

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462267

研究課題名(和文) 鏡視下腫瘍広範切除のための新しい蛍光バイオイメージングの開発

研究課題名(英文) Fluorescent tumor cell detection by tumor-specific virus VSV for precise osteosarcoma resection

研究代表者

久保 忠彦 (KUBO, Tadahiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：70397959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：組換えウイルスVSV-Katushkaを作成し腫瘍細胞特異性を確認した。骨肉腫マウスモデルを作成し、VSV-Katushkaを局所投与後、超微弱蛍光イメージングシステム(WinLight32, Berthold)、蛍光顕微鏡(BZ-9000、keyence)にて本システムの腫瘍イメージング能、腫瘍広範切除の再現性、正確性を確認した。VSV-Katushkaを経静脈投与し、本システムを用い血中循環腫瘍細胞を同定、統計学的に有意な生存率の延長を認めた。本研究により四肢悪性腫瘍に対する鏡視下腫瘍広範切除術および血中循環腫瘍細胞治療のための新たな赤外線蛍光バイオイメージング治療法の可能性が証明された。

研究成果の概要(英文)：Recombinant VSV expressing katushka was generated using the established method of reverse genetics. Five to six weeks old C3H mice were implanted subcutaneously with 1×10^7 osteosarcoma cells LM8 on the right hind leg. We observed tumor-specific fluorescence in vitro using fluorescence microscopy (BZ-9000, keyence) and in osteosarcoma-bearing mice using Bio-fluorescence imaging system (WinLight32, Berthold). Using this imaging system, tumor wide resection was performed safely and precisely and circulating tumor cells were eliminated securely. In conclusion, this study proved the possibility of the new fluorescence imaging system to apply to the advanced therapy of primary lesion and circulating tumor cells.

研究分野：骨軟部腫瘍学

キーワード：骨肉腫 蛍光イメージング 腫瘍溶解性ウイルス 近赤外線蛍光蛋白

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで四肢悪性腫瘍への薬剤、遺伝子、ウイルス・デリバリーシステムや磁気ターゲティングのための多くのデバイスを開発してきた。その一つである腫瘍細胞のみで選択的に複製、増殖する腫瘍特異的ウイルス Vesicular stomatitis virus (VSV)を用いた研究では、Isolated regional perfusion 法による四肢悪性腫瘍への理想的なウイルス・デリバリーシステムを開発した。一方、蛍光イメージングによく使用されているルシフェラーゼ、GFP などの他の発光、青色蛍光イメージングと比べて、波長 700-900nm の近赤外線蛍光は人体組織の自家蛍光が少なく、生体内での蛍光吸収率も低いため、数ミリから数センチメートルの生体内透過性がある。

2. 研究の目的

本研究では新規近赤外線蛍光蛋白 Katushka を VSV に組み込み、四肢悪性腫瘍に対する鏡視下腫瘍広範切除術および近血中循環腫瘍細胞治療のための赤外線蛍光バイオイメージング治療法の開発を計画した。

3. 研究の方法

組換えウイルス VSV-Katushka の作成

大腸菌を用いて VSV ゲノム DNA (pVSV-NX2、アクセッション・ナンバー: NC001560) に近赤外線蛍光蛋白 Katushka の cDNA (アクセッション・ナンバー: KF419293) を制限酵素部位 (NheI, XhoI) を介して挿入し、全長の DNA プラスミドを作成した。これをヘルパープラスミドである pIRES-L, pIRES-N, pIRES-P と共に T7 RNA polymerase を発現する Hamster 腎由来 BHK21 細胞に導入して、組換えウイルス VSV-Katushka を作成した。段階的に希釈した VSV-Katushka を BHK 細胞に感染させ、TCID₅₀ 法で力価を測定した。

