

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22390256
 研究課題名（和文） ヒト HER2 分子の細胞外ドメインを発現する腫瘍融解ウイルスによる胃癌分子治療開発
 研究課題名（英文） Molecular therapy for gastric cancer using HER2-extracellular domain-expressing adenovirus
 研究代表者
 藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：00304303

研究成果の概要（和文）：

Trastuzumab（ハーセプチン）はヒト上皮増殖因子受容体 2 型（HER2）を標的分子とするヒト化モノクローナル抗体であり、HER2 陽性の乳癌、胃癌における有用性が証明されている。われわれは、HER2 陰性あるいは HER2 抵抗性となったヒト癌細胞に HER2 の非機能性の細胞外ドメイン（Extracellular domain; ECD）を発現させることで、ADCC（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity、抗体依存性細胞介在性障害作用）増強による trastuzumab の感受性誘導を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Trastuzumab, a humanized antibody targeting HER2, exhibits remarkable therapeutic efficacy against HER2-positive breast and gastric cancers. We found that exogenous HER2-extracellular domain (ECD) expression had no apparent effect on the signaling pathway, but strongly enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity in low HER2-expressing or trastuzumab-resistant human cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：消化器外科学

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：HER2、ADCC、乳癌、胃癌、アデノウイルス、分子標的医薬品、抗体医薬品、トラスツズマブ trastuzumab

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内の特定の分子を標的としてその機能を抑えることで治療効果を発揮する分子標的治療が注目されており、癌の増殖や転移に必要な分子を特異的に抑制する低分子化合物や抗体医薬品が日常臨床に応用されてい

る。分子標的治療では、創薬の段階から狙い撃ちする細胞内のシグナル伝達経路が明らかであるため、治療前に採取した癌組織を解析することで効果が期待できる患者集団を選別することが可能である。しかし、実際にはその割合はごく限られており、ヒト上皮増殖因

子受容体2型 (HER2) を標的分子とする分子重量148 kDaのヒト化モノクローナル抗体であるtrastuzumab (ハーセプチン) が有効であるHER2/neu遺伝子の増幅を伴う乳癌患者は約25%であり、胃癌では約20%とされている。すなわち、分子標的薬剤の効果が期待できない患者の割合はかなり高率であり、これらの症例に対する新たな治療戦略の開発が必要と考えられる。

2. 研究の目的

抗体医薬品の作用機構の主体は抗体結合による細胞内シグナル伝達の阻害であるが、免疫細胞によるADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity、抗体依存性細胞介在性障害作用) もその治療効果に関与していると考えられている。したがって、癌細胞表面にシグナル伝達機能を持たない標的分子の細胞外ドメイン (ECD、extracellular domain) のみを人工的に過剰に発現させれば、HER2分子の細胞外領域のエピトープ (aa529-625) を認識するtrastuzumabの結合を促進し、ADCC活性を選択的に増強させることができる。

本研究では、テロメラーゼ依存性に増殖する腫瘍融解アデノウイルスTelomelysinをベクターとして、HER2の膜貫通領域を含むECDをコードする遺伝子配列を搭載し、細胞融解効果とtrastuzumab存在下でのADCC活性の増強効果を有する新たなウイルス製剤を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HER2/ECD発現プラスミドの作成

全長のHER2遺伝子から膜貫通領域を含む細胞外ドメインをコードする遺伝子配列を制限酵素処理にて切り出し、pcDNA3発現プラスミドベクターのマルチクローニング部位に挿入した。HER2低発現ヒト胃癌細胞にプラスミドをトランスフェクトし、G418添加培養によ

りHER2/ECD安定発現株を樹立した。

(2) Ad-HER2/ECDウイルスの作成

当初、本研究ではテロメラーゼ依存性に増殖する腫瘍融解アデノウイルスTelomelysinをベクターとしてHER2/ECD発現を計画していたが、腫瘍融解ウイルス自体も抗腫瘍効果を有するため、HER2/ECD発現によるADCC活性の増強を検証できないことが明らかになった。そこで、HER2/ECD発現非増殖型アデノウイルスベクターAd-HER2/ECDを作成した。

