

平成21年 6月20日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007年～2008年  
 課題番号：19791141  
 研究課題名（和文）腫瘍特異的増殖性アデノウイルスを用いた子宮癌細胞の可視化とスクリーニング法の開発  
 研究課題名（英文）Visualization of cancer cells with tumor-specific replication adenovirus and its application to cancer screening  
 研究代表者  
 毎田 佳子（MAIDA YOSHIKO）  
 国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・がん性幹細胞研究プロジェクト・研究員  
 研究者番号：20397219

研究成果の概要：がん細胞の可視化は、がんの診断や治療への応用が可能な技術である。本研究では、がん特異的に発現する遺伝子と蛍光蛋白を産生するウイルスとを組み合わせることでがん細胞でのみ増殖し蛍光を発するウイルス(TRAD-GFP)を作成し、TRAD-GFP を利用した婦人科がんのスクリーニングについて検討した。その結果、TRAD-GFP による蛍光の有無によって正常細胞とがん細胞とが区別でき、さらに蛍光を目印にがん細胞のみを効率よく回収してがんの遺伝子異常を高感度に検出することができた。これらの技術は、客観的かつ感度・特異度の高い新しいがん検診システムに応用できる可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：がん、ウイルス、遺伝子、スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

テロメアは染色体末端にある TTAGGG の繰り返し配列で染色体の保護や安定化に重要である。正常細胞ではテロメアは細胞分裂の度に短縮し、テロメア短縮が閾値を越えると細胞は分裂を止め replicative senescence に至る。がんはテロメア伸長酵素であるテロメラーゼの活性化により senescence を回避し、無限に分裂・増殖を続けることができる。テロメラーゼ活性の有無は触媒サブユニット hTERT の発現の有無により規定されている。

子宮癌は早期に発見されれば治癒可能な癌である。現在検診に用いている細胞診は低侵襲な検査法であるが、細胞形態を観察者の主観により評価するため、子宮内膜細胞診など明確な診断基準のない検体では正診率が低い。我々はこれまでに子宮癌の約 90%がテロメラーゼ陽性であり、活性の有無が hTERT の発現によって調節されていることを見いだした。また、細胞診検体のテロメラーゼ活性を指標とした子宮癌スクリーニングについても検討し、臨床応用への問題点として極微量に含ま

れる癌細胞の検出感度の向上および正常子宮内膜など元来テロメラーゼ活性を有する正常細胞との鑑別法の開発が挙げられた。

我々は hTERT promoter 制御下に E1A, E1B を発現し自己複製するアデノウイルスベクター (Tumor specific replicative adenovirus; TRAD) を作製した (図 1)。TRAD はがん細胞特異的に増殖する。TRAD を用いたがん治療に関して我々はすでに *in vitro*, *in vivo* での有効性・安全性について評価を行い、臨床応用に向けて準備を進めている。一方、腫瘍特異的増殖型ウイルスを用いたがんスクリーニングの試みは未だ報告がない。TRAD のがんスクリーニングへの応用は初めての試みであり、テロメラーゼ活性を指標としたがんスクリーニングにおける問題点を克服できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では TRAD のがん特異的増殖をスクリーニングに応用し、微量検体からの効率的かつ客観的ながんスクリーニング法の開発を目的とする。具体的には TRAD に GFP 遺伝子を組み込んだ GFP 発現型 TRAD (TRAD-GFP) を用いて以下の項目につき検討する。

(1) TRAD-GFP の感染と GFP 発光検出の至適条件および感染に適した臨床検体の処理法を決定する。

(2) GFP 発現を指標としたスクリーニング：細胞株および子宮頸部・内膜擦過細胞検体に TRAD-GFP を感染させ、GFP 発現を指標とした癌および前癌病変のスクリーニングの感度・特異度につき検討する。

(3) TRAD-GFP と他の遺伝子異常を組み合わせた分子標的スクリーニング：正常子宮内膜細胞やリンパ球など、一部のテロメラーゼ活性を有する正常細胞と癌細胞とを鑑別するため、TRAD-GFP 感染による GFP 発現と発癌に関わる他の遺伝子異常の有無とを組み合わせた分子標的スクリーニングを試みる。TRAD-GFP 感染後に GFP 陽性細胞を選択的に回収して遺伝子異常の有無を調べることにより、遺伝子異常の検出感度およびスクリーニングの特異度が共に向上する可能性があり、癌細胞株および子宮頸部・内膜擦過細胞検体を用いて検討する。特に細胞診正診率の低い子宮内膜癌や子宮内膜増殖症、子宮頸部腺癌について通常の細胞診との精度 (感度・特異度) の比較を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体採取

