

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09082

研究課題名(和文) 蛍光蛋白質導入レオウイルスを用いた診断治療一体型ナビゲーション手術の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic and therapeutic integrated navigation surgery using fluorescent protein-transfected reovirus.

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍溶解性レオウイルスは非病原性だが、癌細胞で選択的に増殖し、膵癌や胃癌に対して有効であることを報告している。

本研究では近赤外蛍光蛋白質(iRFP720、BDFP)や、光毒性を有する赤色蛍光蛋白質(KillerRed)に注目し、術中微小癌診断と殺癌細胞効果を目指した。iRFP720組換えレオウイルスを作成し、癌細胞への感染と蛍光発現を示し、論文化した。次にBDFP組換えレオウイルスを作成し、増殖性・蛍光発現が改善した。現在、腹膜播種への感染と蛍光発現を検証している。またKillerRed組換えレオウイルスを作成し、光線力学療法による殺腫瘍効果の上乗せ効果について論文化を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器癌では根治切除が唯一完治できる治療であるが、腹膜転移とリンパ節転移は予後不良因子である。外科的切除において、微小癌遺残が再発・転移に繋がるが、それを蛍光プローブ等により可視化して発見・除去する技術が注目を浴びている。

本研究ではイメージングに適した近赤外蛍光蛋白質(iRFP720及びBDFP)や、光毒性を有する赤色蛍光蛋白質(KillerRed)を発現する組換えレオウイルスを作成・検証した。これらの組換えレオウイルスは術中微小癌診断と殺癌細胞効果を同時に行うという診断治療一体型ナビゲーション手術を可能にし、消化器癌の術後生存率向上に寄与すると考えた。

研究成果の概要(英文)：Oncolytic reovirus selectively proliferates in cancer cells and causes cell lysis. We have shown the efficacy of wild-type reovirus on gastric cancer cell lines in basic research.

In this study, we focused on near-infrared fluorescent proteins (iRFP720 and BDFP) and phototoxic red fluorescent protein (KillerRed) for intraoperative microtumor diagnosis and tumor-killing effect. iRFP720 recombinant reovirus was created and showed infection and fluorescent expression in cancer cells. BDFP recombinant reovirus was created, and its proliferation and fluorescence expression were improved. Currently, we are verifying infection of peritoneal seeding and fluorescence expression. We have also created KillerRed recombinant reovirus, and are currently writing a paper on its efficacy in adding to the tumor-killing effect of photodynamic therapy.

研究分野：ウイルスを用いた癌治療

キーワード：レオウイルス 遺伝子組換え 抗腫瘍効果 光線力学療法 近赤外蛍光

## 1. 研究開始当初の背景

消化器癌では根治切除が唯一完治できる治療であるが、その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。これらに対し、癌のウイルス療法や術中イメージング、光線力学療法が近年注目されている。

腫瘍溶解性レオウイルスは非病原性であるが、ras 経路が活性化している癌細胞で選択的に増殖し、細胞溶解を引き起こす。80%以上の症例に K-ras 遺伝子の変異が存在する膵癌に加えて、胃癌や乳癌に対してもレオウイルスが有効であることを我々は報告している。

最近、遺伝子組換えレオウイルスの作成が可能となった。そこで本研究では、消化器癌の根治的治療法の確立に向けて、術中イメージング・光線力学療法に適した蛍光蛋白質を発現する遺伝子組換えレオウイルスを作成し、術中微小癌診断と殺癌細胞効果を同時に行うという診断治療一体型ナビゲーション手術の開発を行う。

癌のウイルス療法とは、癌細胞のみで複製可能なウイルスを感染させて破壊する方法である。加えて、癌のウイルス療法は癌に対する免疫も惹起させて全身で抗腫瘍効果をもたらすこと (Todo *et al*, Hum Gene Ther, 1999) や、癌幹細胞も破壊すること (Smith *et al*, Oncolytic Virother, 2014) も明らかにされており、手術で全摘できなかった症例における根治的治療としての期待が持たれている。また、近年では遺伝子工学技術を用いてウイルスゲノムを任意に設計して、癌細胞への特異性や殺細胞効果・がん免疫効果を高めて、安全性や効果が向上したがん治療用遺伝子組換えウイルスも開発されている。しかし、多くの癌治療用組換えウイルスは Biosafety level 2 (BSL2) のヒトに病原性のあるウイルスを元にしており、遺伝子組換え生物の拡散防止措置上の課題が存在する。

