

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790700

研究課題名(和文)がん選択的生物製剤を用いた早期大腸癌の超低侵襲治療の開発

研究課題名(英文)Development of a novel less invasive therapeutic intervention for early-stage colorectal cancers using cancer-specific targeting agent

研究代表者

岸本 浩行(KISHIMOTO, HIROYUKI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：50613155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜下層に浸潤する早期大腸癌は、リンパ節の廓清のため外科手術が必要である。本研究では、粘膜下層浸潤癌において腫瘍の局所切除の際に、アデノウイルス製剤OBP-301を併用しリンパ節転移を抑制できるか調べた。早期直腸癌マウスモデルを用いて、内視鏡的粘膜下層剥離術の要領で、病変近傍の粘膜下にOBP-301を注入し、その後腫瘍を切除した。腫瘍切除後の評価では、OBP-301を併用した群が、併用しない群に比べ優位にリンパ節転移を抑制していた。OBP-301の併用により、低侵襲な(内視鏡的)腫瘍切除で治療が完結できる可能性が示唆された。

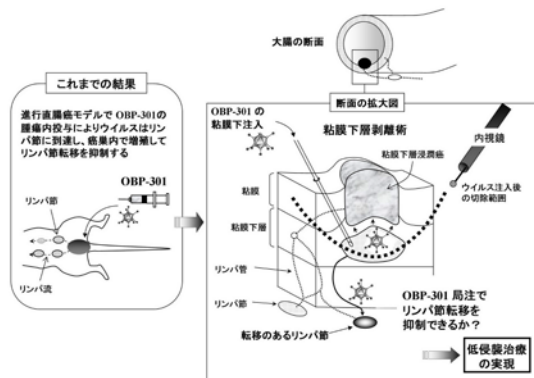
研究成果の概要(英文)：Endoscopic submucosal dissection (ESD) is one of the treatment options for early colorectal cancer. However, cases diagnosed with submucosal (SM) invasion after ESD need surgery. We hypothesized that in SM invasive cases, local tumor resection with a telomerase-dependent tumor killing adenoviral agent (OBP-301) dosing might inhibit LN metastasis. In this study, we assessed whether resection of primary tumor in a similar manner to ESD with prior OBP-301 injection into the peritumoral SM space could purge LN metastasis. Our study demonstrated that OBP-301 could completely eradicate regional LNs metastasis in the SM invasive rectal tumor mouse model with spontaneous LN metastasis by the injection of OBP-301 into the peritumoral submucosal space mimicking the ESD procedures. Virus-mediated biological ablation with the standard ESD technique provides a potential alternative to prophylactic surgery for SM invasive colorectal cancer patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：消化器内視鏡学

1. 研究開始当初の背景

早期大腸癌は、内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic submucosal dissection: ESD) などの内視鏡的治療により、根治が望める可能性が高い。しかし、早期大腸癌であっても粘膜下層まで浸潤している場合は、約 10% にリンパ節転移が認められるという理由から粘膜下層浸潤大腸癌の標準治療はリンパ節郭清を伴った開腹または腹腔鏡による外科的切除とされている。我々は、以前、がん細胞で高発現しているテロメラーゼの構成成分の一つであるヒトテロメラーゼ逆転写酵素のプロモーター依存性に、がん細胞で選択的に増殖し細胞死を誘導するアデノウイルス製剤 (OBP-301) を開発し、それを進行直腸癌へ局所投与することにより、ウイルスが領域リンパ節に到達し、リンパ節の転移病巣内で増殖してリンパ節転移を幾分、抑制できることを報告した。この OBP-301 は、米国において各種進行固形癌患者に単独投与され、平成 20 年で第 I 相臨床試験が終了し、その安全性と臨床効果が確認されている。以上の事実より、リンパ節転移の危険性が 10% 程度あるばかりに、リンパ節廓清のための外科手術が必須とされている大腸癌の粘膜下層浸潤癌症例において、(内視鏡的) 腫瘍切除の際に腫瘍近傍へ増殖型ウイルス OBP-301 の注入を併用するという非常に簡便・低侵襲な処置で、外科治療の必要性の根拠となっているリンパ節転移を制御できないかと考えた。局所切除時にリンパ節転移の制御を目的として抗腫瘍薬を併用するこのような単純な試みは、これまで報告されていない。既存の抗がん剤や他の非増殖型ウイルス製剤との大きな違いは、OBP-301 は腫瘍特異的な増殖ウイルス、つまり癌組織内で薬そのものが増えるという生物製剤でしか持ち得ないユニークな特徴を持っている点であるが、この特性により、内視鏡的粘膜下層剥離術施行時に OBP-301 を併用(局所投与)して所属リンパ節への転移の制御を試みるという、全く新しい発想の治療法を考案するに至った。本研究により患者に優しい低侵襲治療の一選択肢を提案し、過剰な手術を避けることによる医療費の節減、治療後の患者の生活の質の向上に貢献できると期待される。



