

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～2011

課題番号：21591705

研究課題名（和文）

蛍光プローブ導入制限増殖型レオウイルスによる腹膜転移特異的画像診断の開発

研究課題名（英文）

A novel tracer using oncolytic reovirus with new probes for diagnostic tool of peritoneal metastasis

研究代表者

衛藤 剛 (Etoh Tsuyoshi)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：00404369

研究成果の概要（和文）：

胃癌、膵癌では腹膜転移の頻度が高いため、治療法選択には正確な腹膜転移診断が必要不可欠である。しかし現在用いられている検査法による腹膜転移診断の正診率は約 20-50%といまだ低いため、癌特異的かつ正確な腹膜転移診断法の確立が急務である。そこで本研究では、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、腹膜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ってきた。23 年度は継続してレオウイルスに蛍光プローブを付加する実験を行った。

ウイルスはレオウイルス serotype 3 を用い、Alexa Fluor 488, carboxylic acid succinimidyl ester をヒト胃癌細胞株 MKN45P に付加した。その後 Alexa Fluor 488-labeled レオウイルスの感染効果 (CPE ; cell count 法、形態変化) を検討した。これまでの結果として、Alexa Fluor 488-labeled レオウイルスの CPE を認め、感染細胞に蛍光を認めた。さらに抗腫瘍効果も認め臨床応用への展開が期待された。

研究成果の概要（英文）：

Oncolytic reovirus is susceptibility to cells with the activated Ras signaling pathway. The oncolytic efficacy of reovirus has been demonstrated in several cancer experimental models. We preliminarily evaluated the functional activity of reovirus labeled with Alexa Fluor 488, a stable fluorescent dye, as a new tracer for sentinel navigation technique. MKN45p human gastric cancer cell line, L929 cell line as a control, and reovirus serotype 3 were used in this study. The cytopathic effect and morphological change after reovirus labeled with Alexa Fluor 488 infection were examined. After the labeled reovirus infection, cytopathic effect was observed in MKN45p cell line, but not in control cell. In addition, severe morphological changes were also seen especially in the infected cancer cell line. In conclusion, reovirus labeled with Alexa Fluor 488 could specifically infect a human gastric cancer cell line. This labeled virus might act as a novel tracer for sentinel node navigation surgery of gastric cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000

年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、腹膜転移診断、蛍光プローブ

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、消化器癌の治療を困難にしている原因として腹膜転移がある。特に胃癌、膵癌では腹膜転移の頻度が高いため、治療法選択には正確な腹膜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、腹膜転移診断の正診率は約 20-50%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、癌特異的にかつ正確な腹膜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、腹膜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いたい。具体的には蛍光プローブとして GFP をレオウイルスに導入、腹膜転移巣に特異的に感染させ、赤外線イメージ装置および現在大分大学工学部で開発中の光 CT での検出を行う。

3. 研究の方法

(1) GFP 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。

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 での検出を行う。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、GFP が候補となりえるか検討中である。

4. 研究成果

ウイルスはレオウイルス serotype 3 を用い、Alexa Fluor 488, carboxylic acid succinimidyl ester をヒト胃癌細胞株 MKN45P に付加した。その後 Alexa Fluor 488-labeled レオウイルスの感染効果 (CPE ; cell count 法、形態変化) を検討した。これまでの結果として、Alexa Fluor 488-labeled レオウイルスの CPE を認め、感染細胞に蛍光を認めた。さらに抗腫瘍効果も認め臨床応用への展開が期待された。

一方、胃癌腹膜転移モデルを用いて in vivo での蛍光を検出する実験を進めてきた。蛍光プローブ作成のため、レオウイルスへの遺伝子導入方法として Reverse genetics 法が必要であるが、RNA ウイルスの各 segment のベクター作成および再構築が困難であった。現在、ベクターを改良しながら鋭意実験を進めている。一方で先述のようにウイルスに蛍光色素をラベル化することで同様の効果を示すことができることを示してきた。簡便で実用的であるため、今後蛍光色素の開発も進めていく。

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 32 件)

