

201409038A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

難治性固形癌に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを
用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究

(H25-医療技術-一般-010)

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 藤原 俊義

平成27 (2015) 年 5月

目 次

I.	総括研究報告 -----	1
	「難治性固形癌に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究」	
II.	分担研究報告（総括研究報告に一括して記載）	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	5
IV.	研究成果の刊行物・別刷 -----	7

難治性固形癌に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを用いた 放射線併用ウイルス療法の臨床研究

研究代表者 藤原 俊義

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器外科学・教授

【研究要旨】

進行食道癌および頭頸部癌に対する標準治療は未だ確立されておらず、嚥下機能や呼吸機能への影響や合併症を有する高齢患者が多いことから、現行の広域リンパ節郭清を伴う外科切除や放射線化学療法が困難な症例が増えてきている。多くの場合、経口摂取が不能となり生活の質（QOL）の低下は極めて重篤であるが、副作用の少ない分子標的薬剤や抗体医薬品などの新規抗がん医薬品の適応も得られていないため、何らかの新しい有効な治療法の開発が望まれているのが現状である。

Telomelysin（OBP-301）は岡山大学で開発された国産の抗がんアデノウイルス製剤であり、がん細胞のみで選択的に増殖して腫瘍融解を引き起す。また、Telomelysinのアデノウイルス由来のE1B55kDa蛋白質が、放射線によるがん細胞の二重鎖DNA障害により誘導されるMre11/Rad50/NBS1（MRN）蛋白質複合体を分解することでDNA修復を阻害し、放射線感受性を飛躍的に増強することが証明されている。

平成26年度は、平成25年11月29日より開始したレベル1（ 10^{10} virus particle; vp）のTelomelysinと放射線治療併用の臨床研究への食道癌患者の症例登録を積極的に推進した。3例目でGrade 4のリンパ球減少を認めため、実施計画書に基づきレベル1でさらに3症例を追加することとした。5例目は治療中に腫瘍進行がみられたので脱落症例とし、平成27年3月までに7症例に治療を行った。主要評価項目である安全性および副次評価項目である臨床的治療効果を評価し、さらに生検組織を病理学的に解析した。

研究分担者：

白川 靖博

（岡山大学病院・消化管外科・講師）

香川 俊輔

（岡山大学病院・低侵襲治療センター・准教授）

田澤 大

（岡山大学病院・新医療研究開発センター・助教）

A. 研究目的

Telomelysin（OBP-301）は、腫瘍特異的なhTERTプロモーターを用いた遺伝子改変アデノウイルス製剤であり、がん細胞のみで選択的に増殖して腫瘍融解を引き起す。Telomelysinはウイルスの生活環に由来する巧妙な分子機構を基盤とする遺伝子改変生物製剤であり、従来の抗癌治療とは全く異なる作用機序を有することから独創性の高いシーズである。薬理動態に関しては、腫瘍内に投与されたTelomelysinはリンパ流に乗って所属リンパ節領域に拡散し、微小転移で選択的に増殖することが検証された（Kishimoto *et al*, Nature Ned., 2006）。集学的治療への応用では、Telomelysinはがん細胞の放射線によるDNA傷害の修復を阻害す

ることで放射線感受性を増強し、また放射線照射はTelomelysinのがん細胞への感染効率を亢進させる（Kuroda *et al*, Cancer Res., 2010）。すなわち、双方向性の相乗効果が期待でき、ウイルスの拡散領域は放射線治療の照射野とほぼ一致することから、放射線併用Telomelysinウイルス療法は基礎的にも臨床的にも合理的な集学的治療である。

Telomelysinの第I相臨床試験は、2006年10月よりテキサス州ダラスのMary Crowley Medical Research Centerなどにて実施され、単回投与16例、複数回投与6例、計22例においてその臨床的な安全性および6.6～34%の腫瘍縮小などの臨床効果が確認されている（Nemunaitis *et al*, Mol. Ther., 2010）。また、定量的DNA-PCRによる血中ウイルス濃度は、投与直後と7～14日目に2峰性ピークを呈しており、生体内でのウイルス増殖が実証された。

本研究では、難治性固形癌である進行食道癌および頭頸部癌患者を対象に、臨床研究として3回のTelomelysinの内視鏡的腫瘍内投与と6週間の放射線治療の併用の安全性および臨床効果を検討することを目的とする。平成26年度の研究計画では、食道癌患者の症例集積を推進し、レベル1（ 10^{10} virus particle; vp）の登録終了と安全性、臨床効果の評価

を達成目標とした。

B. 研究方法

1) 臨床研究のためのTelomelysin

米国の第I相臨床試験のためオンコリスバイオファーマ（株）が製造し、生物製剤の大量製造・精製を専門とするグローバル企業Lonza Houston Inc.が定期的品質チェックしてきたGood Manufacturing Practice（GMP）規格のTelomelysinの臨床ロットは、バイアル100本が岡山大学病院新医療研究開発センター探索的医薬品開発室に輸入・保管されている。

2) 放射線併用Telomelysinの臨床研究

臨床研究プロトコル「頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究」に基づいて、適応患者を選定して臨床研究に登録する。具体的には、原発巣あるいは転移巣が組織学的又は細胞診により食道癌であると確認され、外科的切除や根治的な化学放射線療法が何らかの理由（高齢、低肺機能、腎機能障害など）で受けることが困難な患者が対象となる。

岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定部会にて審査・承認の後に治療を実施する。

3) 薬理動態・病理学的解析のための検体収集

Telomelysinの体内動態および体外排泄を検討するために、薬剤投与前、および投与後30、60、90分、24時間後、退院時、退院1ヶ月後の血液と薬剤投与前、24時間後、退院時の唾液、喀痰、尿を採取する。また、薬剤投与前と退院3ヶ月後の生検組織を採取する。

（倫理面への配慮）

本研究の実施計画書は「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づいて作成され、またインフォームドコンセントの説明と同意文書は新GCPに乗っ取って作成されている。学内の遺伝子治療臨床研究審査委員会での審議の後、厚生労働省科学技術部会に提出し、平成24年8月23日、「厚生労働省発科0823第3号」にて厚生労働大臣よりその実施が承認されている。また、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく第一種使用規程」についても、同日「厚生労働省発科0823第4号」、「環自野発第120823002号」にて厚生労働大臣および環境大臣より承認されている。

C. 研究結果

平成25年11月29日より、標準治療の対象とならない高齢や併存症を有する食道癌患者へのレベル1（ 10^{10} vp）のTelomelysin投与を開始し、平成27年3月までに53～92歳の7症例に治療が実施された。3

例目でGrade 4のリンパ球減少を認めたため、実施計画書に基づきレベル1で3症例を追加することとした。また、5例目は治療中に腫瘍進行がみられたので脱落症例とし、さらに1例追加して計7症例となった。

有害事象としては、一過性発熱（57.1%）、食道炎（42.9%）、放射線肺臓炎（42.9%）、白血球減少（71.4%）などが40%以上で観察された。Grade 2以上のリンパ球減少は全例に認められ、うち2例はGrade 4となったが、放射線治療の中断などで回復がみられた。

臨床効果としては、内視鏡的には7例中5例で腫瘍縮小が認められ、3例では退院後1ヶ月から3ヶ月の生検組織にて悪性細胞の存在が認められなかった（完全奏功、complete response; CR）。他の2例は、1例は肉眼的には腫瘍は消失し、病理結果を待っている段階であり、1例は部分奏功（partial response; PR）であった。本治療前に抗癌剤が使用され不応であった2例では、1例が不変（stable disease; SD）であり、1例は進行（progression disease; PD）で治療を完遂できずに脱落症例となった。

D. 考察

がんは1981年以来、日本人の死亡原因の第1位を占めており、がん対策推進基本計画に掲げる「がんによる死亡者の減少」を達成し国民の健康と安全・安心な社会を確保するためには、既存の治療コンセプトとは異なる革新的な治療技術シーズの育成が不可欠である。Telomelysinはテロメラーゼ活性を標的とするがん治療を目的とした生物製剤であり、生体内で自立性を持って増殖することによる従来の抗がん剤にない抗腫瘍効果の作用機序を有している。

