

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590922

研究課題名(和文)腫瘍溶解性ウイルスによる新規消化管癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new therapy against gastrointestinal cancer using oncolytic virus

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)・助教

研究者番号：80468248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：HER2陽性胃癌に対してはHER2の分子標的薬トラスツズマブと抗癌剤の併用療法が第一選択となっているが、十分な治療効果が得られていないのが現状である。近年、新たな抗腫瘍療法として腫瘍溶解ウイルスが期待されている。今回我々はHER2陽性胃癌細胞におけるトラスツズマブと腫瘍溶解性レオウイルスの併用による抗腫瘍効果を検討した。HER2陽性胃癌細胞に対するトラスツズマブとレオウイルスの併用は、カスパーゼ3/7を介したアポトーシス誘導により抗腫瘍効果を増強すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Trastuzumab is the key drug against HER2-positive gastric cancer. However, the anti-tumor effect is not enough. Recently oncolytic virus is expected as new anticancer therapy. We examined antitumor effect by the combination of trastuzumab and oncolytic reovirus in HER2-positive gastric cancer cells this time. The combination of trastuzumab and reovirus for HER2-positive gastric cancer cells was thought to reinforce antitumor effect by apoptotic instruction through caspase 3/7.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：レオウイルス トラスツズマブ

1. 研究開始当初の背景

胃癌は世界的に癌死亡率の第2の主要な原因である。進行再発胃癌は、フルオロピリミジン誘導剤を含む多剤併用化学療法によって、主に治療を行う。最近では、細胞障害性化学療法に分子標的治療を併用することによって全生存期間に延長をもたらした。しかし、胃癌患者の全生存期間はまだ1年程度である。このため、更に有効な治療が必要とされる。ヒト上皮成長因子受容体2 (HER2/neu) は上皮成長因子受容体ファミリーのメンバーと二量体化を通して活性化される膜貫通受容器チロシンキナーゼである。そして、Ras/Raf/mitogen-activated プロテインキナーゼの下流の信号伝達とラパマイシン経路のホスファチジルイノシトール-3'-キナーゼ (PI3K) /Akt/哺乳動物標的を含んでいるイベントのカスケードに至る。これらのシグナリング・カスケードは、HER2 陽性の癌細胞と関連した急速な細胞発育、分化、生存に關与する。

胃癌の場合、HER2 過剰発現と増幅は、患者の10%-20%で認められる。ヒト化抗HER2抗体(トラスツズマブ)は、HER2を過剰発現させている癌細胞の発育を阻止するために開発された。

トラスツズマブがリガンドから独立したHER2シグナリングを阻害することを通してその抗腫瘍作用を示すことが示唆される。そして、抗体依存性細胞障害(ADCC)活性をもたらす。そして、p95HER2の形成を妨害して、腫瘍脈管形成を抑制する。

胃癌において、トラスツズマブが化学療法に加えられたとき、HER2陽性の切除不能・進行胃癌(ToGA試験)に関するトラスツズマブ第III相臨床試験では生存を延長した。そして、トラスツズマブはHER2陽性の転移性胃癌の治療のために承認された。

腫瘍溶解性レオウイルスは、エンベロープのない二重鎖RNAウイルスである。

レオウイルス感染は通常上気道および胃腸管に感染し、しばしば無症候性である。

しかしながら、レオウイルスは特定のタイプの悪性細胞で、劇的な細胞溶解反応を示す。腫瘍形成のRas-シグナリング経路の活性化はさまざまなヒト癌でレオウイルスによる腫瘍溶解をもたらす。しかし、最近の報告では他のシグナリング経路がレオウイルスの殺細胞効果に關与すると報告されている。

レオウイルスは、in vitro で多種多様な培養細胞においてアポトーシスを誘発する。

本研究において、in vitro においてレオウイルスがトラスツズマブとの併用で細胞増殖やアポトーシスにおける効果を検討した。またヒト胃癌細胞によるマウスモデルにおける抗腫瘍効果を検討した。

2. 研究の目的

抗癌薬とヒト上皮成長因子受容体2(HER2)-ターゲティング薬剤(トラスツズマブ)を

使用する併用療法は、HER2を過剰発現させている胃癌に対する最善の治療であることが報告された。

トラスツズマブと腫瘍溶解性レオウイルスを使用している併用療法が新しいより有効な治療的なオプションであることをHER2を過剰発現する胃癌において我々は検討した。このため我々はin vitro およびin vivo でトラスツズマブと共にレオウイルスの抗腫瘍効果を検討した。

