

蛍光ウイルス試薬を用いた進行胃癌患者の腹腔内浮遊がん細胞の生物学的悪性度評価に基づく早期再発症例の診断技術の開発

業務主任者 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】

消化器癌の浸潤・転移形式の中で、腹膜播種（癌性腹膜炎）は最終的な死亡原因の大きな割合を占める重大な予後規定因子である。最近、胃癌に使用できる抗癌剤が分子標的医薬品も含めて多岐にわたることからも、腹腔洗浄細胞診（CY）陽性症例を悪性度指標などに基づいて個別化し、適切な治療スケジュールやレジメによって治療することが重要であると言える。

TelomeScan（テロメスキャン、OBP-401）は、平成17年より岡山大学で開発してきた癌特異的蛍光標識アデノウイルス製剤であり、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GFP緑色蛍光を発する。本研究では、胃癌を中心とする消化器癌患者の腹腔洗浄液中の細胞分画から、TelomeScanで遊離癌細胞を可視化して検出する新しい技術を確立し、細胞診陽性患者の中で早期に進展・再発する患者を検出し層別化できるかどうかを検討し、革新的なバイオマーカーとしての臨床的有用性を検証することを目的とする。

平成26年度は、62例の胃癌患者の開腹あるいは腹腔鏡下手術の際に腹腔洗浄液を採取し、TelomeScanを用いてGFP陽性細胞を検出した。生存期間との相関を解析し、TelomeScanによって細胞診陽性患者の中でさらに予後不良な患者集団を選別できる可能性が示唆された。また、より高感度の蛍光検出方法としてモノクローマー型マイクロプレートリーダーの適合性を検証するとともに、簡便な普及型の細胞カウンターを用いた検討も行った。

業務項目担当責任者：

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

消化器癌の浸潤・転移形式の中で、腹膜播種（癌性腹膜炎）は最終的な死亡原因の大きな割合を占める重大な予後規定因子である。進行胃癌では10～15%でみられ、術後再発した症例では50～60%に達するとされている。特に、術中肉眼的に播種結節を認めないP0症例においても、すでに顕微鏡的に播種している症例が少なからずあり、最近では術中に腹腔洗浄細胞診（CY）が一般に広く行われている。しかし、P0症例のCY陽性率は10～40%とばらつきが多く、またP0CY1症例でも長期生存例が認められることから、その正診率や臨床的な意義についてはさらなる検討が必要である。最近、胃癌に使用できる抗癌剤が分子標的医薬品も含めて多岐にわたることからも、CY1症例を悪性度指標などに基づいて個別化し、適切な治療スケジュールやレジメによって

治療することが重要であると言える。

TelomeScan（テロメスキャン、OBP-401）は、岡山大学で開発してきた癌特異的蛍光標識アデノウイルス製剤であり、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GFP緑色蛍光を発する（Kishimoto *et al*, *Nature Med.*, 2006）。現在までに、*ex vivo*で進行癌患者の末梢血にTelomeScanを暴露することで、血中循環癌細胞（circulating tumor cells; CTC）を可視化できることを明らかにしてきた（Kojima *et al*, *J. Clin. Invest.*, 2009）。また、平成22～24年度の第3次対がん総合戦略研究事業（木下班、現 大江班）では、術中腹腔洗浄液からの細胞分画回収、TelomeScan感染、蛍光顕微鏡下のGFP陽性細胞の検出など、一連のプロセスのバリデーションを行った。

本研究では、胃癌を中心とする消化器癌患者の腹腔洗浄液中の細胞分画から、TelomeScanで遊離癌細胞を可視化して検出する新しい技術を確立し、細胞診陽性患者の中で早期に進展・再発する患者を検出し層別化できるかどうかを検討し、革新的なバイオマーカーとしての臨床的有用性を検証することを目的とする。

B . 研究方法

1) 臨床検体を用いたTelomeScan陽性細胞の解析

進行胃癌および他の消化器癌（結腸癌、直腸癌、肝臓癌、膵臓癌など）の開腹あるいは腹腔鏡補助下手術の際に、生理食塩水10～50 mlを腹腔内に散布し、腹腔洗浄液をできるだけ多く採取する。その一部を迅速細胞診に提出した後、直ちに遠心分離にて細胞分画を回収し、細胞数および生細胞率を確認する。生細胞数から1 multiplicity of infection (MOI) となるようにウイルス量を算出し、TelomeScanを添加した後、回転培養器内で24時間培養する。細胞成分を遠心分離し、蛍光顕微鏡下でGFP陽性細胞の形態を観察するとともに固定し細胞数をカウントする。

