

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25293283

研究課題名(和文) 消化器癌に対する細胞内侵入活性を有する免疫細胞をキャリアとするウイルス療法の開発

研究課題名(英文) "Cell-in-cell" activity-based tumor-specific delivery of biologics

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) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で癌細胞指向性(ホーミング機能)を有し、細胞内侵入(Cell-in-Cell)活性を持つ免疫細胞HOZOTをキャリア細胞として、ウイルス表面タンパク質のファイバーを35型アデノウイルスのファイバーに置換したウイルスTelomeScan/F35を搭載したAd-HOZOTの抗腫瘍効果を検討した。Ad-HOZOTは、抗アデノウイルス中和抗体の存在下でも抗腫瘍活性を発揮し、腹膜播種モデルで有意に播種病変を減少させ、壊死を誘導するとともに有意な中間生存期間(MST)の延長を来した。本技術は、難治性消化器癌の標的化治療戦略として有用である。

研究成果の概要(英文)："Cell-in-cell" denotes an invasive phenotype in which one cell actively internalizes in another. The novel human T-cell line HOZOT, established from human umbilical cord blood, was shown to penetrate a variety of human cancer cells but not normal cells. Here, we report a new, intriguing approach using HOZOT cells to transmit biologics such as oncolytic viruses into human cancer cells by cell-in-cell invasion. HOZOT cells were successfully loaded via human CD46 antigen with an attenuated adenovirus containing the fiber protein of adenovirus serotype 35 (OBP-401/F35), in which the telomerase promoter regulates viral replication. OBP-401/F35-loaded HOZOT cells were efficiently internalized into human cancer cells and exhibited tumor-specific killing by release of viruses, even in the presence of anti-viral neutralizing antibodies. Moreover, intraperitoneal administration of HOZOT cells loaded with OBP-401/F35 significantly suppressed peritoneally disseminated tumor growth in mice.

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

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは本来、ヒトの細胞に感染、増殖し、その細胞を様々な機序により破壊する。その増殖機能に選択性を付加することにより、ウイルスを癌細胞のみを傷害する治療用製剤として用いることが可能となる。Telomelysin (OBP-301) は岡山大学で開発されたウイルス製剤であり、アデノウイルス 5 型を基本骨格とし、テロメラーゼ構成成分である hTERT 遺伝子のプロモーターにより癌細胞のみで選択的に増殖して腫瘍融解を引き起す (Kawashima et al, Clin. Cancer Res., 2004; Kishimoto et al, Nature Med., 2006)。ヒトへの Telomelysin 局所投与の安全性は、米国食品医薬品局 (US FDA) の承認のもと、2006 年より米国ダラスで実施した各種固形癌への腫瘍内局所投与による第 I 相臨床試験で実証されている (Nemunaitis et al, Mol. Ther., 2010)。また、局所投与された Telomelysin はリンパ節領域まで拡散し、領域的な抗腫瘍効果を発揮することが確認されている (Kuroda et al, Cancer Res., 2010)。2013 年からは、厚生労働省の承認を受けて、岡山大学で進行食道癌を対象に放射線治療を併用する Telomelysin の腫瘍内投与の臨床研究を開始する。しかし、このウイルス製剤の欠点は、癌特異性はあるものの癌組織への集積性はなく、既感染や初回投与で産生される抗アデノウイルス中和抗体で不活化されるため、全身投与が困難な点である。

HOZOT は 2006 年、林原生物化学研究所で発見された新規の T 細胞である (Takeuchi et al, J. Mol. Cell Biol., 2010)。臍帯血より分離された単核球をマウスストローマ細胞と共培養することで誘導され、CD4、CD8 の両抗原を発現する。HOZOT の特性として、癌細胞指向性 (ホーミング機能) を有し、癌細胞に侵入して (Cell-in-Cell 活性) 自ら死滅すると同時に癌細胞を破壊する。今回、このユニークな癌指向性 HOZOT を生物学的キャリアとして用い、癌局所に Telomelysin を選択的に輸送するとともに、中和抗体による不活化を回避しようと考えた。