レオウイルスはヒトに対する病原性がほとんどない (BSL1) が、ras 経路の活性化により抗ウイルス作用の低下した癌細胞において特異的に増殖する性質をもつことから、癌治療への臨床応用が期待されている。難治性で知られる膵癌では 80%以上の症例に K-ras 遺伝子の変異が存在し、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 (Etoh *et al*, Clin Cancer Res, 2003) さらに胃癌・乳癌に対するレオウイルスの抗腫瘍効果も報告してきた (Himeno *et al*, Int J Oncol, 2005; Hirano *et al*, Oncology Rep, 2008; Kawaguchi *et al*, Int J Oncol, 2010; Hata *et al*, Oncol Rep, 2008)。

レオウイルスの遺伝子操作系については、2007 年に小林ら (現・大阪大学微生物病研究所) によって開発され (Kobayashi *et al*, Cell Host Microbe, 2007) 外来遺伝子の挿入・発現も可能となってきたことから (Kemp *et al*, Cancer Gene Ther, 2019; Kanai *et al*, J Virol, 2019) 癌治療用遺伝子組換えウイルスとしての展望がまさに開けたところである。

消化器癌について、腹膜転移とリンパ節転移は予後不良因子であり、膵癌と胃癌では特にその頻度が高い。予後向上を目指して抗癌剤の腹腔内投与が試みられているが効果は十分でない。特に腹膜転移は根治不能であり、強力な治療の開発は喫緊の課題である。癌の外科的切除における取り残し (微小癌遺残) が再発・転移に繋がるが、それを蛍光プローブ等により可視化して発見・除去する技術 (術中蛍光イメージング) が注目を浴びている (Ueno *et al*, Sci Rep, 2015 等)。また、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は、癌細胞ではその代謝産物であるプロトポルフィリン IX が蓄積し、それが光照射により蛍光・毒性を発揮することを利用して、術中イメージングだけでなく癌治療においても利用され始めている (光線力学療法)。

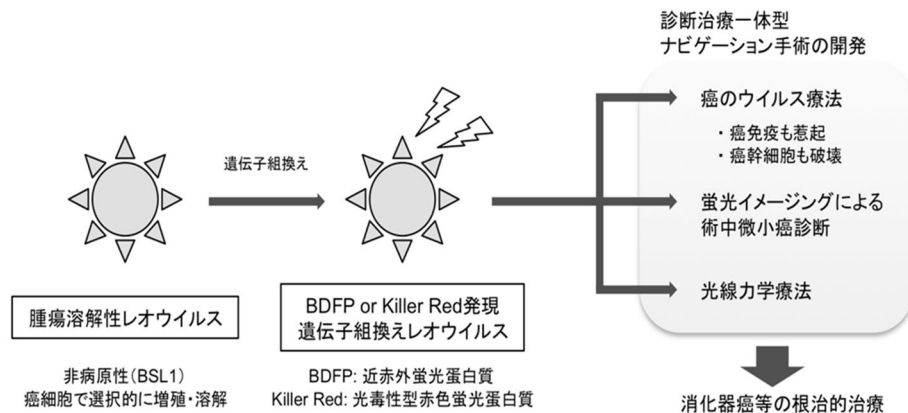


図 1 本研究の概要

## 2. 研究の目的

本研究では、消化器癌等の腹膜転移とリンパ節転移の根治的療法に資する癌診断治療用遺伝子組換えレオウイルスを開発する。すなわち、生体イメージングに適した近赤外蛍光蛋白質としては iRFP720 および BDFP を、光毒性を発揮する赤色蛍光蛋白質としては Killer Red を採用し、これらを発現する組換えレオウイルスを作成して、マウスモデルにてその殺癌細胞効果、リアルタイム微小癌イメージング、および光線力学療法の効果について評価する。