Telomelysinの非臨床的なPOC（proof of concept）としては、Telomelysinによる細胞死にはmicroRNA-7（miR-7）を介したオートファジーが関与しており（Tazawa *et al*, *Int. J. Cancer*, 2012）、低酸素環境でもhTERTプロモーターの活性化で効率的に細胞障害を起こすことを明らかにしている（Hashimoto *et al*, *PLoS One*, 2012）。また、テロメラーゼ活性が低いalternative lengthening of telomere（ALT）機構をもつ肉腫細胞でも、アデノウイルスのE1A蛋白質がhTERTプロモーターを活性化し、活発なウイルス増殖により細胞死が誘導される（Sasaki *et al*, *Clin. Cancer Res.*, 2011）。

これらの非臨床POCおよび単独投与の第I相臨床試験結果に基づき、本研究では難治性固形癌である進行食道癌および頭頸部癌患者を対象に、臨床研究として3回のTelomelysinの内視鏡的腫瘍内投与と6週間の放射線治療の併用の安全性の検討（最大耐量の推定）（主要エンドポイント）および評価可能症例における治療効果（副次エンドポイント）を検討することを目的としている。

平成26年度の総括として、レベル1 (10^{10} vp) の症例登録を終了することができ、安全性と有効性を示唆する臨床効果が検証できたことで、計画は順調に進んでいると言える。ただ、レベル1の症例が当初の予定の3例から7例に増えたことで、採取した生体サンプルのTelomelysinの体内動態や体外排泄の解析が翌年度に持ち越しとなったため、達成度は約90%と考える。

平成27年度は、引き続き適応患者のリクルートと登録を積極的に行い、岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究審査委員会での審査・承認の後、10倍量のレベル2 (10^{11} vp) のTelomelysin投与群 (3例)、さらに最も臨床効果が期待される6例の最高用量レベル3 (10^{12} vp) への段階的増量を目指す。また、採取した喀痰、唾液、尿、血液検体を用いて、ウイルスの薬理動態に関する解析を実施する。

国内外の複数の大手製薬企業が本研究に興味を示しており、平成26年度には秘密保持契約を結んだ上で情報交換を実施した。今後は、企業とのアライアンスによる多施設共同研究やランダム化第IIIb/III相臨床試験などの次なる臨床開発の可能性を模索していく。また、本研究を薬事承認に活用できる医師主導治験に移行することも視野に入れて検討を進める。

Telomelysinは高齢患者に安全に投与できる画期的な医薬品として、国民の健康増進に役立つと期待される。

E. 結論

放射線併用Telomelysinウイルス療法の臨床研究を実施し、安全性と臨床的有効性を示唆するデータを集積することが可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

【英文】

1. 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.*, (in press), 2015.
2. Shigeyasu, K., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Mori, Y., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Nagasaka, T., Kuroda, S., Urata, Y., Goel, A., Kagawa, S., Fujiwara, T. Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics. *Gut*, 64: 627-635, 2015.
3. 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.
4. Shimoyama, K., Kagawa, S., Ishida, M., Watanabe, S., Noma, K., Takehara, K., Tazawa, H., Hahimoto, Y., Tanabe, S., Matsuoka, J., Kobayashi, H., Fujiwara, T. Viral transduction of the HER2-extracellular domain expands trastuzumab-based photoimmunotherapy for HER2-negative breast cancer cells.

Breast Cancer Res. Tr., 149: 597-605, 2015.

5. Kuroda, S., Kubota, T., Aoyama, K., Kikuchi, S., Tazawa, H., Nishizaki, M., Kagawa, S., Fujiwara, T. Establishment of a Non-Invasive Semi-Quantitative Bioluminescent Imaging Method for Monitoring of an Orthotopic Esophageal Cancer Mouse Model. *PLoS One*, 9: e114562, 2014.
6. Yano, S., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman RM. Selective methioninase-induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCI imaging confers chemosensitivity. *Oncotarget* 5: 8729-8736, 2014.
7. Yano, S., Miwa, S., Mii, S., Hiroshima, Y., Uehara, F., Yamamoto, M., Kishimoto, H., Tazawa, H., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman, RM. Invading cancer cells are predominantly in G 0/G 1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle*, 13: 953-960, 2014.
8. Itoh, M., Iwamoto, T., Matsuoka, J., Nogami, T., Motoki, T., Shien, T., Taira, N., Niikura, N., Hayashi, N., Ohtani, S., Higaki, K., Fujiwara, T., Doihara, H., Symmans, W. F., Pusztai, L. Estrogen receptor (ER) mRNA expression and molecular subtype distribution in ER-negative/progesterone receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.*, 143: 403-409, 2014.
9. Shirakawa, Y., Noma, K., Maeda, N., Katsube, R., Tanabe, S., Ohara, T., Sakurama, K., Fujiwara, T. Assistant-based standardization of prone position thoracoscopic esophagectomy. *Acta Med. Okayama*, 68: 111-117, 2014.
10. Yano, S., Zhang, Y., Miwa, S., Tome, Y., Hiroshima, Y., Uehara, F., Yamamoto, M., Suetsugu, A., Kishimoto, H., Tazawa, H., Zhao, M., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Spatial-temporal FUCCI imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle*, 13: 2110-2119, 2014.
11. Utsumi, M., Takaki, A., Umeda, Y., Koike, K., Napier, S.C., Watanabe, N., Sadamori, H., Shinoura, S., Yoshida, R., Nobuoka, D., Yasunaka, T., Nakayama, E., Yamamoto, K., Fujiwara, T., Yagi, T. Frequency of regulatory T-cell and hepatitis C viral antigen-specific immune response in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transpl. Immunol.*, 31: 33-41, 2014.
12. Eto, K., Nishimura, W., Oishi, H., Udagawa, H., Kawaguchi, M., Hiramoto, M., Fujiwara, T., Takahashi, S., Yasuda, K. MafA Is Required for Postnatal Proliferation of Pancreatic β -Cells. *PLoS One*, 9: e104184, 2014.
13. Kagawa, S., Shigeyasu, K., Ishida, M., Watanabe, M., Tazawa, H., Nagasaka, T., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. Molecular diagnosis and therapy for occult peritoneal metastasis in gastric cancer patients. *World J. Gastroentero.*, 20: 17796-17803, 2014.

【邦文】

1. 藤原俊義：消化器癌の Molecular Theranostics：分子イメージングと治療の融合. *G. I. Research* 22: 24-30, 2014.
2. 藤原俊義：ウイルスを用いた DDS：悪性腫瘍のウイルス療法. *医薬ジャーナル* 50: 117-122, 2014.
3. 田澤大、矢野修也、香川俊輔、白川靖博、藤原俊義：テロメラーゼ活性依存的腫瘍融解ウイルスによるがん治療. *腫瘍内科* 13: 817-823, 2014.
4. 長谷井嬢、尾崎修平、山川泰明、田澤大、香川俊輔、尾崎敏文、藤原俊義：骨軟部肉腫に対するテロメラーゼ依存的増殖型腫瘍融解ウイルスを用いた治療戦略. 「*分子細胞治療フロンティア2015*」(外科分子細胞治療研究会、編集) pp128-135、株式会社パピルス、2014.

2. 学会発表

【国内学会】

1. 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)、鹿児島、2014年9月.

2. 香川俊輔、渡邊めぐみ、石田道拓、黒田新士、菊地寛次、田澤太、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 (Interntional Session)、名古屋、2015年4月.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
長谷井 穰、 尾崎 修平、 山川 泰明、 田澤 大、 香川 俊輔、 尾崎 敏文、 藤原 俊義	骨軟部肉腫に対する テロメラーゼ依存性 増殖型腫瘍融解ウイ ルスを用いた治療戦 略.	外科分子細胞 治療研究会	分子細胞治療フ ロンティア2015	株式会社パ ピルス	東京	2014	pp128-135