検討に用いる子宮頸部および体部の擦過細胞検体は、有症者・無症者を含む検診希望者より同意を得て採取する (検診目的で細胞診用に採取される擦過細胞検体を本研究に流用できるため、通常診療の他に新たな侵襲を加えることなく子宮擦過細胞検体を提供していただくことが可能である)。また、同時に作製された細胞診標本をスクリーニング精度の比較対象とする。

### (2) TRAD-GFP の感染と GFP 検出に関する基礎実験

子宮頸部および内膜細胞は接着系細胞であるが、臨床検体として得られる擦過細胞検体ではこれらの細胞が浮遊状態で採取される。TRAD-GFP 感染による GFP 発現には細胞の *viability* 保持が重要であり、細胞株および擦過細胞検体を用いて TRAD-GFP 感染に適した細胞培養条件を検討する。さらに効率良く GFP を検出するための TRAD-GFP の感染条件 (ウイルス量・方法) や GFP 検出法について細胞株を用いて検討する。

### (3) GFP 発現によるスクリーニング感度・特異度の検討

予め蛍光標識した子宮癌細胞株を正常細胞中に種々の比率で混ぜ、基礎実験で定めた条件により TRAD-GFP を感染させる。蛍光顕微鏡にて標識蛍光および GFP の発光を観察し、検体に含まれる癌細胞の検出限界および感度・特異度を検討する。また、GFP 検出の実際的、効率的方法について検討する。

### (4) GFP 発現による臨床検体のスクリーニング

健康者および前癌病変や癌病変の有病者より採取された子宮頸部および体部の擦過細胞検体に TRAD-GFP を感染させ、GFP の発現を指標としたスクリーニングの感度・特異度につき検討する。

### (5) TRAD-GFP と他の遺伝子異常とを組み合わせたスクリーニングに関する検討

正常細胞に癌細胞株を種々の比率で混ぜ、一方はそのまま DNA を抽出する。他方は TRAD-GFP を感染させた後、GFP 陽性細胞を *sorting* により回収し、回収された細胞から DNA を抽出する。この DNA を用いて既知の遺伝子異常を検出し、TRAD-GFP 感染後の *sorting* による癌細胞由来遺伝子異常の検出感度の向上につき検討する。

### (6) TRAD-GFP と他の遺伝子異常との組み合わせ

せによる臨床検体のスクリーニング

子宮頸部・体部擦過細胞検体に TRAD-GFP を感染させ後、GFP 陽性細胞を sorting により回収する。回収細胞より DNA を抽出し、遺伝子異常の有無を検出する。同一患者より同時に採取された TRAD-GFP 未感染の擦過細胞検体より DNA を抽出し、遺伝子異常の検出感度を比較する。

#### 4. 研究成果

##### (1) TRAD-GFP の感染と GFP 検出に関する基礎実験

図 1 に TRAD の構造を示す。

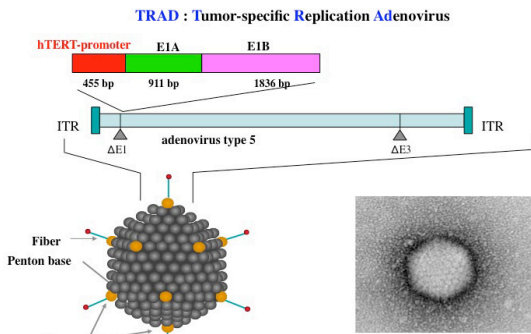


図 1 腫瘍特異的増殖性アデノウイルス(TRAD)の構造

TRAD に GFP 遺伝子を組み込み、TRAD 感染細胞を GFP の発光によって検出するシステムを構築した(図 2)。細胞株および子宮擦過細胞検体に TRAD-GFP を感染させ、適切な条件下で 24 時間培養したのち、癌細胞を含むサンプルにおいて GFP の蛍光が観察された。正常細胞では、TRAD-GFP 感染による GFP の発光は観察されなかった。