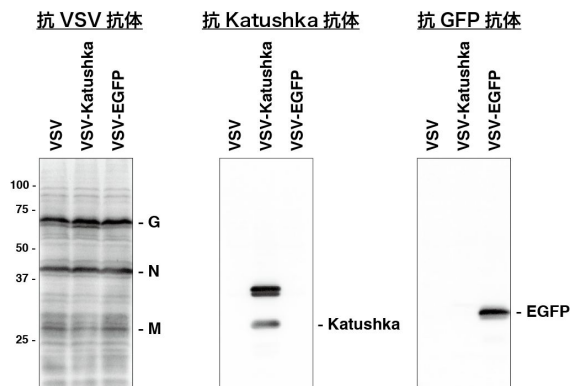
骨肉腫ラットモデルの作成

ネブタール麻酔下に 6 週齢 F344 ラットの 下腿筋内に高肺転移性ラット骨肉腫細胞 MSK (1 X 10⁷ cells) を移植し、骨肉腫動物モデルを作成した。移植後毎週 X 線撮影を行い、脛骨骨破壊像、肺転移巣の大きさを観察した。隔週に屠殺し、骨肉腫腫瘍径、肺転移巣数を観察評価した。

4. 研究成果

VSV-Katushka 蛋白発現の確認

VSV-Katushka を感染させた BHK21 細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。また、VSV-Katushka 感染 BHK21 細胞の溶解液に VSV 抗体、Katushka 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、各蛋白の発現を確認した。

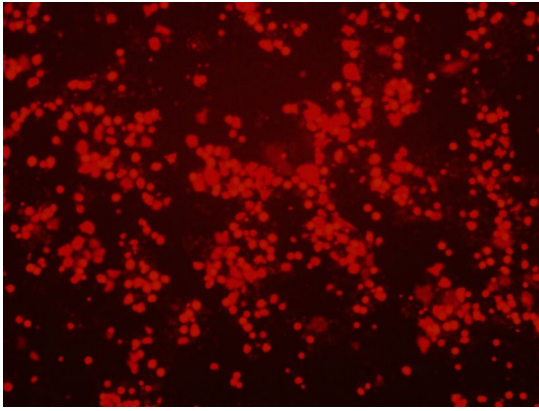


VSV-Katushka 発現の確認

BHK21 細胞に各ウイルスを moi 10 で接種し、23 時間後に溶解し抗 VSV 抗体、抗 Katushka 抗体等を用いてウエスタンブロットをおこなった。

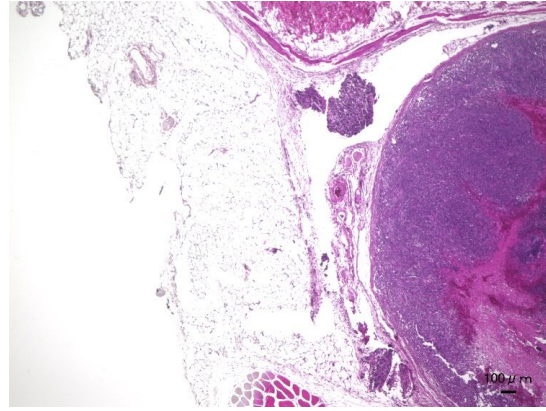
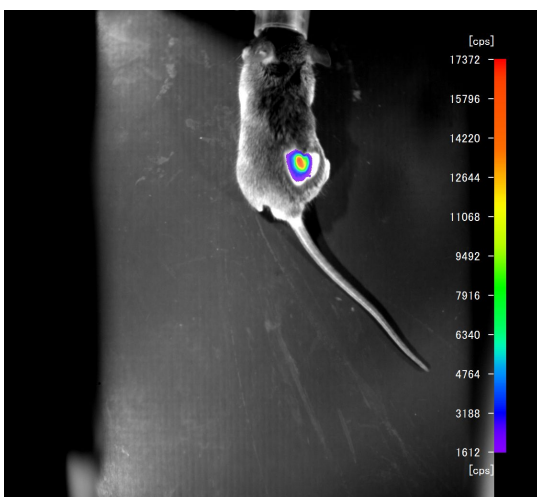
腫瘍細胞への投与

