

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462516

研究課題名(和文) 婦人科癌におけるテロメラーゼ活性化機転に基づく末梢血腫瘍細胞の検出・解析法の確立

研究課題名(英文) Application of telomerase activation mechanism to detect and isolate circulating tumor cells in patients with gynecologic cancers

研究代表者

高倉 正博 (TAKAKURA, Masahiro)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：20313661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：テロメラーゼ活性を指標として末梢血中の癌細胞を検出・解析するためにhTERTプロモーター活性化条件においてのみ増殖しGFPを発現する制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた。子宮頸癌患者より検出したCTCに対しサイトケラチンの発現解析後、顕微鏡下に回収、CTCから原発巣と同じHPV DNAを検出し癌細胞由来であることを確認した。

子宮頸癌でのCTC検出率は約30%であり、臨床進行期などとの相関は認めなかった。回収されたCTCはすべてサイトケラチン陰性であった。このことは本方法で検出したCTCはCellSearch等の上皮マーカー依存的な検出法では見逃されていたものであることを示している。

研究成果の概要(英文)：We applied conditional replication-selective adenovirus vector (modified TRAD) which replicate and express GFP only in cells which hTERT (human telomerase reverse transcriptase) promoter is activated to detect circulating tumor cells (CTC). The blood from cervical cancer patients was infected with modified TRAD. GFP expressing cells were performed immunocytological analysis for cytokeratins and isolated under microscopic observation. The isolated cells were subjected to whole genome amplification followed by a PCR analysis of HPV DNA identical with their primary lesion proving they were originated from cancer.

CTC were detected in about 30% of cervical cancer patients. There was no correlation with tumor stage or other clinicopathological factors. All CTCs we detected were cytokeratin negative, suggesting CTC detecting method depending epithelial marker such as CellSearch may overlook them. It might be important to analyze these cells to reveal the mechanisms of cancer metastasis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：末梢血中腫瘍細胞 テロメラーゼ 子宮頸癌 HPV

1. 研究開始当初の背景

末梢血中腫瘍細胞 (circulating tumor cells; CTC) の検出は乳癌・大腸癌・前立腺癌などで予後マーカーあるいは治療効果の指標として有用と報告されている (N. Engl. J. Med. 2004; 351: 781-91, Clin Cancer Res. 2008; 23: 1420-30, J. Clin. Oncol. 2008; 26: 3213-21)。しかしながら婦人科癌における CTC の臨床的意義は未だ明らかになっていない。また現状では主に EpCAM (ヒト上皮抗原) や Cytokeratin8/18/19 といった細胞表面の上皮マーカーによって CTC を識別している。この方法には以下のような問題点がある。

癌細胞と正常上皮細胞の区別が困難である (正常細胞でも上皮抗原は発現している)。

生細胞と死細胞の区別が困難である。腫瘍細胞が血管内に移行する際、上皮間葉転換 (EMT) によって上皮特異的抗原の発現が減弱する可能性がある (Stem Cells 2010; 28: 1435-45)。これらを克服する新しい CTC 検出法の開発は喫緊の課題として認識されつつある。

テロメラーゼは細胞分裂の都度、短縮を繰り返している染色体末端構造のテロメアを延長することで細胞の無限増殖を可能としている。80%以上の上皮性悪性腫瘍で活性化されていることが知られているが、我々は逆転写酵素蛋白 human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の遺伝子発現の有無がテロメラーゼ活性の決定因子であることを明らかにしてきた (Cancer Res 1998; 58: 1558-61, Int J Cancer. 1998; 78: 539-43)。この研究においてクローニングした hTERT プロモーターは癌細胞においては CMV プロモーター等のウイルスプロモーターに匹敵するような極めて強い活性を示す一方で正常細胞では不活化されており極めて癌特異性が高いことが明らかにされている (Cancer Res. 1999; 59: 551-7)。

TRAD (Telomerase-specific replication-selective adenovirus) はこの hTERT プロモーターを 5 型アデノウイルスの E1A・E1B 遺伝子の 5' 上流に組み込むことで hTERT プロモーターが活性化された細胞すなわちテロメラーゼ陽性細胞でのみ増殖するようにデザインされた改変アデノウイルスである。これに GFP 遺伝子を更に組み込んで癌細胞で特異的に GFP を発現するように改良したものが TRAD-GFP である。TRAD は本来、癌細胞で増殖し細胞毒性を発揮するが、それには感染後 3 日程度を要する。これに対し GFP 発光は感染後 24 時間から認められる。すなわち感染細胞がウイルス自体の毒性で死ぬ前に GFP で癌細胞を可視化することができる。そこで TRAD-GFP を血液に感染させることでその中に極少数存在する癌細胞のみを GFP で発光させることで検出するのが本法の基本的原理である。これは癌特異性、生細胞選択性、EMT による偽陰性の回避と先に上げた問題点をすべて克服した CTC 検出法と成

