

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Fluorescent virus-guided detection system of biologically malignant intraperitoneal free cancer cells in advanced gastric cancer patients

研究開発担当者 (日本語) 大学院医歯薬学総合研究科・教授 藤原俊義

所属 役職 氏名： (英語) Toshiyoshi Fujiwara, Professor & Chairman, Department of Gastroenterological Surgery, Okayama university Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

消化器がんの浸潤・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 POCY1 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、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 (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)。

本研究では、胃癌を中心とする消化器がん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することを目的としている。特に、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。

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。パイロット研究として胃癌患者 31 例を解析したところ、TelomeScan による GFP 陽性細胞が 10 個以上みられた症例は極めて予後不良であり、細胞診 (CY) 陽性よりも GFP 陽性細胞数の方が術後の臨床経過を反映していることが明らかとなった。

本研究の初年度 (平成 26 年度) は、本技術の臨床的な POC (proof of concept) を得るために、さらに前向きに胃癌患者 68 例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、より高感度で簡便な蛍光検出方法として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検証した。

平成 27 年度は、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、岡山大学病院の症例を集積することで本技術の臨床的有用性を検証した。前年度の検討から高感度蛍光検出マイクロプレートリーダーを用いた GFP 蛍光強度による定量的検出システムを採用し、より簡便かつ再現性のある測定法を確立した。

平成 28 年度は、臨床病期の異なる胃癌症例の腹腔洗浄液のさらなる集積を進めるため、岡山大学病院の関連病院のネットワークを形成し、岡山大学に TelomeScan 専用の解析センターを設置した。また、GFP 陽性細胞とクラスターを形成する細胞集団の多重蛍光免疫染色解析を行い、がん関連マクロファージ (Tumor-associated Macrophage; TAM) の関与を明らかにした。さらに、予後の層別化を可能とする体外診断技術として検査メーカー等への導出を目指し、医薬品・医療機器総合機構 (PMDA) との薬事戦略相談を平成 28 年 10 月 27 日に実施した。

Peritoneal dissemination contributes to worse prognosis in gastric cancer patients. Although cytology is widely used for detecting peritoneally disseminated cancer cells, this conventional method cannot distinguish between viable and non-viable cancer cells. Since only viable cancer cells have the malignant potential to develop the peritoneal carcinomatosis, the viability of disseminated cancer cells is informative and helpful to predict gastric cancer patients who cause future peritoneal metastasis.

We constructed a green fluorescent protein (GFP)-expressing attenuated adenovirus, in which the telomerase promoter regulates viral replication (TelomeScan, OBP-401) (Kishimoto *et al*, *Nature Med.*, 2006). We have succeeded to use TelomeScan to establish a simple *ex vivo* method for detecting viable human circulating tumor cells in the peripheral blood (Kojima *et al*, *J. Clin. Invest.*, 2009).

The fluorescence emitted from TelomeScan-positive cells was successfully quantitated by a multi-mode microplate reader. We then analyzed clinical peritoneal washes obtained from 68 gastric cancer patients and found that patients with positive for TelomeScan showed significant worse prognosis. In the cytology-positive patients, median survival time of TelomeScan-positive patients was significantly shorter than that of