2) TelomeScan陽性細胞のサブセット解析

GFP細胞をフローサイトメトリーやマイクロピペットで回収し、白血球のCD45やリンパ球のCD4、CD8、さらにマクロファージの表面マーカーなどで解析し、GFP陽性細胞のoriginを確認する。

3) 高感度あるいは簡便な蛍光検出システムの開発

マイクロプレートリーダーやキュベット型の蛍光検出器など、GFP蛍光を簡便に定量できる技術を比較検討し、多施設共同研究に向けたウイルスに触れない閉鎖系検出システムの開発を目指す。

(倫理面への配慮)

TelomeScanは「自立的な増殖力及び感染力を保持したウイルス又はウイロイド」に該当するため、「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（平成十五年法律第九十七号）」に基づき、文部科学省に「第二種使用等拡散防止措置確認申請」を行い、平成24年6月26日、「24受文科振第537号」にて承認されている。

また、TelomeScanを用いた生体材料の解析に関しては、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会にて「テロメラーゼ依存性腫瘍選択的増殖ウイルスを標的薬剤とする蛍光分子イメージング技術を用いた高感度がん細胞検出システムの開発に関する研究」として、平成18年8月29日に承認されている。

C . 研究結果

1) 臨床検体を用いたTelomeScan陽性細胞の解析

平成22～24年度の第3次対がん総合戦略研究事業で確立したTelomeScanを用いた検出技術の有用性を検証するため、62例の胃癌患者の開腹あるいは腹腔鏡下手術の際に腹腔洗浄液を採取した。TelomeScanを添加して24時間培養した後、蛍光顕微鏡下でGFP陽性細胞数をカウントした。細胞診陽性の16例は細胞診陰性の46例に比して有意に予後不良であった。TelomeScanによるGFP陽性細胞2個

以上の24例は2個未満の38例に比して有意に予後不良であった。TelomeScan陰性/細胞診陰性の30例は最も予後が良好で、TelomeScan陰性/細胞診陽性の8例、TelomeScan陽性/細胞診陰性の16例はほぼ同等の予後で、TelomeScan陽性/細胞診陽性の8例は極めて予後不良であった（図1）。これらの結果から、TelomeScanによって細胞診陽性患者の中でさらに予後不良な患者集団を選別できる可能性が示唆された。

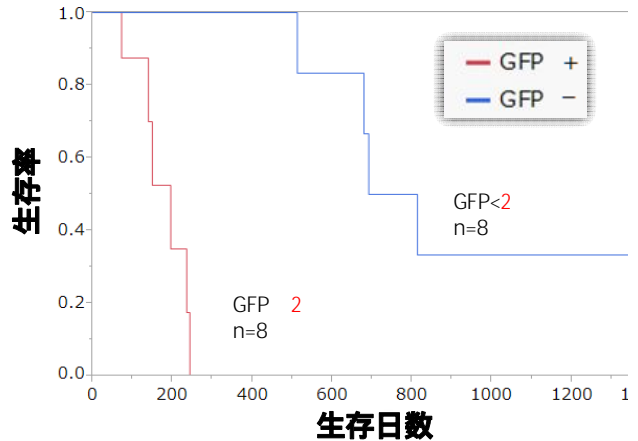


図1 細胞診陽性患者のTelomeScanによる層別化

2) TelomeScan陽性細胞のサブセット解析

腹腔洗浄液中の細胞を多重蛍光免疫染色にて解析したところ、TelomeScanによるGFP陽性細胞はクラスターを形成する傾向があり、多くがCD45陽性の白血球系細胞と集塊を成していることが明らかとなった。さらに、生存期間が短い症例でクラスター形成が顕著である傾向がみられ、今後、腹膜播種形成の病態の解明も試みていく。

3) 高感度あるいは簡便な蛍光検出システムの開発

GFP蛍光陽性細胞は蛍光顕微鏡下に目視にてカウントしてきたが、より客観的かつ簡便な検出技術を開発するために、フィルター型およびモノクロメーター型マイクロプレートリーダーの適合性を比較検討した。その結果、モノクロメーター型の方がGFP蛍光強度と細胞数の相関が強いことが明らかとなった。また、より簡便な普及型の細胞カウンターを用いて、実際にGFP蛍光陽性細胞を検出することが可能であることを確認した。

