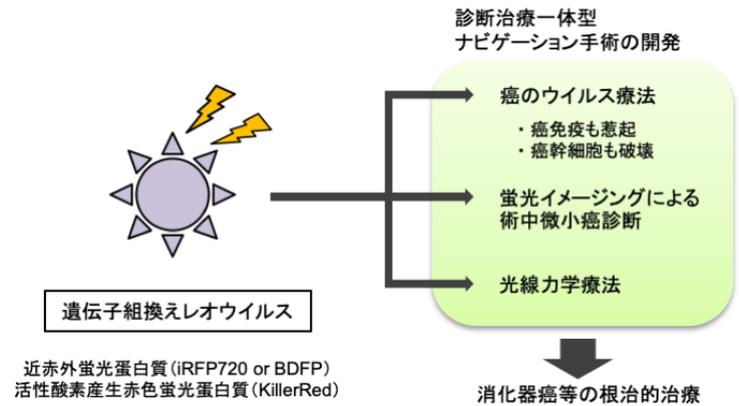


● 事業概要

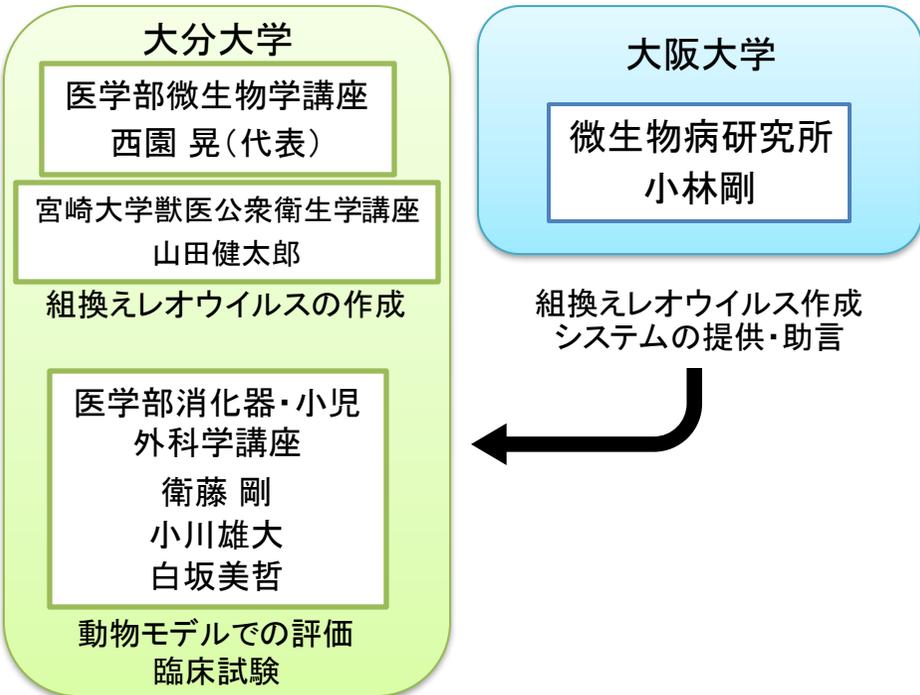
認定期間: 2016年7月～2021年6月

「近赤外蛍光発現腫瘍溶解性組み換えレオウイルスによる、難治性消化器癌診断・治療に向けた新たなアプローチ」

難治性消化器癌の診断(蛍光ナビゲーション)・治療(光線力学療法)に資する近赤外蛍光蛋白質等を発現する腫瘍溶解性レオウイルスを開発する。すなわち、近赤外蛍光蛋白質や活性酸素産生赤色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、膵臓癌や胃癌およびそれらの転移癌の診断・治療における有用性を担癌マウスモデルにて検証する。動物モデルで有用性が確認されれば、実用化に向けた臨床試験も検討する。



● 実施体制



● 実施スケジュール(実績及び予定)

2016～2019

これまでに、近赤外蛍光蛋白質iRFP720を発現する組換えレオウイルスの作成に成功した。
ウイルスゲノムM1分節の3'末端側へのiRFP720遺伝子発現ユニット挿入が、現段階では最も適切であることが判明した。

2020～

iRFP720より遺伝子サイズの小さい近赤外蛍光蛋白質BDFPや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についても作成する。
作成した組換えレオウイルスについて、担癌マウスモデルを用いて、光線力学療法を含めた抗腫瘍効果や、蛍光イメージングによる術中微小癌診断における有用性の評価を行う。
動物モデルで有用性が確認されれば、実用化に向けた臨床試験も検討する