VSV-Katushka を感染させた各種骨肉腫細胞とヒト正常間葉系細胞 MSC を蛍光顕微鏡下に観察した。低濃度の感染でも MSK のみに近赤外線蛍光を認め、腫瘍細胞特異性を確認した。



骨肉腫ラットへの VSV-Katushka 治療

6 週齢 C3H マウスの背部に高肺転移性マウス骨肉腫細胞 LM8 (1 X 10⁷ cells) を移植し、骨肉腫動物モデルを作成する。腫瘍径が 10mm に達したことを確認後、以下の治療を行い、経時的に原発巣、肺転移巣の腫瘍増殖倍率の計測を行った。また、生存曲線を作成し、屠殺時には組織学的評価、免疫染色を行った。VSV-Katushka を局所または静脈内投与後、超微弱蛍光イメージングシステム (WinLight32, Berthold) 蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス) にて本システムの腫瘍イメージング能を確認し、蛍光イメージング下に腫瘍切除を行った。VSV-Katushka を用いた近赤外線蛍光イメージングは腫瘍広範切除の再現性、正確性を担保することが可能であった。



VSV-Katushka を経静脈的に単回投与、毎週投与群を作成し、コントロール群と比較した。毎週投与群において、原発巣、転移巣とも腫瘍増大を抑制し、統計学的に有意な生存率の延長を認めた。

また、腫瘍移植後、経時的に採取した血液から本システムを用い血中循環腫瘍細胞を同定することが可能であった。血中循環腫瘍細胞は採取した末梢血から赤血球を除去後、VSV-Katushka (近赤外線蛍光蛋白) にて感染させスマアジェルで塗抹標本を作製し、蛍光顕微鏡下に細胞数をカウントした。これにより VSV-Katushka は骨肉腫原発巣と血中循環腫瘍細胞の両者の腫瘍細胞増殖能、浸潤遊走能を抑制し、生存率の延長に寄与していることが証明された。

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 3 件)

1. Percent slope analysis of dynamic magnetic resonance imaging for assessment of chemotherapy response of osteosarcoma or Ewing sarcoma: systematic review and meta-analysis. Kubo T, Furuta T, Johan MP, Adachi N, Ochi M. Skeletal Radiol. 2016;45(9):1235-42. 査読有
2. Prognostic significance of (18)F-FDG PET at diagnosis in patients with soft

tissue sarcoma and bone sarcoma;
systematic review and meta-analysis.

Kubo T, Furuta T, Johan MP, Ochi M. Eur
J Cancer. 2016;58:104-11. 査読有

3. Prognostic value of SS18-SSX fusion
type in synovial sarcoma. Kubo T,
Shimose S, Fujimori J, Furuta T, Ochi
M. Springerplus. 2015 25;4:375. doi:
10.1186/s40064-015-1168-3 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

1. Tadahiko Kubo, Jun Fujimori, Taisuke
Furuta, and Mitsuo Ochi. Prognostic
Significance of Positron Emission
Tomography in Patients with Sarcoma.
2016 Annual Meeting of the AAOA, March
1-5, 2016, Orlando, FL, U.S.A.
2. Tadahiko Kubo, Taisuke Furuta, Mitsuo
Ochi, Jun Fujimori, Shoji Shimose,
Prognostic significance of Positron
Emission Tomography in patients with
sarcoma. 第89回日本整形外科学会学術
集会、2016年5月12-15日 パシフィコ
横浜(横浜市西区)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/seikei/office/research.html>

広島大学院整形外科の主な研究内容

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 忠彦 (KUBO TADAHIKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：70397959

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・その他部局等・学長

研究者番号：70177244

下瀬 省二 (SHIMOSE SHOJI)

独立行政法人国立病院機構呉医療センター
臨床研究部・その他部局等・統括診療部長

研究者番号：30304439

藤森 淳 (FUJIMORI JUN)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・寄附
講座助教

研究者番号：70632256

(平成26年4月1日～平成27年9月30日
まで研究分担者)

坂口剛正 (SAKAGICHI TAKEMASA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70196070