



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1466号
学位記番号	第1052号
氏名	濱野 真吾
授与年月日	平成 27年 3月 25日
学位論文の題名	<p>Oncolytic reovirus combined with trastuzumab enhances antitumor efficacy through TRAIL signaling in human HER2-positive gastric cancer cells (トラスツズマブを併用した腫瘍溶解性レオウイルスはヒト HER2 陽性胃癌細胞において TRAIL シグナルを介して抗腫瘍効果を増強する)</p> <p>Cancer Letters. Vol. 356 : P. 846-854, 2015</p>
論文審査担当者	主査： 浅井 清文 副査： 竹山 廣光, 城 卓志

論文内容の要旨

[研究目的]

HER2 陽性進行胃癌に対しては HER2 抗体の分子標的薬トラスツズマブと抗癌剤の併用療法が第一選択となっているが、十分な治療効果が得られていないのが現状である。近年、新たな抗腫瘍療法としてコクサッキーウイルスやレオウイルスなどの腫瘍溶解性ウイルスが期待されている。欧米では頭頸部癌に対するレオウイルスの第Ⅲ相臨床試験が進行中である。今回我々は HER2 陽性胃癌細胞におけるトラスツズマブと腫瘍溶解性レオウイルスの併用による抗腫瘍効果を検討した。

[方法]

1. *in vitro* の実験では、HER2 過剰発現胃癌細胞である NCI-N87 細胞を用いた。
2. WST-8 assay を用いてトラスツズマブとレオウイルスの併用で殺細胞効果を高めるかどうかを検討した。
3. トラスツズマブとレオウイルスの併用で誘導されるアポトーシスをみるために、Caspase3/7 activity を測定した。
4. トラスツズマブとレオウイルスによる癌細胞ダメージへの分子的なメカニズムを調べるために、human PCR Array を用いて 89 のアポトーシス関連遺伝子の遺伝子発現の変化を調べた。
5. PCR Array の結果を確認するために、PCR Array 分析とは異なった PCR プライマーセットを用いて 4 つのアポトーシス遺伝子 (TRAIL、Caspase1、CIDEA、BIRC8) を定量 RT-PCR にて調べた。
6. 細胞増殖抑制経路を調べるためにウェスタンブロットを行った。一次抗体に抗 TRAIL 抗体、caspase-8 抗体、cleaved caspase-8 抗体、caspase-3 抗体、cleaved caspase-3 抗体、PARP 抗体、cleaved PARP 抗体、Akt 抗体、pAkt 抗体、DR4/TRAIL-R1 抗体、DR5/TRAIL-R2 抗体を使用した。
7. アポトーシスで TRAIL シグナルの関与を調べるために、NCI-N87 細胞を抗 TRAIL モノクローナル抗体もしくはコントロールマウス IgG で 30 分間インキュベートした後にトラスツズマブとレオウイルスを投与した。その後細胞生存の測定を行った。
8. *in vivo* の実験では、28 匹の 6 週齢 BALB/c ノドマウスに NCI-N87 細胞を皮下に移植した。コントロール群、トラスツズマブ治療群、レオウイルス治療群、トラスツズマブとレオウイルス併用治療群の 1 群 7 匹の 4 群に分けてトラスツズマブ 10mg/kg 腹腔内投与、 1×10^8 plaque-forming units(pfu)のレオウイルス腫瘍直接投与を毎週、4 週間にわたって行い、腫瘍退縮効果を検討した。
9. ノドマウスから腫瘍を切り抜き、ホルマリン固定した。HE 染色、Ki67 染色、cleaved caspase-3 染色を行い、細胞生存を計測するため核凝集と断片化を HE 染色でカウントした。またアポトーシスを計測するため、Ki67 陽性細胞と cleaved caspase-3 陽性細胞もカウントした。

[結果]

1. *in vitro* での HER2 過剰発現 NCI-N87 細胞の増殖は、トラスツズマブ単剤とレオウイル

ス治療単独で著しく阻害された。

2. Caspase3/7 Assay では、レオウイルス治療単独もしくはトラスツズマブとレオウイルス併用で、トラスツズマブ単独よりもアポトーシスを有意に引き起こした。
3. 定量 RT-PCR 分析では、TRAIL 発現がトラスツズマブ治療もしくはレオウイルス治療により誘導されたが、併用療法ではさらに高いレベルに誘導することが明らかになった。
4. TRAIL 蛋白発現はレオウイルスとトラスツズマブの各々の治療後に誘導されたが、併用療法ではさらに強力に誘導された。また、レオウイルス単独と併用療法は Caspase3 と PARP を活性化させた。
5. TRAIL IgG 抗体でブロックすると、併用療法によって引き起こされていた細胞毒性を有意に阻害した。
6. PI3K/Akt 経路が活性化している HER2 過剰発現細胞でトラスツズマブにレオウイルスを併用すると、トラスツズマブ単独よりもさらに Akt のリン酸化を阻害していた。
7. *in vivo* では、レオウイルス単独群で腫瘍退縮が観察された。トラスツズマブとレオウイルス併用療法群ではさらに抗腫瘍効果が増強した。
8. 病理組織学的分析では、コントロール群もしくはトラスツズマブ単独群よりもトラスツズマブとレオウイルス併用療法でより多くのアポトーシス細胞が観察された。また、より多くの Cleaved Caspase-3 染色細胞とより少ない Ki67 染色陽性細胞が各単剤群やコントロール群よりも併用療法群で観察された。