これまでの成果

【背景】

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
- ❑ 癌に対する免疫の惹起による全身での抗腫瘍効果も誘導
- ❑ 癌幹細胞も破壊
- 手術で全摘できなかった症例における根治的療法として期待
- ❑ 遺伝子工学技術を用いてウイルスを任意に設計可能
- 癌細胞への特異性や殺細胞効果・がん免疫効果を高め、安全性や効果の向上も可能

レオウイルスとは

- ❑ ゲノムは10分節から成り、病原性はほとんどない(高い安全性)
- ❑ Rasの活性化した癌細胞で増殖し、特に膵癌では80%以上の症例でrasの活性化をもたらす変異あり
- ❑ 遺伝子組換え技術が確立済

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
- ❑ 蛍光色素を用いた術中蛍光イメージングによる微小癌診断や光線力学療法が期待されている

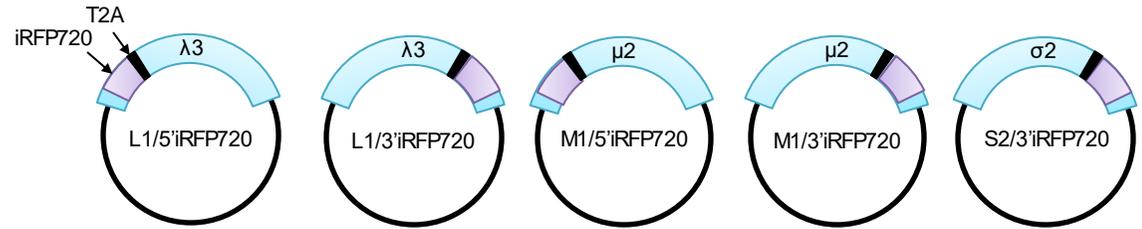
【目的】

術中蛍光イメージングによる微小癌診断や光線力学療法に資する近赤外蛍光蛋白質発現組換えレオウイルスの開発を行う

【成果】

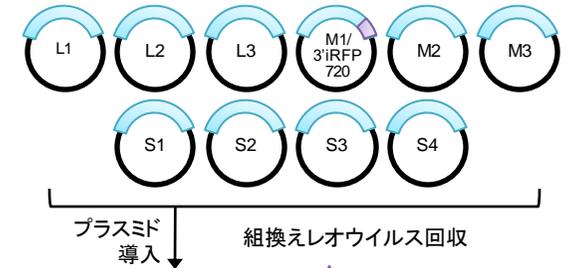
これまで、レオウイルスゲノムへの近赤外蛍光蛋白質遺伝子iRFP720の挿入位置について検討を行った

検討したL1分節の5'もしくは3'末端、M1分節の5'もしくは3'末端、S2分節の3'末端のうち、M1分節3'末端への挿入が組換えウイルスの増殖性や蛍光蛋白質発現の観点から適していることが分かった

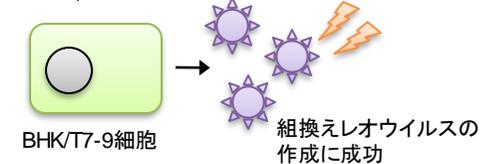


組換えレオウイルス分節ゲノムプラスミド

※2AIは自己切断ペプチドで1つの遺伝子から2つの蛋白質発現が可能

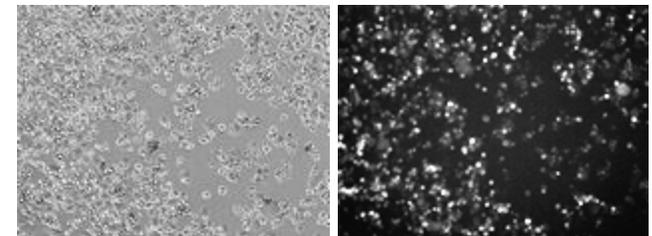


各ゲノムRNAをコードするプラスミド計10本を細胞に同時に導入することで、プラスミド由来、つまり目的の組換えレオウイルスを作成することができる



明視野

蛍光像 (iRFP720)



組換えレオウイルス感染細胞において、細胞変性効果とiRFP720による蛍光発現を確認

これまでの成果

(1-1) 研究、調査及びその成果の発表の実績

年 度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度
論文発表件数	0	2	2	4
上記のうち国際共著論文	0	0	0	3

