

令和元年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05416

研究課題名(和文) 消化器がん個別化医療のための蛍光ウイルスを用いたデュアル体外診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of the Dual fluorescent cytology with tumor-specific viruses for gastrointestinal cancer precision medicine

研究代表者

藤原 俊義 (FUJIWARA, Toshiyoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00304303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：消化器がんの浸潤・転移形式の中で、腹膜播種(癌性腹膜炎)は最終的な死亡原因の大きな割合を占めており、より細やかな(精密な)診断技術が必要である。本研究では、テロメラーゼ特異的蛍光標識ウイルス製剤TelomeScan(OBP-401)で高率かつ簡便に腹腔内浮遊がん細胞を可視化可能であることを明らかにした。さらに、ユニークなCD46を介した標的細胞特性とmicro-RNAによる厳格な増殖制御機能を有する新たな蛍光標識ウイルス試薬TelomeScan-F45(OBP-1101)を併用するデュアル体外診断システムを考案したが、その有用性は示せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テロメラーゼ特異的蛍光標識ウイルス製剤TelomeScan(OBP-401)では、EpCAMなど上皮系マーカーを指標としたCellSearchシステムでは検出不能であった、より悪性化して上皮間葉転換(EMT)を生じたがん細胞も標識することができ、鋭敏で高精度な検出感度が確認できた。TelomeScan-F45(OBP-1101)を併用するデュアル体外診断システムの確立は困難であったが、TelomeScanによる臨床的に有用なプラットフォームは構築できたと考える。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dissemination is the most common form of metastasis in gastrointestinal cancer, and is associated with an extremely poor prognosis. We developed a new approach to visualize floating tumor cells using a green fluorescent protein (GFP)-expressing attenuated adenovirus in which the telomerase promoter regulates viral replication (TelomeScan, OBP-401). Moreover, we used a unique TelomeScan derivative (TelomeScan-F45, OBP-1101) that have a strict replication control function by micro-RNA together with targeting properties through CD46; however, unfortunately, the combination strategy was not able to show the usefulness.

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌 遺伝子 細胞・組織 医療・福祉 トランスレーショナルリサーチ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報の蓄積により、疾患中心に行われてきた医療は患者個々の病態に合わせた個別化医療 (Personalized Medicine) の方向へと進化してきている。消化器がん治療においても、画一的な治療よりも患者や癌の情報に基づいた細やかな治療戦略の構築が重要とされている。われわれは、テロメラーゼ活性 (hTERT 遺伝子発現) 依存性に癌細胞で選択的に増殖し、蛍光遺伝子 GFP を発現する改変アデノウイルス TelomeScan (OBP-401) を作成し (Kishimoto et al, Nature Med, 2006)、癌患者の血中循環癌細胞 (CTC) の可視化を実現した (Kojima et al, J Clin Invest, 2009)。また、平成 22 年度からの第 3 次対がん総合戦略研究事業、平成 26 年度からの革新的がん医療実用化研究事業にて、胃癌患者の腹腔洗浄液中の細胞分画から遊離癌細胞を GFP 陽性細胞として検出する新しい技術を確認し、細胞診陽性かつ TelomeScan 陽性症例は急速に進展・再発する群として層別化できることを明らかにした (図 1)。しかし、当該研究にて、当初の予想以外に、細胞診陰性患者の中にも TelomeScan 陽性となる集団が存在し、それらの症例の予後が良好であることも発見した。すなわち、TelomeScan は癌細胞以外の細胞集団も可視化していると考えられ、その細胞群を解析し同定することで、さらに精密な治療選択 (Precision Medicine) が可能となる。現在、その形態学的所見から、マクロファージ等の免疫担当細胞ではないかと推測している。

アデノウイルス 5 型を基本骨格とする TelomeScan は、標的細胞表面の受容体 (Coxsackievirus and adenovirus receptor; CAR) を介して感染するが、CAR 発現の低い血球系細胞にはほとんど感染しないと考えられている。しかし、増殖能を有する TelomeScan は、テロメラーゼ活性を持つ血球系細胞に少量でも感染すると、偽陽的に GFP 蛍光を発現してしまう可能性は否定できない。大阪大学大学院薬学研究科の水口裕之 教授、櫻井文教 准教授らのグループは、TelomeScan のファイバーを赤血球以外のすべてのヒト細胞が発現する CD46 に結合するアデノウイルス 35 型由来のファイバーに置換し、さらに血球系細胞で高発現している microRNA である miR-142-3p の標的配列を組み込むことで、感染効率を上げながらも血球系での非特異的 GFP 蛍光発現を抑制する新たな癌特異的蛍光標識ウイルス試薬 TelomeScan-F35 (OBP-1101) を開発した。本ウイルス試薬は、CAR 陰性のヒト癌細胞も検出可能であり、標的癌スペクトラムの拡大が期待される。

