecular pathways responsible for cell damage by reovirus were explored using PCR-arrays and Western blots. Reovirus significantly induced apoptotic cell death in GIST-T1 and GIST-IR cells in vitro, despite differences in the activation of receptor tyrosine kinase pathways between GIST-T1 and GIST-IR. Molecular assays indicated the possibility that reovirus induces apoptotic cell death via Fas signaling. Furthermore, in vivo mouse tumor xenograft models demonstrated a significant anti-tumor effect of reovirus on both GIST-T1 and GIST-IR cells. Our results demonstrate the therapeutic potential of reovirus against GIST.

研究分野：消化管腫瘍

キーワード：レオウイルス 腫瘍溶解性ウイルス 消化管腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、消化管間質腫瘍 (GIST; Gastrointestinal stromal tumor) を対象として、腫瘍溶解性ウイルス、レオウイルスの抗腫瘍効果についての研究を行った。GIST は消化管壁深部の固有筋層から発生する間葉系腫瘍である。治療は外科的切除が基本であるが、遠隔転移を伴う切除不能 GIST には薬物治療が行われる。薬剤としては、GIST に発現している c-Kit や PDGFR などを標的とした、マルチターゲット型のチロシンキナーゼ阻害剤が使用される。GIST の 1 次治療には、チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブが推奨されている。イマチニブの奏効率は比較的良好であるが、イマチニブにより GIST が治癒に至ることは稀で、イマチニブの長期間の使用により多くの症例で薬剤耐性が獲得され、2 次治療への移行が必要となる。2 次治療では、イマチニブと同様にチロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブが、さらにイマチニブ、スニチニブへの耐性が獲得された GIST に対しては、マルチキナーゼ阻害剤であるレゴラフェニブが使用される。このように現時点で推奨されている GIST に対する薬物療法は、チロシンキナーゼ受容体を標的とした薬剤のみであり、治療選択のバリエーションに乏しく、また、ほぼ必発の薬剤耐性や、これらの薬剤を用いても完全治癒に至らない点などが改善すべき課題として認識されている。

このように GIST の薬物療法については、薬剤の選択肢が非常に限られている点や、既存の治療法では完全治癒に至らない点など改善の余地が大きく、新たな治療方法の開発が喫緊の課題となっている。

## 2. 研究の目的

腫瘍溶解性ウイルス、レオウイルスは、腫瘍細胞内のみで増殖し、細胞を破壊し、近接する腫瘍細胞に感染を拡大することで抗腫瘍効果を示す。レオウイルスは腫瘍選択的な殺細胞効果を示すが、これは、レオウイルスが癌細胞における *Ras* や *EGFR* などの遺伝子変異にともなう細胞内シグナル伝達系の異常を利用して増殖するためで、これまでに頭頸部癌、膵癌、大腸癌などで、その有効性が報告されている。すでに欧米では、これらの癌種を対象としたレオウイルスの臨床試験が進行中である。これまでに我々は、カルガリー大学 (カナダ) との共同研究により、レオウイルスが胃癌細胞に対し抗腫瘍効果を示すことを明らかとし、さらに HER2 陽性胃癌に対するレオウイルスと分子標的薬の併用療法の有効性について報告してきた (*Cancer Letters*, 2015)。レオウイルスは、既存の抗がん剤とは異なるメカニズムで作用するため、他剤との併用による相乗的な抗腫瘍効果

や、薬剤耐性を獲得した腫瘍への有効性が期待できる。

以上から、腫瘍溶解性ウイルス、レオウイルスによるがん治療が、治療選択の乏しい GIST の新たな治療オプションとして、また薬剤耐性を獲得した GIST に対する治療法として有効であるかについて基礎的な検討を行う目的で本研究を立案した。

## 3. 研究の方法

(1) GIST 細胞株に対するレオウイルスの有効性の検討

レオウイルスを GIST 細胞株 (GIST-T1) へ投与し、MTS アッセイや Caspase 活性アッセイなどの各種アッセイ系を用いレオウイルスの殺細胞効果を評価する。レオウイルスとイマチニブなどの既存の GIST 治療薬との併用効果についても検討する。

(2) レオウイルスの作用メカニズムの解析

レオウイルスに暴露させた GIST 細胞株 (GIST-T1) から mRNA を抽出し、レオウイルスにより誘導された細胞死関連因子を PCR-array 解析により同定する。さらに PCR-array 解析により同定された細胞死関連因子については、ウエスタンブロット法により蛋白レベルでの発現を検討し、レオウイルスの作用メカニズムを明らかとする。

(3) 薬物耐性細胞株の樹立および、薬剤耐性細胞株へのレオウイルスの有効性の検討

GIST 治療薬、イマチニブに対する耐性 GIST 細胞株を作製する。GIST 細胞株を低濃度のイマチニブに暴露し、培養、継代する。薬剤濃度を漸増し、耐性株を樹立する。樹立した薬剤耐性細胞株に対するレオウイルスの有効性について 1. と同様の手法を用い検討する。なお薬剤耐性細胞株については、薬剤耐性と関連した遺伝子変異についてシーケンサーで、また薬剤耐性に関わる細胞内シグナル伝達系について抗体アレイを用いて検討し、耐性株のプロファイリングを行う。