(1-2) 認定期間に発表した代表的な論文リスト5件

- Kanai Y, Kawagishi T, Sakai Y, Nouda R, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, [Kobayashi T](#). Cell-cell fusion induced by reovirus FAST proteins enhances replication and pathogenicity of non-enveloped dsRNA viruses, *PLoS Pathogens*, 2019, 15, 4, e1007675, 10.1371/journal.ppat.1007675.
- Isomura M, Yamada K, Noguchi K, [Nishizono A](#). Near-infrared fluorescent protein iRFP720 is optimal for *in vivo* fluorescence imaging of rabies virus infection. *J Gen Virol*. 2017 Oct 17. doi:10.1099/jgv.0.000950.
- [Yamada K](#), Noguchi K, Kimitsuki K, Kaimori R, Saito N, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, [Nishizono A](#). Reevaluation of the efficacy of Favipiravir against rabies virus using *in vivo* imaging analysis. *Antiviral Res*. 2019 Dec;172:104641. doi:10.1016/j.antiviral.2019.104641. Epub 2019 Oct 28.
- [Etoh T](#), Honda M, Kumamaru H, Miyata H, Yoshida K, Koderia Y, Kakeji Y, Inomata M, Konno H, Seto Y, Kitano S, Hiki N: Morbidity and Mortality From a Propensity Score-Matched, Prospective Cohort Study of Laparoscopic Versus Open Total Gastrectomy for Gastric Cancer: Data From a Nationwide Web-Based Database. 32 (6) : 2766-2773, *Surg Endosc*, 2018.

(2) セミナー、シンポジウム、研修会等の企画及び開催実績の件数

年 度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度
件 数	0	0	0	6

(3-1) 共同研究、受託研究、寄附金及び競争的研究資金の獲得実績の件数

年 度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度
共同研究件数	0	0	0	0
受託研究件数	0	0	0	0
寄附金受入れ件数	0	0	0	0
競争的資金獲得件数	3	3	3	0

これまでの成果

(3-2) 共同研究、受託研究、寄附金及び競争的研究資金の獲得実績の金額

単位：千円

年 度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度
共同研究獲得金額	0	0	0	0
受託研究獲得金額	0	0	0	0
寄附金受入れ金額	0	0	0	0
競争的資金獲得金額	7,519	1,710	1,380	0

(4) 知的財産関係

単位：件数/千円

年 度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度
特許化件数(うち外国)	0	0	0	0
特許実施許諾件数	0	0	0	0
譲渡件数／金額	0	0	0	0
特許実施料収入	0	0	0	0

(5) その他

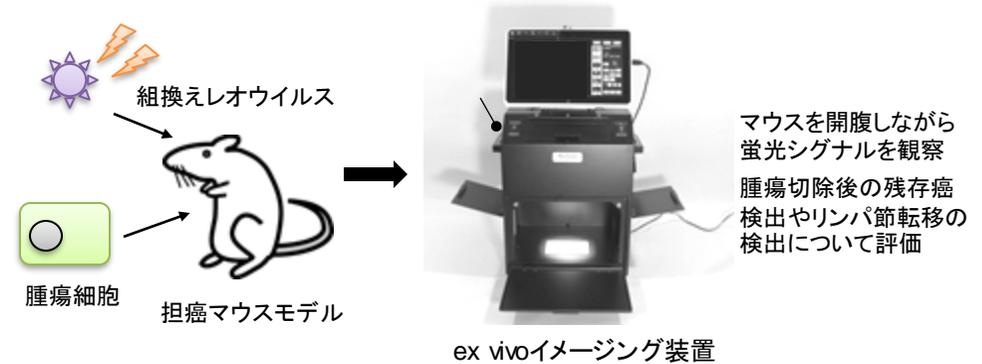
年 度	2016年度	2017年度	2018年度	2019年度
件 数	0	0	0	0

今後の展開及び期待される成果

【今後の展開】

担癌マウスでの評価

癌細胞を接種したマウス(担癌マウスモデル)を用いて、作成したiRFP720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癌診断における有用性について、ex vivoイメージング等により評価する

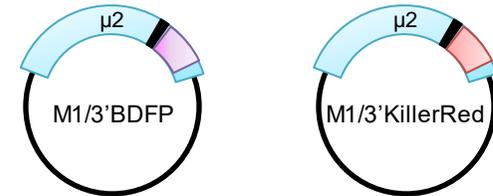


組換えレオウイルスの改良

作成したiRFP720発現組換えレオウイルスの増殖力や殺細胞能は野生型に比べ著しく低下
原因は挿入遺伝子のサイズが950塩基と大きいことによると推察

最近、iRFP720より小さく(456塩基)、かつ約2.4倍明るい近赤外蛍光蛋白質BDFPが報告された(Li et al, Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019)

→ BDFPを発現する組換えレオウイルスを作成し、評価を行う



光線力学療法に資する組換えレオウイルスの開発

KillerRedは励起光照射により活性酸素を産生して細胞死を誘導する赤色蛍光蛋白質

KillerRedを発現する組換えレオウイルスは、蛍光ナビゲーション手術と光線力学療法による強力な殺腫瘍効果を同時に行えるようになることが期待される

→ KillerRedを発現する組換えレオウイルスを作成し、評価を行う

【期待される成果】

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