2. 研究の目的

分子標的医薬品など消化器癌に対する有効な新薬が開発されてきているが、腹膜播種や遠隔転移を来たした場合は極めて難治性である。Telomelysin はテロメラーゼ依存性に癌細胞を殺傷する腫瘍融解アデノウイルス製剤であるが、腹腔内投与や全身投与では中和抗体による不活化で効果が著しく減弱する可能性がある。本研究では、生体内で癌細胞指向性 (ホーミング機能) を有し、細胞内侵入 (Cell-in-Cell) 活性を持つ免疫細胞 HOZOT をキャリア細胞として Telomelysin の抗腫瘍活性を検証し、難治性消化器癌を標的とする新たな治療戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

1) HOZOT の分離・培養

ドナー臍帯血より分離された単核球の全画分をマウスストローマ細胞と共培養することで HOZOT を誘導する。

2) HOZOT に搭載する至適ウイルス製剤の検討

HOZOT における各種アデノウイルス受容体の発現をフローサイトメトリーにて解析する。具体的には、CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor)、avb3 インテグリン、avb5 インテグリン、CD46 などを測定して感染効率との相関を検討する。

ウイルス表面タンパク質のファイバー領域の改変を行った各種アデノウイルスの感染効率を検討する。まず、感染性のみを比較するために、ファイバー改変非増殖型 GFP 発現アデノウイルスを感染させ、GFP 陽性 HOZOT の比率を比較検討し、最適なファイバーを決定する。

3) ウイルス搭載した HOZOT (Ad-HOZOT) の抗腫瘍効果の検討

最適なファイバーを有する改変 GFP 発現 Telomelysin を作成し、HOZOT への感染効率を確認する。各種癌細胞とウイルスを感染させた HOZOT (Ad-HOZOT) を *in vitro* で共培養し、抗腫瘍効果と Cell-in-Cell 活性、ウイルスの細胞内局在、ウイルスの拡散などを比較検討する。これらの効果は蛍光顕微鏡下にタイムラプス観察にて動画として記録し、さらに三次元スフェロイド培養した癌細胞を用いて三次元構造での Cell-in-Cell 活性とウイルス拡散能を検証する。

4) Ad-HOZOT に対する抗アデノウイルス中和抗体の影響の検討

段階希釈した抗アデノウイルス抗体を各ウェルに添加し、*in vitro* において各種癌細胞に対するファイバー改変 Telomelysin 単独と HOZOT に感染させた Ad-HOZOT の抗腫瘍効果を比較検討する。中和抗体によってウイルス単独の効果は不活化されるはずであるが、Ad-HOZOT ではキャリア細胞が抗体のウイルス結合を回避するため、抗腫瘍効果は維持されると推測される。さらに、三次元スフェロイド培養下での中和抗体の影響も、タイムラプス観察を行い同時に確認する。

5) 担癌マウスにおける Ad-HOZOT の生体内動態と抗腫瘍効果の検討

ヌードマウスの腹腔内に赤色蛍光 (RFP) でラベルしたヒト癌細胞を移植して作成した腹膜播種モデルで、Ad-HOZOT と HOZOT 単独の腹腔内投与の抗腫瘍効果を比較検討する。

4. 研究成果

1) HOZOT の分離・培養

ヒト臍帯血からの HOZOT の分離培養を定型化し、ドナー臍帯血から十分量の HOZOT を凍結保存した。

蛍光ラベルした HOZOT と非侵襲的 in vivo イメージングシステム IVIS を用いて、正常および担癌マウスにおける HOZOT の生体内動態を観察したところ、肺を中心に HOZOT は全身に分布し、担癌マウスでは背部腫瘍に集積することが確認できた。

2) HOZOT に搭載する至適ウイルス製剤の検討

In vitro において HOZOT への GFP 遺伝子発現 Telomelysin (TelomeScan) の感染効率を検討したところ低効率であったため、ウイルス表面タンパク質のファイバーを 35 型アデノウイルスのファイバーに置換したウイルス TelomeScan/F35 を使用した。TelomeScan/F35 の癌細胞に対する殺細胞効果が強いこと、かつ HOZOT 自身への細胞障害活性が低いことを確認し、HOZOT に TelomeScan/F35 を感染させた Ad-HOZOT を用いて以後の実験を行うこととした。

3) ウイルス搭載した HOZOT (Ad-HOZOT) の抗腫瘍効果の検討

Ad-HOZOT の容量依存性を確認し、抗アデノウイルス中和抗体の存在下ではウイルス単独の抗腫瘍活性は減弱するのに対して Ad-HOZOT は有効であることを確認した。

また、三次元スフェロイド培養下でも Ad-HOZOT が癌細胞塊を攻撃することをタイムラプス観察によって確認した。

5) 担癌マウスにおける Ad-HOZOT の生体内動態と抗腫瘍効果の検討

赤色蛍光 (RFP) でラベルしたヒト癌細胞をヌードマウスの腹腔内に投与して腹膜播種モデルを作成し、Ad-HOZOT を腹腔内投与することで播種病変への TelomeScan/F35 感染を検証した。

治療後約 2 ヶ月で開腹し、蛍光強度を測定して播種量を定量すると、Ad-HOZOT は有意に播種病変を減少させていた。病理組織学的には、Ad-HOZOT 治療群ではウイルスの存在を示すヘキソタンパク質の発現部位に顕著な壊死組織が観察され、有意な中間生存期間 (MST) の延長が認められた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. 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.*, 15: 199-208, 2016, 査読有
2. 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.*, 15: 402-411, 2016, 査読有
3. Yano, S., Takehara, K., Miwa, S., Kishimoto, H., Hiroshima, Y., Murakami, T., Urata, Y., Kagawa, S., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Improved resection and outcome of colon-cancer liver metastasis with fluorescence-guided surgery using in situ GFP labeling with a telomerase-dependent adenovirus in an orthotopic mouse model. *PLoS One*, 11: e0148760, 2016, 査読有
4. Sakurai, F., Narii, N., Tomita, K., Togo, S., Takahashi, K., Machitani, M., Tachibana, M., Ouchi, M., Katagiri, N., Urata, Y., Fujiwara, T., Mizuguchi, H. Efficient detection of human circulating tumor cells without significant production of false-positive cells by a novel conditionally replicating adenovirus. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 3:16001, 2016, 査読有
5. Shigeyasu, K., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Mori, Y., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Nagasaka, T., Kuroda, S., Urata, Y., Goel, A., Kagawa, S., Fujiwara, T. Fluorescent virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumor cells for non-invasive companion diagnostics. *Gut*, 64: 627-635, 2015, 査読有
6. Kikuchi, S., Kishimoto, H., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Nishizaki, M., Nagasaka, T., Shirakawa, Y., Kagawa, S., Urata, Y., Hoffman, R.M., Fujiwara, T. Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer. *Mol. Ther.*, 23: 501-509, 2015, 査読有
7. Yano, S., Miwa, S., Kishimoto, H., Tonei, M., Hiroshima, Y., Yamamoto, M., Bouvet, M., Urata, Y., Tazawa, H., Kagawa, S., Fujiwara, T., Hoffman, R. Experimental curative fluorescence-guided surgery of highly invasive glioblastoma multiforme selectively labeled with killer-reporter adenovirus. *Mol. Ther.*, 23: 1182-1188, 2015, 査読有
8. 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, 査読有
9. 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, 査読有