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shigeyasu, K., <u>Tazawa, H.</u> , Hashimoto, Y., Mori, Y., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Nagasaka, T., Kuroda, S., Urata, Y., Goel, A., <u>Kagawa, S.</u> , <u>Fujiwara, T.</u>	Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics.	Gut	64	627-635	2015
Kikuchi, S., Kishimoto, H., <u>Tazawa, H.</u> , Hashimoto, Y., Kuroda, S., Nishizaki, M., Nagasaka, T., <u>Shirakawa, Y.</u> , <u>Kagawa, S.</u> , Urata, Y., Hoffman, R.M., <u>Fujiwara, T.</u>	Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer.	Molecular Therapy	23	501-509	2015
Shimoyama, K., <u>Kagawa, S.</u> , Ishida, M., Watanabe, S., Noma, K., Takehara, K., <u>Tazawa, H.</u> , Hahimoto, Y., Tanabe, S., Matsuoka, J., Kobayashi, H., <u>Fujiwara, T.</u>	Viral transduction of the HER2-extracellular domain expands trastuzumab-based photoimmunotherapy for HER2-negative breast cancer cells.	Breast Cancer Research and Treatment	149	597-605	2015
Kuroda, S., Kubota, T., Aoyama, K., Kikuchi, S., <u>Tazawa, H.</u> , Nishizaki, M., <u>Kagawa, S.</u> , <u>Fujiwara, T.</u>	Establishment of a non-invasive semi-quantitative bioluminescent imaging method for monitoring of an orthotopic esophageal cancer mouse model.	PLoS One	9	e114562	2014
<u>Shirakawa, Y.</u> , Noma, K., Maeda, N., Katsube, R., Tanabe, S., Ohara, T., Sakurama, K., <u>Fujiwara, T.</u>	Assistant-based standardization of prone position thoracoscopic esophagectomy.	Acta Medica Okayama	68	111-117	2014

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yano, S., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Bouvet, M., <u>Fujiwara, T.</u> , Hoffman RM.	Selective methioninase- induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCI imaging confers chemosensitivity.	Oncotarget	5	8729-8736,	2014
Yano, S., Miwa, S., Mii, S., Hiroshima, Y., Uehara, F., Yamamoto, M., Kishimoto, H., <u>Tazawa, H.</u> , Bouvet, M., <u>Fujiwara, T.</u> , Hoffman, RM.	Invading cancer cells are predominantly in G 0/G 1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging.	Cell Cycle	13	953-960	2014
<u>Kagawa, S.</u> , Shigeyasu, K., Ishida, M., Watanabe, M., <u>Tazawa, H.</u> , Nagasaka, T., <u>Shirakawa, Y.</u> , <u>Fujiwara, T.</u>	Molecular diagnosis and therapy for occult peritoneal metastasis in gastric cancer patients.	World Journal of Gastroenterology	20	17796-17803	2014

3

骨軟部肉腫に対するテロメラゼ依存性増殖型
腫瘍融解ウイルスを用いた治療戦略

長谷井 嬢 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 整形外科科学)
Hasei Joe

尾崎 修平 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 整形外科科学)
Osaki Shuhei

山川 泰明 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 整形外科科学)
Yamakawa Yasuaki

田澤 大 (岡山大学病院 新医療研究開発センター助教)
Tazawa Hiroshi

香川 俊輔 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 消化器外科学講師)
Kagawa Shunsuke

尾崎 敏文 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 整形外科科学教授)
Ozaki Toshifumi

藤原 俊義 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 消化器外科学教授)
Fujiwara Toshiyoshi

— Summary —

テロメラゼ依存性腫瘍融解ウイルス OBP-301、OBP-405 及び OBP-702 は、骨軟部腫瘍に対して強力な抗腫瘍効果を認めた。OBP-401 は従来法より簡便に機能的なアデノウイルス受容体 (coxsackie and adenovirus receptor; CAR) の発現を測定可能であり、アデノウイルス 5 型を用いるベクター治療の効果予測判定に有用と考えられた。テロメラゼ依存性腫瘍融解ウイルスは骨軟部肉腫に対する新規治療薬として、また検出用・診断用試薬としての可能性が期待される。

キーワード：テロメラゼ、腫瘍融解ウイルス、骨軟部腫瘍

はじめに

骨軟部肉腫は稀な悪性腫瘍であるが、若年者にも多く発生する。外科的切除に化学療法、放射線療法を加えた集学的治療の進歩により生存率・患肢温存率は改善したが、予後不良の症例も未だ多く存在する。これまでテロメラゼ依存性に増殖し腫瘍細胞を破壊、または蛍光色素により細胞を可視化する制限増殖型アデノウイルスの有用性を報告してきたが、本稿では骨軟部肉腫におけるそれらのウイルス製剤の有用性について報告する。

I. 骨軟部肉腫に対する OBP-301、OBP-405 の抗腫瘍効果

上皮系腫瘍において OBP-301 (Telomelysin) はテロメラゼ活性依存性に増殖するアデノ

3 骨軟部肉腫に対するテロメラーゼ依存性増殖型腫瘍融解ウイルスを用いた治療戦略

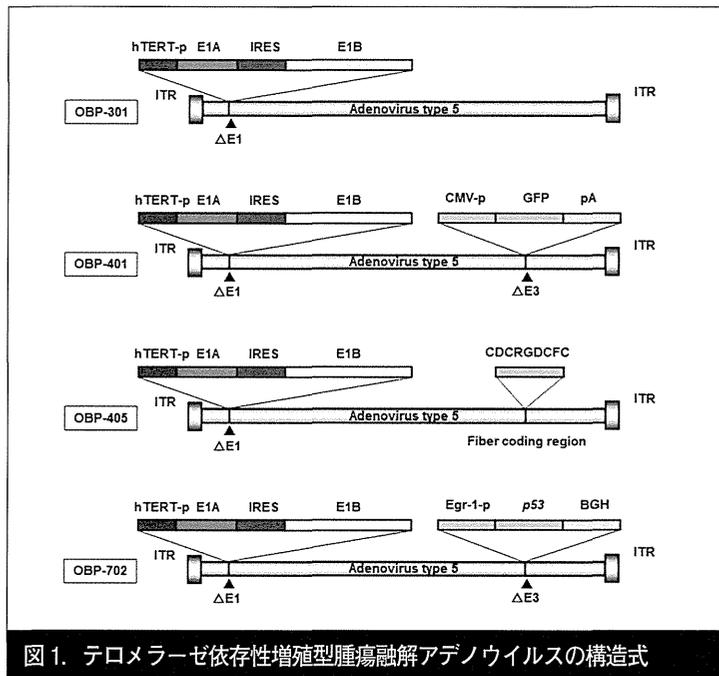


図 1. テロメラーゼ依存性増殖型腫瘍融解アデノウイルスの構造式

ウイルスで腫瘍特異的に抗腫瘍効果を発揮し¹⁾、また化学療法や放射線療法との併用による相乗効果も報告されている。しかし全体の 56% でテロメラーゼ活性が低いとされる骨軟部肉腫²⁾における OBP-301 の抗腫瘍効果は不明であったため、OBP-301 の骨軟部肉腫に対する抗腫瘍効果を検討した³⁾。

1. OBP-301 の特徴

OBP-301 はアデノウイルス 5 型を基本構造とし、ウイルス増殖に必須の E1 遺伝子をテロメラーゼ・プロモーターで制御するよう改変されたウイルス製剤である(図 1)。テロメラーゼは、きわめて多くの悪性腫瘍でその活性の上昇が明らかになっており、悪性腫瘍が進行するにつれてその活性は徐々に上昇していく⁴⁾。正常細胞においてはテロメラーゼ活性が低いためウイルス増殖が抑えられるが、テロメラーゼ活性の高い悪性腫瘍細胞では腫瘍特異的にウイルスが増殖し、cytopathic effect (CPE) を誘導し細胞死に導く。

2. 骨軟部肉腫に対する OBP-301 の抗腫瘍効果

まず *in vitro* でヒト骨軟部肉腫細胞株 14 種類に対して OBP-301 の抗腫瘍効果を、XTT-assay を用いて検討した。14 種類のうち 12 種類において時間および用量依存性に細胞活性の低下を認めた(図 2a)。一方、ヒト正常肺線維芽細胞(NHLF)においては OBP-301 による細胞活性の低下は認めなかった³⁾。OBP-301 の感染経路となる細胞膜上の CAR (coxsackie and adenovirus receptor) の発現量をフローサイトメトリーで測定したところ、OBP-301 の ID50 (50% inhibitory dose) と CAR の発現量は逆相関を示し、OBP-301 の抗腫瘍効果は CAR の発現に依存しているものと考えられた³⁾。また OBP-301 感染後に hTERT mRNA の発現を経時的に測

