

## 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 小坂隆司

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻  
消化器・腫瘍外科学

### 審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	梁 明秀
副査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	利野 靖
副査	横浜市立大学附属病院病理部准教授	山中 正二

博士の学位論文審査結果の要旨

## Imaging and Antitumoral Effect of a Cyclo-oxygenase 2-specific Replicative Adenovirus for Small Metastatic Gastric Cancer Lesions.

(制限増殖型アデノウイルスによる胃癌微小転移巣の可視化と抗腫瘍効果)

### 【背景】

胃癌腹膜播種は同病変に対する確立された治療法がなく、病変自体が微小であり診断が困難である。新たな治療・診断のツールとしてアデノウイルスに遺伝子改変を施した制限増殖型アデノウイルス (CRAd) による抗癌治療、微小病変のイメージングの報告がなされその効果が期待されている。

### 【目的】

CRAd の胃癌腹膜播種モデルに対する抗癌作用と病変描出能を明らかにすること。

### 【方法】

胃癌細胞で特異的に発現している Cox2 に反応して増殖し、増殖の際に発光基質の酵素であるルシフェラーゼを産生する CRAd を実験に使用した。

胃癌培養細胞に野生型アデノウイルスと各種 CRAd を投与し感染させ、その殺細胞効果とウイルスの増殖程度を評価した。赤色蛍光蛋白 (DsRed) 発現胃癌細胞を作成し、これをヌードマウスの腹腔内に投与することで DsRed 発現胃癌腹膜播種モデルマウスを作成した。このマウスに CRAd を腹腔内投与し、開腹してウイルス発光による病変描出能を評価し、また生存期間の比較を行った。

### 【結果】

胃癌培養細胞に CRAd を投与した感染実験では各胃癌細胞株に対して殺細胞効果を認めた。開腹した腹膜播種モデルマウスにおいて肉眼での検索では 58.2% の同定能だったのに対し、ウイルスによる発光によるイメージングでは 78.8% と同定能が向上した。継時的に経過を追った腹膜播種モデルマウスでは、ウイルス投与マウス (n=6) の生存期間は PBS 投与マウス (n=6) よりも有意に長期であった (85.7 日 vs. 34.3 日,  $p < 0.01$ )。

### 【考察】

今回の研究で用いた CRAd は胃癌腹膜播種に対するイメージング、抗癌治療の新たなツールとなりうると考えられた。

審査にあたり、以上の論文内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、山中副査より以下の論評・質問がなされた。

- 1) Virus の抗腫瘍効果によって病変が見えなくなる現象が起こるのであれば、腫瘍の可視化という意味では相反することをしているのではないか。
- 2) 胃癌には実際に Cox2 はどの程度発現しているのか。炎症細胞など正常に機能している細胞でも Cox2 は発現していると思われるが、これによる影響はないのか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた

- 1) 腫瘍の可視化と抗腫瘍効果は相反しており分けて考えるべきであったと思う。抗腫瘍効果を発揮しながら可視化も行うという実験系なので、抗腫瘍効果によって病変が消滅してしまった場合には可視化ができないといった状況は当然起こりうる。計画を立案する段階で抗腫瘍効果を発揮するウイルス・可視化をするウイルスを分けて開発し、実験も別々に行うべきであったと考える。
- 2) 臨床検体での Cox2 の発現を調べたデータはなかったものの、胃癌 cell line で Cox2 が発現しているデータはある。胃癌内で Cox2 は発現していると思われるが、その発現率や特徴についてはわからない。Cox2 は炎症細胞・免疫細胞でも発現しているため、これらの細胞が障害を受けて副作用が出現する可能性は高いと考える。

