

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591543
 研究課題名（和文）
 微小リンパ節転移を標的とする選択的ウイルス療法による消化器癌治療の低侵襲化の試み
 研究課題名（英文）
 Telomerase specific oncolytic virotherapy to purge lymph node metastasis for minimizing invasiveness of gastrointestinal surgery
 研究代表者
 香川 俊輔（KAGAWA SYUNSUKE）
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：00362971

成果の概要：

これまで癌細胞を選択的に破壊するウイルス製剤テロメラインの研究開発をおこなってきた。消化器癌治療における病態に応じた低侵襲手術の実現を目指し、癌のリンパ節転移に対するテロメラインの治療効果を検討した。癌の原発巣に投与したテロメラインはリンパ流に乗ってリンパ節に到達し、転移病巣内で治療効果を発揮することが確認された。テロメラインは癌の原発巣とともにリンパ節転移をも治療できる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：消化器癌、遺伝子治療、ウイルス療法

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌、転移、アデノウイルス、テロメラーゼ、ウイルス療法

1. 研究開始当初の背景

近年内視鏡などの診断技術の向上により消化器癌に関して比較的早期の癌が発見される頻度が上昇し、それに呼応し内視鏡的粘膜切除や鏡視下手術といった癌治療の選択肢が増え、個々の病態に応じた治療の個別化、低侵襲化が求められている。手術の低侵襲化を目指す場合に最も重要な情報はリンパ節への転移有

無である。しかし、多くの癌はリンパ節転移がない確証を術前に得ることは不可能性であり、未だ臓器切除とともにリンパ節郭清を画一的に行わざるをえないのが現状である。

病態に応じた臓器切除範囲の縮小、過不足ないリンパ節郭清といった個別的な低侵襲手術を実現するためには、手術に際して癌の進展範囲や転移リンパ節を正確に診断する新

たな診断技術の開発が必須である。我々は癌に特異的に認められるテロメラーゼ活性によって選択的に癌細胞で増殖するウイルス製剤テロメライシン（Telomelysin：OBP-301）に Green Fluorescent Protein（GFP）遺伝子を組み込み、微小リンパ節転移を可視化する技術を確立してきた。そもそもテロメライシンは、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で選択的に増殖し、細胞融解を引き起す性質を持つ。テロメライシンの固形腫瘍への臨床応用は、米国食品医薬品局（FDA）の承認のもと、2006年10月より第I相臨床試験が米国にて行われ、テロメライシンの安全性に関する情報は得られるが、リンパ節転移への具体的な抗腫瘍活性についての研究は未だ行われていない。

これまでの研究結果から、原発巣に投与されたテロメライシンはリンパ流に乗って所属リンパ節に至り、転移癌組織で増殖することにより選択的に微小リンパ節転移を破壊すると期待される。

2. 研究の目的

上述の背景から、内視鏡的粘膜切除や鏡視下手術により原発巣を制御し、かつ原発巣内に投与されたテロメライシンによりリンパ節転移を治療することが可能になれば、消化器癌治療の個別低侵襲化の新たな治療戦略の発展に寄与する可能性がある。テロメライシンを用いて微小リンパ節転移に対するウイルス療法の効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 胃癌、大腸癌を含むヒト消化器癌細胞およびヒト正常細胞における hTERT 遺伝子発現の解析、およびテロメラーゼ活性の測定を行い、消化器癌のテロメラーゼを標的とすることの妥当性を検討する。

(2) リンパ節内の消化器癌細胞をテロメラ

イシンが選択的に攻撃しうるかを検討するため、ヒト消化器癌細胞とヒトリンパ球を混合培養した中にテロメライシンを感染させ、腫瘍細胞へのテロメライシンの選択的殺細胞効果の有無を検討する。

(3) 大腸癌細胞のヌードマウス同所性移植リンパ節転移モデルの作製を行い、“原発巣”にインジゴカルミン染色液を注入し、所属リンパ節までのリンパ流を実体顕微鏡下に確認する。

(4) 同所性直腸癌モデルの直腸腫瘍内に GFP 発現テロメライシンを投与し、一定時間の後に開腹し、高感度蛍光観察システムで GFP 発現テロメライシンのリンパ節転移病巣内での増殖を検証する。

(5) 直腸腫瘍へのテロメライシンの投与後の転移リンパ節での治療効果の評価法として新たな技術の確立が必要で、マウス組織内でのヒト細胞を鑑別し、定量化する方法としてヒト DNA に特異的な Alu 配列に対する定量的 PCR を用いて、マウス組織内のヒト癌細胞量を定量化する方法を確立する。マウスリンパ節に対し既知の数のヒト癌細胞を混合し、PCR でヒト細胞を検出、定量化できるかを検討する。

(6) ヌードマウスの直腸肛門部にヒト直腸癌細胞を移植後、テロメライシンを局所投与し、一定期間の後にマウスを犠牲死させ、リンパ節転移病巣を採取し、上記のヒト細胞の定量化により抗腫瘍効果を解析する。

