

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592381

研究課題名(和文) テロメア動態と上皮間葉移行機序を応用した血管内浮遊癌細胞に対する治療戦略

研究課題名(英文) Treatment strategy for circulating tumor cell using telomerase activity with epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

北川 育秀 (Kitagawa, Yasuhide)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：00452102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の不死化に関連する酵素の一つであるテロメラーゼの活性サブユニットであるhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT)のプロモーターをadenovirusに組み込むことで、癌特異的な発現ベクターを構築した。細胞数を調整した腎癌細胞株ACHN, 前立腺癌細胞株PC3, LNCaP, DU145を健康成人血液中に混注したサンプルにて血液中の癌細胞を同定することが可能であったが、検出には血液1ml中に100-1000個の癌細胞が必要であり、精度は低かった。泌尿器癌患者30例の血液サンプルでは血液中の癌細胞を同定できず、結果を得るのに至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Novel adenovirus vector with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter could be constructed. In vitro, renal cancer cells (ACHN) and prostate cancer cells (PC3, LNCaP, DU145) were detected in human blood using this vector, however, 100 to 1000 cells were needed to detect in 1 ml of human blood, which was insufficient for the clinical practice. In vivo, circulating tumor cells could not be detected in the human blood samples of 30 patients with urological cancers (10 renal cell carcinoma, 12 urothelial carcinoma, 8 prostate cancer).

研究分野：泌尿器科

キーワード：泌尿器癌 テロメラーゼ 血管内浮遊癌細胞

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、本邦における癌罹患率、癌死亡率は増加の一途をたどっている。癌治療の究極の目標は癌死亡の撲滅であり、死亡に繋がる癌転移の予防は重要な研究課題である。転移が成立するためには、癌細胞が原発巣より正常基底膜を超えて浸潤し、血管内を遊走した上で、転移臓器に接着、増殖することが必要になる。そこで最近注目されているのは血管内癌細胞 (circulating tumor cell; CTC) の早期発見と、CTC 段階での治療である。

以前より各種癌症例において、CTC を同定する試みが行われており、乳癌では CTC の存在が臨床的に予後因子として、あるいは薬剤による治療効果を確認する生物学的マーカーとして有用であることが報告されている。泌尿器科領域においても同様のシステムを用いて前立腺癌と尿路上皮癌患者に CTC を確認した報告がある。しかし、これらに報告された CTC 同定方法は、上皮細胞に特異的な抗原を認識するいくつかの抗体を用いて陽性細胞数を測定しており、問題点として、陽性細胞が癌細胞か正常細胞か正確には同定できないこと、陽性細胞が viable か否か判断不能なこと、治療により癌細胞の抗原発現量が減少することで偽陰性と判定される可能性があること、などが挙げられる。現時点において、一般に使用できる CTC 測定システムのうち、これらの問題点を克服したものはない。

研究申請者は、細胞の不死化に関連する酵素の一つであるテロメラーゼとその活性サブユニットである human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の発現制御機構についての研究に従事しており、腎癌、尿路上皮癌において hTERT の発現が亢進しており、腫瘍マーカーとして臨床応用できる可能性があること、前立腺癌において hTERT が癌抑制遺伝子である p16 と癌遺伝子である myc により発現調節されていることを報告した。この

際に使用した hTERT プロモーターを adenovirus に組み込むことで、癌特異的な発現ベクターである Tumor-specific Replication Adenovirus (TRAD) システムが開発され、GFP を用いた癌細胞の可視化が可能となった。このシステムにより子宮頸癌細胞である C33A と正常細胞を混合した状態で、癌細胞のみを同定できた。このシステムが癌細胞の hTERT 発現に依存している点を考慮すると、この実験結果により多種の細胞の中で viable な癌細胞を検出することが可能になる。泌尿器癌 (腎癌、尿路上皮癌、前立腺癌、胚細胞腫瘍) では、CTC についての報告が少ない一方で、腎癌、尿路上皮癌については、有用な腫瘍マーカーが同定されていない。これは癌特異的な分泌系酵素や癌細胞に対する特異的な抗体が確認されていないためであるが、hTERT の発現は癌特異的であり、腎癌、尿路上皮癌、前立腺癌にもあることがわかっている。このような背景から、TRAD-GFP システムを用いた血管内癌細胞の同定法をいち早く確立し、腫瘍マーカーとして担癌時の癌生物学的活性を確認をすることは臨床的に有用性が高い。

癌細胞が原発巣から離脱し、血管内に遊走する際には、上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) と呼ばれる変化を起こすと仮定されているが、その分子機序については未だに不明なことが多い。TRAD システムでは血中の viable な浮遊癌細胞を同定できるため、原発巣の癌細胞との遺伝子変化を比較することで EMT に関わる分子を解明できる可能性がある。癌特異的な EMT 関連遺伝子が同定できれば、その遺伝子をターゲットにした分子標的治療が可能になる。さらに、TRAD システムには治療用の遺伝子を組み込むことが可能であり、TRAD を応用することで、浮遊癌細胞をターゲットとした遺伝子治療を展開できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) 対象を腎癌，尿路上皮癌，前立腺癌，胚細胞腫瘍患者とし，患者の末梢血液内に viable な癌細胞を同定し，細胞数を測定する．腎癌，尿路上皮癌患者（特に浸潤癌）では血液内癌細胞と臨床的病理的背景との相関について検討する．臨床経過にあわせて CTC 数の変化があるかどうかについて興味がある．前立腺癌と胚細胞腫瘍についてはすでに使用されている腫瘍マーカーと CTC との相関について検討し，予後因子としていずれが優れているか検証する．

腎癌については，生物学的マーカーが確立されていないことで臨床経過を予測することが非常に困難になっている．今回の手法で CTC を同定し，CTC 数が臨床経過や治療効果を反映すれば，生物学的マーカーの確立という点で得られる恩恵は計り知れない．現状では，病理結果で静脈侵襲を認める場合でも細胞の viability が判定できないため，術後補助療法について否定的な意見があるが，CTC の信頼性により術後補助療法の可能性も考慮される．

尿路上皮癌では，非筋層浸潤癌と筋層浸潤癌において，それぞれ CTC の動態が全く異なることが予想される．非筋層浸潤癌における腫瘍進展例で CTC の存在が証明されれば，予後因子として有用になる．筋層浸潤癌では術前化学療法の経過で CTC 数が変化する可能性がある．

前立腺癌と胚細胞腫瘍では，CTC 数が腫瘍マーカーと相関し，乖離する例において CTC が有用である可能性が予想される．新薬臨床試験と組み合わせることが可能であり，臨床的意義が大きい．

(2) viable な血中浮遊癌細胞を PicoPipet® にて回収し，DNA および mRNA を抽出する．今までに報告されている EMT 関連遺伝子についての発現や遺伝子変化を検討するとともに，

手術にて摘出した原発巣での癌細胞と microarray による比較を行い，EMT に関連する分子機序を解明する．今回の手法で viable な血中浮遊癌細胞が採取できれば，泌尿器癌が血管内に遊走する際の分子生物学的な挙動を確認できる．EMT に関連する分子を同定することで，今後の分子標的治療への応用が可能となる．

(3) 実験用マウスに hTERT が発現している癌細胞株（腎癌，前立腺癌）と TRAD-GFP を血管内に投与し，in vivo で hTERT プロモーターを介した遺伝子強制発現が認められるかどうかを検討する．あわせて，治療用遺伝子を組み込んだ新規 adenovirus vector の開発を進め，腫瘍増殖抑制効果や転移抑制効果について検討する．

## 3. 研究の方法

(1) 泌尿器癌患者の血液内における viable な癌細胞の同定と細胞数測定

TRAD システムでの hTERT プロモーターと GFP を組み込んだ新規 adenovirus は OBP-401 というベクターとして婦人科癌において preliminary な実験結果を得た．具体的には，採取した 10ml の血液サンプルに OBP-401 を加えて蛍光顕微鏡で観察することで，viable な血液内癌細胞を同定できる．泌尿器癌においての実験結果はないため，予備実験として腎癌細胞株 ACHN，膀胱癌細胞株 T24，前立腺癌細胞株 LNCaP，DU145，PC3 などの細胞希釈液を作製し，血液と混合して検出率を検討した．

泌尿器癌患者の血液を採取し， の手法で CTC の同定と細胞数の測定を行った．

TRAD システムによる実験系の精度を向上させるために，adenovirus ベクターの改良を

試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 泌尿器癌患者の血液内における viable な癌細胞の同定と細胞数測定

細胞数を調整した腎癌細胞株 ACHN, 前立腺癌細胞株 PC3, LNCaP, DU145 を 20ml の健康成人血液中に混注した研究サンプルを作成した。TRAD システムを使用して血液中の癌細胞を同定することが可能であったが, 検出には血液 1ml 中に 100-1000 個の癌細胞が必要であり, 精度は低かった。

臨床研究として金沢大学医学倫理委員会に申請し, 泌尿器癌 (腎癌, 腎盂尿管膀胱を含めた尿路上皮癌, 前立腺癌, 精巣癌) 患者の血液サンプルを使用できる状況を整えた。尿路上皮癌 12 例, 腎癌 10 例, 前立腺癌 8 例において TRAD システムによる実験を施行したが, 検出力精度の点では実験系が未熟であり, 結果を得るのに至らなかった。婦人科癌 (卵巣癌, 子宮体癌) 患者においては比較的検出できており, この場合, 進行癌ではない早期癌でも血管内浮遊癌細胞が検出されている。癌腫により検出力に差が認められることも一つの所見と考えられ, 泌尿器癌において血管内浮遊癌細胞がどのように検出されるか検討することが必要と考えられた。泌尿器癌においては, 早期では血管内浮遊癌細胞が認められない可能性があり, 癌腫による細胞学的特徴を検討する工夫が必要と思われた。

の結果を受けて, ベクターの改良を考慮したが, ベクターを改良できず, 精度の向上が得られなかった。

#### 5. 主な発表論文等

実績なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北川 育秀 (KITAGAWA, Yasuhide)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号: 00452102

##### (2) 研究分担者

小中 弘之 (KONAKA, Hiroyuki)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号: 40334768

京 哲 (KYO, Satoru)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 50272969