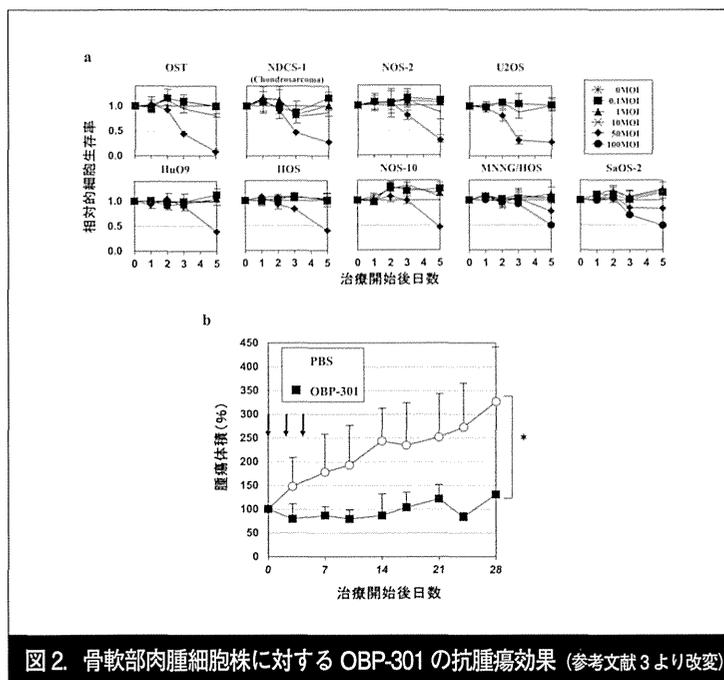


図 2. 骨軟部肉腫細胞株に対する OBP-301 の抗腫瘍効果 (参考文献 3 より改変)

定したところ、時間依存性に hTERT mRNA の発現増強を認め、hTERT 活性の低い細胞でも OBP-301 の感染後に hTERT mRNA 発現が増強し OBP-301 による抗腫瘍効果を発揮することが確認された³⁾。さらに *in vivo* で、ヌードマウス脛骨に骨肉腫細胞株を移植、腫瘍同所性モデルを作成し、OBP-301 の腫瘍内局所投与を行ったところ、未治療(PBS)群と比べ OBP-301 群では有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた(図 2b)。

3. OBP-301 抵抗株に対する OBP-405 の抗腫瘍効果

OBP-301 が無効であった 2 種類の骨軟部肉腫細胞株は CAR の発現がなく、ウイルスが細胞内に感染できないため抗腫瘍効果を認めなかったと考えられた³⁾。そこで OBP-301 のファイバーを改変し、インテグリンを介して細胞に感染することが可能な OBP-405 での抗腫瘍効果を検討した。その結果、これら 2 種類の細胞株に対して抗腫瘍効果を認めた(図 3a)。*in vivo* マウス同所性モデルにおいても未治療群、OBP-301 群と比べ腫瘍増殖抑制を認める結果が得られた(図 3b)。これらの結果から CAR の発現が弱い腫瘍細胞では OBP-405 の使用が有用であることが示唆された³⁾。

テロメラーゼ活性の低い腫瘍も含まれる肉腫細胞においても OBP-301 は抗腫瘍効果を認めた。その抗腫瘍効果はウイルスの侵入経路である CAR の発現に依存していた。CAR 発現の低い腫瘍細胞においては OBP-405 を使用することが有用と考えられた。

II. CAR 発現の検出用試薬としての OBP-401

アデノウイルス 5 型(Ad5)は、遺伝子治療やウイルス療法のベクターとして広く用いられている⁵⁾。前述のとおり Ad5 は標的細胞に CAR を介して感染するため、Ad5 の感染効率は標的

3 骨軟部肉腫に対するテロメラーゼ依存性増殖型腫瘍融解ウイルスを用いた治療戦略

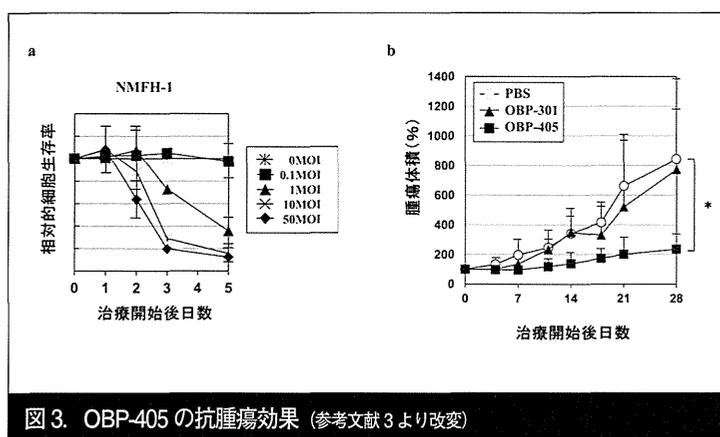


図 3. OBP-405 の抗腫瘍効果 (参考文献 3 より改変)

細胞の CAR の発現に依存する⁶⁾。CAR 発現量の測定方法としては、従来からフローサイトメトリー、ウェスタンブロット、免疫細胞化学法などが用いられてきた。しかしこれらの方法で測定された CAR の発現が、Ad5 による細胞への結合能力と相関するかについては議論もある。より機能的な CAR の発現を測定するために OBP-401 (Telomescan) を用いる方法を検討した。OBP-401 は、Ad5 を基本骨格とする OBP-301 の E3 領域に GFP を組み込んだ遺伝子改変ウイルスである(図 1)。OBP-401 が細胞に感染し増殖すると細胞内に GFP を発現するため、GFP の蛍光を観察することにより OBP-401 の感染・増殖が確認可能である。細胞や組織の CAR の発現を簡便に、そして機能的に測定する方法として OBP-401 を用いた測定法について検討した⁷⁾。

1. 適切なプロトコルの設定

CAR の発現量の異なる 6 種類の肉腫細胞株と、NHLF を用いて検討を行った。フローサイトメトリーによって CAR の発現量を測定したところ、4 種類の肉腫細胞株と NHLF では CAR の発現が確認可能であったが、2 種類の肉腫細胞株で CAR の発現は確認できなかった(図 4a)。次に各細胞株に OBP-401 を 1、10、100MOI (multiplicity of infection) の濃度で感染させ、経時的に観察を行った。24 時間後の測定では OBP-401 を 10MOI で感染させることにより CAR 陽性細胞株では GFP の発現が確認できたが、一方で CAR 陰性細胞株と NHLF では GFP の発現は認めなかった(図 4b)。よって OBP-401 を 10MOI で感染させて 24 時間後に観察を行うプロトコルが最も適切と考えられた。

2. CAR の発現と OBP-401 による GFP の発現との相関

次に各細胞株に OBP-401 を 10MOI で感染させ、経時的に観察を行った。4 種類の CAR 陽性細胞株においては経時的に GFP 陽性細胞の増加が確認できた(図 4c)。OBP-401 感染後 24 時間における GFP の蛍光強度を測定したところ、フローサイトメトリーによる CAR の発現量と有意な相関を認めた(図 4d, e)。腫瘍細胞において OBP-401 による GFP の発現は、CAR の発現と強く相関していると考えられた。

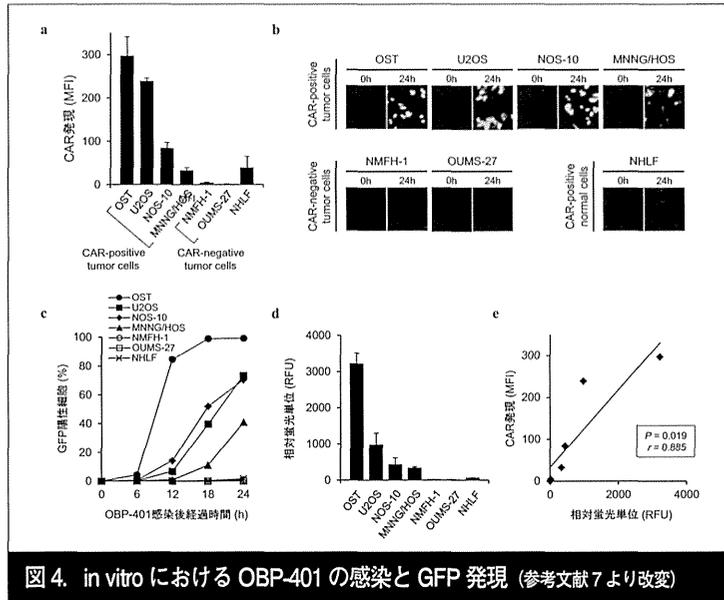


図 4. in vitro における OBP-401 の感染と GFP 発現 (参考文献 7 より改変)

