

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21185

研究課題名(和文) 胃癌の腹膜播種転移に対する高感度蛍光診断技術の開発と治療との融合の検証

研究課題名(英文) Novel theranostic strategy against peritoneal metastasis of gastric cancer

研究代表者

菊地 覚次(Kikuchi, Satoru)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40736584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌腹膜播種に対する新規治療として、癌細胞中で選択的に増殖する腫瘍溶解ウイルス(OBP-301)に緑色蛍光蛋白(GFP)を搭載したOBP-401と化学療法(Paclitaxel:PTX)を併用し、その効果を検証した。OBP-401、PTXの併用療法により、強い抗腫瘍効果を示し、PTXによってOBP-401の複製効率が高まることによって、相乗効果があることを確認した。

また、マウス胃癌腹膜播種モデルでは、OBP-401の腹腔内投与により、微細な腹膜播種もGFPで同定できることを証明した。治療モデルでは、PTXとOBP-401の腹腔内投与を行い、著明な腹膜播種治療効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the efficacy of combination therapy using oncolytic adenovirus; OBP-401 which could replicate only within the tumor cells selectively and express green fluorescent protein (GFP) and chemotherapeutic agent, paclitaxel (PTX). OBP-401 synergistically suppressed the viability of two kinds of human SGC cells in combination with PTX in vitro. And PTX enhanced the efficacy of OBP-401 replication, resulted in synergistic effect. Peritoneal metastatic cells were visualized as GFP-positive cells selectively by the intra-peritoneal (i.p.) administration of OBP-401 in the orthotopic mouse model. The combination therapy with i.p. administration of OBP-401 and PTX could also significantly inhibited the tumor growth in vivo.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 腹膜播種 腹腔内投与 腫瘍溶解ウイルス パクリタキセル

1. 研究開始当初の背景

CT、PET などの画像技術の進歩により胃癌の転移診断は向上しているが、微小な腹膜播種転移の診断は依然として困難である。胃癌の腹膜播種診断は、術中に肉眼的観察や腹腔洗浄細胞診を用いた病理学的診断により行われる。最近では審査腹腔鏡が導入され、診断感度は 30-40%改善されたと報告されている。しかし、偽陰性が 10%程度存在すると報告されており、腹膜播種に対するより精度の高い新たな診断技術の開発が望まれる。

一方、胃癌の腹膜播種転移は治療困難であり、現在の標準治療である、全身投与による化学療法を行っても MST (Median Survival Time) は 1 年程度と予後不良である。その原因として、全身投与による化学療法を行っても、腹膜播種転移病巣に薬剤が到達しづらいという問題点がある。近年胃癌の腹膜播種転移に対する腹腔内投与による化学療法の有用性が報告されており、期待されている。しかし、その治療効果は限定的であり、さらなる治療法の改良が望まれる。

申請者らの研究グループは、癌細胞のもつ高いテロメラーゼ活性に依存して制限増殖する腫瘍融解アデノウイルス製剤 (OBP-301: Telomelysin) を開発し、米国での臨床試験にて安全性と有効性を確認し、国内においても臨床試験 (UMIN000010158) が進行中である。また、Telomelysin に GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子を搭載したウイルス製剤 (OBP-401: TelomeScan) (図 1) を開発し、大腸癌腹膜播種マウスモデルにおいて、TelomeScan を腹腔内投与した際に腹膜播種転移を高感度に標識可能であった。また、胃癌患者から採取した腹水中に存在する癌細胞の検出も可能であった。さらに、我々は現在までに、Telomelysin や TelomeScan が様々な癌種に対して抗腫瘍効果を示すことを報告してきたが、既存の抗癌剤と TelomeScan を併用することにより抗腫瘍効果が増強されることも明らかにしている。