2. 研究の目的

早期がんの中でも粘膜下層浸潤癌では、リンパ節転移の危険性が約 10% があるため、内視鏡ではアクセス不能な所属リンパ節を廓清するために進行がんと同様な腸管を切除する外科手術が必要とされている。本研究では、大腸の粘膜下層浸潤癌において腫瘍の局所切除の際に、申請者らが開発した殺腫瘍アデノウイルス製剤 OBP-301 を併用し、外科治療の必要性の根拠となっているリンパ節転移の抑制が可能か調べ、患者に優しい低侵襲な治療法の提案を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) In vitro における OBP-301 の抗腫瘍効果の検討：
96 ウェルプレートにヒト大腸癌 HCT-116-GFP 細胞を 1000 細胞/ウェルずつ播種し、20 時間後に OBP-301 を mock、1、5、10、50、100MOI で感染させた。Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche) を用いて、OBP-301 感染後から 1、2、3、5 日目に XTT アッセイを行った。同容量のコントロール非増殖型アデノウイルス dl312 についても XTT アッセイを行った。

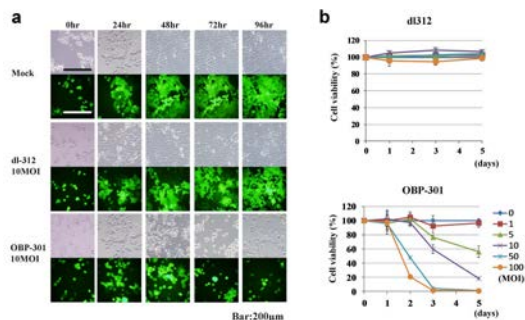
(2) 早期直腸癌マウスモデルの開発：
メスのヌードマウスの直腸の粘膜下層に、PBS 15 μ l とマトリゲル 15 μ l にヒト大腸癌細胞の GFP 安定発現株 HCT-116-GFP を 1.5×10^6 個混じた細胞懸濁液を、30 ゲージ針で注射した。7 日後に開腹して直腸癌の領域リンパ節への転移状況を蛍光観察、組織学的観察により調べ、蛍光観察により治療効果の判定が可能かどうかを評価した。

(3) 腫瘍の局所切除における OBP-301 の併用によるリンパ節転移抑制効果の検討：
本研究で確立した蛍光観察により治療効果の判定が可能早期直腸癌マウスモデルを用いて、腫瘍の局所切除において OBP-301 を併用することによりリンパ節転移を抑制できるか検討した。メスのヌードマウスの直腸粘膜下層にヒト大腸癌 HCT-116-GFP 細胞を移植し、7 日後に開腹して蛍光観察によりリンパ節転移のあるマウスのみを選別し実験に用いた。腫瘍移植 7 日目にリンパ節転移が確認されたマウスにおいて、ESD の手技に準じて、原発直腸腫瘍の周囲の直腸粘膜下に OBP-301 を 1×10^9 PFU/30 μ l 注入した後に、直腸固有筋層を保つように原発直腸腫瘍を局所切除した。手術 7 日後に再開腹してリンパ節転移状況を蛍光観察および組織学的に評価した。対照群として、PBS ないしは非増殖型アデノウイルス dl312 を用いた。