3. 従来法との比較

ウェスタンブロット及び蛍光免疫染色でも CAR の発現量を確認した。使用した 7 種類の細胞株のうちウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色で CAR の発現を確認できた細胞株は OST のみであった。他の 3 種類の CAR 陽性細胞株は、CAR 陰性細胞株と同程度に弱く確認できなかった。OBP-401 による GFP を用いた検出法は、ウェスタンブロット及び蛍光免疫染色と比較して、より高感度に CAR 陽性細胞株の検出が可能であると考えられた。

4. 腫瘍組織片に対する OBP-401 を用いた CAR 発現の検出

CAR 陽性細胞株 OST と CAR 陰性細胞株 OUMS-27 を用いたマウス皮下移植腫瘍モデルを作成し、ex vivo における OBP-401 による CAR 発現の検討を行った。切除した腫瘍組織片に OBP-401 を感染させた。24 時間後に PBS で洗浄後に GFP 発現を測定した(図 5a)。OST の組織片では GFP の発現を認めたが、OUMS-27 の組織片では GFP の発現は認めなかった(図 5b)。腫瘍組織片における CAR の発現を測定する方法としても、OBP-401 を用いた方法が有用である可能性が示された。

従来する方法と比較して OBP-401 を用いる方法は、簡便で高感度に細胞および組織の CAR の発現を測定可能であった。OBP-401 は腫瘍組織の機能的な CAR の発現量を計測できるイメージングツールとして有用であり、Ad5 を用いたベクター治療の効果予測判定に有用と考えられた。

III. p53 武装化腫瘍融解アデノウイルス OBP-702 の抗腫瘍効果

OBP-301 の骨軟部肉腫細胞株への抗腫瘍効果の検討では、OBP-301 抵抗株が存在した³⁾。近年、腫瘍抑制遺伝子 p53 の誘導がウイルスの抗腫瘍効果を増強する報告がある⁸⁾が、増強メカ

3 骨軟部肉腫に対するテロメラゼ依存性増殖型腫瘍融解ウイルスを用いた治療戦略

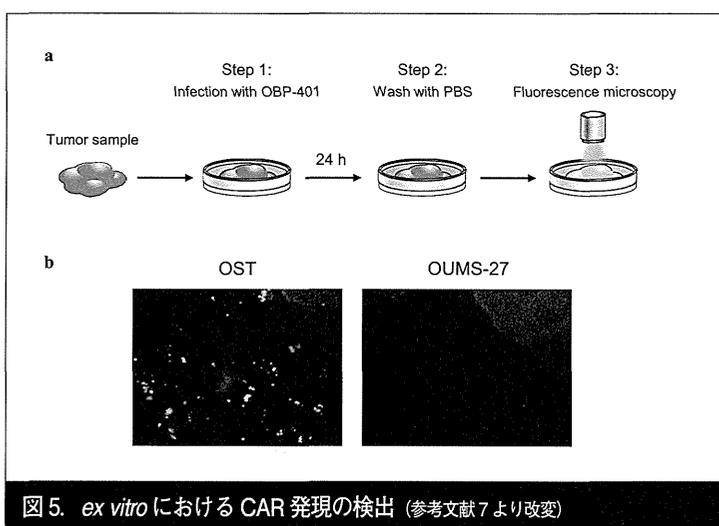


図 5. *ex vitro* における CAR 発現の検出 (参考文献 7 より改変)

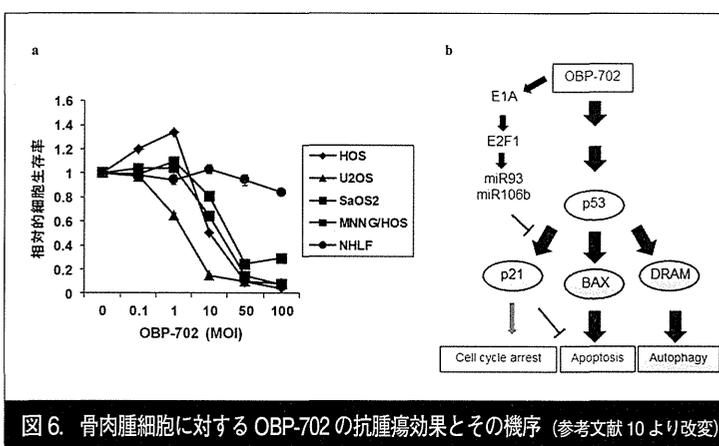


図 6. 骨肉腫細胞に対する OBP-702 の抗腫瘍効果とその機序 (参考文献 10 より改変)

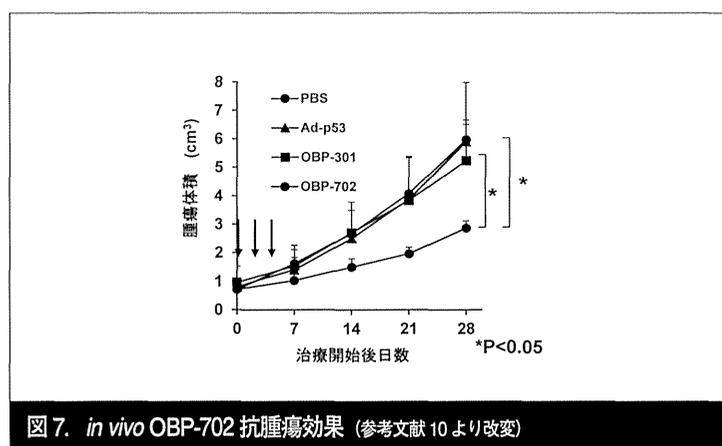
ニズムは未だ不明である。そこで、我々は OBP-301 の E3 領域に p53 の発現カセットを挿入した OBP-702(図 1)を用いて OBP-301 抵抗性骨肉腫細胞株を中心に、OBP-702 の抗腫瘍効果と細胞死誘導のメカニズムを検討した。

1. *in vitro* での骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果

2 種類の OBP-301 感受性骨肉腫細胞株(HOS, U2OS)と 2 種類の OBP-301 抵抗性骨肉腫細胞株(SaOS-2, MNNG/HOS)を用いて、OBP-702 の細胞障害活性を検討したところ、OBP-301 感受性株と OBP-301 抵抗株に対して、OBP-702 は強力な抗腫瘍効果を示した。OBP-702 の ID50 は、全ての細胞株において OBP-301 の ID50 より低値を示し、OBP-702 は OBP-301 より強力な抗腫瘍活性を有する一方で、NHLF に対して殆ど細胞障害活性を示さない事が明らかとなった(図 6a)

2. OBP-702 の抗腫瘍効果のメカニズム

OBP-301 抵抗性の SaOS-2、MNNG/HOS 細胞株を用いて、OBP-301、OBP-702、Ad-p53



のアポトーシス誘導能について PARP の切断(C-PARP)、活性化 caspase-3、細胞周期に関して検討したところ、OBP-702 は OBP-301 や Ad-p53 より強力にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、OBP-702 は p53 を強力に発現誘導する一方でその下流である p21 の発現は誘導しない事も明らかとなった。p21 は細胞周期を停止させるだけではなく、アポトーシスやオートファジーを抑制する作用が報告されている⁹⁾。

この p21 の抑制は、OBP-702 感染後 E1A の増加に伴う E2F1 の増強と、E2F1 誘導型 p21 抑制性マイクロ RNA(miR-93、miR-106b)の発現が増加したためであり、OBP-702 によるアポトーシスの誘導に E1A 依存的な miR-93/106b 誘導を介した p21 の発現抑制が関与している事が示唆された(図 6b)。

また、その miR-93/106b による p21 の抑制はオートファジーを効率的に誘導する事も示唆された。p53 誘導による DRAM の発現増強も合わさり、OBP-702 は OBP-301 よりも強力なオートファジーを誘導する事も明らかとなった(図 6b)。

3. 同所性モデルに対する OBP-702 の抗腫瘍効果

マウス脛骨に MNNG/HOS 細胞株を移植し同所性モデルを作成、OBP-702、OBP-301、Ad-p53 の抗腫瘍効果を比較検討した。OBP-702 は、OBP-301 や Ad-p53 と比較して有意に腫瘍増殖を抑制し(図 7)、腫瘍浸潤に伴う骨破壊も抑制した¹⁰⁾。OBP-702 治療群の腫瘍は、他治療群の腫瘍に比べて、病理組織学的検討においても広範な壊死領域が認められ、OBP-702 は強力な細胞増殖の抑制と細胞死の誘導を行うことが示唆された¹⁰⁾。