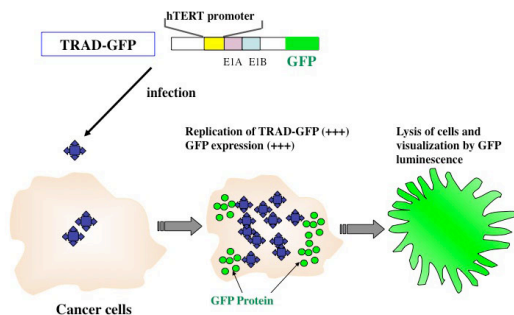


図 2 TRAD-GFP 感染による癌細胞の可視化

##### (2) GFP 発現によるスクリーニング感度・特異度の検討

子宮癌細胞株と正常細胞を種々の比率で混ぜ TRAD-GFP を感染させた。蛍光顕微鏡にて観察し、GFP の発現は癌細胞に特異的であるこ

と、および、GFP に基づいて癌細胞を感度良く検出できることを確認した。

##### (3) GFP 発現による臨床検体のスクリーニング

健康者および癌患者より採取された子宮頸部および体部の擦過細胞検体に TRAD-GFP を感染させ、GFP の発現を指標としたスクリーニングの感度・特異度につき検討した(図 3)。癌患者における GFP 陽性率は 90%以上であり、本スクリーニングが極めて高い感度を有することが示唆された。

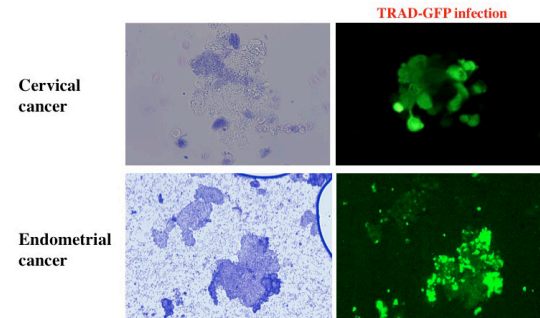


図 3 子宮癌擦過細胞検体への TRAD-GFP 感染

##### (4) TRAD-GFP と他の遺伝子異常とを組み合わせたスクリーニングに関する検討

子宮頸癌細胞株 C-33A を用いて TRAD-GFP と他の遺伝子異常とを組み合わせたスクリーニングに関する検討を行い、TRAD-GFP 感染後に GFP 陽性細胞を sorting により選択的に回収・解析することにより、p53 mutation の検出感度が上昇することを確認した。

DNA ミスマッチ修復遺伝子 hMLH1 のプロモーターのメチル化は子宮体癌に高頻度に認められる異常であり、子宮内膜発癌の比較的早期に生じる変異と考えられている。子宮体部擦過細胞検体に TRAD-GFP を感染させた後 GFP 陽性細胞を sorting により回収して遺伝子解析を行ったところ、細胞診懸濁液からは検出できなかった hMLH1 プロモーターメチル化が検出可能となった。

本研究により TRAD-GFP を用いて検体中に含まれる微量な癌細胞を効率良く検出できるシステムが構築できた。さらに、sorting により GFP 陽性細胞を選択的に回収することで癌細胞の enrichment が可能となり、遺伝子異常の検出感度が従来の方法に比べて格段に上昇した。本方法は細胞診材料からの遺伝子スクリーニングの実用に道を開く画期的な technology である。

#### 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1件)

1. **Maida Y**, Kyo S, Sakaguchi J, Mizumoto Y, Hashimoto M, Mori N, Ikoma T, Nakamura M, Takakura M, Urata Y, Fujiwara T, Inoue M. Diagnostic potential and limitation of imaging cancer cells in cytological samples using telomerase-specific replicative adenovirus. Int J Oncol. 34:1549-56, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計1件)

1. **Maida Y**, Kyo S, Mori N, Sakaguchi J, Mizumoto Y, Hashimoto M, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Visualization of cancer cells with telomerase-specific replication adenovirus and its application to cancer screening. 第66回日本癌学会学術総会(2007年10月4日、横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

毎田 佳子 (MAIDA YOSHIKO)

国立がんセンター(研究所及び東病院臨床開発センター)・がん性幹細胞研究プロジェクト・研究員

研究者番号: 20397219