今回我々は TelomeScan を用いた新規の胃癌腹膜播種治療の開発を行う。

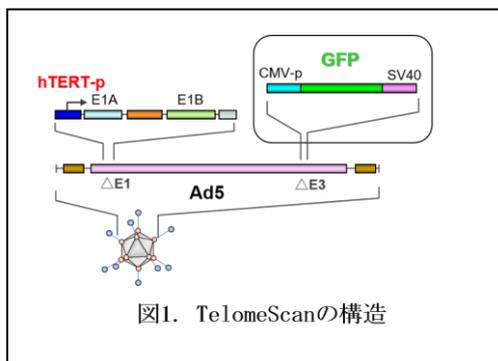


図1. TelomeScanの構造

2. 研究の目的

本研究では、緑色蛍光蛋白 (GFP) を発現する腫瘍選択的増殖型アデノウイルス製剤 (OBP-401: TelomeScan) を腹腔内投与することにより、腫瘍のリアルタイムイメージング

を可能にし、術前や術中に診断困難な胃癌腹膜播種に対する精度の高い腹膜播種診断技術の開発を目的とする。さらに、腫瘍選択的増殖型アデノウイルス製剤 (TelomeScan) と既存の化学療法を併用し、腹腔内投与することにより、治療困難な胃癌腹膜播種に対する新規の有効な治療法を確立し、胃癌腹膜播種に対する診断と治療の融合 (Theranostics) の可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株に対する TelomeScan の抗腫瘍効果および抗癌剤との相乗効果の検討

腹膜播種を来たしやすしい未分化な組織型であるヒト胃癌細胞株 (KatoIII, GCIY) に対して、TelomeScan および胃癌に対して現在臨床で用いられている抗癌剤 (Paclitaxel: PTX) の単独および併用投与時の抗腫瘍効果について、XTT assay にて検討する。同時に、TelomeScan および抗癌剤の治療至適濃度や投与時期について検討し、最も治療効果の高い条件を設定する。また、相乗効果の有無について、Calcosyn Software を用いて評価を行う。相乗効果の機序についても Time-lapse imaging や western blotting を用いて検討を行う。さらに、TelomeScan および抗癌剤の単独や併用投与時に誘導される細胞死の形態について、Apoptosis 関連マーカー (PARP) や Autophagy 関連マーカー (p62) のタンパク発現を解析し、確認する。

(2) 胃癌腹膜播種マウスモデルの作製と腹膜播種転移イメージング

胃癌細胞株を用いて、ヌードマウスに胃癌腹膜播種マウスモデルを作製し、TelomeScan の腹腔内投与を行った後、腹膜播種転移巣の TelomeScan による可視化について蛍光顕微鏡を用いて検討する。さらに、GFP 蛍光を発現する腹膜播種結節を切除し、免疫組織学的にウイルス関連マーカー (E1A) を検出し、TelomeScan の腫瘍特異性についても確認を行う。

(3) 胃癌腹膜播種マウスモデルにおける TelomeScan と抗癌剤の腹腔内投与による抗腫瘍効果の検討

胃癌腹膜播種マウスモデルを用いて、TelomeScan および抗癌剤を単独、併用で腹腔内投与した際の腫瘍の大きさ (IVIS imaging system を使用)、重量、生存期間についての検討を行い、腹腔内投与による TelomeScan や PTX の効果、併用療法の効果について評価する。さらに、腹水量についても、Computed Tomography:CT などを用いて、治療効果判定に用いる。また、腹腔内投与を行った TelomeScan の分布については、ウイルス関連蛋白の E1A に対する抗体を用いて、免疫組織学的染色により確認する。副作用については体重減少や腸管穿孔、肝障害、腹腔内癒着等についての肉眼的および組織学的評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株 (GCIY, KATO-III) に対して、TelomeScan (OBP-401) と PTX を作用させると、単独でもそれぞれ濃度依存性に抗腫瘍効果を認めた (図 2a)。併用療法では、より強力な抗腫瘍効果があることを証明し (XTT assay, 3D sphere formation assay)、さらに、併用療法では、Calculusyn Software を用いた解析によって、相乗効果を示すことを証明した (図 2b)。このことは、既存の化学療法と抗腫瘍ウイルスの併用療法が、難治である胃癌腹膜播種に対して、有望な治療法となる可能性を示している。