OBP-301 に抵抗性を示す骨肉腫細胞株に対しては、OBP-702 はアポトーシスやオートファジーの細胞死を強力に誘導して抗腫瘍効果を発揮する事が明らかとなった。OBP-702 は単独でも非常に強力な抗腫瘍効果を有するが、ウイルスによる p53 誘導や p21 の抑制は化学療法感受性を増進させる報告があり、OBP-702 と化学療法の併用においても優れた抗腫瘍効果が期待できる事から、臨床応用が待たれる。

3 骨軟部肉腫に対するテロメラーゼ依存性増殖型腫瘍融解ウイルスを用いた治療戦略

おわりに

テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルスは高い腫瘍特異性と抗腫瘍効果を有しており、現在 OBP-301 は上皮系腫瘍に対して国内臨床試験が進行している。また OBP-401 は CTC (Circulating Tumor Cell) 等の検出・診断試薬としての可能性も期待されている。テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルスの今後の進展に期待したい。

■ References ■

1. Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N et al: Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* 10 : 285-292, 2004
2. Umehara N, Ozaki T, Sugihara S et al: Influence of telomerase activity on bone and soft tissue tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 130: 411-416, 2004
3. Sasaki T, Tazawa H, Hasei J et al: Preclinical evaluation of telomerase-specific oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 17: 1828-1838, 2011
4. 藤原 俊義, 田中 紀章: テロメラーゼ活性を標的とした悪性腫瘍に対するウイルス療法の開発. *ウイルス* 58 : 11-18, 2008
5. Yamamoto M, Curiel DT: Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses. *Mol Ther* 18: 243-250, 2010
6. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G et al: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323, 1997
7. Sasaki T, Tazawa H, Hasei J et al: A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *Gene Ther* 20: 112-118, 2013
8. Sakai R, Kagawa S, Yamasaki Y et al: Preclinical evaluation of differentially targeting dual virotherapy for human solid cancer. *Mol Cancer Ther* 9: 1884-1893, 2010
9. Fujiwara K, Daido S, Yamamoto A et al: Pivotal role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in apoptosis and autophagy. *J Biol Chem* 283: 388-397, 2008
10. Hasei J, Sasaki T, Tazawa H et al: Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. *Mol Cancer Ther* 12(3): 314-325, 2013

ORIGINAL ARTICLE

Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics

Kunitoshi Shigeyasu,¹ Hiroshi Tazawa,^{1,2} Yuuri Hashimoto,¹ Yoshiko Mori,¹ Masahiko Nishizaki,¹ Hiroyuki Kishimoto,¹ Takeshi Nagasaka,¹ Shinji Kuroda,¹ Yasuo Urata,³ Ajay Goel,⁴ Shunsuke Kagawa,¹ Toshiyoshi Fujiwara¹

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306957>).

¹Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan

²Center for Innovative Clinical Medicine, Okayama University Hospital, Okayama, Japan

³Oncolys BioPharma, Inc., Tokyo, Japan

⁴Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Charles A. Sammons Cancer Center and Baylor Research Institute, Baylor University Medical Center, Dallas, Texas, USA

Correspondence to

Professor Toshiyoshi Fujiwara, Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan; toshi_f@md.okayama-u.ac.jp

Received 10 February 2014

Revised 20 April 2014

Accepted 8 May 2014

Published Online First

28 May 2014



► <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307647>



To cite: Shigeyasu K, Tazawa H, Hashimoto Y, *et al. Gut* 2015;**64**:627–635.

ABSTRACT

Background Molecular-based companion diagnostic tests are being used with increasing frequency to predict their clinical response to various drugs, particularly for molecularly targeted drugs. However, invasive procedures are typically required to obtain tissues for this analysis. Circulating tumour cells (CTCs) are novel biomarkers that can be used for the prediction of disease progression and are also important surrogate sources of cancer cells. Because current CTC detection strategies mainly depend on epithelial cell-surface markers, the presence of heterogeneous populations of CTCs with epithelial and/or mesenchymal characteristics may pose obstacles to the detection of CTCs.

Methods We developed a new approach to capture live CTCs among millions of peripheral blood leukocytes using a green fluorescent protein (GFP)-expressing attenuated adenovirus, in which the telomerase promoter regulates viral replication (OBP-401, TelomeScan).

Results Our biological capturing system can image epithelial and mesenchymal tumour cells with telomerase activities as GFP-positive cells. After sorting, direct sequencing or mutation-specific PCR can precisely detect different mutations in *KRAS*, *BRAF* and *KIT* genes in epithelial, mesenchymal or epithelial–mesenchymal transition-induced CTCs, and in clinical blood samples from patients with colorectal cancer.

Conclusions This fluorescence virus-guided viable CTC capturing method provides a non-invasive alternative to tissue biopsy or surgical resection of primary tumours for companion diagnostics.

INTRODUCTION

The rapid evolution of genetic and genomic technologies in regards to predictive pharmacogenetic biomarkers for molecularly targeted therapies (eg, monoclonal antibodies and small-molecule tyrosine kinase inhibitors) have resulted in tremendous advances in personalised oncologic treatment.¹ The current commonly used biomarkers include human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) for the use of trastuzumab in breast and gastric cancer,^{2–3} *KRAS* for the use of cetuximab and panitumumab in colorectal cancer,⁴ echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) for the use of crizotinib, and epidermal growth factor receptor (EGFR) for the use of

Significance of this study

What is already known about this subject?

- The molecular characterisation of circulating tumour cells (CTCs) based on genetic alterations facilitates the administration of molecular targeted drugs for preventing metastatic progression in individual patients with cancer.
- Heterogeneous populations of CTCs with epithelial and/or mesenchymal characteristics make it difficult to detect the entire CTC population because CTC detection mainly depends on epithelial cell surface markers.

What are the new findings?

- Our fluorescence virus OBP-401 selectively labelled human CTCs with green fluorescent protein (GFP) among millions of peripheral blood leukocytes.
- Our biological capturing system can image both epithelial and mesenchymal tumour cells with telomerase activities as GFP-positive cells.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Because current CTC detection strategies mainly depend on epithelial cell surface markers, the presence of heterogeneous populations of CTCs with epithelial and/or mesenchymal characteristics may pose obstacles to the detection of CTCs.
- The fluorescence virus-based biological capture system is a promising tool for monitoring genetic alterations in epithelial and mesenchymal types of CTCs.

erlotinib and gefitinib, in non-small cell lung cancer,^{5–6} and BCR–ABL for the use of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukaemia.⁷ Companion diagnostic assays are designed to accompany specific therapies and help guide selection of patients according to expected drug responses. While the use of these assays has led to a shift in paradigms from disease-based therapeutic regimens to molecular target-based protocols,^{8–9}

GI cancer

many of these molecular diagnostic modalities have onerous requirements to obtain specimen, such as needle core biopsies or surgical sampling of tumour tissues that can be invasive.

Circulating tumour cells (CTCs), first described in 1869 by Ashworth,¹⁰ are often present in the peripheral blood of patients with advanced cancers. However, as CTCs are very rare within the bloodstream, detection of CTCs can be difficult. The most commonly used CTC detection method is the CellSearch system,^{11 12} which can enrich CTCs using magnetised antibodies that target the major epithelial cell surface marker, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). More recently, genetic analysis of the *EGFR* gene using the EpCAM-dependent CTC-chip detection system has been described for the surveillance of CTCs in patients with lung cancers.¹³ CTCs are thought to contain the metastasis-initiating tumour cells that form metastatic colonies at distant organs,^{14 15} but recent studies have suggested that there are heterogeneous populations that include CTCs with both epithelial and mesenchymal characteristics,¹⁶ which are associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT).¹⁷ Recently, EpCAM-positive and EpCAM-negative CTCs from patients with breast cancer have been shown to exhibit high potential to metastasise to the lung and brain, respectively, in nude mice.^{18 19} In patients with colorectal cancer, not only captured cytokeratin (CK)-positive CTCs, but also co-captured CK-negative cells have been shown to possess complex aneuploidy.²⁰ Moreover, it has been reported that *plstin3* (*PLS3*), which is a novel marker for EMT, was detected in EpCAM-positive and EpCAM-negative CTCs in patients with colorectal cancer with distant metastasis.²¹ These findings indicate the presence of CTCs without epithelial markers in patients with colorectal cancer. Therefore, development of a CTC capture system that functions independent of the epithelial cell marker is required to precisely assess the sensitivity of highly metastatic tumour cells to molecularly targeted drugs.