4. 研究成果

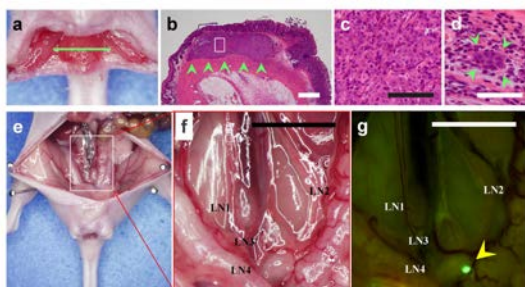
(1) In vitro における OBP-301 の抗腫瘍効果の検討：

OBP-301 のヒト大腸癌細胞への抗腫瘍活性を調べるために、ヒト大腸癌 HCT-116-GFP 細胞に OBP-301 とコントロールである非増殖型アデノウイルス d1312 をそれぞれ 10MOI 感染させ、位相差視野と蛍光視野でタイムラプス観察を行った。d1312 の感染では、明らかな細胞増殖障害を認めなかったが、OBP-301 の感染では感染後 48 時間後から細胞は円形化し 72 時間では細胞死によりシャーレから浮遊しているのが観察された。また、OBP-301 および d1312 を mock、1、5、10、50、100MOI で感染させ、感染後から 1、2、3、5 日目に XTT アッセイによる評価を行った。d1312 の感染では明らかな細胞障害は見られなかったが、OBP-301 の感染では容量依存的な殺細胞効果が認められた。



(2) 同所性の粘膜下層浸潤早期直腸癌マウスモデル：

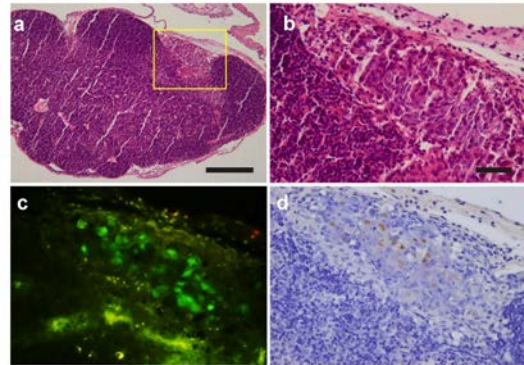
マトリゲルを用いてヒト大腸癌 HCT-116-GFP 細胞をヌードマウスの直腸粘膜下層に移植すると、移植 7 日後には直腸腫瘍が形成され、組織学的に粘膜下層に主座のある早期直腸癌であることが確認された。また、粘膜下層内のリンパ管への脈管侵襲も認めた。移植 7 日後に直腸局所および開腹により腹腔内を GFP 蛍光観察すると、原発直腸腫瘍のみならず、腹腔内の所属リンパ節への小さな転移巣にも腫瘍細胞の GFP 蛍光を検出できた。42 匹中 33 匹 (78.5%) のマウスにリンパ節転移が認められ、死亡例はなかった。本モデル移状況を非常に簡便かつ高感度に評価できることが示された。



(3) 領域リンパ節へのウイルスデリバリーの検討：

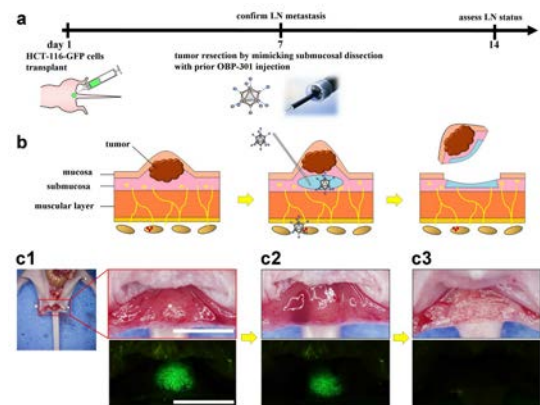
OBP-301 を直腸原発腫瘍の近傍の粘膜下に投与した際に、ウイルスが領域リンパ節内の転移腫瘍組織に到達することを、ヒト大腸癌 HCT-116-GFP を用いた同所性粘膜下層浸潤

直腸癌マウスモデルにおいて確認を試みた。HCT-116-GFP 細胞の直腸粘膜下層への移植 7 日後に OBP-301 を粘膜下に注射し、その 6 日後に、開腹下の蛍光観察で GFP 蛍光を有するリンパ節を採取した。リンパ節切片の HE 染色で被膜下に微小な転移腫瘍細胞塊を認め、同部に一致して、腫瘍細胞由来の GFP 蛍光を認めた。さらに、転移腫瘍組織においてのみ、OBP-301 が産生するアデノウイルス E1A タンパクが認められた。この結果は、OBP-301 は直腸腫瘍の近傍の粘膜下投与されると、領域リンパ節に到達し、腫瘍選択的にウイルス増殖することを示唆している。