りうる。

また、腫瘍の遺伝子解析は大腸癌で KRAS 遺伝子活性型変異の有無が分子標的薬の有効性を予測する因子として保険適応となるなど、近年重要性が増してきている。転移巣が生検不能である場合や患者の全身状態が不良の場合など、末梢血からの腫瘍遺伝子解析による恩恵は計り知れない。予備実験において蛍光顕微鏡下に本法で検出した CTC を微小ピペットにより単離可能であることが実証されている。単一細胞からの DNA 解析は Whole Genome Amplification 法を用いて可能となっており、これを CTC に応用することは十分可能である。

さらに単離した細胞は今まさに転移しようとしている細胞であり、こういった細胞での遺伝子発現状況を解析することで癌転移に関する新たな知見が得られるものと考えられる。

2. 研究の目的

末梢血中腫瘍細胞 (CTC) はいくつかの癌種において予後マーカーと成りうることが示されているが、その測定法や解釈などはいまだに発展途上である。現在の CTC 測定法は細胞表面の上皮特異抗原を検出するものが主流であるが、本研究では発想を転換し、癌特異的に起こる不死化関連酵素テロメラーゼの活性化に着目し、テロメラーゼが活性化された細胞でのみ増殖可能な改変型アデノウイルス (Telomerase-specific replication-selective adenovirus) を用いた新しい CTC 測定法を確立した。本研究ではこれを用いて婦人科癌における CTC の臨床的意義を解明するとともに、CTC の単離と遺伝子変異解析を確立することで、癌の転移機構の解明につなげることを目的として本研究を立案した。

3. 研究の方法

TRAD-GFP の改良と CTC 検出法の最適化
in vitro にて 10~100Moi にて多くの癌細胞は TRAD の感染が成立する。ウイルス量を増やせば感染率は高くなるが、同時に白血球への TRAD の非特異的感染による GFP 発光が増えてくる。血液中に癌細胞を混ぜて行った検出実験では感染させるウイルス量を 1×10^5 pfu/ml にすると 5ml の血液中の約 50% の癌細胞が GFP 陽性として識別でき、数個の白血球が GFP 陽性となる。我々は白血球共通抗原である CD45 の免疫染色を加えることで両者を留意に区別することができる系を構築した。この系では白血球の細胞膜が赤色蛍光で認識されるため、GFP 陽性細胞の細胞辺縁部の赤色蛍光の有無で癌細胞か否かを判定する。さらに飛躍的に検出感度を向上させるために TRAD-GFP ベクターの改良に着手する。5 型アデノウイルスの感染はウイルスのカプシド蛋白のファイバーが細胞表面の CAR (coxsackievirus and adenovirus

receptor)と結合することにより起こる。このため CAR 陰性細胞では感染効率が悪い。悪性度の高いがんでは CAR 発現が少ないこともあり、CAR 非依存的に感染できるようにウイルスを改良する。

婦人科癌患者における CTC の測定
改良型 TRAD-GFP ベクターを用いて婦人科癌患者での CTC 測定を行う。

CTC 単離方法の確立
多数の細胞の中から一つの細胞を単離する方法としては FACS あるいは微小ピペットの使用などが挙げられるが後者がより簡便で直接的である。我々はナノリットル単位でのマニピレーションが可能な PicoPipet®にて蛍光顕微鏡下での GFP 陽性細胞の単離に培養細胞を用いた系で成功しており、臨床検体からの CTC 単離がルーチンに行える環境を整える。

CTC における DNA 変異解析
まずは健常者血液に癌細胞を混ぜた実験系で TRAD-GFP 感染を行い、GFP 陽性細胞を項目の手法で単離し、解析検体とする。HPV DNA、KRAS 遺伝子等各々の細胞株が持つ遺伝子異常を検出できることを目標とする。手法としては単一細胞からの whole genome amplification 後、PCR 増幅、シーケンシングを行う。PTEN、P53 等頻度の高い遺伝子異常に関しては PCR 条件等をプロトコル化し、容易に該当部位の遺伝子増幅ができるようにする。

4. 研究成果

(1) 研究協力者であるオンコリスバイオファーマとその研究グループが開発した改良型 TRAD-GFP (Sakurai F et al. Mol Ther Methods Clin Dev 3: 16001, 2016) の提供を受け、研究を行った。これはアデノウイルス 5 型 fiber 遺伝子を 35 型のものに置換している。このため CAR 非依存的な感染が可能となっている。また E1A/E1B 遺伝子と GFP 遺伝子の下流に血球細胞で特異的に発現している microRNA miR142-3 の結合配列を挿入したことで、血球細胞に感染が成立してもこれらの遺伝子が発現後速やかに分解されるようにデザインしてある。