Epithelial and mesenchymal types of malignant tumour cells possess high telomerase activity to maintain the length of telomere during aberrant cell proliferation, suggesting the potential of telomerase activity as a general tumour marker²² and therapeutic target.²³ We previously developed a green fluorescent protein (GFP)-expressing telomerase-specific replication-competent adenovirus (OBP-401, TelomeScan) that drives the adenoviral *E1A* and *E1B* genes under the *hTERT* gene promoter for telomerase-dependent virus replication. OBP-401 enables the visualisation of viable epithelial and mesenchymal types of human tumour cells with telomerase activity as GFP-positive cells.^{24 25} OBP-401-mediated GFP labelling is a useful method to detect viable CTCs in patients with gastrointestinal cancers^{26 27} and ovarian cancers.²⁸ The present study extends our previous work by exploring the potential of an OBP-401-based biological CTC capture system for the surveillance of genetic mutations in viable CTCs as a novel non-invasive companion diagnostic strategy.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

The human colorectal cancer cell lines, SW480, HCT116 and HT29; the human pancreatic cancer cell line, Panc1; the human lung cancer cell line, A549 and H1299; the human gastrointestinal stromal tumour (GIST) cell line, GIST882; and the human normal oesophageal fibroblasts, FEF3, were purchased from the American Type Culture Collection. All cell lines were cultured according to the manufacturer's specifications. There are four types of *KRAS* gene mutations (G12D, G12V, G12S, G13D) in Panc1, SW480, A549 and HCT116 cells, respectively. HT29 cells have one mutation (V600E) in the *BRAF* gene, whereas

GIST882 cells harbour one mutation (K642E) in the *KIT* gene. Normal FEF3 cells have no mutations in the *KRAS*, *BRAF* or *KIT* genes.

To obtain the EMT-induced human cancer cells, A549 cells were treated with transforming growth factor β (TGF- β) (10 ng/mL) for 72 h. EMT induction was defined as a morphological change to spindle type and a change in the EMT-related marker expression, including downregulation of epithelial markers (EpCAM and E-cadherin) and upregulation of the mesenchymal marker (N-cadherin).

Recombinant adenovirus

OBP-401 is a telomerase-specific replication-competent adenovirus variant, in which the *hTERT* gene promoter drives the expression of *E1A* and *E1B* genes that are linked to an internal ribosome entry site and in which the *GFP* gene is inserted into the E3 region under a cytomegalovirus (CMV) promoter (figure 1A).^{24–26} OBP-401 was purified by ultracentrifugation using CsCl step gradients. Viral titres were determined by a plaque-forming assay using 293 cells, and the virus was stored at -80°C .

Immunocytochemical staining

The cells seeded on tissue culture chamber slides were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min on ice. The slides were subsequently incubated with the PE-conjugated mouse anti-EpCAM antibody (BioLegend, San Diego, California, USA) for 1 h on ice. Then the slides were analysed using an inverted fluorescence microscope (Olympus; Tokyo, Japan).

Flow cytometry

The cells (1×10^5 cells) were labelled with primary mouse antibodies for EpCAM, E-cadherin, N-cadherin (BioLegend) and coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) for 30 min on ice and were analysed using flow cytometry (FACS Array; Becton Dickinson, Mountain View, California, USA).

CTC model

CTC models were established by incubation with tumour cell lines (SW480, HCT116, HT29, Panc1, EMT-induced A549 and GIST882 cells) in 5 mL of blood (containing approximately 3.5×10^7 white blood cells) from a healthy volunteer.

DNA extraction from CTC models and clinical samples

The protocol for DNA extraction from the CTC models or clinical samples is shown in figure 2A and online supplementary figure S1. Approximately 5 mL of blood was incubated with lysis buffer containing ammonium chloride to remove the red blood cells (RBCs). These cancer cells were then infected with OBP-401 at 1×10^6 plaque-forming units (PFU) and incubated for 24 h. Thereafter, the cell pellets were labelled with anti-CD45 antibody conjugated with PE and sequentially sorted by FACS Aria (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). We set the P1 gate to obtain viable cells, the P2 gate to detect GFP-positive cells without intrinsic fluorescence and the P3 gate to detect only GFP-positive tumour cells without the haematopoietic CD45 marker. Cells in the P2 or P3 gates were collected and stored temporarily at -30°C . DNA was extracted from captured cells using a QiaAMP DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, California, USA). The DNA solution was mixed with DNA polymerase, and each primer was subjected to PCR analysis. Five-millilitre blood samples were collected with consent from patients with colorectal cancer, according to a protocol

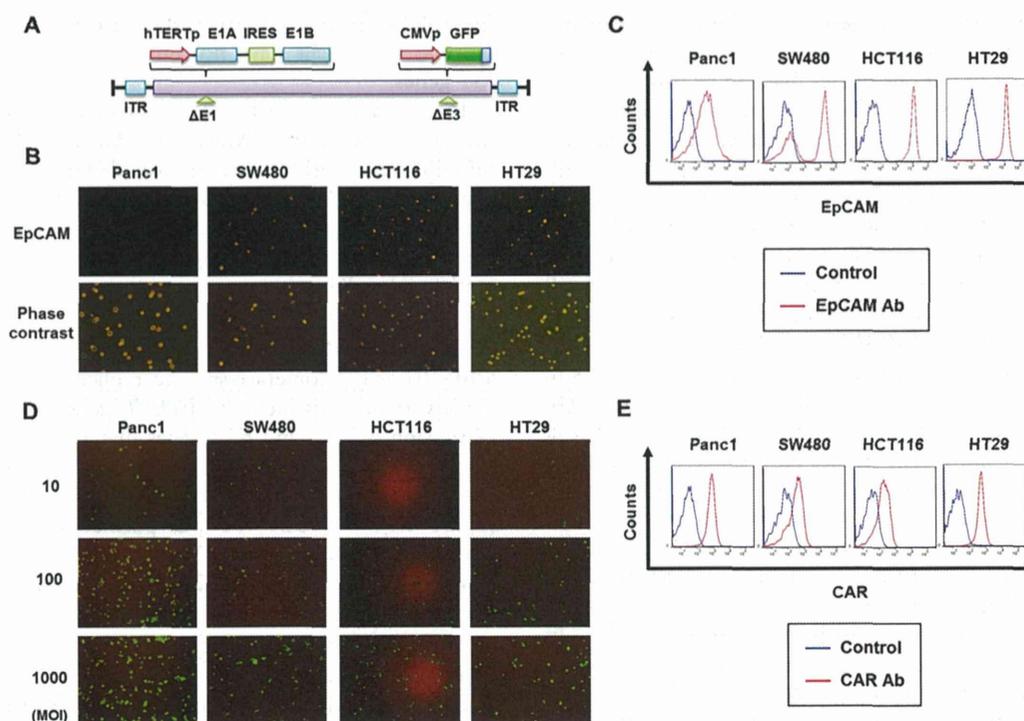


Figure 1 OBP-401-mediated green fluorescent protein (GFP) expression in human cancer cells with different levels of EpCAM expression. (A) Schematic DNA structure of OBP-401 (TelomeScan). OBP-401 is a telomerase-specific replication-competent adenovirus variant in which the hTERT promoter element drives expression of the *E1A* and *E1B* genes linked with internal ribosome entry sites (IRES). The *GFP* gene is inserted under the cytomegalovirus (CMV) promoter into the E3 region. (B) Immunofluorescence staining of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in four human cancer cell lines (Panc1, SW480, HCT116, and HT29 cells). EpCAM expression under fluorescence microscopy (top panels) and phase-contrast microscopy (bottom panels). Original magnification: $\times 100$. (C) Flow cytometric analysis of EpCAM expression in four human cancer cell lines. Cells are incubated with anti-EpCAM antibody. An isotype-matched normal mouse IgG1 is used as a control. (D) Cells re-infected with OBP-401 at multiplicity of infection (MOI) of 10, 100 or 1000 plaque-forming units per cell and assessed for GFP expression under fluorescence microscopy 24 h after infection. (E) Expression of CAR is analysed using flow cytometry in four human cancer cell lines.

approved by the institutional review board at Okayama University Graduate School (Receipt No. 1537).

