

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591469

研究課題名 (和文) 制限増殖型レオウイルスを利用した新しいリンパ節転移診断法の開発

研究課題名 (英文) Development of novel diagnostic tool for lymph node metastasis using by oncolytic reovirus.

研究代表者

衛藤 剛 (ETOH TSUYOSHI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00404369

研究成果の概要：制限増殖型レオウイルスは ras 経路が活性化している癌細胞に選択的に感染・増殖し、細胞溶解を引き起こす。膵癌では 80%以上の症例に K-ras 遺伝子の変異が存在し細胞内 ras 経路が活性化しているため、レオウイルスの標的となりうることを我々は世界で初めて報告した。さらにレオウイルスを用いた膵癌に対する新しいウイルス癌治療法の開発に向け研究成果を挙げてきた (Etoh et al. Clin Cancer Res 2003、Himeno et al. Int J Oncol 2005、Hata et al. Oncol Reports 2008、Hirano et al. Oncol Reports 2009)。

また、レオウイルスの癌特異的効果をもとに、癌存在診断に応用できるトレーサーの選定を行ってきた。現在有力なトレーサーとして G F P および carboxylic acid succinimidyl ester を候補として、トレーサー付加レオウイルスの癌細胞に対する感染効率を検討している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	0	1,700,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：レオウイルス、リンパ節転移診断、K-ras 活性、消化器癌

1. 研究開始当初の背景

制限増殖型レオウイルスは ras 経路が活性化している癌細胞に選択的に感染・増殖し、細胞溶解を引き起こす (Lee et al. Science, 1998)。膵癌では 80%以上の症例に K-ras 遺伝子の変異が存在し、細胞内 ras 経路が活性化しているため、レオウイルスの標的となりうることを我々は世界で初めて報告した (Etoh et al. Clin Cancer Res, 2003, Himeno et al. Int J Oncol, 2005)。

一方、消化器癌や乳癌、肺癌の治療法選択には、正確なリンパ節転移診断が必要不可欠である。しかし CT 検査や超音波検査など現在の画像診断法では、術前リンパ節転移診断の正診率は約 50-60%とされているのが実情である。至適な治療選択のためには、癌特異的かつ正確なリンパ節転移診断法の確立が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、癌特異的に感染・増殖する制限増殖型レオウイルスを利用し、リンパ節転移の新しい診断法の開発、すなわち新しいトレーサーの開発を行う。また蛍光色素をレオウイルスに付加し、リンパ節転移巣に特異的に感染させ、赤外線トレーサーにて転移リンパ節の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) GFP導入レオウイルスの作成および Carboxylic acid succinimidyl ester (Alexa Fluor 488) 付加レオウイルスの作成

レオウイルスは2本鎖RNAウイルスであるため遺伝子導入はReverse genetics法が必要であり、RNAウイルスの各segmentのベクター作成を行い、GFP遺伝子導入レオウイルスを構築する。その後、viabilityを確認し癌特異的感染能力が保たれていることを明らかにする。

(2) GFP導入レオウイルスの検出法の開発

GFPをいかに可視化するかが課題となる。術中腹膜転移の検出方法としては、現在一般臨床で使用されている赤外線イメージ装置 (Typhoon 9400 laser scanning fluorescence imager: Amersham Biosciences) で可視化できるかを検証する。

4. 研究成果

レオウイルスを用いた膵癌に対する新しいウイルス癌治療法の開発にて以下の研究成果を挙げた。

- 膵癌異種動物モデルにおいて、皮下腫瘍に対するレオウイルスの抗腫瘍効果を認めた。さらに組織学的に癌特異的な感染を証明した (Etoh et al. Clin Cancer Res :9:1218-23, 2003)。
 - 膵癌同種動物モデルにおいて、膵癌肝転移に対するレオウイルス門脈内投与での抗腫瘍効果を認めた (Himeno et al. Int J Oncol: 27:901-907, 2005)。
- また癌診断への応用に向けての実験として以下の成果を挙げた。
- 乳癌に対してのレオウイルス抗腫瘍効果の報告を行った (Hata et al. Oncol Reports 16, 1395-8, 2008)。
 - 膵癌同種動物モデルにおいて、膵癌腹膜転移に対するレオウイルス腹腔内投与での抗腫瘍効果を認めた (Hirano et al. Oncol Reports, 21: 1381-1384, 2009)。

