

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11270

研究課題名(和文) 癌特異的プロモーターと磁性ナノ粒子を応用した婦人科癌における末梢血中腫瘍細胞解析

研究課題名(英文) Analysis of circulating tumor cells in gynecologic cancer applying cancer specific promoters and magnetic nanoparticles.

研究代表者

高倉 正博 (TAKAKURA, Masahiro)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：20313661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌特異的プロモーター下流に膜貫通タンパク質とタグタンパク質の融合タンパクを発現するようにデザインしたプラスミドを作成し、血液検体にエレクトロレーションで導入することで末梢血中腫瘍細胞(circulating tumor cells: CTC)を検出する系を確立した。正常血液に培養癌細胞を一定数混入させたCTCモデル検体に対して行った検出実験では感度は80-90%であった。一方でリガンド化磁性ナノ粒子を用いたCTCの生細胞の回収率は20%程度と低率であったが、回収されたCTC生細胞は単一細胞からの培養増殖が可能であり、今後さらに改善を要するものの将来的に有望な方法と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢血中腫瘍細胞(circulating tumor cells: CTC)は癌の新規バイオマーカーとして、またliquid biopsyの手段として注目を集めているが、その検出方法や応用法はいまだに発展途上である。現在主流の細胞膜表面抗原に頼った検出方法では様々に姿を変える癌細胞を捉えきれていないのが現状である。我々は癌の不死化能に着目し、不死化関連酵素であるテロメラーゼの活性化を指標として癌細胞を検出・分離するシステムを構築し、さらに磁性ナノ粒子を応用して従来は困難であった生細胞の回収・解析に向けた基礎データを示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we established a circulating tumor cells (CTC) detection system, in which plasmid vectors expressing fusion of membrane protein and tag protein driven by cancer specific promoters were transfected by electroporation to blood samples. The detection rate of CTCs were 80-90% using model samples, in which cancer cell-line cells were spiked into normal blood. On the other hand, recover rate of CTCs using ligand-conjugated magnetic nanoparticles was low at 20%, however, recovered living CTCs were able to growth in culture, suggesting this method is promising in future to analyze living CTCs, although further improvement is needed.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：婦人科悪性腫瘍 末梢血中腫瘍細胞 テロメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

癌の血行性転移が成立するには癌細胞は接着状態からの離脱、血管内への侵入(上皮間葉転換:EMTを介するものと、血管への直接浸潤によるもの)の両者があり得る。血液中でのアノキス(浮遊状態によって誘導されるアポトーシス)回避、転移先での血管壁への再接着、血管外への浸潤、単細胞(あるいは少数細胞)からの腫瘍形成と多くの関門を乗り越える必要がある(図1)。末梢血中腫瘍細胞(circulating tumor cells; CTC)はこの過程にある癌細胞と考えられ、その臨床的あるいは生物学的な意義が注目を集めている。

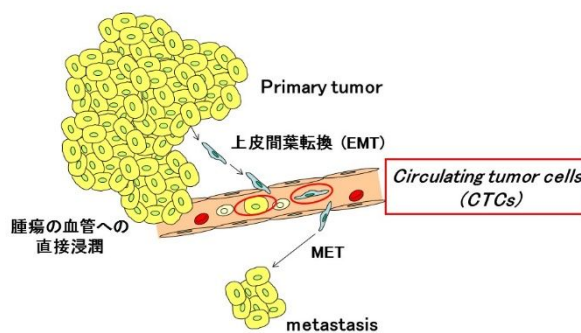


図1. 末梢血中腫瘍細胞とは

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サロゲートマーカー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)。婦人科癌では卵巣癌で比較的多くの報告がなされており、メタ解析の結果、予後マーカーとなりうることを示されている(Plos One. 10: e0130873, 2015)。しかしながらサブ解析では現在、一般的に普及しており唯一FDAの認可を受けているCTC測定法であるCellSearch®(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)では有意差が認められておらず、上皮マーカーなどの表面抗原に依存したCTCの検出には限界がある可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