- ① Kitano S, Shiraishi N.
Editorial: Laparoscopy-assisted distal gastrectomy with jejuna pouch interposition.
Ann Surg Oncol 17(8): 1987-1988, 2010
- ② Etoh T, Yasuda K, Inomata M, Shiraishi N, Kitano S.
Revisional surgery after gastrectomy for gastric cancer: Review of the literature.
Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, Oct; 20(5):332-337, 2010
- ③ Etoh T, Yasuda K, Inomata M, Shiraishi N, Kitano S.
Current status of laparoscopic gastrectomy for gastric malignancies.
Surg Technol Int, 20:153-157, 2010
- ④ Anwar T, Shiraishi N, Ninomiya S, Tajima M, Inomata M, Kitano S.
Activation of nuclear factor kappa B (NFkB) and induction of migration inhibitory factor (MIF) in tumors by surgical stress of laparotomy vs. CO2 pneumoperitoneum: an animal experiment.
Surg Endosc 24(3): 578-583, 2010
- ⑤ Matsumoto T, Endo Y, Uchida H, Kusumoto T, Muto Y, Kitano S.
An examination of safety on laparoscopic surgery in patients with ventriculoperitoneal shunt by a CO2 reflux experiment.
Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques 20(3):231-234, 2010
- ⑥ Akagi T, Inomata M, Etoh T, Yasuda K, Shiraishi N, Kitano S.
Clinical outcomes of laparoscopic colonic resection for diverticular disease in Japanese patients.
Asian J Endosc Surg 3(3):133-136, 2010
- ⑦ Yasuda K, Kitano S.
Lymph node navigation for pancreatic and biliary malignancy by NOTES. J Hepatobiliary Pancreat Surg 17(5): 617-621, 2010
- ⑧ Ali AT, Shiraishi N, Ninomiya S, Tajima M, Inomata M, Kitano S.
Increased m RNA expression of epidermal growth factor receptor, human epidermal receptor, and survivin in human gastric cancer after the surgical stress of laparotomy versus carbon dioxide pneumoperitoneum in a murine model.
Surg Endosc 24(6): 1427-1433
- ⑨ Kong SH, Oh BM, Ahn HS, Lee HJ, Chung SG, Shiraishi N, Kitano S, Yang HK.
Comparison of two-and three-dimensional camera systems in laparoscopic performance: a novel 3D system with one camera.
Surg Endosc 24(5): 1132-1143, 2010
- ⑩ Akagi T, Shiraishi N, Hiroishi K, Etoh T, Yasuda K, Kitano S.
Intra-abdominal adhesions induced by artificial ulceration after endoscopic submucosal dissection (ESD) before additional laparoscopic gastrectomy.
Gastrointestinal Endoscopy 72(2): 438-443, 2010
- ⑪ Uchida H, Matsumoto T, Ijichi H, Endo Y, Koga T, Takeuchi H, Kusumoto T, Muto Y, Kitano S
Contralateral occurrence after laparoscopic total extraperitoneal hernia repair for unilateral inguinal hernia.
Hernia 14:481-484, 2010
- ⑫ Suzuki K, Yasuda K, Kawaguchi K, Yoshizumi F, Inomata M, Shiraishi N, Kitano S.
Cardiopulmonary and immunologic effects of transvaginal NOTES cholecystectomy in comparison with those of laparoscopic cholecystectomy in a porcine survival model.
Gastrointestinal Endoscopy 2(6):1241-1248, 2010
- ⑬ Kitano S, Inomata M.
Is laparoscopic surgery acceptable for advanced colon cancer?
Cancer Science 100(4): 567-571, 2009
- ⑭ Kitano S.
What technique is suitable for laparoscopic suprapancreatic lymph node dissection?.
Gastric Cancer 12(2): 67-68, 2009
- ⑮ Yasuda K, Kitano S
Single port surgery: review of the literature and our initial experience.
Asian J Endosc Surg 2(2): 29-35, 2009