他の腫瘍溶解性ウイルスと異なり、レオウイルスは野生型の時点で非病原性でありながら腫瘍溶解活性を有し、遺伝子組換え実験レベルもクラス 1 であることから安全下に行うことができるため、臨床応用においてアドバンテージであると考えられる。今回、蛍光蛋白質を搭載することにより術中イメージングや光線力学療法を上乘せして、診断治療一体型ナビゲーション手術という新しい癌治療法を提案するが、我々の研究室では腹腔鏡下手術に力を入れていることから、将来的に組換えレオウイルスを用いた腹腔鏡下による診断治療一体型ナビゲーション手術への展開を構想しており、従来法よりも低侵襲性・低副作用の消化器癌等に対する根治的療法の確立を目指したい。

## 3. 研究の方法

本研究では iRFP720・BDFP・Killer Red 発現組換えレオウイルスを作成し、担癌マウスモデルでそれらを用いた診断治療一体型ナビゲーション手術の有効性を立証する。これを達成するため以下に記すように計画に沿って進める。

- (1) iRFP720・BDFP・Killer Red 発現組換えレオウイルスの作成
- (2) 培養細胞での性状評価
- (3) 担癌マウス（ヒト由来癌細胞・ヌードマウス）での評価
- (4) 担癌マウス（同系マウス由来癌細胞・免疫正常マウス）での評価

### (1) iRFP720・BDFP・Killer Red 発現組換えレオウイルスの作成

- ・ 組換え M1 分節ゲノムプラスミドを構築する（図 2）。iRFP720、BDFP1.8 および Killer Red 遺伝子については人工合成遺伝子受託サービスより入手し、M1 分節の 3' 末端側に挿入する。
- ・ 構築した組換え M1 分節ゲノムプラスミドと他の 9 つのゲノム分節を T7 RNA ポリメラーゼを恒常的に発現する BHK/T7-9 細胞 (Ito, Takayama, Yamada *et al*, Microbiol Immunol, 2003) に共導入して、目的の組換えレオウイルスを回収する（図 2）。

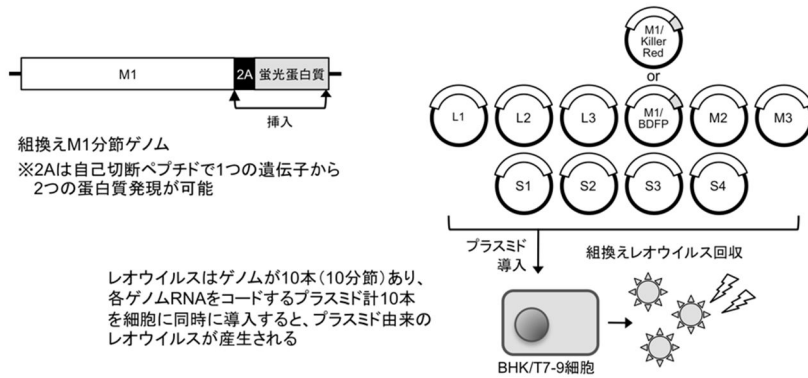


図 2 BDFP・Killer Red 発現組換えレオウイルスの作成

(2)培養細胞での性状評価

- レオウイルスが良く増殖する培養細胞株 (L929 細胞等) で増殖性、蛍光蛋白質等の発現、および挿入遺伝子の安定性について調べる。発現解析では多重染色による解析に加え、ウェスタンブロットや FACS 解析によっても行う。挿入遺伝子の安定性については、組換えレオウイルス培養細胞で連続継代を行い、蛍光発現が何代目まで維持されるか検証する。
- さらに、ヒト・マウス由来癌細胞株を用いて、組換えレオウイルスの殺細胞効果や蛍光発現について検証する。

(3)担癌マウス (ヒト由来癌細胞・ヌードマウス) での評価

まずはヒト由来癌細胞株を免疫不全マウス (ヌードマウス) に移植する系 (異種移植モデル) を用いて、組換えレオウイルスの有用性について以下のように評価を行う。

- 蛍光蛋白質遺伝子 (組換えレオウイルスとは異なる波長特性) を導入したヒト由来癌細胞株をヌードマウスに皮下もしくは腹腔内移植する。
- 組換えレオウイルスを腫瘍部に接種し、抗腫瘍効果について腫瘍の計測および in vivo イメージングによるシグナル解析より評価する。In vivo イメージングではウイルスの腫瘍部特異的な増殖やその度合いについてもシグナル解析により評価する。
- Killer Red 発現ウイルスでは光線力学療法についての評価も行う。すなわち、光源には LED もしくはレーザーを使用し、効果の高い強度・照射時間・回数について検討する。
- 安楽死させた担癌マウスを解剖しながら、腫瘍部の ex vivo イメージングを行い、肉眼的に腫瘍部を切除した後の残存癌やリンパ節転移の検出をレオウイルスの発する蛍光を指標に行う (疑似術中イメージング)。さらに、腫瘍部について病理組織学的解析を行い、ex vivo イメージングによる検出との一致性について確認・検証する。