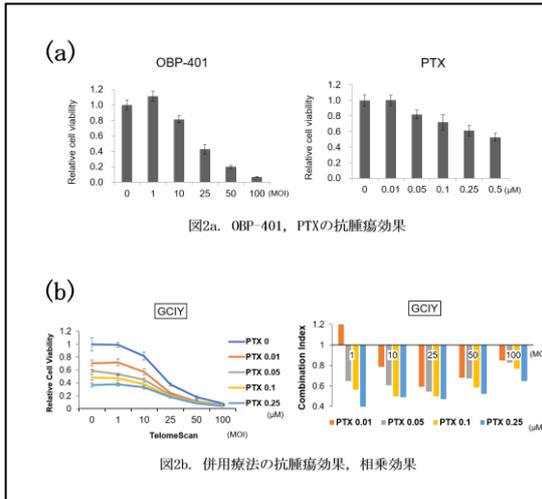


図2a. OBP-401, PTXの抗腫瘍効果

図2b. 併用療法の抗腫瘍効果, 相乗効果

(2) 癌細胞の細胞死メカニズムとして、PTX 治療では、Apoptosis (C-PARP ↑) が関連しており、TelomeScan (OBP-401) による治療では、Apoptosis (C-PARP ↑) および Autophagy (p62 ↓) が関連していることがわかった (western blotting, 図 3)。この結果により、併用療法が、異なった経路やメカニズムによって、治療効果を発揮している可能性を示唆している。

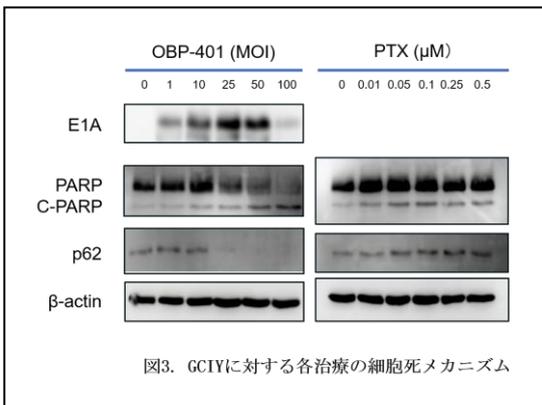


図3. GCIYに対する各治療の細胞死メカニズム

また併用療法では、time-lapse imaging の実験において、PTX と併用した場合、TelomeScan が腫瘍細胞に感染し、GFP 陽性となる細胞数が増加していることがわかった (図 4a)。さらに western blotting においても、PTX を併用することにより、TelomeScan

の複製数 (E1A ↑) が上昇していることが確認され (図 4b)、PTX と TelomeScan の併用療法では、PTX によって TelomeScan の腫瘍細胞内での複製効率が上がり、相乗効果を示していることが示唆された。この結果は、抗腫瘍ウイルスを臨床使用する際に、PTX を併用することによって、より低濃度でも治療効果を発揮することが可能であり、副作用の軽減にもつながる可能性がある。