- ①⑥ Konishi F, Kawamura Y, Kitano S, Kimura T, Watanabe M
Laparoscopic colorectal cancer surgery: Japanese experience.
Asian J Endosc Surg 2(2): 36-42, 2009
- ①⑦ Etoh T, Shiraishi N, Kitano S.
Current trends of laparoscopic gastrectomy for gastric cancer in Japan. Asian Journal of Endoscopic Surgery, Vol.2, 18-23, 2009
- ①⑧ Inomata M, Yasuda K, Shiraishi N, Kitano S.
Clinical evidences of laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer.
Jpn J Clin Oncol 38(8): 471-477, 2009
- ①⑨ Kitano S.
Editorial: Can an intramucosal undifferentiated-type gastric cancer become a candidate for endoscopic submucosal resection?.
Gastric Cancer 12(3):125-126, 2009
- ②⑩ Kawano Y, Sasaki A, Kai S, Endo Y, Iwaki K, Uchida H, Shibata K, Ohta M, Kitano S.
Prognosis of patients with intrahepatic recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma: a retrospective study.
Eur J Surg Oncol 35(2): 174-179, 2009
- ②⑪ Ohta M, Kitano S, Kai S, Shiromizu A, Eguchi H, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H.
Initial Japanese experience with ntragastric balloon placement. Obes Surg 19(6): 791-795, 2009
- ②⑫ Uchida H, Shibata K, Iwaki K, Kai S, Ohta M, Kitano S.
Ampullary cancer and preoperative jaundice: possible indication of the minimal surgery. Hepato-Gastroenterology 93(56): 1194-1198, 2009.
- ②⑬ Yoshizumi F, Yasuda K, Kawaguchi K, Suzuki K, Shiraishi N, Kitano S.
Submucosal tunneling using endoscopic submucosal dissection for peritoneal access and closure in natural orifice transluminal endoscopic surgery: a porcine survival study. Endoscopy 41(8): 707-711, 2009
- ②⑭ Shibata K, Uchida H, Iwaki K, Kai S, Ohta M, Kitano S.
Lymphatic invasion: an important prognostic factor for stages T1b-T3 gallbladder cancer and an indication for additional radical resection of incidental gallbladder cancer. World J Surg 33(5): 1035-1041, 2009
- ②⑮ Endo Y, Ohta M, Sasaki A, Kai S, Eguchi H, Iwaki K, Shibata K, Kitano S.
A comparative study of the long-term outcomes after laparoscopy-assisted and open left lateral hepatectomy for hepatocellular carcinoma. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech 19(5): e171-174, 2009
- ②⑯ Shibata K, Iwaki K, Kai S, Ohta M, Kitano S.
Increased levels of both carbohydrate antigen 19-9 and duke pancreatic monoclonal antigen type 2 reflect postoperative prognosis in patients with pancreatic carcinoma. Pancreas 38(6): 619-624, 2009
- ②⑰ Hirano S, Etoh T, Okunaga R, Shibata K, Ohta M, Nishizono A, Kitano S.
Reovirus inhabits the peritoneal dissemination of pancreatic cancer cells in an immunocompetent animal model. Oncol Rep 21(6): 1381-1384, 2009
- ②⑱ Tominaga M, Ohta M, Kai S, Iwaki K, Shibata K, Kitano S.
Increased heat-shock protein 90 expression contributes to impaired adaptive cytoprotection in the gastric mucosa of portal hypertensive rats. J Gastroenterol Hepatol 24(6): 1136-1141, 2009
- ②⑲ Ninomiya S, Inomata M, Tajima M, Ali AT, Ueda Y, Shiraishi N, Kitano S.
Effects of bevacizumab, a humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor, on peritoneal metastasis of MNK-45P human gastric cancer in mice. J Surg Res 154(2): 196-202, 2009
- ③⑩ Kusano, Sasaki A, Kai S, Endo Y, Iwaki K, Shibata K, Ohta M, Kitano S.
Predictors and prognostic significance of operative complications in patients with hepatocellular carcinoma who underwent hepatic resection. European Journal of Surgical Oncology 35(11): 1179-1185, 2009
- ③⑪ Endo Y, Ohta M, Hirashita T, Eguchi H, Kai S, Kitano S.
Additional effect of visceral fat resection on an obese rat model of gastric banding.

Obesity Surgery 19(6): 777-782, 2009

- ② Ohta M, Kai S, Iwashita Y, Endo Y, Hirashita T, Eguchi H, Kitano S.
Initial experience in laparoscopic sleeve gastrectomy for Japanese morbid obesity.
Asian J Endosc Surg 2(3):68-72, 2009

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 衛藤剛、猪股雅史、白石憲男、北野正剛
胃癌腹膜播種モデルを用いた制限増殖型
レオウイルスの抗腫瘍効果
第 70 回日本癌学会学術総会,
2011.10.3-5 名古屋
- ② 衛藤剛、猪股雅史、白石憲男、北野正剛
制限増殖型レオウイルスの固形癌に対する
抗腫瘍効果の検討
第 69 回日本癌学会学術総会,
2010.9.22-24 大阪
- ③ 衛藤剛、猪股雅史、白石憲男、北野正剛
制限増殖型レオウイルスと Gemcitabine
併用投与でのヒト膵臓細胞株に対する抗
腫瘍効果の検討
第 68 回日本癌学会学術総会,
2009.10.1-3 横浜
- ④ Kawaguchi K, Etoh T, Inomata M,
Shiraishi N, Kitano S
Efficacy of oncolytic reovirus against
peritoneal metastasis in gastric cancer.
9th International Conference of the
Asian Clinical Oncology Society,
2010.8.25-27 Gifu

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

白下 英史(SHIROSHITA HIDEFUMI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：50596955

白石 憲男 (SHIRAISHI NORIO)
大分大学・医学部・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・学長

研究者番号：90169871