GFP導入レオウイルスの開発に関してReverse genetics法を行ってきたが、レオウイルスは2本鎖RNAウイルスであり、フラグメントのベクター作成、および導入が困難であった。そこで、現在は遺伝子導入ではな

く、蛍光色素である Carboxylic acid succinimidyl ester (Alexa Fluor 488) をレオウイルスに付加したトレーサーを作成中である。

また、術前診断に関しては現在大分大学工学部で開発中の光CTでの検出を行っている。すなわち近赤外線レーザー光を生体に照射した際に得られる散乱光強度の測定データに着目し、生体組織の光学パラメーターを計算、可視化を試みるものである。この光CTは従来のエックス線CTのような被曝はなく、造影剤の注入に伴う患者の負担もない利点がある。現在、開発段階であるが、Alexa Fluor 488が候補となりえるか検討したところ、光CTにおいてAlexa Fluor 488の波長を感受でき、感度を上げる作業を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Hirano S, Etoh T, Okunaga R, Shibata K, Ohta M, Nisizono A, Kitano S. Reovirus inhibits the peritoneal dissemination of pancreatic cancer cells in an immunocompetent animal model. Oncol Rep 2009, (21):1381-84. 査読有
- ② Hata Y, Etoh T, Inomata M, Shiraishi N, Nishizono A, Kitano S. Efficacy of oncolytic reovirus against human breast cancer cells. Oncol Rep 2008 Jun;19(6):1395-8. 査読有
- ③ Mimori K, Fukagawa T, Kosaka Y, Kita Y, Ishikawa K, Etoh T, Iinuma H, Sasako M, Mori M. Hematogenous metastasis in gastric cancer requires isolated tumor cells and expression of vascular endothelial growth factor receptor-1. Clin Cancer Res 2008 1;14(9):2609-16. 査読有
- ④ Ueda Y, Ishikawa K, Shiraishi N, Yokoyama S, Kitano S. Clinical significance of HLA class I heavy chain expression in patients with gastric cancer. J Surg Oncol 2008 Apr 1;97(5):451-5. 査読有