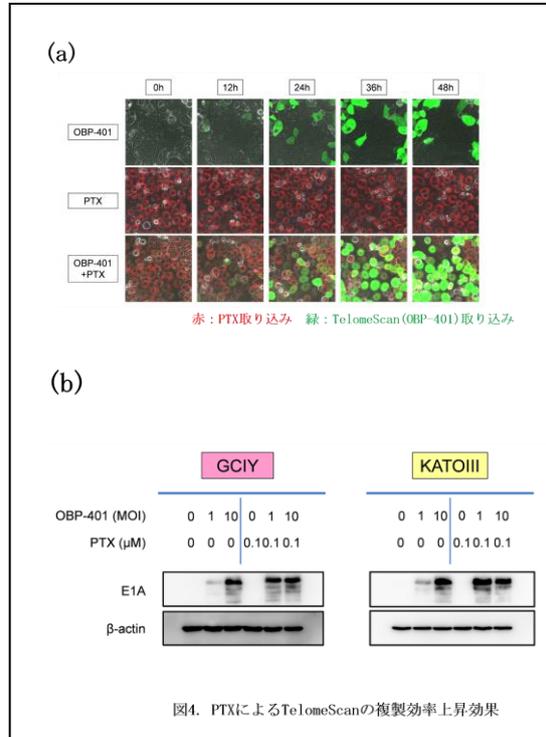


図4. PTXによるTelomeScanの複製効率上昇効果

(3) ノードマウスを用いて、同所性ヒト胃癌腹膜播種モデルを作成し、腹腔内に TelomeScan を投与することにより、蛍光顕微鏡下で腹膜播種結節を特異的に GFP 蛍光として、可視化できることを証明した (図 5)。今までは腹膜播種の有無判定が困難であったが、TelomeScan を用いることによって、腹腔内の微小な腹膜播種結節も術中に高感度に検出可能となり、より正確な診断ができ、患者個人の病期にあったよりの確な治療方針を決定することができる。

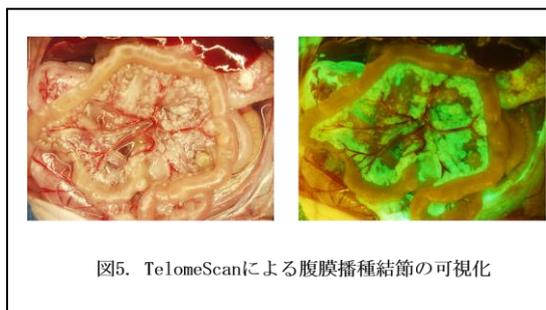


図5. TelomeScanによる腹膜播種結節の可視化

(4) マウス同所性ヒト胃癌腹膜播種モデルを用いて、TelomeScan および PTX の腹腔内投与による治療によって、単独療法でも腫瘍増殖

抑制効果があることがわかり、さらに、両者の併用療法では、有意に強力な腫瘍抑制効果があることを証明した(図 6)。また、治療後の腹膜播種結節を採取し、ウイルス関連蛋白の E1A に対する免疫組織学的染色を行うと、PTX, TelomeScan の併用療法では、ウイルス単独治療に比べて、腫瘍のより深部にまでウイルスが浸透して、治療効果を及ぼしていることが確認された(図 7)。腹腔内併用療法をおこなった群においては、無治療群と比較し、腹水の増加による体重増加が抑制されていた。