我々は癌の本質的性質である不死化能をターゲットとして癌細胞を同定補足するシステムの構築を目指して研究を進めてきた。テロメラーゼは細胞分裂の都度、短縮を繰り返す染色体末端構造のテロメアを延長することで細胞を不死化に導くことが知られている。80%~90%の上皮性悪性腫瘍で活性化されているが、我々はその構成因子である逆転写酵素蛋白 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を示した(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遺伝子の上位に組み込むことで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遺伝子を組み込んだTRAD-GFPを用いて我々は婦人科癌でのCTC検出を行った。治療前の婦人科癌の約40%にCTCを認めた。CTCは治療効果のサロゲートマーカーとして有意差が認められた(Br J Cancer. 107:448-54, 2012)。Publication後の観察期間を延長した検討ではCTCの有無は卵巣癌においてのみ無増悪生存との間に相関が認められた。これはCTCの臨床的・生物学的意義に疾患による違いがある可能性を示唆している。さらに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。回収された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陰性で上皮の形質を失っていた(図2)。このことは我々が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。しかしながら本法の欠点としてウイルス感染が細胞にとって致死的であり、かつ遺伝子発現プロファイルも乱すことから検出した細胞の解析に制限があること。テロメラーゼ陰性細胞あるいは、最近になって報告されてきたhTERTプロモ

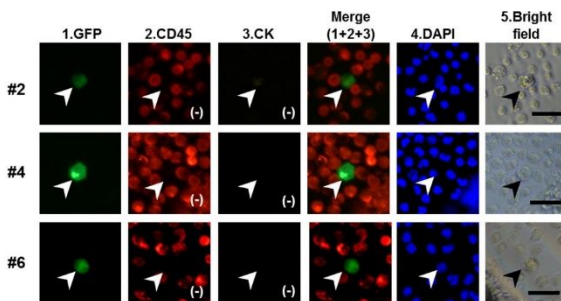


図2. 子宮頸癌におけるCTCは上皮形質を欠く

ーター領域の変異によってテロメラーゼが活性化されている細胞では無効であることなどが挙げられていた。本研究ではこれらの欠点を克服したウイルス非依存的な CTC 検出システムを構築すると同時に、効率的に CTC を回収する方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

アデノウイルスベクターを用いた従来法の欠点を克服するために、hTERT プロモーター下流に膜蛋白の膜貫通ドメインと特異的リガンドを有するタグ蛋白の融合タンパクを発現するようにデザインしたプラスミドを作成しエレクトロポレーション法で導入する。hTERT プロモーターが活性化されている細胞では細胞膜上にタグ蛋白が発現される (Surface Tag-protein expressed in tumor cells; STET) (図 3)。タグ蛋白として特異的リガンドが存在する人工蛋白である Halotag を使用した。また hTERT プロモーター活性がない癌に対応するためにやはり癌特異的に高い転写活性を示すプロモーターとして survivin プロモーターを STET 上流に配した survivin-STET を併用した。STET 発現細胞はタグ蛋白のリガンドに蛍光物質を付加した場合には蛍光ラベルが可能であるが、さらに効率的に細胞を回収するためにナノ粒子磁性体を結合したリガンドを作成し、磁力による生きた CTC の回収を試みた。

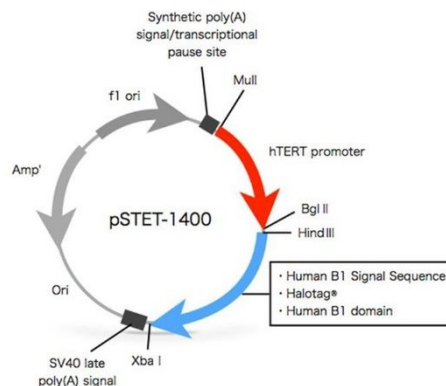


図 3. hTERT-STETプラスミド

4. 研究成果

マルチパルス式エレクトロポレーション法による癌培養細胞での STET の導入効率 (Halotag リガンド-GFP による蛍光標識での陽性率) は 80 ~ 95%、細胞の生存率は 75 ~ 100% であり、十分実用に耐えうるものと考えられた。hTERT 転写活性がない癌に対応するために、癌特異的に高い転写活性を示すプロモーターとして survivin プロモーターを STET 上流に配した survivin-STET を作成し、STET と同様の実験を行った。survivin-STET による陽性率は 70 ~ 85% と STET よりやや低かったが、両者を併用することで 5% 程度の陽性率の上積みが可能であることが明らかになった。

正常血液に培養癌細胞を一定数混入させた CTC モデル検体に対して行った CTC 検出実験では HaloTag リガンド化蛍光プローブを用いて行った検出感度は 80 ~ 90% であり、十分に臨床検体への応用が可能と考えられた (図 4)。一方で CTC の回収に関しては Halotag リガンド化磁性体を用いて MACS (magnetic cell separation technology; Miltenyi Biotec) で回収を試みた実験では回収率は 20% 程度と低率であった。細胞表面への STET 発現量が少ないことが原因と考えられた。この点に関しては今後さらに改善を要するものと思われた。しかしながら本法で回収された CTC は生細胞であり単一細胞からの培養が可能であった。このことから将来的に本法は生きた CTC の分離検出に有望と考えられた。

