

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590999

研究課題名（和文） 改変アデノウィルスベクターを用いた癌細胞の検出法の開発

研究課題名（英文） Development of the new cancer cell detection method using a modified adenoviral vector

研究代表者

高山 浩一（TAKAYAMA KOICHI）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：50274444

研究成果の概要（和文）：アデノウィルスベクターの構造蛋白を改変した血清型5型/3型キメラアデノウィルスを用いた癌細胞の検出ツールとして用いた。同キメラウィルスは血清型5型アデノウィルスをベースとし、ファイバー部分のみを3型アデノウィルスに置き換えた組み換えアデノウィルスであり、これまでの研究から多種の癌細胞に対して5型アデノウィルスに比べて高い感染性を有することが知られている。今回の研究では胸水中の癌細胞を同キメラウィルスを用いて検出することにより細胞診検査の精度向上を目指した。癌細胞の検出は具体的には同キメラウィルスにCMVプロモーター下に接続したルシフェラーゼcDNAもしくはGFPcDNAの発現カセットを組み替え、感染細胞のルシフェラーゼ活性もしくはGFPの発色により確認した。希釈した血清に培養肺癌細胞を一定数混入して疑似癌性胸水を用いた検討では赤血球溶血処理を加えることで、最小10個の癌細胞があれば有意にルシフェラーゼ活性が増加し癌細胞の検出が可能であることを示した。実際に臨床検体として得られた良性胸水および悪性胸水を用いた検討では一部の良性胸水で高いルシフェラーゼ活性を示す検体があり、本法による癌性胸膜炎の診断精度は感度75%、特異度79%であった。細胞診検査結果と比較したところ、診断精度については全体に特に劣るものではないが、本法ではリンパ腫等の血液癌に対してはアデノウィルスの感染性が低いこともあり細胞診検査よりも偽陰性例が多くみられた。一方、上皮性悪性腫瘍に対しては良好な結果を示した。また、良性胸水におけるルシフェラーゼ活性高値の理由についてはGFP発現ベクターを用いた解析から、良性中皮細胞への感染がその主たる原因と考えられた。以上の結果より、癌の種類によっては癌性胸膜炎や腹膜炎の補助診断に有用であるが、腫瘍特異的プロモーターを使用する等の工夫により診断の特異度を向上させ、診断精度を改善できるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, the adenoviral vector that was modified in fiber region was used as a cancer cell detection tool. The modified adenovirus has a serotype 3 adenoviral fiber protein on the serotype 5 adenovirus, and is reported to show the high infectivity to various cancer cells in the previous paper. The purpose of this study is to improve the diagnosis accuracy for malignant pleuritis or ascites in cytological examination in combination with the modified adenoviral vector. A fire fly luciferase cDNA or GFP cDNA driven by CMV promoter are recombined into the modified adenoviral genome using the homologous recombination method. Cancer cells infected with this recombinant modified adenoviral vectors showed a high luciferase activity or green lumination under the fluorescent microscopy. Using a diluted serum including fixed number of cancer cells as an artificial malignant effusion, the recombinant modified adenoviral vector was confirmed to detect only 10 cancer cells after RBC cells were lysed out. For the clinical samples including various benign or malignant pleural effusion and ascites, the sensitivity and specificity in the diagnosis were xx% and xx%, respectively. The diagnosis accuracy with this method is a little better than that in usual cytological examination. However, in the malignant effusion

with hematological malignancies like a lymphoma, the sensitivity is relatively low probably due to the lack of receptor protein for adenovirus infection on the surface of these malignant cells. On the other hand, some benign effusion also showed the higher luciferase activity resulting a pseudo-positive specimen. With a GFP expressing modified adenoviral vector, some contaminated mesothelial cells were also infected with viral vector, and might deteriorate the diagnosis specificity. In conclusion, this method is suggested to be useful for cancer cell detection in the effusion samples in combination with cytological examination. Using a tumor specific promoter instead with CMV promoter, the diagnosis accuracy is suggested to be improved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：癌、ウイルス、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

従来の細胞診による**癌性胸膜炎**の診断率は満足すべきレベルになく改善が必要である。診断率の向上のため胸水中に存在する少数の癌細胞を検出する試みは多くの報告があり、癌細胞に由来する DNA の検出と癌細胞由来の蛋白およびその活性の検出に分けられる。肺癌細胞の検出においては DNA 診断ではマイクロサテライトマーカーや p53 遺伝子、Fhit 遺伝子など変異・欠失の頻度の高いものが使用され、後者では腫瘍マーカーやテロメラーゼ活性の測定等が行われている。しかしながら、いずれも細胞診検査に匹敵するような結果は得られていない。我々が考案した**改変アデノウイルスベクター**を用いる方法は、上皮系細胞である癌細胞に極めて高い感染性を有する一方、胸水中の主たる成分である血球由来の細胞や中皮細胞に対する感染性は非常に低い。よってこのようなアデノウイルスの特性を生かし胸水中に存在する少量の癌細胞検出にアデノウイルスベクターを用いることを着想した。

2. 研究の目的

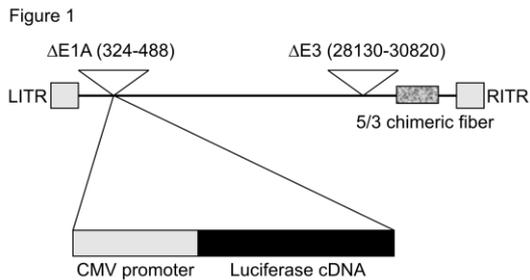
本研究の目的は**改変アデノウイルスベクター**を用いて生体より得られた**胸水中の癌細胞を検出し**、癌性胸膜炎の診断率を改善することである。研究期間内に下記の点を明らかにしたい。