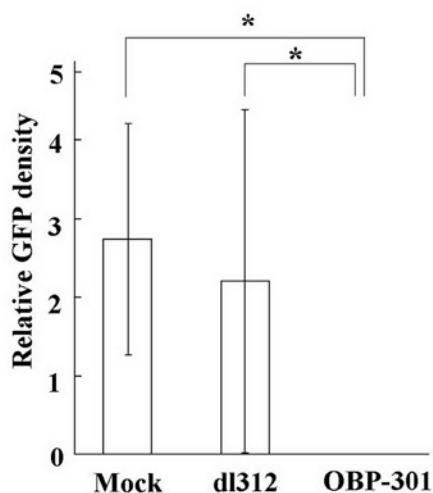
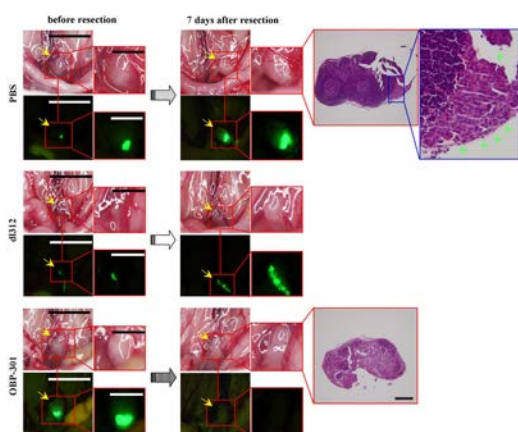


(4) 腫瘍の局所切除における OBP-301 の併用によるリンパ節転移抑制効果の検討：

粘膜下層浸潤早期直腸癌マウスモデルを用いて、粘膜下層切除により腫瘍を局所切除する際に、粘膜下層へ OBP-301 を投与することにより、リンパ節転移を抑制できるか検討した。ヌードマウスの直腸粘膜下層にヒト大腸癌 HCT-116-GFP 細胞を移植し、7 日後に開腹して蛍光観察によりリンパ節転移のあるマウスのみを実験に用いた。腫瘍移植 7 日目に ESD の手技に準じて、原発直腸腫瘍の周囲の直腸粘膜下に OBP-301 を 1×10^9 PFU/ 30μ l 注入した後に、直腸固有筋層を保つように原発直腸腫瘍を局所切除した。対照群として、PBS ないしは非増殖型アデノウイルス d1312 (1×10^9 PFU/ 30μ l) を用い、局所切除 7 日後に再開腹してリンパ節転移状況を蛍光観察および組織学的に評価した。



PBS 投与群では、切除前に比べてリンパ節の GFP シグナルは増強し、リンパ節転移は増悪していた。一方、OBP-301 投与群では、切除前に認めていた GFP 蛍光は消失し、組織学的にも腫瘍組織は認められず、著明にリンパ節転移を抑制していた。dl312 投与群ではリンパ節転移の抑制は PBS 投与群と比較して有意差は認められなかった。これらの結果により、ESD 施行時に、粘膜下層へ OBP-301 を投与することにより微小リンパ節転移を制御しうる可能性が示唆された。



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 2 件)

①Kikuchi S, Kishimoto H, Tazawa H, Hashimoto Y, Kuroda S, Nishizaki M, Nagasaka T, Shirakawa Y, Kagawa S, Urata Y, Hoffman RM, Fujiwara T: Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer. Mol Ther. 査読有、2015, 23(3):501-9. DOI: 10.1038/mt. 2014. 244.

②Kishimoto H, Momiyama M, Aki R, Kimura

H, Suetsugu A, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM: Development of a clinically-precise mouse model of rectal cancer. PLoS One. 査読有、2013, 8(11):e79453. DOI: 10.1371/journal.pone.0079453.

[学会発表] (計 12 件)

①菊地覚次、岸本浩行、田澤 大、黒田新士、西崎正彦、香川俊輔、浦田泰生、ロバート Hoffman、藤原俊義 : テロメラーゼ依存性増殖型アデノウイルス製剤を用いた早期大腸癌の微小リンパ節転移制御
第 73 回日本癌学会 横浜 2014 年 9 月 25 日

②Naoto Hori, Satoru Kikuchi, Hiroyuki Kishimoto, Hiroshi Tazawa, Shinji Kuroda, Shunsuke Kagawa, Yasuo Urata, Robert M. Hoffman, Toshiyoshi Fujiwara: Combination strategy of endoscopic resection and telomerase-targeting oncolytic virus (OBP-301) for eradicating lymph node metastasis of submucosal invasive colorectal cancer
第 105 回 AACR サンディエゴ (アメリカ) 2014 年 4 月 8 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 浩行 (KISHIMOTO Hiroyuki)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号 : 50613155

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし