

論文内容要旨

Novel Near-Infrared Fluorescence-Guided Surgery With Vesicular Stomatitis Virus for Complete Surgical Resection of Osteosarcomas in Mice

(骨肉腫マウスモデルにおける完全外科的切除のための水疱性口内炎ウイルスを用いた新しい近赤外線蛍光ガイド手術)

Journal of Orthopaedic Research, 37(5): 1192-1201, 2019.

主指導教員：安達 伸生教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：久保 忠彦准教授

(医系科学研究科 整形外科学)

作田 智彦

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

悪性骨軟部腫瘍切除の基本原理は、周囲の正常組織と一緒に広範囲に切除されることである。腫瘍切除縁は術前磁気共鳴画像法(MRI)などによりある程度推定されるが、術中に正確に識別するには不十分である。蛍光イメージングは、がんのスクリーニングと外科的切除に有望な方法であり、これまでも蛍光ガイダンスを用いて術中腫瘍細胞を可視化する試みがなされてきた。しかし現在も明確な境界の同定と完全な腫瘍切除は困難な課題である。これに対処するために、腫瘍特異性ウイルスの1つである水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus;VSV) に近赤外蛍光蛋白(katushka)を組み込んで組換え VSV-Katushka (rVSV-K) を作成し、新しい蛍光バイオイメージングシステムを開発した。本研究の目的は骨肉腫細胞における rVSV-K の腫瘍特異性を評価し、rVSV-K 蛍光ガイダンスによる完全な腫瘍切除の可能性を評価することである。

【方法】

近赤外線蛍光蛋白 Katushka を遺伝子導入した組換えウイルス (rVSV-K) を作成し、*in vitro* にて種々のヒト及びマウス骨肉腫細胞や正常なヒト間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells; MSCs)に感染させ、蛍光顕微鏡下に近赤外線蛍光を観察した。*in vivo* ではC3H雄マウスの皮下に高肺転移性マウス骨肉腫細胞 LM-8 (1×10^7 cells) を移植して骨肉腫マウスモデルを作成し、rVSV-K 局注後、近赤外線蛍光バイオイメージングシステムを用いて経時的に蛍光量を測定した。また、rVSV-GFP 投与群、非投与群を作成し比較を行った。別実験にて rVSV-K による蛍光ガイド腫瘍切除を施行した。また、VSV 投与による非ガイド切除群、saline 投与による非ガイド切除群を作成し比較検討を行った。腫瘍切除標本 (H&E 染色標本)、ウイルス感染細胞領域 (VSV-G 抗体免疫染色標本) の評価及び、局所再発、遠隔転移、生存率の評価を行った。

【結果】

*In vitro*において低用量の感染でも rVSV-K 感染骨肉腫細胞にのみ近赤外線蛍光を認めた。*In vivo*では rVSV-K 投与群、rVSV-GFP 投与群にて蛍光が観察できたが、rVSV-K 投与群腫瘍領域より広範囲の蛍光を認めたが rVSV-GFP 投与群は腫瘍全体の蛍光がみられなかった。切除縁から腫瘍辺縁までの距離は蛍光ガイド切除群が非ガイド切除群より有意に大きかった。局所再発においては蛍光ガイド腫瘍切除群では0例、非ガイド切除群は2群とも3例であり、局所再発率は、蛍光ガイド切除群が非ガイド切除群よりも有意に低かった。ウイルス投与群の腫瘍切除標本では免疫染色 (抗 VSV-G 抗体) で VSV 感染を確認した。遠隔転移、生存率に関しては全群間で有意差を認めなかった。

【考察】

本研究では、*In vitro*において低用量の感染でも rVSV-K 感染骨肉腫細胞にのみ近赤外線蛍光を認めたことより VSV は骨肉腫細胞を標的とする蛍光物質のベクターとして適していると考えられる。

本研究では、蛍光強度と腫瘍領域に対する蛍光領域の比率を、rVSV-K 群と rVSV-GFP

群の間で比較した。rVSV-K 群では、蛍光領域は腫瘍縁よりも大きかったが rVSV-GFP 群では小さかった。これは腫瘍自体から伸びた rVSV-K 感染腫瘍細胞による強い蛍光及び、蛍光ガイド切除群の腫瘍標本にて観察された顕微鏡的浸潤に起因しうる。さらに、それは rVSV-K ガイダンス技術によって原発腫瘍と共に切除されたため、蛍光ガイド切除群の局所再発率の低下に寄与したと考える。本研究は、rVSV-K の腫瘍内投与が骨肉腫原発巣において強い蛍光を発生し、原発巣全体の完全切除を可能にしたことを示す最初の報告である。

本研究では、蛍光ガイド切除群は非ガイド切除群のマウスよりも長期間生存する傾向があったが、統計的に有意差はなく、全群で遠隔転移が生じた。本研究で使用したマウス骨肉腫細胞 LM-8 は高い転移特性を有するために、腫瘍切除施行前に微小転移が既に存在し、それが後に遠隔転移巣を形成、結果的に転移や生存率は我々の外科的技術の影響を受けなかったと考えた。当科の過去の研究では骨肉腫マウスに対して VSV による全身療法を行い、遠隔転移予防と生存率延長を可能にしたことを示した。今後は VSV による全身療法と蛍光ガイド切除を組み合わせた新しい包括的なアプローチの開発が期待される。

【結論】

本研究から rVSV-K が骨肉腫細胞に特異的に感染すること、rVSV-K を用いた近赤外線蛍光バイオイメージングはマウスにおける骨肉腫の完全な腫瘍切除を可能にすることが示唆された。本研究は骨肉腫患者における今後の術中蛍光ガイド手術療法発展に寄与することが期待される。