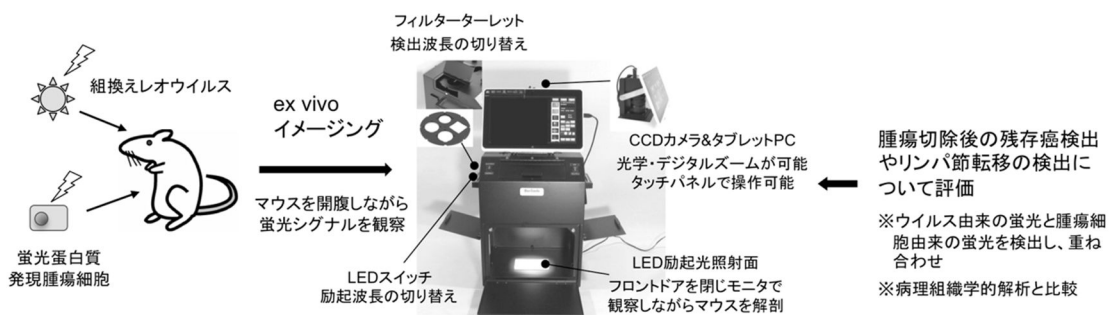


図 3 ex vivo イメージング (疑似術中イメージング) による評価

(4)担癌マウス (同系マウス由来癌細胞・免疫正常マウス) での評価

- 異種移植マウスモデルでは獲得免疫を機序とした治療効果の評価には適さない。したがって、マウス由来癌細胞株を同系の免疫正常マウスに移植する系 (同種移植モデル) においても組換えレオウイルスの評価を上記と同様に行う。今回、マウス腺癌細胞株の腹膜播種モデルを用いて、組換えレオウイルスによる癌免疫効果についても検証する (ウイルス非依存的な抗腫瘍効果をイメージングおよび病理組織学的解析により検出する)。

#### 4. 研究成果

iRFP720 を使用した、組換え M1 分節ゲノムプラスミドを構築した。構築した組換え M1 分節ゲノムプラスミドと他の 9 つのゲノム分節を T7 RNA ポリメラーゼを恒常的に発現する BHK/T7-9 細胞 (Ito, Takayama, Yamada *et al*, Microbiol Immunol, 2003) に共導入して、目的の組換えレオウイルスを回収した。その後、レオウイルスが良く増殖する培養細胞株 (L929 細胞等) で増殖性、蛍光蛋白質等の発現、および挿入遺伝子の安定性について調べた。さらに、ヒト・マウス由来癌細胞株を用いて、組換えレオウイルスの殺細胞効果や蛍光発現について示した (Ogawa K *et al*, J Virol Methods. 2022)。

組換えレオウイルスの改良として、近赤外蛍光蛋白を iRFP720 から BDFP へ変更した BDFP 発現組換えレオウイルスの作成を行った。S2 および M1 分節への BDFP 導入が、増殖性・殺細胞効果・蛍光発現全てにおいて iRFP720 発現組換えレオウイルスよりも改善されていることが確認された。また、光線力学療法に資する組換えレオウイルスの開発として、活性酸素産生赤色蛍光蛋白質 (KillerRed) を発現する組換えレオウイルスの作成も行った。これまでに 590nm の光線照射により KillerRed による殺細胞効果は自施設において実証済みである。現在、KillerRed 組換えレオウイルスによる *in vitro* における光線力学療法による強力な殺腫瘍効果の上乗せ効果について検証している。BDFP/killerRed 組換えレオウイルスは共に胃癌細胞株 (NUGC4, MKN45, MKN45P) および膵癌細胞株 (PK1, Panc1)、ハムスター癌細胞 (HPD-1NR, HPD-2NR, HPD-3NR, HaP-T1a) への感染と蛍光発現も確認された。

