

受賞対象論文

Kikuchi 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* (2015) 23, 501-509.

菊地 覚次  
Satoru Kikuchi

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学, 岡山大学病院  
低侵襲治療センター

Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science, Minimally Invasive Therapy Center, Okayama University Hospital



<プロフィール>

昭和54年生まれ  
平成16年3月 岡山大学医学部医学科卒業  
平成16年4月 岡山済生会総合病院 初期研修医  
平成18年4月 広島市立広島市民病院 外科 後期研修医  
平成20年4月 姫路中央病院 外科 医員  
平成22年10月 岡山大学病院 肝胆膵外科 医員  
平成23年4月 北川病院 外科 医員  
平成25年10月 岡山大学病院 消化管外科 医員  
平成27年1月 テキサス大学 MD Anderson Cancer Center, Melanoma Medical Oncology, Research Intern  
平成27年4月 岡山大学医学部 消化器外科学 客員研究員  
平成27年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了  
平成28年10月 岡山大学病院 低侵襲治療センター 助教

研究の背景と経緯

胃癌や大腸癌などの消化管癌では、領域リンパ節への転移頻度が高いため、根治的な治療としては、所属リンパ節の郭清を含めた広範な原発巣切除が標準治療である。しかし、比較的壁浸潤の浅い早期消化管癌ではリンパ節転移の頻度がほとんどないため、局所切除で根治が望める。そのため、粘膜内癌に対して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が、低侵襲で機能温存可能な手術方法として広く普及している。しかし、壁浸潤がもう少し進行した粘膜下層浸潤癌においては、そのリンパ節転移頻度が10~20%程度存在するが、術前に正確にリンパ節転移診断の有無を評価することが不可能なために、技術的に ESD 可能であっても、標準治療としては予防的な領域リンパ節郭清を伴う原発巣を含めた広範な消化管切除が行われている。そのために、結果として多くの患者では、不必要な手術のために体重減少や食事摂取量の減少といった quality of life (QOL) の低下を引き起こしている。

一般的に、ESDの際には安全に粘膜下層剥離を行うため、粘膜下層に生理食塩水やグリセオールなどを局

注して、粘膜下層を広げて切除を行う。この局注液の中に抗腫瘍物質を混注することによって、リンパ管を經由して領域リンパ節へ抗腫瘍物質が転移リンパ節へ到達し、ESDと同時に転移リンパ節を治療できないかと今回仮説を立てた(図)。これが実現すれば、現在受けている不必要な過大侵襲の手術が回避でき、より低侵襲で機能温存できる手術が確立できる可能性がある

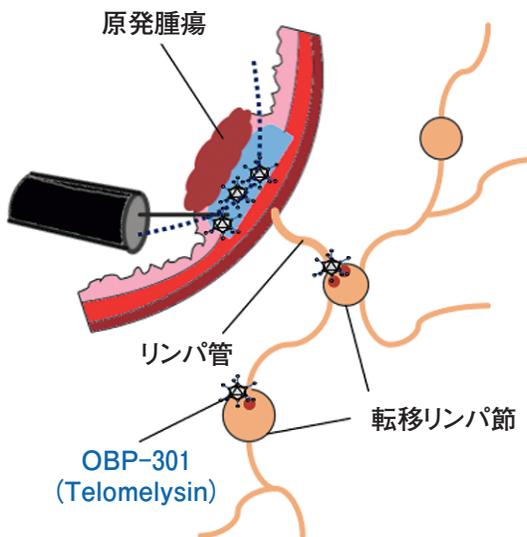


図 内視鏡的治療に OBP-301を応用した転移リンパ節の治療

と考えられる。

その抗腫瘍物質として、今回用いたものが、我々岡山大学消化器外科学教室の藤原俊義教授を中心に研究・開発を行ってきた抗腫瘍ウイルスである OBP-301 (Telomelysin) である<sup>1)</sup>。OBP-301はアデノウイルス5型を基本骨格として、human telomerase reverse transcriptase (hTERT) プロモーターによってウイルスの増殖が制御されるように改変されている。そのため、OBP-301はテロメラーゼ活性の高い腫瘍細胞では増殖し、腫瘍細胞を死滅させるが、正常細胞ではテロメラーゼ活性が低いために増殖できず、正常細胞には害をおよぼさない腫瘍選択的増殖型ウイルス製剤である。

## 研究成果の内容

### 1. in vitro におけるヒト大腸癌細胞株に対する OBP-301の抗腫瘍効果

最初に、2種類 of ヒト大腸癌細胞株を用いて OBP-301の抗腫瘍効果を検討した。抗腫瘍効果は cell viability assay として、XTT assay にて行った。さらに、ヒト大腸癌細胞株は green fluorescence protein (GFP) を導入したものをを用いて視覚的にも評価できるようにした。また、コントロールウイルスとして、増殖制限型のアデノウイルスである dl312を用いた。コントロールおよび dl312投与群では、経時的に腫瘍細胞は増殖を認めたが、OBP-301投与群では投与24時間後より効果を認め、96時間後にはほぼ完全に腫瘍細胞は死滅した。XTT assay においても、OBP-301投与では、濃度依存的に抗腫瘍効果を認めた。