- ⑤Moriyama F, Hifumi E, Yamada M, Nishizono A, Uda T. Therapeutic effects of molecularly designed antigen UREB138 for mice infected with *Helicobacter pylori*. *Biotechnol Bioeng*. 2008 Jul 1;100(4):634-43. 査読有
- ⑥Hifumi E, Moriyama F, Hattuchi K, Okuda T, Nishizono A, Uda T. Catalytic features and eradication ability of antibody light-chain UA15-L against *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 2008 Jan 11;283(2):899-907. 査読有
- ⑦Wei JM, Shiraishi N, Goto S, Yasuda K, Inomata M, Kitano S. Laparoscopy-assisted distal gastrectomy with D1+beta compared with D1+alpha lymph node dissection. *Surg Endosc* 2008 Apr;22(4):955-60. 査読有
- ⑧Kosaka Y, Mimori K, Fukagawa T, Ishikawa K, Etoh T, Katai H, Sano T, Watanabe M, Sasako M, Mori M. Identification of the high-risk group for metastasis of gastric cancer cases by vascular endothelial growth factor receptor-1 overexpression in peripheral blood. *Br J Cancer*. 2007 Jun 4;96(11):1723-8. 査読有
- ⑨Etoh T, Shiraishi N, Tajima M, Shiromizu A, Yasuda K, Inomata M, Kitano S Transient liver dysfunction after laparoscopic gastrectomy for gastric cancer patients. *World J Surg* 31(5): 1116-1121, 2007 査読有
- ⑩ Yasuda K, Inomata M, Shiromizu A, Shiraishi N, Higashi H, Kitano S. Risk factors for occult lymph node metastasis of colorectal cancer invading the submucosa and indications for endoscopic mucosal resection. *Dis Colon Rectum* 50:1-7, 2007, 査読有
- ⑪Shiraishi N, Sato K, Yasuda K, Inomata M, Kitano S. Multivariate prognostic study on large gastric cancer. *J Surg Oncol* 96(1): 14-8, 2007, 査読有
- ⑫ Kitano S, Shiraishi N. Laparoscopic gastric and intragastric operation. *International Principle of Laparoscopic Surgery* (分担執筆, in press) 2007, 査読有
- ⑬Moriyama F, Fujii R, Hifumi E, Nishizono A, Uda T. Effects of vaccination by a recombinant antigen ureB138 (a segment of the beta-subunit of urease) against *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol*. 2007 Jun;56(Pt 6):847-53. 査読有
- ⑭Kitano S, Shiraishi N, Uyama I, Sugihara K, Tanigawa N, the Japanese Laparoscopic Surgery Study Group. A multicenter study on oncological outcome of laparoscopic gastrectomy for early cancer in Japan. *Ann Surg* 245(1):68-72, 2007, 査読有
- ⑮Etoh T, Ishikawa K, Shiromizu A, Yasuda K, Inomata M, Shiraishi N, Kitano S. Clinicopathologic features and treatment of residual early cancers after endoscopic mucosal resection of the stomach. *J Clin Gastroenterol* 2006 Oct;40(9):801-5. 査読有
- ⑯Etoh T, Sasako M, Ishikawa K, Katai H, Sano T, Shimoda T. Extranodal metastasis is an indicator of poor prognosis in patients with gastric carcinoma. *Br J Surg*. 2006 Mar;93(3):369-73. 査読有
- ⑰ Shiraishi N, Yasuda K, Kitano S. Laparoscopic gastrectomy with lymph node dissection for gastric cancer. *Gastric Cancer* 9(3): 167-176, 2006 査読有
- ⑱Sonoda K, Izumi K, Matsui Y, Inomata M, Shiraishi N, Kitano S Decreased growth rate of lung metastatic lesions after splenectomy in mice. *Eur Surg Res* 38(5): 469-475, 2006 査読有
- [学会発表] (計 5 件)
- ① Etoh T, Reovirus therapy against metastatic pancreatic cancer in immunocompetent model, The 5th International Meeting on Replicating Oncolytic Virus Therapeutics, March 18-22, 2009, Banff, Alberta, Canada
- ②奥永良樹、衛藤剛、江口英利、遠藤裕一、

岩城堅太郎、内田博喜、甲斐成一郎、柴田浩平、太田正之、北野正剛。膝癌細胞に対するレオウイルス、ゲムシタビン併用投与における抗腫瘍効果の検討，
第108回日本外科学会総会，2008.5.15-17，長崎

③衛藤剛、柴田浩平、太田正之、白石憲男、北野正剛。制限増殖型レオウイルスを用いた転移性膝癌に対する抗腫瘍効果の検討，
第67回日本癌学会学術総会，2008.10.28-30，名古屋

④秦 陽子，衛藤 剛，白水章夫，安田一弘，
猪股雅史，白石憲男，西園 晃，北野正剛。
制限増殖型レオウイルスの乳癌に対する抗腫瘍効果の検討，
第106回日本外科学会，2006.3.29-31，東京

⑤衛藤 剛，柴田浩平，猪股雅史，白石憲男，
北野正剛。固形がんに対する腫瘍溶解性レオウイルスの抗腫瘍効果，
第65回日本癌学会学術総会，2006.9.28-30，横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

衛藤 剛 (ETOH TSUYOSHI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：00404369

(2) 研究分担者

安田 一弘 (YASUDA KAZUHIRO)
大分大学・医学部・講師
研究者番号：70325710

白石 憲男 (SHIRAIISHI NORIO)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：20271132

西園 晃 (NISHIZONO AKIRA)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：70218155

北野 正剛 (KITANO SEIGO)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：90169871