今後、癌細胞を接種したマウス及びハムスター (皮下および腹膜播種担癌モデル) を用いて、作成した BDFP および KillerRed 発現組換えレオウイルスの術中蛍光イメージングによる微小播種診断の有用性を *ex vivo* イメージング等により評価し、さらに抗腫瘍効果も明らかにする予定である。用いる細胞株としては、*in vitro* で最も蛍光発現が強かった低分化型印環細胞癌 (NUGC-4) により皮下結節担癌マウスモデルでの組換えレオウイルスの Viability を検討する。そして、腹膜播種担癌マウスモデルとして高頻度胃癌腹膜播種株 (MKN45P) および腺がん低分化型株 (OCUM-1) での組換えレオウイルス蛍光発現、抗腫瘍効果を実証する。さらには、immunocompetent model を用いた組換えレオウイルスの抗腫瘍効果および生体内動態についても検証を行うため、ハムスター膵管癌細胞下部 (HaP-T1a) を用いた皮下結節・腹膜播種担癌ハムスターモデルでの組換えレオウイルスの Viability を検討する。

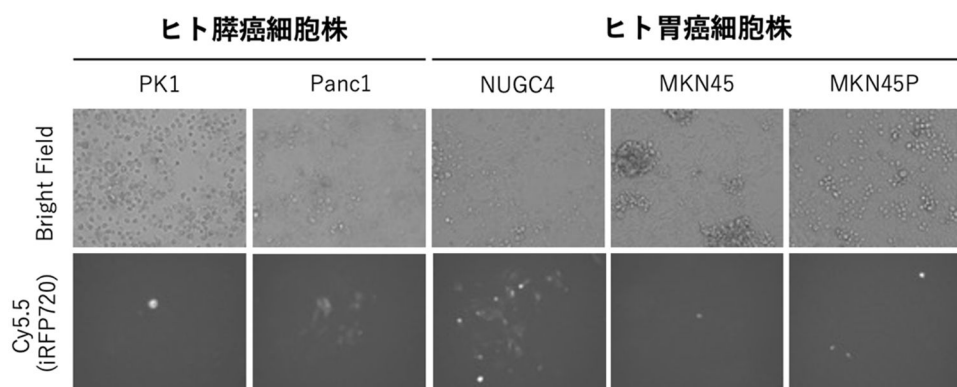


図 4 ヒト癌細胞への iRFP720 組換えレオウイルスの感染と蛍光発現

感染4日目

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小川 雄大、山田 健太郎、衛藤 剛、野口 賀津子、白坂 美哲、小林 剛、西園 晃、猪股 雅史
2. 発表標題 癌腹膜播種に対する近赤外蛍光蛋白発現組換えレオウイルスを用いた新規診断・治療法の開発
3. 学会等名 2021年度日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuhiro Ogawa, Kentaro Yamada, Tsuyoshi Etoh, Masahiro Kitagawa, Yoshinori Shirasaka, Noguchi Kazuko, Takeshi Kobayashi, Akira Nishizono & Masafumi Inomata
2. 発表標題 Development of a novel diagnostic and therapeutic method using recombinant reovirus expressing near-infrared fluorescent protein for peritoneal dissemination
3. 学会等名 Society of Surgical Oncology 2022 Global Partner Posters Program (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白坂 美哲、衛藤 剛、山田 健太郎、小林 剛、野口 賀津子、北川 雅浩、小川 雄大、西園 晃、猪股 雅史
2. 発表標題 胃癌腹膜播種に対するKillerRed発現組換えレオウイルスを用いた新規診断法の開発
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川 雄大、衛藤 剛、山田 健太郎、小林 剛、野口 賀津子、白坂 美哲、白下 英史、白石 憲男、西園 晃、猪股 雅史
2. 発表標題 胃癌腹膜転移に対する近赤外蛍光蛋白発現組換えレオウイルスを用いた新規診断・治療法の開発
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	猪股 雅史  (Inomata Masafumi)  (60315330)	大分大学・医学部・教授   (17501)	
研究分担者	山田 健太郎  (Yamada Kentaro)  (70458280)	大分大学・医学部・准教授   (17501)	
研究分担者	小川 雄大  (Ogawa Katsuhiko)  (40733621)	大分大学・医学部・病院特任助教   (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------