[考案]

HER2 過剰発現胃癌細胞でのトラスツズマブとレオウイルス併用療法は TRAIL 発現を引き起こしアポトーシスを誘導する。また、Akt シグナルの抑制とカスパーゼ経路を介したアポトーシス誘導により抗腫瘍効果を増強すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

【研究内容の概要】

HER2 は、上皮成長因子受容体 (EGFR) に類似した構造を持つ受容体型チロシンキナーゼであり、近年 HER2 に対する分子標的薬が開発され、HER2 を高発現する悪性腫瘍に対する治療薬として使われるようになってきている。HER2 陽性進行胃癌に対しても HER2 抗体の分子標的薬トラスツズマブと抗癌剤の併用療法が第一選択となっているが、満足のいく治療効果が得られていないのが現状である。そこで、本研究では、新たな治療法として腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスに着目をして、HER2 陽性胃癌細胞におけるトラスツズマブと腫瘍溶解性レオウイルスの併用による抗腫瘍効果を検討した。

In vitro 実験系では、HER2 を過剰発現している NCI-N87 細胞を用いて検討した。細胞増殖は、トラスツズマブ単剤、又は、レオウイルス治療単独で著しく阻害されたが、両者併用でさらに阻害された。また、Caspase-3/7 Assay では、レオウイルス治療単独もしくは併用でアポトーシスを誘導することが判明した。定量 RT-PCR により、TRAIL 発現がトラスツズマブ治療もしくはレオウイルス治療により誘導されるが、併用ではさらに強く誘導されることが明らかになった。TRAIL 蛋白はレオウイルスとトラスツズマブの各々の治療後に誘導されたが、併用療法ではさらに強力に誘導された。また、レオウイルス単独と併用で Caspase-3 と PARP が活性化した。TRAIL IgG 抗体でブロックすると、併用によって引き起こされていた細胞傷害を有意に低下させた。また、PI3K/Akt 経路を検討したところ、トラスツズマブ単独よりも併用でさらに Akt のリン酸化が阻害された。

In vivo では、6 週齢 BALB/c スードマウスに NCI-N87 細胞を皮下に移植し、コントロール群、トラスツズマブ治療群、レオウイルス治療群、トラスツズマブとレオウイルス併用群を比較したところ、レオウイルス単独群で腫瘍退縮が観察され、併用群ではさらに抗腫瘍効果が増強した。マウスから腫瘍を取り出して病理組織学的分析を行ったところ、コントロール群もしくはトラスツズマブ単独群よりも併用群でより多くのアポトーシス細胞が観察された。また、各単剤群やコントロール群よりも併用群でより多くの Cleaved Caspase-3 陽性細胞とより少ない Ki67 陽性細胞が観察された。以上より、HER2 陽性胃癌細胞におけるトラスツズマブとレオウイルス併用療法は、Akt シグナルの抑制と、TRAIL、カスパーゼ経路を介したアポトーシス誘導により抗腫瘍効果を増強すると考えられた。

【審査の概要】

副査の竹山教授から、腫瘍溶解性ウイルスの作用機序、トラスツズマブの作用機序、なぜ腫瘍溶解性ウイルスと HER2 分子標的薬の組み合わせなのか、HER2 低発現と強発現でのレオウイルスの効果の違いなど、13 項目の質問があり、主査の浅井教授からは、レオウイルスの免疫、正常細胞での HER2 発現の有無、トラスツズマブの副作用、*in vitro* と *in vivo* でのトラスツズマブとレオウイルスの併用療法における効果の違い、実験の苦労や今後の計画など 7 項目の質問があり、副査の城教授からは、胃癌の内視鏡治療や ESD の拡大適応患者についてなど 4 項目の質問がなされた。これらの質問におおむね満足すべき回答が得られ、本論文の主旨を十分に理解しているとともに、専門領域においても十分な知識を持ち得ているものと判断した。本研究により、HER2 過剰発現胃癌に対し、トラスツズマブとレオウイルス併用療法が新たな治療法となる可能性が示された。よって本論文の筆頭著者は博士 (医学) を授与されるに相応しいと判定した。

論文審査担当者 主査 教授 浅井 清文 副査 教授 竹山 廣光 教授 城 卓志