TelomeScan-negative patients. These results suggest that this fluorescent virus-guided cytology detect biologically more malignant cancer cells in the peritoneal washes and further discriminate the prognostic difference in gastric cancer patients.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 4件、国際誌 15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.*, 2016, 15: 199-208.
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.*, 2016, 15: 402-411.
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*, 2016, 11: e0148760.
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.*, 2016, 3:16001.
5. Yoshida, K., Nagasaka, T., Umeda, Y., Tanaka, T., Kimura, K., Taniguchi, F., Fuji, T., Shigeyasu, K., Mori, Y., Yanai, H., Yagi, T., Goel, A., Fujiwara, T. Expansion of epigenetic alterations in EFEMP1 promoter predicts malignant formation in pancreatobiliary intraductal papillary mucinous neoplasms. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142: 1557-1569.
6. Osaki, S., Tazawa, H., Hasei, J., Yamakawa, Y., Omori, T., Sugi, K., Komatsubara, T., Fujiwara, T., Sasaki, T., Kunisada, T., Yoshida, A., Urata, Y., Kagawa, S., Ozaki, T., Fujiwara, T. Ablation of MCL1 expression by virally induced microRNA-29 reverses chemoresistance in human osteosarcomas. *Sci Rep*, 2016, 6: 28953.
7. Urano, S., Ohara, T., Noma, K., Katsube, R., Ninomiya, T., Tomono, Y., Tazawa, H., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Kimura, F., Nouse, K., Matsukawa, A., Yamamoto, K., Fujiwara, T. Iron depletion enhances the effect of sorafenib in hepatocarcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17: 648-656.
8. Nishitan, S., Noma, K., Ohara, T., Tomono, Y., Watanabe, S., Tazawa, H., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. Iron depletion-induced downregulation of N-cadherin expression inhibits invasive malignant phenotypes in human esophageal cancer. *Int. J. Oncol.*, 2016, 49: 1351-1359.
9. Kuroda, S., Nishizaki, M., Kikuchi, S., Noma, K., Tanabe, S., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. Double flap technique as an anti-reflux procedure in esophagogastrectomy after proximal gastrectomy. *J*

*Am Coll Surgons*, 2016, 223: e7-e13.

10. Kumano, K., Nishinakamura, H., Mera, T., Itoh, T., Takahashi, H., Fujiwara, T., Kodama, S. Pretreatment of donor islets with papain improves allograft survival without systemic immunosuppression in mice. *Islets*, 2016, 8: 145-155.
11. Yano, S., Takehara, K., Tazawa, H., Kishimoto, H., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Efficacy of a cell-cycle decoying killer adenovirus on 3-D gelfoam®-histoculture and tumor-sphere models of chemo-resistant stomach carcinomatosis visualized by FUCCI imaging. *PLoS One*, 2016, 11: e0162991.
12. Onishi, T., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Takeuchi, M., Otani, T., Nakamura, S., Sakurai, F., Mizuguchi, H., Kishimoto, H., Umeda, Y., Shirakawa, Y., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Tumor-specific delivery of biologics by a novel T-cell line HOZOT. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 38060.
13. Yano, S., Takehara, K., Tazawa, H., Kishimoto, H., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T., Hoffman, R.M. Therapeutic efficacy in vivo of a telomerase-dependent adenovirus in an orthotopic model of chemotherapy-resistant human stomach carcinomatosis peritonitis visualized with cell cycle color coding FUCCI imaging. *J Cell Biochem*, 2017, 118: 559-569.
14. Machitani, M., Sakurai, F., Wakabayashi, K., Tachibana, M., Fujiwara, T., Mizuguchi, H. Enhanced oncolytic activities of the telomerase-specific replication-competent adenovirus expressing short-hairpin RNA against Dicer. *Mol. Cancer Ther.*, 2017, 16: 251-259.
15. Yano, S., Takehara, K., Kishimoto, H., Tazawa, H., Urata, Y., Kagawa, S., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman, R.M. OBP-401-GFP telomerase-dependent adenovirus illuminates and kills high-metastatic more effectively than low-metastatic triple-negative breast cancer in vitro. *Cancer Gene Ther.*, 2017, 20: 45-47.
16. 藤原俊義：腫瘍融解ウイルス療法の臨床開発. *医学のあゆみ「癌標的分子と治療開発 -現状と将来」* 2016, 258: 503-508.
17. 藤原俊義：Molecular theranostics for gastrointestinal cancer：分子イメージングと治療の融合. *JSMI Report* 2016, 10: 7-11.
18. 藤原俊義：ウイルス療法とは. *がん免疫療法* 2017, 1: 51-52.
19. 藤原俊義、田澤大、田邊俊介、香川俊輔、白川靖博：食道がんに対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究. *日本臨床「ゲノム情報と遺伝子治療」* 2017, 75: 746-751.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Fluorescence-guided imaging of gastric cancer cells for an insight into peritoneal dissemination. 口頭、香川俊輔、渡邊めぐみ、栗田和也、菊地覚次、黒田新士、坂本修一、西崎正彦、田澤大、藤原俊義、**第88回日本胃癌学会総会（パネルディスカッション）**、2016/3/19、国内.
2. Molecular Theranostics for gastrointestinal cancer. 口頭、藤原俊義、田澤大、水口裕之、浦田泰生、香川俊輔：**第11回日本分子イメージング学会総会・学術集会（シンポジウム）**、2016/5/28、国内.