Gene mutation analysis by direct sequencing

Taq polymerase, forward primer and reverse primer were mixed with eluted DNA solution, and DNA was amplified using the PCR Thermal Cycler. Primer sequences and PCR settings are shown in online supplementary table S1. Using the PCR products, the sequence of each gene was analysed with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

Gene mutation analysis by ASB-PCR

ASB-PCR for the KRAS and BRAF genes was performed with a primer set of a TaqMan Mutation Detection Assays (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), as described in a previous report.²⁹ This assay amplifies only mutant alleles with mutant-specific primers and prevents the amplification of wild-type alleles using blocking oligonucleotides. Genetic mutations of target genes were analysed with the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). Genotyping Master mix and Mutation Detection Assay were mixed with two sets of eluted DNA solution, and this mixture was applied to real-time PCR analysis. The mutation detection method was customised as follows. The PCR cycle number was set to 70 for the efficient amplification of small copy numbers of target genes. A total cell count was restricted to less than 50 cells/well to prevent non-specific amplification of wild-type alleles. The sensitivity and

specificity were analysed using a mixture of KRAS/BRAF wild-type and mutant cells. Genetic mutation was recognised as positive when the amplification for mutant alleles using a specific primer was detected.

RESULTS

Fluorescence imaging of human cancer cells with differential EpCAM expression

OBP-401 (TelomeScan) was previously constructed by inserting the *GFP* gene under the control of the CMV promoter at the deleted E3 region of the telomerase-specific replication-selective type 5 adenovirus OBP-301 (Telomelysin) (figure 1A). To assess the potential of OBP-401-mediated biological imaging, we used four epithelial types of human cancer cell lines (Panc1, SW480, HCT116 and HT29) that differentially express EpCAM in immunocytochemistry (figure 1B) and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (figure 1C). All cell lines could be visualised by OBP-401-induced GFP expression in a dose-dependent manner, independently of EpCAM expression (figure 1D). The expression level of CAR, which is associated with adenovirus infectivity, was similar among all cell lines (figure 1E). These results suggest that OBP-401-mediated biological imaging is a useful method to detect human cancer cells regardless of high or low EpCAM expression.

Fluorescence-guided isolation of CTCs with multi-laser FACS

We used OBP-401 to establish a simple ex vivo method to capture viable human CTCs in the peripheral blood for genetic

GI cancer

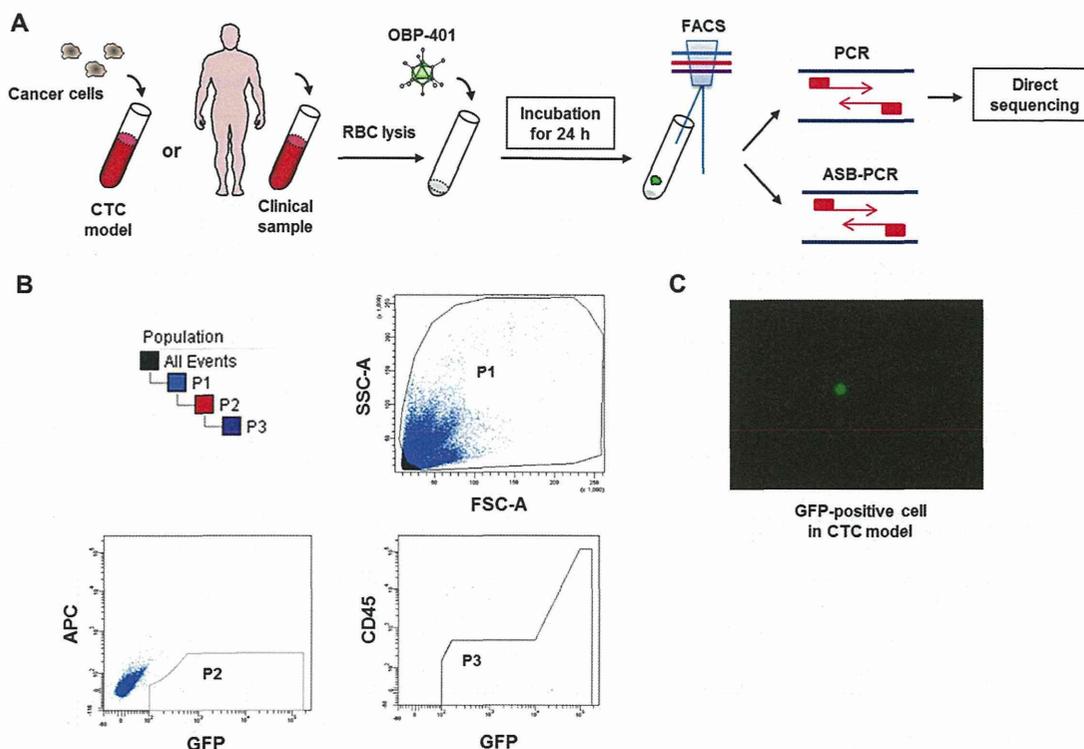


Figure 2 A simple fluorescence virus-guided capturing system of circulating tumour cells (CTCs). (A) Cell isolation steps in the OBP-401-based CTC capturing system. CTC models containing spiked human cancer cells in 5 mL of blood sample or clinical blood samples obtained from patients with cancer are incubated with red blood cell (RBC) lysis buffer for 6 min. After centrifugation, cell pellets are then infected with OBP-401 at 1×10^6 plaque-forming units and incubated for 24 h. Thereafter, cells are incubated with anti-CD45 antibody, and the cell pellet is sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS). DNA extracted from FACS-sorted green fluorescent protein (GFP)-positive cells is subjected to direct sequencing or allele-specific blocker PCR (ASB-PCR) analysis. (B) Each gate is set to capture the GFP-positive CTCs by FACS analysis. After isolating only viable cells at the P1 gate, the P2 and P3 gates are set to exclude the intrinsic fluorescence-positive cells and CD45-positive normal blood cells, respectively. (C) Representative image of GFP-positive CTCs in blood sample containing SW480 cells after infection with OBP-401. Original magnification: $\times 200$.

analysis. By spiking a certain number of human cancer cells that have different types of genetic mutations in the *KRAS* or *BRAF* gene in 5 mL of blood from healthy volunteers, we made CTC models with different types of genetic mutations. As illustrated in figure 2A and online supplementary figure S1, following the lysis of RBCs in 5 mL aliquots of CTC models or whole blood samples obtained from patients, the cell pellets were subsequently incubated with OBP-401 at 1×10^6 PFU for 24 h, labelled with anti-CD45 antibody conjugated with phycoerythrin (PE), and sequentially sorted by FACS. In preliminary experiments using CTC models, we found suitable conditions for sorting only GFP-positive CTCs by excluding auto-fluorescent allophycocyanin-positive cells at the P2 gate and haematopoietic CD45-positive cells at the P3 gate (figure 2B). The GFP-positive cells could be detected in the CTC model under a fluorescence microscope (figure 2C).

Genetic analysis of OBP-401-labelled GFP-positive cells using direct sequencing

FACS-isolated GFP-positive CTCs at the P3 gate were analysed genetically by direct sequencing (see online supplementary table 1). The expected genetic mutations in the *KRAS* or *BRAF* gene were precisely detected in all CTC models comprising four human cancer cell lines by direct sequencing (figure 3A and see online supplementary figure S2), indicating that the OBP-401-based biological capture system is effective for the

collection of CTCs expressing various levels of the EpCAM marker. Recent studies have demonstrated that a heterogeneous population of CTCs is present within individual patients with cancer and that these CTCs have epithelial and mesenchymal markers, suggesting the diverse genetic variations with wild-type and mutant-type genes in the populations of CTCs. To evaluate the minimum purity limitation of mutant-type CTCs for genetic analysis using direct sequencing, SW480 cells (*KRAS* G12V mutant) were mixed with H1299 cells (*KRAS* wild-type) at a 50%, 40%, 30%, 20% or 10% purity ratio. *KRAS* gene mutations could be detected by direct sequencing only in samples containing more than a 30% purity ratio of SW480 cells (figure 3B). Thus, high purity of mutant-type CTCs in heterogeneous populations is necessary for detection of genetic alterations by direct sequencing.

Genetic analysis of OBP-401-labelled GFP-positive cells using ASB-PCR

To further increase the sensitivity to detect genetic alterations in heterogeneous populations of CTCs, we next evaluated the potential of the Allele-Specific Blocker (ASB)-PCR method using four types of mutation-specific primers for the *KRAS* or *BRAF* genes. Before analysing the human cancer cells, we confirmed that there was no amplification of PCR products in human normal fibroblasts with wild-type *KRAS* and *BRAF* genes or in blood obtained from normal healthy volunteers by ASB-PCR