4. 研究成果

(1) 胃癌、大腸癌細胞のhTERT発現をみたところ、胃癌細胞株MKN28、MKN45、大腸癌細胞株SW620、HT29では正常細胞よりも高い発現が観察され、テロメラーゼ活性を有することが示唆された。またこれらの細胞株はアデノウイルスの感染が成立することから、テロメラー

ぜ活性を標的としたアデノウイルス製剤による治療の妥当性が示唆された。

(2) *in vitro*の実験としてヒト正常白血球と大腸癌細胞HT29細胞を混合培養し、その中でOBP-301が選択的に癌細胞を攻撃できるか検討を行ったところ、白血球との混合培養の条件下でも癌細胞数を減じることができた。

(3) 直腸癌の同所性モデルを作製するためHT29細胞をヌードマウスの直腸粘膜下に移植したところ、直腸腫瘍が形成され、腹腔内リンパ節転移も形成することが確認された。その同所性腫瘍モデルの直腸部腫瘍にインジゴカルミン染色液を注入したところ、1分後から所属リンパ節の青色染色が確認された。つまり原発腫瘍からリンパ節へのリンパ液の流入路の存在が確認された。

(4) 上記同所性腫瘍モデルの腫瘍にGFP蛍光発現テロメラインを投与後、5日目に開腹しリンパ節を蛍光実体顕微鏡を用いて観察したところ、直腸腫瘍部だけでなく転移リンパ節にもGFP蛍光を認め、転移リンパ節へテロメラインが到達、感染し増殖していることが確認された。

さらに、同所性にヒト大腸癌細胞を移植後14日目から3回テロライシンを投与し、35日目にマウスを犠牲死させ腹腔内リンパ節転移を観察したところ、転移病巣が減少しておりリンパ節転移への治療効果が確認された。

(5) ヒトDNAに特異的なAlu配列に対する定量的PCRを用いて、マウス組織内のヒト癌細胞量の定量化を検討したところ、その定量化が可能であることが確認された。

(6) 上記(4)の結果を定量的に評価するため、ヒトDNAに特異的なAlu配列に対する定量的PCRを用いて、リンパ節転移を定量したところ、テロメラインの投与を受けたマウスでは、有意にリンパ節内のヒト癌細胞量が減少しており、リンパ節転移への治療効果が確認

された。

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 4 件)

- ① Ikeda Y, Kojima T, Kuroda S, Endo Y, Sakai R, Hioki M, Kishimoto H, Uno F, Kagawa S, Watanabe Y, Hashimoto Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. A novel antiangiogenic effect for telomerase-specific virotherapy through host immune system. *Journal of Immunology*, 182: 1763-1769. 2009年、査読有り
- ② Hioki M, Kagawa S, Fujiwara T, Sakai R, Kojima T, Watanabe Y, Hashimoto Y, Uno F, Tanaka N, Fujiwara T. Combination of oncolytic adenovirotherapy and Bax gene therapy in human cancer xenografted models. Potential merits and hurdles for combination therapy, *International Journal of Cancer*, 122: 2628-2633, 2008年、査読有り
- ③ Endo Y, Sakai R, Ouchi M, Onimatsu H, Hioki M, Kagawa S, Uno F, Watanabe Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic T-lymphocyte activity via proteasome activator upregulation. *Oncogene*, 27: 2375-2381, 2008年、査読有り
- ④ Hashimoto Y, Watanabe Y, Shirakiya Y, Uno F, Kagawa S, Kawamura H, Nagai K, Tanaka N, Kumon H, Urata Y, Fujiwara T. Establishment of biological and pharmacokinetic assays of telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Cancer Science*, 99: 385-390, 2008年、査読有り

〔学会発表〕（計5件）

- ① 児島 亨, テロメラーゼ特異的腫瘍融解ウイルスによる大腸がんモデルにおけるリンパ節内転移癌細胞の粛清効果の検討, 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月29日, 愛知県名古屋市
- ② Toru Kojima, In vivo biological purging of lymph node metastasis by Telomerase-specific oncolytic virus in an orthotopic human colorectal cancer model. AACR 99th Annual Meeting, 2008年4月14日, San Diego, 米国
- ③ 児島 亨, Telomerase-specific virotherapy targeting lymph node micrometastasis of human cancer, 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3日, 神奈川県横浜市
- ④ Toru Kojima, Telomerase-specific virotherapy targeting lymph node metastasis of gastrointestinal cancer, 10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, 2007年6月1日, Washington, 米国
- ⑤ 児島 亨, 消化器癌の微小リンパ節転移を標的とする新規ウイルス製剤OBP-301による治療法の開発, 第107回日本外科学会定期学術集会, 2007年4月11日, 大阪府大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香川 俊輔 (KAGAWA SHUNSUKE)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号 : 00362971

(2) 研究分担者

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号 : 00304303

(3) 連携研究者
なし