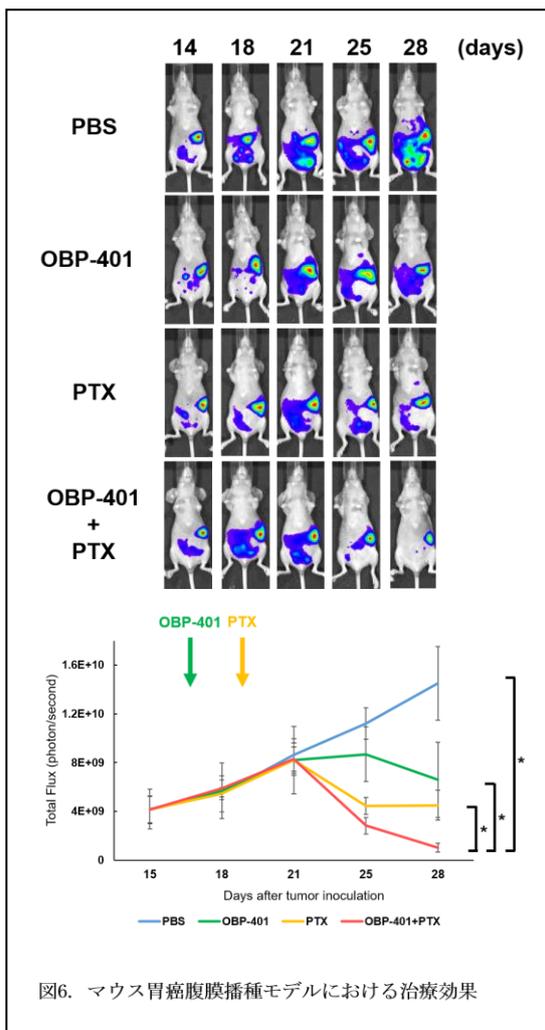


図6. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける治療効果

さらに、腹腔内治療後の腹膜播種結節を採取し、ウイルス関連蛋白である E1A に対する抗体で免疫組織学的染色を行うと、TelomeScan と PTX の併用治療群では、TelomeScan 単独治療群に比べて、腫瘍のより深部にまで TelomeScan が到達し、作用していることが確認された(図 7)。これらの結果から、TelomeScan と PTX 併用による腹腔内治療は、治療困難な胃癌腹膜播種に対して、腫瘍に直接作用し、より強力な抗腫瘍効果を発揮する有効な治療法であると考えられる。また、PTX による抗腫瘍ウイルスの複製増強効果により、腹腔内投与を行うウイルスの濃度も低濃度で十分な効果を発揮することができるため、副作用の軽減を図ることが可能で

ある。

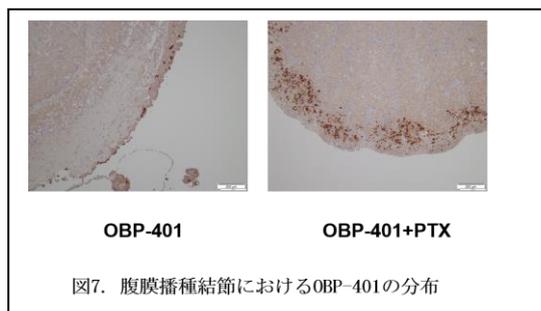


図7. 腹膜播種結節におけるOBP-401の分布

今回使用した抗腫瘍ウイルスと同一の基本骨格を有する OBP-301:Telomelysin については、すでに米国での臨床試験において安全性と有効性を確認され、現在国内においても食道癌を対象とした臨床試験 (UMIN000010158) が進行中であり、その安全性と有効性が確認されている。TelomeScan を腹腔内投与し、術中に腹膜播種診断を行う方法は高感度に検出可能であり、さらに、微小な腹膜播種転移は抗腫瘍ウイルスにより死滅し、同時に治療できる可能性もある。また、既存の化学療法と TelomeScan を併用し腹腔内投与を行う今回の研究は、治療困難な胃癌腹膜播種に対して新規の有効な治療法となる可能性があり、今後の臨床応用に向けてさらなる研究が望まれる。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

- ①石川 亘、菊地覚次、スキルス胃癌の腹膜播種に対する新たな診断的治療戦略：腫瘍融解型アデノウイルスと化学療法の融合、第 73 回日本消化器外科学会、2018 年 7 月 13 日、城山観光ホテル (鹿児島市)
- ②石川 亘、菊地覚次、Novel theranostic strategy against scirrhous gastric cancer: combination with fluorescence oncolytic adenovirus and chemotherapy、AACR Annual Meeting 2018、2018 年 4 月 17 日、シカゴ (アメリカ合衆国)
- ③石川 亘、菊地覚次、Novel theranostic strategy : combination of fluorescence oncolytic virus and chemotherapy for scirrhous gastric cancer、第 76 回日本癌学会、2017 年 9 月 30 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ④石川 亘、菊地覚次、Novel theranostic strategy with combination of fluorescence oncolytic adenovirus and chemotherapy for peritoneal metastasis of gastric cancer、第 23 回日本遺伝子細胞治療学会、2017 年 7 月 2 日、岡山コンベンションセンター (岡山市)
- ⑤石川 亘、菊地覚次、Novel theranostic strategy against scirrhous gastric cancer; combination of chemotherapy and fluorescence oncolytic adenovirus、AACR

Annual Meeting 2017、2017年4月3日、ワシントンD.C. (アメリカ合衆国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 覚次 (KIKUCHI Satoru)  
岡山大学病院・低侵襲治療センター・助教  
研究者番号：40736584

(4) 研究協力者

石川 亘 (ISHIKAWA Wataru)