### 2. センチネルリンパ節転移を有する同所性直腸癌マウスモデルの確立

次に、この研究で key となるリンパ節転移を有する早期消化管癌（粘膜下層浸潤癌）モデルの作成を行った。ヌードマウスの直腸粘膜下層に顕微鏡下でヒト大腸癌細胞株の移植を行った。リンパ節転移の有無を簡便に評価するために、GFP を導入したヒト大腸癌細胞株を用いて実験を行い、腫瘍をマウス直腸に移植7日後に開腹を行い、センチネルリンパ節への転移の有無について、蛍光顕微鏡を用いて評価した。その結果、原発巣の組織切片にて粘膜下層浸潤直腸癌モデルが作成可能であることを確認した。また、このモデルにおいて、センチネルリンパ節への転移は腫瘍移植後7日

目で78.5% (33/42) と高頻度に認めることがわかった。こうしてセンチネルリンパ節転移を有する同所性直腸癌マウスモデルを確立した。

### 3. 腫瘍周囲に局注した OBP-301が転移リンパ節に到達し、転移した腫瘍内で増殖する

ESD の治療を想定した場合、直腸の腫瘍周囲に局注した OBP-301がリンパ管を經由して転移リンパ節に到達し、転移した腫瘍内で選択的に増殖し、抗腫瘍効果を示すかどうかを確かめるため、red fluorescence protein (RFP) が導入されたヒト大腸癌細胞株を用いてセンチネルリンパ節転移を有する同所性直腸癌マウスモデルを作成した後、GFP ラベルした OBP-301 (OBP-401)<sup>2)</sup> を腫瘍周囲に局注し、red (腫瘍) および green (ウイルス) の分布について、蛍光顕微鏡を用いて確認した。その結果、転移リンパ節内の red (腫瘍) と green (ウイルス) の分布は完全に一致していた。さらに、転移リンパ節の免疫染色においても、ウイルスの E1A 蛋白がリンパ節内の腫瘍細胞内でのみ発現を認めていた。これらの結果から、原発巣周囲の直腸に局注したウイルスがリンパ管を經由して、転移リンパ節に到達し、転移した腫瘍内で選択的に増殖していることが証明された。

### 4. 転移リンパ節に対する OBP-301の治療効果

センチネルリンパ節転移を有する同所性早期直腸癌マウスモデルを用いて、臨床で行われる ESD の要領で、直腸腫瘍周囲の粘膜下層に OBP-301を局注し腫瘍と直腸の筋層の間にスペースを作った後、腫瘍切除を行った。治療後7日目に再開腹して、転移リンパ節を確認すると、PBS, cisplatin, dl312投与群では転移リンパ節の GFP 蛍光領域 (腫瘍細胞) が増大していたが、OBP-301投与群では GFP 蛍光 (腫瘍細胞) は消失していた。治療前後の GFP 蛍光強度を定量すると、有意に OBP-301投与では治療効果を認めた。さらに治療後のリンパ節を摘出し RT-PCR を行うと、OBP-301治療群ではヒト特異的な Alu 配列の増幅は認めず、OBP-301により腫瘍細胞が完全に根絶され、リンパ節において腫瘍細胞の遺残がないことが確認された。また、OBP-301のリンパ節転移に対する効果は濃度依存性であった。治療後4週間目まで追跡した結果、PBS, cisplatin, dl312投与群では転移リンパ節の GFP 蛍光領域 (腫瘍細胞) はさらに増大していたが、OBP-301投与群では GFP 蛍光領域は認めず、OBP-301投与群では再発も認めないことが確認された。

## 研究成果の意義

リンパ節転移の可能性のある早期消化管癌の内視鏡的治療において、抗腫瘍ウイルスである OBP-301 を併称することを想定した場合、今回確立した同所性早期直腸癌の治療モデルの結果は非常に有用である。リンパ系ルートは癌の重要な転移経路であるが、同時に抗腫瘍薬剤の到達ルートとも考えることができる。進行癌においては、腫瘍細胞の浸潤等により、通常のリンパ網が破壊されてしまい利用できない可能性があるが、早期癌ではリンパ網を利用した局所療法が有用であると考えられる。また、実臨床において ESD などの内視鏡的治療の際、腫瘍を安全に切除するために腫瘍周囲の粘膜下層に生理食塩水などの液体を局注して、腫瘍と筋層との間にスペースをつくり切除を行うが、本研究の方法は、その液体に抗腫瘍ウイルスを混注するだけでよく、臨床応用も容易であると考えられる。さらに、リンパ網が破壊されていない限り、腫瘍周囲に局注されたウイルスは容易にリンパ流に乗って、素早く広がり、センチネルリンパ節以上のリンパ節に対しても効果が期待できる。

## 今後の展開や展望

今回使用した OBP-301 は、すでに米国における phase I 試験でその安全性について様々な癌腫の患者

で確認されている<sup>3)</sup>。さらに、本邦では現在岡山大学病院において、岡山大学消化器外科学を中心に標準治療が困難な食道癌患者に対して、OBP-301 と放射線療法併用の phase I / II 試験が行われており、その安全性と有効性が確認されている。今後、リンパ節転移を有する消化管癌治療において、原発巣の局所切除に OBP-301 を併用することにより、同時にリンパ節転移も治療できるという、より低侵襲で機能温存手術が臨床に応用されることが期待される。

## 文 献

- 1) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, et al. : Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* (2004) 10, 285-292.
- 2) Kishimoto H, Kojima T, Watanabe Y, Kagawa S, Fujiwara T, et al. : In vivo imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat Med* (2006) 12, 1213-1219.
- 3) Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, Senzer N, Phadke AP, et al. : A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol Ther* (2010) 18, 429-434.

---

平成29年8月21日受稿  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-2  
電話：086-235-7257 FAX：086-221-8775  
E-mail：satorukc@okayama-u.ac.jp