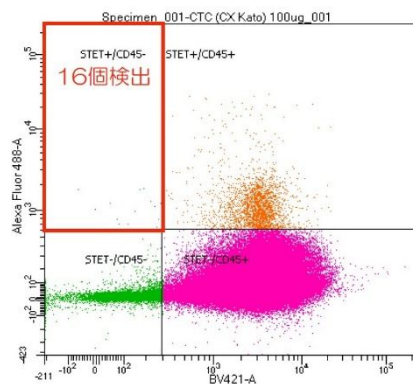


図 4. FACS による CTC モデル検出実験

(10mL 血液中に 20 個の HeLa 細胞を混入)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sakamoto Jinichi, Saito Mayumi, Zhang Shitai, Takakura Masahiro, Takagi Hiroaki, Sasagawa Toshiyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Determination of human papillomavirus type in archival tissue specimens of invasive cervical cancer using molecular mapping and E6/E7-based polymerase chain reaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e265996 ~ e265996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0265996	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuroki Hiroko, Sakamoto Jinichi, Shibata Takeo, Takakura Masahiro, Sasagawa Toshiyuki	4. 巻 93
2. 論文標題 Comparison of Aptima and hybrid capture 2 HPV tests and Pap test in the referral population in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 5076 ~ 5083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.26865	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takakura Masahiro, Takata Emi, Sasagawa Toshiyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 A Novel Liquid Biopsy Strategy to Detect Small Amounts of Cancer Cells Using Cancer-Specific Replication Adenoviruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4044 ~ 4044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9124044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Shitai, Saito Mayumi, Yamada Sumire, Sakamoto Jinichi, Takakura Masahiro, Takagi Hiroaki, Sasagawa Toshiyuki	4. 巻 92
2. 論文標題 The prevalence of VAIN, CIN, and related HPV genotypes in Japanese women with abnormal cytology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 364 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Hiroaki, Takata Emi, Sakamoto Jinichi, Fujita Satoko, Takakura Masahiro, Sasagawa Toshiyuki	4. 巻 2018
2. 論文標題 Malignant Transformation of an Ovarian Endometrioma during Endometriosis Treatment: A Case Report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/6210172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Jinichi, Kamiura Shoji, Okayama Kaori, Okodo Mitsuaki, Shibata Takeo, Osaka Yasuhiro, Fujita Satoko, Takata Emi, Takagi Hiroaki, Takakura Masahiro, Sasagawa Toshiyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Single type infection of human papillomavirus as a cause for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Papillomavirus Research	6. 最初と最後の頁 46~51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pvr.2018.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Hiroaki, Takata Emi, Sakamoto Jinichi, Fujita Satoko, Takakura Masahiro, Sasagawa Toshiyuki	4. 巻 2018
2. 論文標題 Malignant Transformation of an Ovarian Endometrioma during Endometriosis Treatment: A Case Report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/6210172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takakura Masahiro, Matsumoto Takeo, Nakamura Mitsuhiro, Mizumoto Yasunari, Myojyo Subaru, Yamazaki Rena, Iwadare Jyunpei, Orisaka Shunsuke, Obata Takeshi, Iizuka Takashi, Kagami Kyosuke, Mizuguchi Hiroyuki, Urata Yasuo, Fujiwara Toshiyoshi, Kyo Satoru, Sasagawa Toshiyuki, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 109
2. 論文標題 Detection of circulating tumor cells in cervical cancer using a conditionally replicative adenovirus targeting telomerase-positive cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 231~240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Mari, Mohan Priyank, Mukai Kojiro, Takeda Yuichi, Matsumoto Takeo, Matsumura Kazuaki, Takakura Masahiro, Arai Hiroyuki, Taguchi Tomohiko, Maenosono Shinya	4. 巻 2
2. 論文標題 Magnetic Separation of Autophagosomes from Mammalian Cells Using Magnetic?Plasmonic Hybrid Nanobeads	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 4929 ~ 4937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.7b00929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takakura M, Sasagawa T
2. 発表標題 Establishment of non-viral detection method of Circulating tumor cells targeting telomerase activation
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前之園 信也 (MAENOSONO Shinya) (00323535)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授 (13302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------