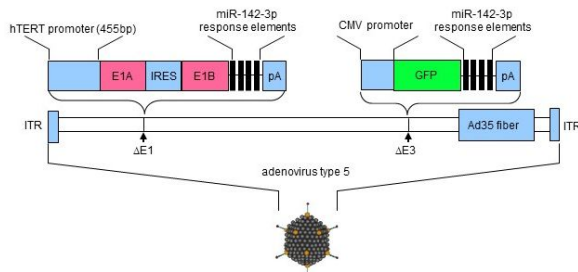


図1. 改良型TRAD-GFPの構造

子宮頸癌患者を対象に TRAD-GFP で検出した CTC に対し免疫染色を行い Cytokeratin の発現解析後、モニター下に細胞を回収、最終的に CTC の DNA から原発巣と同じ HPV DNA を

増幅して癌細胞由来であることを確認する研究を行った。血球細胞における偽陽性の発現は大幅に減少した。また CTC 回収を 96well プレートに分注後、モニター観察下に自動化することで習熟度に関係なく、ロスのない回収が可能となった。

(2) 子宮頸癌での CTC 検出率は約 30%程度であり、臨床進行期などとの因子との相関は求められなかった。CTC (最終的に癌細胞由来であることが確認されたもの) はすべて Cytokeratin 陰性で上皮的形質を失っていたことは我々が改良型 TRAD-GFP で検出した CTC は理論上 CellSearch®等の上皮マーカー依存的な検出法では見逃されていたものであることを示している。これらの CTC は初期癌から認められており、これらをさらに解析していくことで癌転移のメカニズム解明に寄与するものと考えられる。

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5件)

Maida Y, Takakura M, Nishiuchi T, Yoshimoto T, Kyo S. Exosomal transfer of functional small RNAs mediates cancer-stroma communication in human endometrium. Cancer Med. 5: 304-14, 2016 査読有り

Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Matsumoto T, Takakura M, Fujiwara H. Synchronous endometrioid adenocarcinomas in the uterine cervix and corpus. J Obstet Gynaecol Res. 42: 1390-1394, 2016 査読有り

Yamazaki R, Inokuchi M, Ishikawa S, Myojo S, Iwadare J, Bono Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Takakura M, Iizuka T, Ohta T, Fujiwara H. Tamoxifen-induced ovarian hyperstimulation during premenopausal hormonal therapy for breast cancer in Japanese women. Springerplus. 4: 425, 2015 査読有り

Kyo S, Mizumoto Y, Takakura M, Nakamura M, Sato E, Katagiri H, Ishikawa M, Nakayama K, Fujiwara H. Nerve-sparing abdominal radical trachelectomy: a novel concept to preserve uterine branches of pelvic nerves. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 193: 5-9, 2015 査読有り

Bono Y, Kyo S, Kiyono T, Mizumoto Y, Nakamura M, Maida Y, Takakura M, Fujiwara H. Concurrent estrogen action was essential for maximal progestin effect in oral contraceptives. Fertil

Steril. 101: 1337-43, 2014 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

テロメラーゼ強発現細胞のライブイメージングと婦人科癌組織における局在性の検討

松本多圭夫、高倉正博、水本泰成、保野由紀子、小幡武司、飯塚 崇、鏡 京介、中村充宏、藤原 浩

第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 一般演題 (ポスター)

平成 28 年 4 月 21 日 ~ 24 日 東京都 (東京国際フォーラム)

テロメラーゼ活性を応用した末梢血中腫瘍細胞 (CTC) の検出と遺伝子解析 ー現時点における CTC の位置づけー

松本多圭夫、高倉正博、水本泰成、保野由紀子、小幡武司、中村充宏、藤原 浩

第 4 回婦人科がんバイオマーカー研究会 学術集会

平成 28 年 2 月 27 日 岐阜県 (岐阜大学サテライトキャンパス)

子宮頸癌症例における末梢血中腫瘍細胞は上皮マーカーを発現しているか?

松本 多圭夫、高倉 正博、金谷 太郎、水本 泰成、保野 由紀子、小幡 武司、中村 充宏、藤原 浩

第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 優秀演題賞

平成 27 年 4 月 9 日 ~ 12 日 神奈川県 (パシフィコ横浜)

末梢血中腫瘍細胞の検出とその遺伝子解析

高倉正博

第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会・ワークショップ

平成 26 年 7 月 17 日 宇都宮市

婦人科癌症例における末梢血中腫瘍細胞の効率的検出および回収と遺伝子解析にむけた基礎的検討

高倉正博、京哲、中村充宏、水本泰成、保野由紀子、藤原浩

第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会・ミニワークショップ

平成 26 年 4 月 18 日 東京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 血中循環腫瘍細胞回収用試薬及び被験者の血液試料中の血中循環腫瘍細胞を回収するための方法

発明者: 高倉正博、松本多圭夫

権利者: 国立大学法人金沢大学

種類: 特許

番号: 2016-139473

出願年月日: 2016 年 7 月 14 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://obgyn.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高倉 正博 (TAKAKURA, Masahiro)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号: 20313661

(2) 研究分担者

藤原 浩 (FUJIWARA, Hiroshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 30252456

京 哲 (KYO, Satoru)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 50272969

尾崎 聡 (OZAKI, Satoshi)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号: 40401921

(3) 研究協力者

早川 英毅 (HAYAKAWA, hideki)