(3) HER2/ECD蛋白質の発現

HER2/ECD安定発現株およびAd-HER2/ECD感染細胞で、HER2の細胞外ドメイン、シグナル伝達ドメイン、それぞれを選択的に検出する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い、目的とする蛋白質を発現・産生することを検証した。また、フローサイトメトリー解析にて、trastuzumabの認識エピトープが膜表面に発現していることを確認した。

(4) HER2/ECD発現のtrastuzumabのADCC活性への影響の検討

ECD過剰発現のADCC活性に及ぼす影響を検討するため、trastuzumab存在下に末梢血単核球 (PBMC) のHER2/ECD発現細胞に対する⁵¹Cr遊離アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) Trastuzumab長期暴露によるHER2発現

HER2陽性ヒト乳癌細胞を長期間 (3ヶ月) trastuzumabに暴露することで、HER2発現が低下し、ADCC活性の低下が認められた。すなわち、trastuzumab抵抗性の分子機構の1つはHER2発現低下であると考えられる。

(2) Ad-HER2/ECDによるHER2発現

Ad-HER2/ECDの感染によって非常に強力なHER2-ECD発現が誘導されることを、ウエスタンブロット解析、フローサイトメトリー解析にてヒト乳癌細胞MCF-7、MDA-MB-231、およびヒト胃癌細胞MKN1、MKN28で検証し

た。また、それぞれのAd-HER2/ECD感染細胞でtrastuzumabの結合能が増強していることをフローサイトメトリーにて確認した。さらに、HER2発現が低下した抵抗性胃癌細胞において、Ad-HER2/ECD感染で外因性にECD発現が増強できることを明らかにした。

(3) HER2/ECD発現によるADCC活性の増強
プラスミドにてHER2/ECDを発現させることで、低HER2発現ヒト癌細胞にPBMC存在下にtrastuzumabのADCC活性の増強が認められた。また、Ad-HER2/ECD感染MCF-7、MDA-MB-231、MKN1、MKN28細胞を標的細胞とし、trastuzumabとPBMCを加えた⁵¹Cr遊離アッセイを行ったところ、すべての細胞において有意なADCC活性の増強が認められた。

これらの結果より、外因性のHER2/ECD発現はHER2陰性あるいは発現低下したヒト癌細胞のtrastuzumab感受性を増強し、臨床的にも有用と考えられる。

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 34 件)

以下、全て査読あり

1. Hashimoto, Y., Tazawa, H., Teraishi, F., Kojima, T., Watanabe, Y., Uno, F., Yano, S., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. The hTERT promoter enhances the antitumor activity of an oncolytic adenovirus under a hypoxic microenvironment. *PLoS One*, (in press), 2013.
2. Shigeyasu, K., Kagawa, S., Uno, F., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Gochi, A., Kimura, T., Takahata, T., Nonaka, Y., Ninomiya, M., Fujiwara, T. Multicenter phase II study of S-1 and docetaxel combination chemotherapy for advanced or recurrent gastric cancer patients with peritoneal dissemination. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 71: 937-943, 2013.
3. Ohara, T., Noma, K., Urano, S., Watanabe, S., Nishitani, S., Tomono, Y., Kimura, F., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. A novel synergistic effect of iron depletion on anti-angiogenic cancer therapy. *Int. J. Cancer*, 132: 2705-2713, 2013.
4. Hasei, J., Sasaki, T., Tazawa, H., Osaki, S., Yamakawa, Y., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Onishi, T., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 12: 314-325, 2013.
5. Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Osaki, S., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Yano, S., Yoshida, R., Kagawa, S., Uno, F., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *Gene Ther.*, 20: 112-118, 2013.
6. Yamasaki, Y., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., Kuroda, S., Yano, S., Yoshida, R., Uno, F., Mizuguchi, H., Ohtsuru, A., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. A novel apoptotic mechanism of genetically engineered adenovirus-mediated tumour-specific p53 overexpression through E1A-dependent p21 and MDM2 suppression. *Eur. J. Cancer*, 48: 2282-2291, 2012.
7. Tazawa, H., Yano, S., Yoshida, R., Yamasaki, Y., Sasaki, T., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Ouchi, M., Onishi, T., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., Fujiwara, T. Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *Int. J. Cancer*, 131, 2939-2950, 2012.
8. Yoshida, R., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Yano, S., Onishi, T., Sasaki, T., Shirakawa, Y., Kishimoto, H., Uno, F., Nishizaki, M., Kagawa, S., Fujiwara, T. Mechanism of resistance to trastuzumab and molecular sensitization via ADCC activation by exogenous expression of HER2-extracellular domain in human cancer cells. *Cancer Immuno. Immunother.*, 61: 1905-1916, 2012.
9. Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., Fujiwara, T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-specific oncolytic adenovirus with valproic acid against human cancer cells. *Cancer Gene Ther.*, 19: 767-772, 2012.
10. Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Yano, S., Yoshida, R., Uno, F., Kagawa, S., Morimoto, Y., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. Preclinical evaluation of telomerase-specific

- oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res.*, 17: 1828-1838, 2011.
11. Sugio, K., Sakurai, F., Katayama, K., Tashiro, K., Matsui, H., Kawabata, K., Kawase, A., Iwaki, M., Hayakawa, T., Fujiwara, T., Mizuguchi, H. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin. Cancer Res.*, 17: 2807-2818, 2011.
 12. Ohara, T., Takaoka, M., Toyooka, S., Tomono, Y., Nishikawa, T., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., Tanaka, N., Fujiwara, T., Naomoto, Y. Inhibition of mTOR by temsirolimus contributes to prolonged survival of mice with pleural dissemination of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.*, 102: 1344-1349, 2011.
 13. Kishimoto, H., Aki, R., Urata, Y., Bouvet, M., Momiyama, M., Tanaka, N., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Tumor-selective, adenoviral-mediated GFP genetic labeling of human cancer in the live mouse reports future recurrence after resection. *Cell Cycle*, 10: 2737-2741, 2011.
 14. Nemunaitis, J., Tong, A. W., Nemunaitis, M., Senzer, N., Phadke, A. P., Bedell, C., Adams, N., Zhang, Y. A., Maple, P. B., Chen, S., Pappen, B., Burke, J., Ichimaru, D., Urata, Y., Fujiwara, T. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol. Ther.*, 18: 429-34, 2010.
 15. Watanabe, Y., Kojima, T., Kagawa, S., Uno, F., Hashimoto, Y., Kyo, S., Mizuguchi, H., Tanaka, N., Kawamura, H., Ichimaru, D., Urata, Y., Fujiwara, T. A novel translational approach for human malignant pleural mesothelioma: heparanase-assisted dual virotherapy. *Oncogene*, 29:1145-1154, 2010.
 16. Kojima, T., Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Yamasaki, Y., Yano, S., Ouchi, M., Tazawa, H., Uno, F., Kagawa, S., Kyo, S., Mizuguchi, H., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. In vivo biological purging for lymph node metastasis of human colorectal cancer by telomerase-specific oncolytic virotherapy. *Ann. Surg.*, 251: 1079-1086, 2010.
 17. Sakai, R., Kagawa, S., Yamasaki, Y., Kojima, T., Uno, F., Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Urata, Y., Tanaka, N., Fujiwara, T. Preclinical evaluation of differentially targeting dual virotherapy for human solid cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 9: 1884-1893, 2010.
 18. Kuroda, S., Fujiwara, T., Shirakawa, Y., Yamasaki, Y., Yano, S., Uno, F., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Watanabe, Y., Noma, K., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery. *Cancer Res.*, 70: 9339-9348, 2010.
- [学会発表] (計 54 件)
1. 藤原俊義：消化器がん治療における遺伝子工学技術に基づく先端医療開発. **第20回日本消化器関連学会週間 (第10回日本消化器外科学会大会)**、神戸、2012年10月12日.
 2. 藤原俊義：アカデミアにおける探索的医薬品開発の方向性～国産ウイルス製剤の米国での臨床試験への道程～. **第11回CRCと臨床試験のあり方を考える会議 (特別講演I)**、岡山、2011年9月24日.
 3. Fujiwara, T. Molecular imaging and multidisciplinary therapy for human cancer with telomerase-specific oncolytic adenovirus. **8th International Symposium on Minimal Residual Cancer (Plenary Lecture)**, Osaka, 2011年9月22日.
 4. Fujiwara, T., Urata, Y. Molecular imaging and multidisciplinary therapy for human cancer with telomerase-specific replication-selective adenovirus. **第17回日本遺伝子治療学会(シンポジウム)**、福岡、2011年7月16日.
 5. Fujiwara, T. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer. **US-Japan Joint Seminars "Trend of gene& cell therapy as translational research in USA and Japan"**, Fukuoka, 2011年7月14日.
 6. 藤原俊義、浦田泰生：テロメラーゼ活性を標的とするウイルス製剤の癌診断・治療への応用. **第20回癌病態治療研究会(シンポジウム)**、東京、2011年6月17日.
 7. Fujiwara, T. Telomerase-specific oncolytic adenovirus for human cancer therapy and diagnostic imaging. **14th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy: Scientific Symposium "Viral Vectors for Immunomodulation of Cancer: From Bench to Bed"**, Seattle (USA), 2011年5月20日.
 8. Fujiwara, T., Uno, F., Hashimoto, Y., Shirakawa, Y., Nagasaka, T., Kagawa, S., Urata, Y. Detection of viable human

- circulating tumor cells using telomerase-specific GFP-expressing bioengineered adenovirus in patients with gastric cancer: A feasibility study. **2011 ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium**, San Francisco (USA), 2011年1月20日.
9. 藤原俊義 : Theranostic application of telomerase-specific replication-selective adenovirus for human cancer. **第69回日本癌学会学術総会**、大阪、2010年9月24日.
 10. Fujiwara, T. Molecular imaging of human cancer with telomerase-specific replication-selective adenovirus. **Pre-conference Satellite Meeting of World Molecular Imaging Conference "Shedding Light for Unveiling Life"**, Seoul (Korea), 2010年9月6日.
 11. 藤原俊義、宇野太、田澤大、香川俊輔、児島亨、矢野修也、吉田亮介、橋本悠里、浦田泰生 : 遺伝子改変ウイルス製剤を用いた蛍光イメージングによる血中循環がん細胞 (CTC) の検出. **第65回日本消化器外科学会総会**、山口、2010年7月16日.
 12. Fujiwara, T., Urata, Y., Nemunaitis, J. Phase I clinical trial of telomerase-specific oncolytic adenovirus for advanced solid tumors. **第16回日本遺伝子治療学会**、宇都宮、2010年7月2日.
 13. 藤原俊義 : Telomerase-specific molecular radiosensitizer for human cancer. **第49回日本生体医工学会大会**、大阪、2010年6月27日.
 14. 藤原俊義 : テロメラーゼ活性を標的とするウイルス製剤の癌診断・治療への応用. **第110回日本外科学会定期学術集会 (ワークショップ)**、名古屋、2010年4月8日.
- [図書] (計1件)
1. Fujiwara, T. In vivo imaging of human cancer with telomerase-specific replication-selective adenovirus. In **"In Vivo Vellular Imaging Using Fluorescent Proteins"** (Hoffman, R. B., ed.), pp129-139, Humana Press, c/o Springer Science + Business Media, LLC, New York, USA, 2012.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 00304303