

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591953

研究課題名(和文)レオウィルスナノプローブを用いた微小転移迅速診断法の開発

研究課題名(英文)Development of a new tracer using oncolytic reovirus for detection of cancer cells

研究代表者

衛藤 剛 (ETO, Tsuyoshi)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：00404369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌において根治切除後の治療を困難にしている原因として、微小癌細胞の存在がある。本研究では、癌特異的に感染・増殖する制限増殖型レオウィルスを利用し、微小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こと目的とした。ウィルスはレオウィルスserotype 3を用い、Alexa Fluor 488-labeled レオウィルスの胃癌細胞株に対する感染効果を検討した。結果として、Alexa Fluor 488-labeled レオウィルスの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 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 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. 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.

研究分野：医歯薬学

キーワード：レオウィルス 微小転移 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向
制限増殖型レオウイルスは ras 経路が活性化した癌細胞に特異的に増殖する (Lee *et al.* Science, 1998)。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膵癌に対するレオウイルスの抗腫瘍効果を報告してきた (Etoh *et al.* Clin Cancer Res, 2003, Himeno *et al.* Int J Oncol, 2005)。しかし本邦での臨床応用はまだ実施されていない。

(2) 本研究の着想に至った経緯

欧米ではレオウイルスと抗癌剤を併用した第 I/II 相臨床試験が進行中であるが、レオウイルスを診断に利用するという発想はいまだない。消化器癌はリンパ節転移、腹膜転移が予後不良因子であり、これらの正確な診断は治療方針を考える上で極めて重要となる。これまで研究代表者 (衛藤 剛) は、平成 18-20 年度科学研究費補助金・研究課題「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」、および平成 21-23 年度科学研究費補助金・研究課題「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」にて臨床応用に向けた研究をお粉てきた。今回、特に治療法決定に重要な術中を含めた周術期に応用できる癌微小転移に対する診断法の開発に主眼をおき研究を遂行したい。

2. 研究の目的

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肉眼では検出できない微小癌細胞の存在がある。特に胃癌、膵癌では腹膜転移、リンパ節転移の頻度が高いため、治療法選択には正確な微小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、腹膜転移やリンパ節転移の

診断正診率は約 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、癌特異的でかつ正確な微小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、微小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、癌転移巣に特異的に感染させ、赤外線イメージ装置での検出を行う。

3. 研究の方法

1、Reverse genetics 法による GFP 導入レオウイルスの作成

- レオウイルス ST3 S2 segment coding vector に GFP 遺伝子を導入した (Kobayashi T *et al.* Cell Host Microbe, 19;1(2):147-157, 2007)

- レオウイルス ST3 の他の RNA segment をコードする vector とともに、L929 細胞に transfect した。

- L929 細胞内で各 segment を再構築させ、GFP 遺伝子導入レオウイルスを複製した。

2、*In vitro* における GFP 導入レオウイルスの Viability の検討

- GFP 導入レオウイルスを力価測定した。

- 癌細胞への感染効率 (Cytopathic effect: CPE) を判定した。

- 感染細胞内でのウイルス蛋白測定を行った (免疫沈降法)

- 感染細胞の増殖への影響を検討した。

- 感染細胞内での GFP の検出および Light microscopy image analysis を用いた GFP の定量化を行った。

3、*In vivo* における GFP 導入レオウイルスの生体内動態の検討

- 膵癌同種動物モデル (腹膜転移モデル) を用い、GFP 導入レオウイルス局所投与および静脈投与後の腫瘍内、各臓器 (脳、心、肺、肝、腎、腸管、血液) でのウイルス濃度を測定し、さらに GFP を検出した。

・上記モデルにおける血清レオウイルス抗体を測定した。

・宿主免疫に対する影響の評価: NK activity や Th1/Th2 バランスを検討した。

・ウイルス投与動物への副作用の検討を行った。

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。ベクターを改良しながら実験を進め、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た。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

衛藤 剛、猪股雅史、白石憲男、北野正剛、
Development of a new tracer using oncolytic reovirus labeled with Alexa Fluor 488 -a preliminary examination-、
第71回日本癌学会総会、2012年9月20日、

ホテルロイトン札幌(北海道札幌市)

[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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

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

白石 憲男 (SHIRAISHI, Norio)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 20271132

猪股 雅史 (INOMATA, Masafumi)

大分大学・医学部・教授

研究者番号： 60315330

西園 晃 (NISHIZONO, Akira)

大分大学・医学部・教授

研究者番号： 70218155

太田 正之 (OHTA, Masayuki)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号： 80271104

北野 正剛 (KITANO, Seigo)

大分大学・法人本部・学長

研究者番号： 90169871

(3)連携研究者

()

研究者番号：