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診断・治療技術の育成が不可欠である。その大きな方向性は個別化医療に向かっており、従来の一貫的な治療ではなく、患者個々の病態に基づいた細やかな治療戦略

の構築が重要である。

現在、多くの消化器癌治療はガイドラインに基づき標準治療が行われているが、バイオマーカーによる治療選択が推奨されていくと予測される。本研究が目指すのは、消化器癌腹膜播種患者において、術中腹腔洗浄液中のTelomeScan / GFP陽性細胞数により、集中的な分子標的薬剤を含む化学療法を必要とする症例、標準治療が妥当な症例、比較的軽い維持療法で十分な症例などを層別化することで、副作用が少ないより有効な治療アルゴリズムを確立することである。それによって、過剰な治療による生活の質（QOL）の低下を予防し、必要な患者に集中的な治療を行うことで生存期間を延長させ、国民の健康増進や医療経済の節減にも役立つと期待される。

平成26年度の総括として、掲げた目標はすべて達成できており、計画は順調に進んでいると言える。平成27年度以降は、トランスレーショナル・リサーチとしての臨床研究を推進し、症例を集積することで本技術の臨床的有用性を検証していく。また、多重蛍光免疫染色を用いてGFP陽性細胞とクラスターを形成する細胞集団を解析し、腹膜播種形成の病態の解明も試みていく。最終的には、GFP陽性細胞数による症例の層別化を行い、集中治療、標準治療、低用量による維持治療などの無再発生存期間や全生存期間に与える影響を比較検討する前向き臨床研究を計画する。TelomeScanによる癌細胞の可視化は、免疫染色やPCRによる方法と異なり生きた癌細胞のみを検出するため、より鋭敏な予後との関連性が認められると期待される。

E . 結論

TelomeScanにより消化器癌患者の腹腔洗浄液中の血球系細胞とクラスターを形成する癌細胞を可視化することができ、バイオマーカーとして細胞診陽性症例の中で極めて予後不良の患者を選別できる可能性が示唆された。

F . 研究発表

1. 論文発表

【英文】

1. 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.
2. 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.
3. Shimoyama, K., [Kagawa, S.](#), Ishida, M., Watanabe, S., Noma, K., Takehara, K., [Tazawa, H.](#), Hashimoto, 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.
4. [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.
 5. Yano, S., Miwa, S., Mii, S., Hiroshima, Y., Uehara, F., Yamamoto, M., Kishimoto, H., [Tazawa, H.](#), [Fujiwara, T.](#), Hoffman, R.M. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Yano, S., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Bouvet, M., [Fujiwara, T.](#), Hoffman R.M. Selective methioninase-induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCI imaging confers chemosensitivity. *Oncotarget* 5: 8729-8736, 2014.
 12. 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.
- #### 【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.

2. 学会発表

【国際学会】

1. Watanabe, M., Kagawa, S., Ishida, M., Hori, N., Kikuchi, S., Kuroda, S., Kishimoto, H., Nishizaki, M., Tazawa, H., Fujiwara, T. Virus-guided fluorescence imaging of intraperitoneal free gastric cancer cells as a potential clinical biomarker. *Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2014*, San Diego, 2014.
2. Yano, S., Zhao, M., Tazawa, H., Hoffman, R.M., Fujiwara, T. Real-time FUCCI imaging demonstrates targeting dormant cancer cells *Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2014*, San Diego, 2014.

【国内学会】

1. 永坂岳司、母里淑子、稲田涼、岸本浩行、近藤喜太、浅野博昭、佃和憲、西崎正彦、香川俊輔、藤原俊義：Genetic/epigenetic 変異を基盤とした大腸癌個別化治療の構築。 **第69回日本消化器外科学会総会（シンポジウム）**、郡山、2014年7月。
2. 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、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。
3. Watanabe, M., Kagawa, S., Ishida, M., Hashimoto, Y., Hori, N., Kikuchi, S., Kuroda, S., Kishimoto, H., Nishizaki, M., Tazawa, H., Urata, Y., Fujiwara, T. A feasibility study To visualize intraperitoneal disseminated gastric cancer by fluorescence-emitting virus, TelomeScan. **第73回日本癌学会学術総会**、横浜、2014年9月。