2. 研究の目的

消化器がんの浸潤・転移形式の中で、腹膜播種 (癌性腹膜炎) は最終的な死亡原因の大きな割合を占める。しかし、腹腔洗浄細胞診 (CY) 陽性であっても、その治療感受性や生命予後は症例によって大きな差があり、より細やかな (精密な) 治療選択が必要である。本研究では、テロメラーゼ特異的蛍光標識ウイルス製剤 TelomeScan (OBP-401) に、ユニークな CD46 を介した標的細胞特性と micro-RNA による厳格な増殖制御機能を有する新たな蛍光標識ウイルス試薬 TelomeScan-F45 (OBP-1101) を組み合わせ、蛍光発現パターンを解析することで、胃癌、膵癌などの CY 陽性あるいは陰性の消化器がん患者の予後をさらに層別化するデュアル体外診断システムを開発することを目的とする。また、蛍光標識される生物学的悪性度の高い癌細胞やマクロファージを中心とした活性化免疫担当細胞の機能解析も実施する。

3. 研究の方法

1) TelomeScan (OBP-401) と TelomeScan-F35 (OBP-1101) の力価比較

アデノウイルス精製や大量製造に用いる HEK293 細胞を用いて OBP-401、OBP-1101 それぞれのウイルス試薬の生物学的力価を測定した。

2) 培養ヒト悪性腫瘍細胞における GFP 蛍光発現パターンの解析

胃癌細胞株を中心とする複数の消化器臓器由来の上皮系癌細胞株と骨肉種など間葉系悪性腫瘍細胞株を対象に、OBP-401、OBP-1101 それぞれの感染効率と経時的 GFP 蛍光発現パターンを検討した。

3) 消化器がん患者の腹腔洗浄液の臨床検体を用いた解析

進行胃癌および他の消化器がん (膵臓癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、など) の開腹あるいは腹腔鏡補助下手術の際に、生理食塩水 100 ml を腹腔内に散布し、腹腔洗浄液をできるだけ多く採取する。その一部を迅速細胞診に提出した後、直ちに遠心分離にて細胞分画を回収し、細胞数および生細胞率を確認する。生細胞数から前述の条件設定で算出したウイルス量 (MOI) となるように OBP-401 あるいは OBP-1101 を添加した後、回転培養器内で 24 時間培養する。細胞成分を遠心分離し、蛍光顕微鏡下で GFP 蛍光発現陽性細胞の形態を観察するとともに固定し細胞数をカウントする。患者のフォローアップ情報や追跡調査結果から、術後化学療法のレジメ、治療期間、無再発生存期間、全生存期間などのデータを入手し、GFP 蛍光発現陽性細胞数との相関を検証する。

4. 研究成果

1) TelomeScan (OBP-401) と TelomeScan-F35 (OBP-1101) の力価比較

VP (virus particle)/PFU (plaque-forming units) 比を算出して、各サンプルに均等な感染が可能な

ウイルス用量の微調整を行った。

2) 培養ヒト悪性腫瘍細胞における GFP 蛍光発現パターンの解析

至適ウイルス量 (multiplicity of infection: MOI) を同定し、またモノクロメーター型マイクロプレートリーダー SpectraMax i3 を用いて GFP 陽性細胞の蛍光強度の定量性を確認して、cut-off 値を設定した。

3) 消化器がん患者の腹腔洗浄液の臨床検体を用いた解析

OBP-401 は Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を介して標的細胞に感染し、テロメラーゼ活性依存性に増殖することで GFP 蛍光を発現する。したがって、CAR 発現が低い血球系細胞や他の正常細胞でも、いったん感染が成立すれば、テロメラーゼ活性に応じて GFP 蛍光発現が生じてしまう可能性がある。一方、OBP-1101 はヒト細胞で広範に発現する CD46 表面抗原を受容体として標的細胞に感染するが、細胞内で血球系細胞に特異的な miR-142-3p 標的配列が機能することで、例えテロメラーゼ酵素が活性化されていても、その増殖・複製は強力に抑制されると推測される。

胃癌 49 例中、401 陽性/1101 陽性 13 例 (27%)、401 のみ陽性 6 例 (12%)、1101 のみ陽性 4 例 (8%)、いずれも陰性 26 例 (53%) であった。また、膵癌 23 例中、401 陽性/1101 陽性 5 例 (22%)、401 のみ陽性 1 例 (4%)、1101 のみ陽性 1 例 (4%)、いずれも陰性 16 例 (70%) であった。

予後に関しては、401 のみ陽性症例へのインパクトを期待したが、症例数も少なく明確な結論は得られなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 52 件)