10. Yano, S., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Shirakawa, Y., Kuroda, S., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Uno, F., Nagasaka, T., Urata, Y., Kagawa, S., Hoffman, R. M., Fujiwara, T. A genetically engineered oncolytic adenovirus decoys and lethally traps quiescent cancer stem-like cells into S/G2/M-phases. *Clin. Cancer Res.*, 19:6495-6505, 2013, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 香川俊輔、渡邊めぐみ、栗田和也、菊地寛次、黒田新士、坂本修一、西崎正彦、田澤大、藤原俊義 : Fluorescence-guided imaging of gastric cancer cells for an insight into peritoneal dissemination. **第88回日本胃癌学会総会(パネルディスカッション)**、別府国際コンベンションセンター(大分県別府市)、2016年3月19日。
2. 香川俊輔、渡邊めぐみ、石田道弘、黒田新士、菊地寛次、田澤大、岸本浩行、栗田和也、久保田哲史、堀直人、田辺俊介、西崎正彦、浦田泰生、藤原俊義 : Novel cytological diagnosis of peritoneal wash for gastric cancer by fluorescence-emitting virus TelomeScan. **第115回日本外科学会定期学術集会(International Session)**、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015年4月16日。
3. 香川俊輔、渡邊めぐみ、石田道弘、栗田和也、黒田新士、菊地寛次、香川哲也、西崎正彦、田澤大、藤原俊義 : 腫瘍特異的蛍光発現 virus 試薬による腹腔洗浄液中の遊離胃癌細胞診断の臨床的意義. **第70回日本消化器外科学会総会(ワークショップ)**、オークラアクトシティ浜松(静岡県浜松市)、2015年7月17日。
4. 藤原俊義、田辺俊介、田澤大、香川俊輔、白川靖博 : Phase I/II trial of endoscopic intratumoral administration of OBP-301, a novel telomerase-specific oncolytic virus, with radiation in esophageal cancer patients. **第21回日本遺伝子治療学会学術集会(シンポジウム)**、大阪国際会議場(大阪府大阪市)、2015年7月26日。
5. 菊地寛次、岸本浩行、田澤大、黒田新士、西崎正彦、香川俊輔、浦田泰生、Hoffman, R. M.、藤原俊義 : 早期消化管がんに対する新規リンパ節転移治療の可能性. **第74回日本癌学会学術総会(シンポジウム)**、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015年10月9日。
6. 藤原俊義 : 食道癌に対する放射線併用ウイルス療法の前臨床研究. **第74回日本癌学会学術総会(シンポジウム)**、名古屋国際会

議場(愛知県名古屋市)、2015年10月10日。

7. Kagawa, S., Tanabe, S., Tazawa, H., Noma, K., Koujima, T., Kashima, H., Kato, T., Kuroda, S., Kikuchi, S., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. A phase I/II study of endoscopic intratumoral administration of a telomerase targeted oncolytic virus, OBP-301, in combination with radiotherapy for esophageal cancer. **第53回日本癌治療学会学術総会(FACO International Workshop)**、国立京都国際会館(京都府京都市)、2015年10月30日。
8. Kikuchi, S., Kishimoto, H., Tazawa, H., Kuroda, S., Nishizaki, M., Kagawa, S., Urata, Y., Hoffman, R. M., Fujiwara, T. The possibility of biological ablation of lymphatic metastasis for early gastrointestinal cancer patients. **第53回日本癌治療学会学術総会(FACO International Workshop)**、国立京都国際会館(京都府京都市)、2015年10月30日。
9. 香川俊輔、渡邊めぐみ、石田道弘、栗田和也、黒田新士、菊地寛次、西崎正彦、田澤大、藤原俊義 : 腹腔内遊離胃癌細胞の検出と腹膜播種に対する光線免疫療法. **第26回日本消化器癌発生学会総会(シンポジウム)**、米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)、2015年11月19日。
10. 菊地寛次、岸本浩行、田澤大、黒田新士、西崎正彦、香川俊輔、浦田泰生、Robert Hoffman、藤原俊義 : 消化器がんにおける遺伝子改変ウイルスを用いたセンチネルリンパ節転移アブレーション. **第16回SNNS研究会学術集会(シンポジウム)**、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)、2014年9月19日。
11. 香川俊輔、岸本浩行、宇野太、黒田新士、石田道弘、橋本悠里、重安邦俊、西崎正彦、白川靖博、永坂岳司、藤原俊義 : 胃癌における蛍光発現ウイルスによる腹腔洗浄液診断: 生物学的悪性度指標としての可能性. **第113回日本外科学会定期学術集会(シンポジウム)**、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2013年4月13日。
12. 重安邦俊、橋本悠里、宇野太、永坂岳司、田澤大、香川俊輔、水口裕之、浦田泰生、藤原俊義 : テロメラーゼ活性を指標とする血中遊離癌細胞の高感度検出法の開発と遺伝子解析技術への応用. **第113回日本外科学会定期学術集会(ワークショップ)**、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2013年4月13日。

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

(2)研究分担者

香川 俊輔 (KAGAWA, Shunsuke)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：00362971

(3)研究分担者

白川 靖博 (SHIRAKAWA, Yasuhiro)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60379774