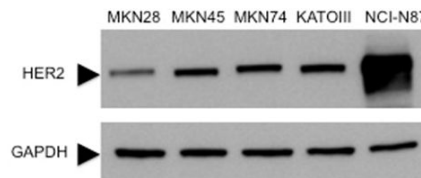
3. 研究の方法

(1)HER2高発現胃癌細胞株(NCI-N87細胞)に対するレオウイルスおよびトラスツズマブ併用による殺細胞効果をWST-8アッセイを用いて検討した。(2)アポトーシス誘導効果をカスパーゼ3/7活性の測定にて検討した。(3)PCRマイクロアレイにて併用抗腫瘍効果に重要な役割を果たす遺伝子を検索した。(4)マウス皮下移植xenograftモデルを用いて腫瘍縮小効果を検討した。

4. 研究成果

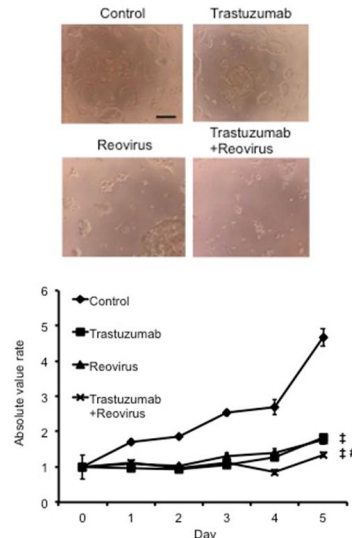
HER2過剰発現胃癌細胞NCI-N87が本研究で使用された。HER2発現はウエスタンブロット法で確認した(図1)。

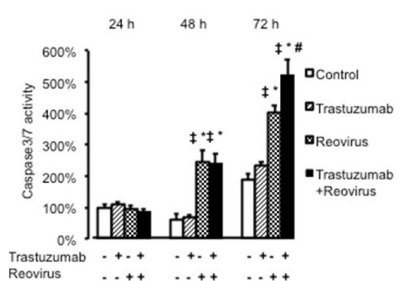
図1



次にトラスツズマブとレオウイルスの単独の殺細胞効果及び併用の殺細胞効果を調べた。それぞれ単独でも殺細胞効果を認めたが併用にて相乗効果を認めた。更にcaspase-3/7 assayではレオウイルスとトラスツズマブの併用はトラスツズマブ単独よりアポトーシスを誘導した(図2)。

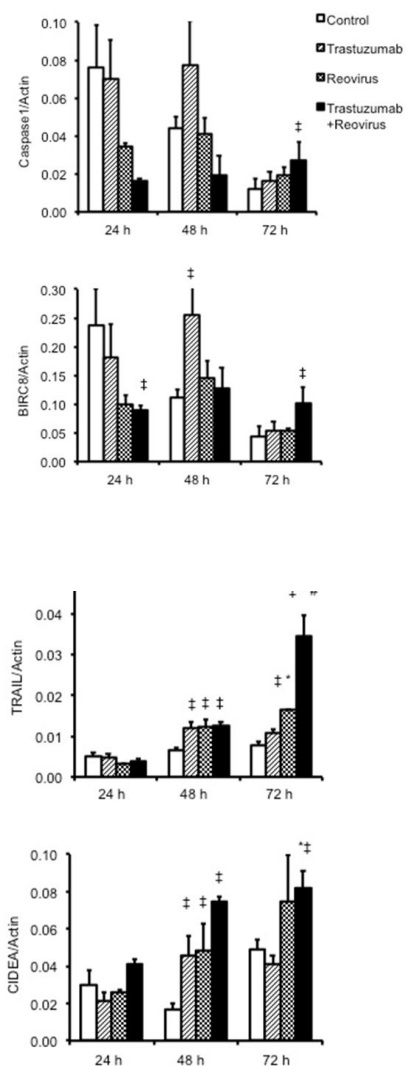
図2





次にトラスツズマブとレオウイルスによる処理が癌細胞障害をもたらす分子メカニズムについて検討した。89種類のアポトーシス関連遺伝子を調べることのできる PCR array を用いた。Caspase1、BIRC8、TRAIL、CIDEA、が増幅されていた。PCR array の結果を確認するために定量的リアルタイム PCR を行った。これにより TRAIL の発現がトラスツズマブやレオウイルスにより誘導され、併用によって更に増強されることが示された (図 3)。

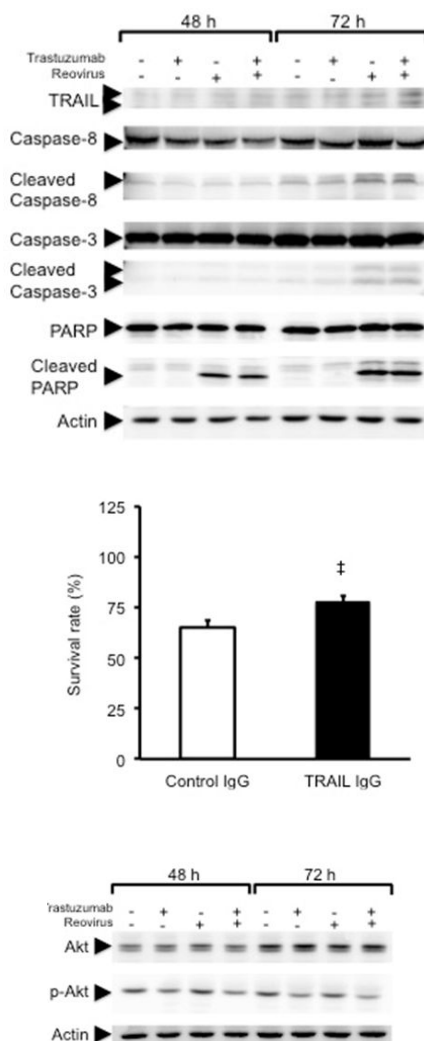
図 3



ウエスタンブロットにてトラスツズマブやレオウイルス単独で TRAIL が誘導され、さ

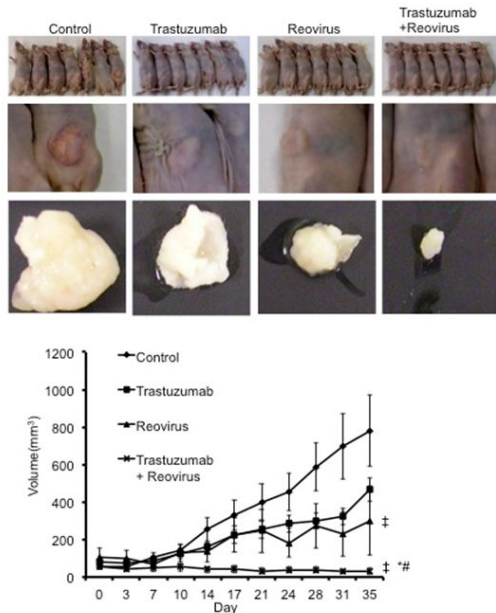
らに併用では増強されることが示された。加えてレオウイルス感染は caspase-3 の活性化と PARP cleavage をもたらすことが示された。一方でトラスツズマブ単独では caspase-3 の活性化や PARP cleavage は認めなかった。そしてレオウイルスとトラスツズマブの併用ではレオウイルス単独と同様の結果であった。アポトーシスにおける TRAIL の関与を示すために、TRAIL 抗体を用いて細胞生存率を検討した。TRAIL 抗体により優位に併用療法による殺細胞効果が抑制された。HER2 高発現細胞は増殖を高めるために抗アポトーシス経路である PI3K/Akt が活性化されていると報告されている。これを調べるためにウエスタンブロットによって Akt のリン酸化や caspase cleavage を測定した。トラスツズマブで処理された細胞において Akt のリン酸化が確認された。さらにレオウイルスとトラスツズマブ併用においては更なる Akt リン酸化が確認された。これによってレオウイルスとトラスツズマブの併用は Akt リン酸化の抑制と caspase-3 活性化を介したアポトーシス誘導によって HER2 陽性胃癌細胞株の増殖と発育を抑制することが示された (図 4)。

図 4



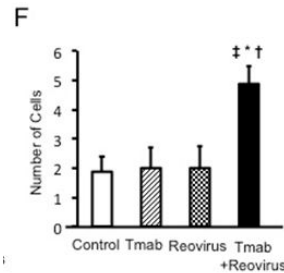
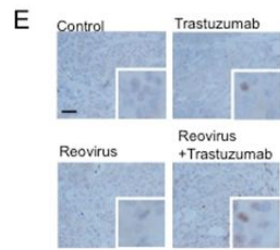
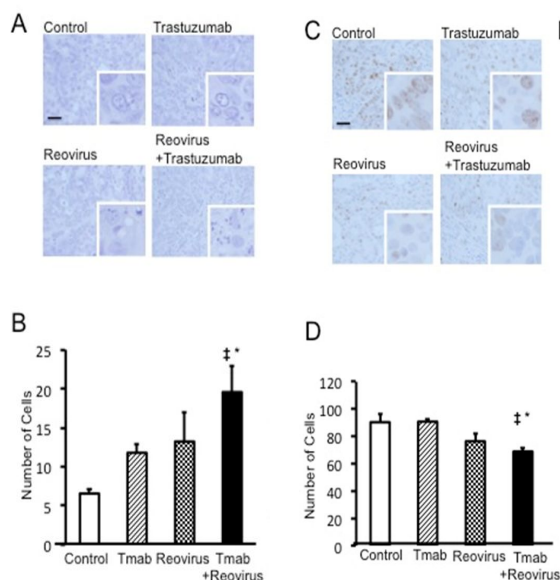
in vitro にて HER2 高発現胃癌細胞の増殖がトラスツズマブとレオウイルスの併用によって抑制されることが示されたため、次に in vivo での実験を行った。マウスにおけるヒト胃癌モデルに対してコントロール、レオウイルス単独、トラスツズマブ単独、及び併用によって処置をし、腫瘍径を測定した。併用療法により有意に腫瘍径の増大を抑制した。また組織学的検査によって併用群において有意にアポトーシス細胞が多いことが示された(図 5)。

図 5



また caspase-3 陽性細胞の増加や Ki-67 陽性細胞の低下が観察された。これによって in vivo でもレオウイルスとトラスツズマブの併用効果があることが示された(図 6A-F)。

図 6A-F



考察

この研究によって腫瘍溶解性レオウイルスは HER2 高発現胃癌細胞に対してアポトーシスを誘導することを示した。またトラスツズマブとレオウイルスの併用が HER 高発現胃癌細胞に対して、それぞれの単剤と比較し増強効果があることを in vitro と in vivo で示した。

トラスツズマブとレオウイルスが癌細胞に与える分子メカニズムを明らかにするために、まず我々は HER 高発現胃癌細胞株 NCI-N87 における遺伝子発現の変化を検討した。われわれのデータはトラスツズマブ及びレオウイルスそれぞれ単剤で TRAIL の発現を誘導することを示す。さらにこれらの併用は更に TRAIL の発現を増強させることを示した。TRAIL は tumor necrosis factor ファミリーに属し、in vitro および in vivo で様々な腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導する。しかし、正常細胞には障害はもたらさない。このため TRAIL は抗腫瘍薬につながる代表的なターゲットである。TRAIL を介したアポトーシスシグナルは表面デスレセプターを介して誘導される。

以前の報告で重要なことは HER2 高発現胃癌における Akt の恒常的活性化である。Akt pathway はアポトーシス抑制や細胞周期の活性に関連する。我々の研究でレオウイルスの感染が Akt をターゲットにすることを見出した。これにより Akt 活性化が抑制され、トラスツズマブとの併用において効果の増強をもたらす。

トラスツズマブに対する耐性は他の抗癌剤との併用によって対応することができる。我々の研究では細胞内のシグナル伝達の解析がレオウイルスとトラスツズマブの併用のメカニズムに重要であることを明らかにした。Akt リン酸化の抑制や caspase-3、PARP の活性化である。

我々はトラスツズマブとレオウイルスの併

用効果を in vivo においても明らかにした。トラスツズマブの効果は ADCC を介して行われるため in vivo での解析はレオウイルスとトラスツズマブの併用効果をより正確に表すと考えられる。BALB-nu/nu マウスは ADCC 活性をもたらず動物モデルであるため、我々はこれを用いた実験を行った。ヒト胃癌細胞 NCI-N87 によるマウスモデルに、レオウイルスやトラスツズマブを投与した。我々はレオウイルスとトラスツズマブの併用効果を明らかにした。

これまでに多くの抗腫瘍効果のある物質が報告されているが、単剤では効果が乏しいのが現実である。このため2剤以上の抗腫瘍剤が投与されているが相加効果だけではなく、相乗効果をもたらされることが望ましい。そして、そのメカニズムが明らかになっていることが期待される。我々の研究ではレオウイルスとトラスツズマブの併用が in vivo と in vitro 両方においてアポトーシスを介して相乗効果があることをもたらずことを明らかにした。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

濱野真吾、森義徳、片岡洋望、西脇裕高、田中守、尾関啓司、塚本宏延、海老正秀、溝下勤、久保田英嗣、谷田諭史、城卓志
HER2 陽性胃癌細胞に対するトラスツズマブ・レオウイルス併用療法の基礎的検討
第 55 回日本消化器病学会・2013 年 10 月 10 日、品川プリンスホテル(東京都)

濱野真吾、森義徳、片岡洋望、田中守、久保田英嗣、城卓志
HER2 陽性胃癌細胞に対するレオウイルスとトラスツズマブ併用による抗腫瘍効果の検討
第 24 回日本消化器癌発生学会総会、2013 年 9 月 5 日、石川県立音楽堂(石川県)

濱野真吾、森義徳、片岡洋望、西脇裕高、田中守、尾関啓司、塚本宏延、海老正秀、溝下勤、久保田英嗣、谷田諭史、青山峰芳、浅井清文、城卓志
HER2 陽性胃癌細胞に対するトラスツズマブと腫瘍溶解性レオウイルス併用による抗腫瘍効果
第 45 回胃病態機能研究会、2013 年 8 月 3 日、名古屋市立大学(愛知県)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし。

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)・助教

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

三浦 裕(MIURA YUTAKA)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 90285198

粕谷 英樹(KASUYA HIDEKI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 00402636

青山 峰芳(AOYAMA MINEYOSHI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 70363918