- Kato, T., Noma, K., Ohara, T., Kashima, H., Katsura, Y., Sato, H., Komoto, S., Katsube, R., Ninomiya, T., Tazawa, H., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. Cancer-associated fibroblasts affect intratumoral CD8+ and FoxP3+ T cells via interleukin 6 in the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 査読有 24: 4820-4833, 2018.
- Shigeyasu, K., Okugawa, Y., Toden, S., Miyoshi, J., Toiyama, Y., Nagasaka, T., Takahashi, N., Kusunoki, M., Takayama, T., Yamada, Y., Fujiwara, T., Chen, L., Goel, A. AZIN1 RNA editing confers cancer stemness and enhances oncogenic potential in colorectal cancer. *JCI Insight*, 査読有 3: pii: 99976, 2018.
- Kubota, T., Kuroda, S., Kanaya, N., Morihiro, T., Aoyama, K., Kakiuchi, Y., Kikuchi, S., Nishizaki, M., Kagawa, S., Tazawa, H., Fujiwara, T. HER2-targeted gold nanoparticles potentially overcome resistance to trastuzumab in gastric cancer. *Nanomedicine*, 査読有 14: 1919-1929, 2018.
- Watanabe, M., Kagawa, S., Kuwada, K., Hashimoto, Y., Shigeyasu, K., Ishida, M., Sakamoto, S., Ito, A., Kikuchi, S., Kuroda, S., Kishimoto, H., Tomida, S., Yoshida, R., Tazawa, H., Urata, Y., Fujiwara, T. Integrated fluorescent cytology with nano-biologics for peritoneally disseminated gastric cancer patients. *Cancer Sci.*, 査読有 109: 3263-3271, 2018.
- Kuwada, K., Kagawa, S., Yoshida, R., Sakamoto, S., Ito, A., Watanabe, M., Ieda, T., Kuroda, S., Kikuchi, S., Tazawa, H., Fujiwara, T. The epithelial-to-mesenchymal transition induced by tumor-associated macrophages confers chemoresistance in peritoneally disseminated pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 査読有 37: 307, 2018.
- Yamakawa, Y., Tazawa, H., Hasei, J., Osaki, S., Omori, T., Sugiu, K., Komatsubara, T., Uotani, K., Fujiwara, T., Yoshida, A., Kunisada, T., Urata, Y., Kagawa, S., Ozaki, T., Fujiwara, T. Role of zoledronic acid in oncolytic virotherapy: promotion of antitumor effect and prevention of bone destruction. *Cancer Sci.*, 査読有 108: 1870-1880, 2017.
- Aoyama, K., Kuroda, S., Morihiro, T., Kanaya, N., Kubota, T., Kakiuchi, Y., Kikuchi, S., Nishizaki, M., Kagawa, S., Tazawa, H., Fujiwara, T. Liposome-encapsulated plasmid DNA of telomerase-specific oncolytic adenovirus with stealth effect on the immune system. *Sci. Rep.*, 査読有 7: 14177, 2017.
- Takehara, K., Tazawa, H., Okada, N., Hashimoto, Y., Kikuchi, S., Kuroda, S., Kishimoto, H., Shirakawa, Y., Narui, N., Mizoguchi, H., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Targeted photodynamic virotherapy armed with a genetically encoded photosensitizer. *Mol. Cancer Ther.*, 査読有 15: 199-208, 2016.
- Ishida, M., Kagawa, S., Shimoyama, K., Takehara, K., Noma, K., Tanabe, S., Shirakawa, Y., Tazawa, H., Kobayashi, H., Fujiwara, T. Trastuzumab-based photoimmunotherapy integrated with viral HER2 transduction inhibits peritoneally disseminated HER2-negative cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 査読有 15: 402-411, 2016.
- Osaki, S., Tazawa, H., Hasei, J., Yamakawa, Y., Omori, T., Sugiu, K., Komatsubara, T., Fujiwara, T., Sasaki, T., Kunisada, T., Yoshida, A., Urata, Y., Kagawa, S., Ozaki, T., Fujiwara, T. Ablation of MCL1 expression by virally induced microRNA-29 reverses chemoresistance in human osteosarcomas. *Sci Rep*, 査読有 6: 28953, 2016.

Onishi, T., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Takeuchi, M., Otani, T., Nakamura, S., Sakurai, F., Mizuguchi, H., Kishimoto, H., Umeda, Y., Shirakawa, Y., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Tumor-specific delivery of biologics by a novel T-cell line HOZOT. *Sci. Rep.*, 査読有 6: 38060, 2016.

[学会発表](計 89 件)

重安邦俊、田澤大、橋本悠里、母里淑子、西崎正彦、岸本浩行、永坂岳司、黒田新士、香川俊輔、藤原俊義：がん特異的蛍光ウイルス製剤を用いた簡便な循環がん細胞 (CTC) の遺伝子プロファイリング技術の開発. **第 118 回日本外科学会定期学術集会 (外科学の新知見)** 東京、2018 年.