3. 食道癌に対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究の中間報告. 口頭、田辺俊介、白川靖博、金谷信彦、岡田剛、前田直見、黒田新士、野間和広、田澤大、香川俊輔、藤原俊義、**第70回日本食道学会学術集会 (ワークショップ)**、2016/7/4、国内.
4. 食道癌に対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究:低用量群 (Level 1) の薬理動態解析. 口頭、藤原俊義、香川俊輔、田辺俊介、田澤大、野間和広、黒田新士、菊地覚次、白川靖博、**第71回日本消化器外科学会総会 (ワークショップ)**、2016/7/14、国内.
5. 胃癌個別化治療に向けた腹腔内遊離癌細胞イメージング技術の応用. 口頭、渡辺めぐみ、香川俊輔、栗田和也、坂本修一、菊地覚次、黒田新士、岸本浩行、西崎正彦、田澤大、藤原俊義、**第71回日本消化器外科学会総会 (ワークショップ)**、2016/7/14、国内.
6. 標的陰性癌に対する Photoimmunotherapy. 抗原修飾による抗原陽転化と不均一性の克服. 口頭、香川俊輔、石田道弘、下山京子、竹原清人、野間和広、田辺俊介、渡邊めぐみ、田澤大、小林久隆、藤原俊義、**第71回日本消化器外科学会総会 (特別企画)**、2016/7/14、国内.
7. Next-Generation Telomelysin: multifunctional telomerase-specific oncolytic adenovirus armed with the wild-type p53 tumor suppressor gene. 口頭、藤原俊義、香川俊輔、田澤大、**第22回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 (シンポジウム)**、2016/7/28、国内.
8. 消化器がんに対するテロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤を用いた集学的治療. 口頭、藤原俊義、**第75回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)**、2016/10/6、国内.
9. Multidisciplinary therapy with telomerase-specific oncolytic adenovirus for human gastrointestinal cancer. 口頭、藤原俊義：**第54回日本癌治療学会学術集会 (シンポジウム)**、2016/10/20、国内.
10. テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤を用いた食道癌に対する集学的治療. 口頭、藤原俊義、**第39回日本分子生物学会年会 (シンポジウム)**、2016/12/2、国内.
11. Clinical implications of fluorescence-emitting virus guided peritoneal cytology in gastrointestinal cancer. 口頭、Kagawa, S., Watanabe, M., Kuwata, K., Sakamoto, S., Shigeyasu, K., Tazawa, H., Kuroda, S., Kikuchi, S., Nishizaki, M., Fujiwara, T. **The 19<sup>th</sup> International Congress of Cytology**, 2016/5/31、国内.
12. PD-L1 expression as a predictive factor for recurrence pattern and prognosis in curatively resected gastric cancer. 口頭、Morihiro, T., Kuroda, S., Kubota, T., Tazawa, H., Kagawa, S., Fujiwara, T. **2016 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Minisymposium)**, 2016/4/18、国外.
13. Tumor associated macrophages promote malignant phenotypes of disseminated human gastric cancer cells in intraperitoneal cancer immune microenvironment. 口頭、Sakamoto, S., Kagawa, S., Kuwada, K., Ito, A., Kagawa, T., Kikuchi, S., Kuroda, S., Yoshida, R., Tazawa, H., Fujiwara, T. **2017 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Minisymposium)**, 2017/4/4、国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願