続いて利野副査より以下の論評・質問がなされた

山中副査でも話があったように、治療と可視化は分けて考えるべきだった。

- 1) 腹膜播種モデルマウスへのウイルスの治療効果を検討した実験で開腹せずに病変をイメージングしているが、これはどうやっているのか。この実験では発光イメージングのほうが深部観察には有利だったのか。
- 2) 今回のイメージングで結節型の病変は同定できているが、実臨床でみるような肥厚型の病変についてもイメージングはできるのか。
- 3) 正常細胞に取り込まれたウイルスはどうなっているのか。
- 4) 実際に臨床応用する際にはどのような投与方法を考えているのか。

これに対して以下の回答がなされた。

- 1) Virus は腹腔内に直接注入されている。腹壁全体をアクリル板で圧迫して表在から腹腔内病変までの距離をなるべく近づけるようにして撮影を行った。発光イメージングは深部観察に有利との報告があるが、実際に実験を行った印象だと蛍光イメージングに比べて発光イメージングが優れているということはない。

2) 可能と考える。しかし肥厚型の病変は線維組織が主体で癌細胞はまばらに存在するため、病変の体積に対する腫瘍細胞の比率が小さくなる。このため病変からの発光は微弱になると考えられる。

3) おそらく Virus は細胞内に取り込まれて脱殻し、ウイルス DNA は細胞核内に取り込まれるが、そこから増幅しないのでそのままの状態となっていると考えられる。

4) 治験を行うに当たっては皮膚転移など表面から投与しやすい病変に対する局所投与から開始することになると思う。感染対策については本邦他大学のケースでは個室隔離で投与されていたようで、これを踏襲することになる。

最後に梁主査より以下の論評・質問がなされた。

1) CAR・CD46 の正常組織・癌組織での発現はどのような特徴があるのか。

2) 腹膜播種を同定する実験系において正常組織内で発光がみられた事例はなかったのか。

3) 腹腔内で Virus が行き渡らずに感染していない組織がある可能性はないのか。

4) 蛍光しているが発光していない病変はどのような状態だったのか。

5) Virus を投与して100日間生存したマウスの腹腔内に残存していた腹膜播種病変はどのような状態だったのか。

6) Virus に対する宿主側の免疫は Virus の抗腫瘍効果に対して正に働くことはないのか。

7) 原発巣と腹膜播種とで違いがあるのか。それを治療に活かすことはできないのか。

これに対して以下の回答がなされた。

1) CAR・CD46 は正常組織内では高発現し、胃癌組織では CAR は 50%程度、CD46 は高頻度に発現している。

2) なかった。肝臓についても発光はなく、肝表面に付着した微小病変を同定できる状態であった。

3) 腹腔内に癒着はなく、Virus は腹腔内全体に行き渡っていたと考えられる。

4) 2つ可能性があると考え。①Cox2 陰性・陽性細胞が混在した病変内で Cox2 陰性細胞が残存していた。②すべて癌細胞は死滅したが DsRed 自体が残存していた。①②どちらなのかはすべての病変を病理学的に検討したわけではないので不明である。

5) 残存している病変内の胃癌細胞の増殖と新たなウイルスの感染が相互に発生しているものと考えられるが、詳細については今後確認したい。

6) アデノウイルスが感染した腫瘍細胞を標的とした腫瘍免疫は働くと思われるが、治験データで宿主側の血清・腹水中の抗 Ad 抗体の高発現が Poor prognosis

と相関しているとのデータがあり、全体として宿主免疫は Virus の治療効果に対し負に働いていると考えられる。

7) 原発巣と播種巣の特性が異なるデータはある。今回の Virus は Cox2 を標的としているが、播種巣に特異的に発現しているマーカーを標的とする戦略は可能であるとする。

以上のような質疑応答がなされ適切に回答した。本学位論文は制限増殖型アデノウイルスを用いた胃癌微小転移巣の診断と治療を目的とした橋渡し研究であり、今後の臨床応用が大いに期待される。申請者は本学位論文に関する基礎研究を主体的に実施し、関連する学術的事項について深い理解と洞察を持っていることを示した。審査員による協議の結果、本研究は博士（医学）の学位論文に値するものと判定された。