藤原俊義：消化器がんの診断・治療に有用な遺伝子改変ウイルス製剤の開発研究. **第 73 回日本消化器外科学会総会 (JSGS Science of the Year (学術部門) 受賞講演)** 鹿児島、2018 年.

藤原俊義：消化器がんに対する集学的ウイルス療法. **第 16 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (International Symposium)** 神戸、2018 年.

田澤大、田邊俊介、香川俊輔、浦田泰生、白川靖博、藤原俊義：Recent advances in clinical application of telomerase-specific oncolytic viruses. **第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 (シンポジウム)** 東京、2017 年.

田澤大、田邊俊介、香川俊輔、浦田泰生、白川靖博、藤原俊義：Phase I/II study of a telomerase-specific oncolytic adenovirus OBP-301 in combination with radiotherapy in elderly esophageal cancer patients. **第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 (シンポジウム)** 岡山、2017 年 7.

國府島健、田澤大、杭瀬崇、信岡大輔、吉田龍一、榎田祐三、浦田泰生、香川俊輔、八木孝仁、藤原俊義：膵癌に対するテロメラーゼ特異的腫瘍融解ウイルス療法. **第 72 回日本消化器外科学会総会 (ワークショップ)** 金沢、2017 年.

藤原俊義、田澤大、香川俊輔、田辺俊介、白川靖博：食道がんに対するテロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤を用いた集学的治療. **第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (パネルディスカッション)** 神戸、2017 年.

家田偉史、田澤大、菊地覚次、黒田新士、大原利章、野間和広、岸本浩行、永坂岳司、西崎正彦、香川俊輔、今村健志、藤原俊義：EMT-がん微小環境ネットワークの蛍光生細胞イメージングシステム. **第 76 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)** 横浜、2017 年.

谷本光隆、田澤大、家田偉史、能所洋、尾山貴徳、浦田泰生、香川俊輔、野田卓男、藤原俊義：MYCN 増幅神経芽細胞種の MYCN 依存性を標的とするテロメラーゼ特異的腫瘍融解アデノウイルス療法. **第 76 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)** 横浜、2017 年.

田澤大、香川俊輔、浦田泰生、藤原俊義：蛍光標識ウイルス TelomeScan によるがん細胞検出システムの臨床応用. **第 55 回日本癌治療学会学術総会 (シンポジウム)** 横浜、2017 年.

金谷信彦、黒田新士、垣内慶彦、森廣俊昭、久保田哲史、田澤大、菊地覚次、西崎正彦、香川俊輔、藤原俊義：テロメラーゼ依存性腫瘍選択的融解アデノウイルス製剤の免疫原性薬剤としての可能性と抗 PD-1 交代との併用療法の有用性. **第 30 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (シンポジウム)** 岐阜、2017 年.

藤原俊義、田澤大、水口裕之、浦田泰生、香川俊輔：Molecular Theranostics for gastrointestinal cancer. **第 11 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (シンポジウム)** 神戸、2016 年.

田辺俊介、白川靖博、金谷信彦、岡田剛、前田直見、黒田新士、野間和広、田澤大、香川俊輔、藤原俊義：食道癌に対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究の中間報告. **第 70 回日本食道学会学術集会 (ワークショップ)** 東京、2016 年.

藤原俊義、香川俊輔、田辺俊介、田澤大、野間和広、黒田新士、菊地覚次、白川靖博：食道癌に対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究:低用量群 (Level 1) の薬理動態解析. **第 71 回日本消化器外科学会総会 (ワークショップ)** 徳島、2016 年.

渡辺めぐみ、香川俊輔、桑田和也、坂本修一、菊地覚次、黒田新士、岸本浩行、西崎正彦、田澤大、藤原俊義：胃癌個別化治療に向けた腹腔内遊離癌細胞イメージング技術の応用. **第 71 回日本消化器外科学会総会 (ワークショップ)** 徳島、2016 年.

藤原俊義、香川俊輔、田澤大：Next-Generation Telomelysin: multifunctional telomerase-specific oncolytic adenovirus armed with the wild-type p53 tumor suppressor gene. **第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 (シンポジウム)** 東京、2016 年.

藤原俊義：消化器がんに対するテロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤を用いた集学的治療. **第 75 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)** 横浜、2016 年.

藤原俊義：Multidisciplinary therapy with telomerase-specific oncolytic adenovirus for human gastrointestinal cancer. **第 54 回日本癌治療学会学術集会 (シンポジウム)** 横浜、2016 年.

藤原俊義：テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤を用いた食道癌に対する集学的治療. **第 39 回日本分子生物学会年会 (シンポジウム)** 横浜、2016 年.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：香川 俊輔

ローマ字氏名：(KAGAWA, Shunsuke)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 00362971

研究分担者氏名：田澤 大

ローマ字氏名：(TAZAWA, Hiroshi)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 90415513

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。