(4) マウス腫瘍皮下移植モデルを用いたレオウイルスの抗腫瘍効果検討

GIST 細胞株 (GIST-T1) を免疫不全マウスの皮下に移植したマウスモデルを作製する。腫瘍が形成された後、マウスにレオウイルスを投与する。経時的に腫瘍の大きさを計測し、レオウイルスの有効性を評価する。レオウイルスと既存の抗腫瘍薬との併用効果についても、マウスモデルを用い評価する。さらに、3. で樹立した薬剤耐性株についてもレオウイルスの有効性について同様の検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) レオウイルスによる細胞増殖抑制効果を WST-1 assay を用いて検討した。レオウイルスは濃度依存的に、GIST 細胞株、GIST-T1

の増殖を抑制した。またレオウイルスは、濃度依存性に Caspase 活性を誘導しており、レオウイルスは GIST-T1 に対しアポトーシスを介した細胞増殖抑制作用をもたらすことが確認された。

(2)ウエスタンブロット法によりレオウイルスによるアポトーシスの誘導について検討した。レオウイルスを暴露した GIST-T1 では、Cleaved caspase-3、Cleaved PARP の発現を認め、レオウイルスはアポトーシスの誘導による殺細胞効果を示すことが確認された。さらに PCR-array 解析によりアポトーシス関連遺伝子の発現変化について検討したところ、レオウイルスにより Fas、TRAIL の発現が優位に上昇していた。ウエスタンブロット法を用い蛋白レベルでの Fas、TRAIL の発現を検討したところ、レオウイルスの GIST-T1 への暴露により、ともに発現が誘導されていた。Fas のリガンドである FasL、TRAIL の受容体である DR4、DR5 についても発現変化について検討したところ、蛋白レベルで DR5 の発現がレオウイルスの暴露により増強されていたが、DR5 以外の発現は変化しなかった。レオウイルスの GIST 細胞に対する殺細胞効果の作用メカニズムとして、Fas および TRAIL によるアポトーシス誘導シグナルが関与していると考えられたため、GIST 細胞に Fas もしくは TRAIL を単独もしくはレオウイルスとの併用で投与した。TRAIL については、単独では効果を認めず、またレオウイルスの効果を増強する作用も認めなかった。一方、Fas については単独投与で抗腫瘍効果を示し、さらにレオウイルスとの併用投与では、相乗的な作用の増強が認められた。以上の結果から、GIST-T1 に対しては、レオウイルスは Fas を介したアポトーシスを誘導していること、また Fas とレオウイルスの併用によりレオウイルスの有効性が相乗的に増強される可能性が示された。

(3)GIST-T1 をイマチニブに暴露し、イマチニブ耐性 GIST 細胞、GIST-IR を作成した。GIST-IR がイマチニブ耐性獲得 GIST に特異的な c-kit および PDGFRA の遺伝子変異を獲得したかについてシーケンサを用いて検討したが、遺伝子変異は認めなかった。抗体アレイを用い、GIST-IR のチロシンキナーゼを介するシグナル伝達系の活性を検討したところ、GIST-IR では、イマチニブにより c-kit や Tie2 などの活性が阻害されないことが確認され、GIST-IR は、増殖に関連した細胞内シグナル伝達系の変調により、耐性を獲得していると考えられた。この GIST-IR を用い、細胞増殖アッセイにより、レオウイルスの効果を検討したところ、レオウイルスは GIST-T1 と同様に GIST-IR の増殖を有意に抑制した。また Caspase 活性 assay では、レオ

ウイルスによる GIST-IR のアポトーシス誘導が示された。

(4)GIST-T1 および GIST-IR を免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍形成を確認した後にレオウイルスをマウスに投与し、その有効性を評価した。レオウイルスは、GIST-T1、GIST-IR ともに増殖を抑制した。レオウイルス投与後腫瘍を摘出し、免疫染色によりアポトーシスの誘導や Fas の発現について評価したところ、レオウイルス投与により腫瘍細胞にアポトーシスが誘導され、また Fas の発現が増強していることが確認され、*in vitro* の実験結果と矛盾しない結果であった。

#### 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 1 件)

Inagaki Y, Kubota E, Mori Y, Aoyama M, Kataoka H, Johnston RN, Joh T. Anti-tumor efficacy of oncolytic reovirus against gastrointestinal stromal tumor cells. *Oncotarget* 査読有り, 18;8(70):115632-115646, 2017.

〔学会発表〕(計 3 件)

久保田英嗣、稲垣佑祐、片岡洋望、青山峰芳、城卓志, Anti-tumor activity of oncolytic reovirus against gastrointestinal stromal tumor. 第 76 回日本癌学術総会, 2017 年 9 月 29 日, 横浜

久保田英嗣、片岡洋望、森義徳、城卓志, Utility of reovirus as an inhibitor of metastasis in gastric cancer. *European Cancer Congress 2015 (ECC 2015)* (18<sup>th</sup> ECCO-40<sup>th</sup> ESMO), September 25-29, 2015

稲垣祐裕、久保田英嗣、森義徳、西江宏忠、林則之、片野敬仁、尾関啓司、片岡洋望、Randal N. Johnston、城卓志, Anti-tumor effect of oncolytic reovirus against gastrointestinal stromal tumor. *Digestive Disease Week 2016, San Diego, USA* 2015.5.24

〔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

森 義徳 (MORI YOSHINORI)

名古屋市立大学・医学（系）研究科（研究院）・研究員

研究者番号：80468248

### (2)研究分担者

片岡 洋望 (KATAOKA HIROMI)

名古屋市立大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：40381785

青山峰芳 (AOYAMA MINAYOSHI)

名古屋市立大学・薬学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：70363918

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

( )