

令和元年6月13日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10506

研究課題名(和文) 制限増殖型レオウイルスに光線療法を併用した新しい集学的癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new multidisciplinary treatment using oncolytic reovirus with photodynamic therapy for cancer

研究代表者

衛藤 剛 (Etoh, Tsuyoshi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：00404369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：今回、Reverse genetics法により、ALAの代わりに近赤外蛍光蛋白質iRFP720遺伝子をL1分節に挿入した組換えレオウイルスの作成に成功し、感染細胞における近赤外蛍光の発現も確認された。しかし、組換えレオウイルスの増殖性は野生型レオウイルスに比べて低下していたため、今後、改良を加えて本研究の目的に資する、より高い抗腫瘍効果と蛍光機能を持つウイルスを作成・選別する。また、光療法について我々はこれまで動物実験において特定の波長の光が、抗炎症作用を示すことを報告してきており、今回開発した組み換えレオウイルスを用い、動物実験での光療法との併用を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

- (1) レオウイルスは活性化ras経路を持つ癌特異的にその有効性が期待できること
レオウイルスの最大の特徴は活性化ras経路内で増殖し細胞溶解を起こすことである。膵癌などにおいてレオウイルスの感受性を認めており、多くの癌が標的となる可能性がある。
- (2) レオウイルスをベクターとして用いることで、iRFP720を腹膜転移巣およびリンパ節転移巣に特異的に移行させること

研究成果の概要(英文)：We have successfully made a constructed reovirus, which was transfected iRFP720 gene by reverse genetics method. The visibility of the constructed reovirus in BHK/T7-9 cell line was examined by immunofluorescence microscopy. The constructed reovirus was visualized in this line. In addition, cytopathic effect of constructed reovirus was observed in BHK/T7-9 cell line. The labeled reovirus was visualized in cancer cell line. In future, we are going to examine the cytopathic effect and visualization of the constructed reovirus to cancer cell lines.

研究分野：消化器外科

キーワード：遺伝子改変型レオウイルス 光療法 5-アミノレブリン酸 iRFP720遺伝子

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 (Eto *et al.* Clin Cancer Res, 2003)。一方、消化器癌では根治切除が唯一完治できる治療であるが、根治切除後の治療を困難にしている原因として腹膜転移、リンパ節転移がある。至適な治療選択のためには、癌特異的な治療戦略の構築が急務である。

また、我々はこれまで動物実験において特定の波長の光が、抗炎症作用を示すことを報告してきた (Hiratsuka T *et al.* JGH 2014)。近年では in vitro で抗腫瘍作用を示す報告があり (Yazan SK *et al.* Lancet, 2015) この作用は光増感物質である 5-アミノレブリン酸 (ALA) により増強される。また、ALA は腹膜転移診断への応用も検討されている物質として注目されている (Namikawa Tet *et al.* World J Gastroenterol 2015)。

現在、欧米において脳腫瘍に対するレオウイルス治療の第 I/II 相臨床試験が進行中である。一方、本邦では我々が基礎実験で消化器癌に対するレオウイルスの抗腫瘍効果を報告してきた (Eto *et al.* Clin Cancer Res, 2003, Himeno *et al.* Int J Oncol, 2005, Hirano *et al.* Oncology Rep, 2008, Kawaguchi *et al.* Int J Oncol, 2010) しかし本邦での臨床応用はまだ実施されていない。

2. 研究の目的

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・増殖する。我々はこれまでレオウイルスが消化器癌の標的となりうることを報告してきた。そこで今回、光増感物質である 5-アミノレブリン酸 (ALA) を導入したレオウイルスを開発し、新規微小転移診断法の確立を目指す。さらに、ALA は抗腫瘍効果を有していることから新規ウイルス光線療法となりうる。この研究により、レオウイルスの殺細胞効果と、ALA により増幅された光線療法との相加・相乗効果をもつ消化器癌に対する新しいウイルス光線療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

ALA 導入レオウイルスの作成

レオウイルスは 2 本鎖 RNA ウイルスであり遺伝子導入が困難といわれているが、レオウイルスに対する遺伝子導入システムに関しては、レオウイルス S2 genome segment に CATgene を導入できたことから、本研究に応用可能と考えている。28 年度は、reverse genetics 法を用い ALA をレオウイルスに導入、新規ベクターを作成する。

- (1) Reverse genetics 法による ALA 導入レオウイルスの作成
- (2) *In vitro* における ALA 導入レオウイルスの Viability の検討
- (3) *In vivo* における光線照射下での ALA 導入レオウイルスの抗腫瘍効果の検討
- (4) *In vivo* における ALA 導入レオウイルスの生体内動態の検討

実験動物での検証

膵癌同種動物モデル (腹膜転移腫瘍モデル) に ALA 導入レオウイルス腹腔内投与および静脈投与後、膵癌腹腔内腫瘍を上記画像診断法で検出する。

- (1) 赤外線イメージ装置および光 CT で検出可能かどうかの検証
- (2) 原発巣および転移巣での病理診断、ALA の定量と赤外線イメージ装置、光 CT での検出力を比較検討し、正診率を算定する。有用性の確認の後、腹膜転移腫瘍モデルを用い、ALA 導入レオウイルス腹腔内投与と光線療法を併用し、抗腫瘍効果を検討する。

4 . 研究成果

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・増殖する。我々はこれまでレオウイルスが消化器癌の標的となりうることを報告してきた。一方、実地臨床では、癌特異的で正確な転移診断法に基づく治療戦略の構築が急務である。そこで、今回 ALA 導入レオウイルスの開発による癌特異的存在診断法に基づき、ALA 導入レオウイルス療法および ALA による抗腫瘍効果増強を期待した光線療法の新規ウイルス光線療法の開発を行う。

今回、Reverse genetics 法により、ALA の代わりに近赤外蛍光蛋白質 iRFP720 遺伝子を L1 分節に挿入した組換えレオウイルスの作成に成功し、感染細胞における近赤外蛍光の発現も確認された。近赤外光は生体透過性が高く、自家蛍光も低いため、生体イメージングや光線療法においても近年脚光を浴びている。しかし、組換えレオウイルスの増殖性は野生型レオウイルスに比べて低下していたため、今後、改良を加えて本研究の目的に資する、より高い抗腫瘍効果と蛍光機能を持つウイルスを作成・選別する。また、光療法について我々はこれまで動物実験において特定の波長の光が、抗炎症作用を示すことを報告してきた (Hiratsuka T *et al.* JGH 2014)。近年では *in vitro* で抗腫瘍作用を示す報告があり (Yazan SK *et al.* Lancet, 2015)。この作用は光増感物質である 5-アミノレブリン酸(ALA)により増強される。現在、胃癌細胞株 MKN-45 を用い、532nm の波長の照射により、抗腫瘍効果を検討中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：猪股 雅史

ローマ字氏名：Inomata Masafumi

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60315330

研究分担者氏名：平塚 孝宏

ローマ字氏名：Hiratsuka Takahiro

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：20600886

研究分担者氏名：西園 晃

ローマ字氏名：Nishizono Akira

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70218155

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。