- 1) 良性疾患より得られた胸水にルシフェラーゼまたは GFP 発現アデノウイルスを感染させ、正常細胞におけるベースラインのルシフェラーゼ活性および GFP 発光細胞割合を明らかにする。
- 2) 良性疾患より得られた上記の検体に培養癌細胞を定量的に混和し、**ルシフェラーゼアッセイ**および**GFP 蛍光**による癌細胞の検出限界を明らかにする。
- 3) 肺癌患者より得られた悪性胸水に同ウイルスを感染させて、ルシフェラーゼ活性の測定および GFP 発光細胞割合を測定し、**細胞診検査**との比較においてその臨床的意義を明らかにする。
- 4) GFP 蛍光法を従来の細胞診検査と組み合わせることで癌細胞検出力の改善をはかる。

3. 研究の方法

使用するウイルスベクターは CMV プロモーターによって駆動される GFP 発現カセットおよびルシフェラーゼ発現カセットを組み込んだ非増殖型アデノウイルスとする。これらのウイルスベクターは基本ウイルスとして 5 型アデノウイルス (Ad5luc1) および 5 型/3 型キメ

ラウイルス (Ad5/3luc1) を用いて既に作成が完了している。これらのウイルスは過去の報告に従って作成されている (K Takayama et al. Cancer Gene Ther. 2008)。Figure 1にシエーマを示す。



ウイルスの大量調整

上記のアデノウイルスはHEK293細胞を用いて大量培養を行う。凍結融解を繰り返して細胞を破砕した後上清をセシウム溶液に重層し、超遠心によってウイルスを分離する。さらにウイルス溶液をグリセロールを混和したリン酸緩衝液中で透析し、TCID50法でタイトル確認後に実験に使用する。(大学院生に依頼：中垣憲明1名)

良性疾患由来の臨床検体におけるGFP発現とルシフェラーゼ活性の測定

良性疾患由来の胸水および血液(全血)を0.3%、1%、3%になるように混和した疑似血性胸水を作製し、細胞成分を遠心分離する。細胞成分をPBS溶液中に混和し、上記のウイルスを定量的に感染させる。感染後48時間経過した後細胞融解液によって細胞を処理し、GFP蛍光陽性細胞の割合の算出および融解液の一部をルシフェリンと混和してその蛍光強度を専用の計測器で定量する。

癌細胞を含む臨床検体におけるルGFP発現とシフェラーゼ活性の測定

上記の良性胸水に各種肺癌細胞株を定量的に混和し、同様の方法によってGFP蛍光陽性細胞の割合の算出とルシフェラーゼ活性を定量する。肺癌細胞株は小細胞肺癌由来のSBC1、SBC5、NCI-N417、非小細胞肺癌由来のNCI-H157、A549、EBC-1、NCI-H460、NCI-H1299、PC-9を使用する。

肺癌由来の臨床検体におけるGFP発現とルシフェラーゼ活性の測定

肺癌患者由来の胸水を用いて同様の方法によってルシフェラーゼ活性を測定し、細胞診結果と比較検討する。

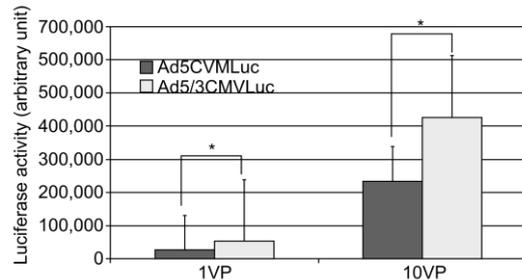
4. 研究成果

1) 培養肺癌細胞に対するアデノウイルスの

感染性

各種の改変アデノウイルス (Ad5/3CMVluc1、Ad5/3CMVGFP) については大量調整およびタイトル測定が完了した。また、肺癌細胞株 (H1299、H460、H157) を用いた感染実験において上記のウイルスによる遺伝子導入によりそれぞれ導入遺伝子の活性を確認した。従来より報告されているとおり、5型3型キメラウイルスは5型に比べて高い感染性を示した (H1299の結果についてはFigure 2参照)。

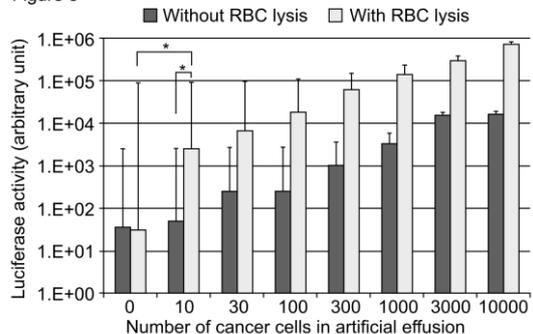
Figure 2



2) 疑似胸水を用いた癌細胞の検出感度

良性の胸水に培養癌細胞を定数混入した疑似癌性胸水を作成し、検出感度を測定した。血球成分が多数含まれる血性胸水の場合は、ルシフェラーゼ活性が非常に低く癌細胞の検出感度は1000個/mLであった。原因として赤血球によるウイルス感染の阻害が疑われたため、最初に赤血球融解処理を行った後にウイルス感染させることで検出感度の改善がみられた。最終的には癌細胞10個/mLまで感度を高めることができ、本法を用いて実際の臨床検体を用いた測定実験を行った。Figure 3に示すとおり、赤血球溶血処理をほどこすことで10個の癌細胞を混入した検体でコントロールと比較して有意なルシフェラーゼ活性の増加を認めた。

Figure 3



3) 臨床検体を用いた測定結果

実際に細胞診検査によって悪性胸腹水の確定診断を得られた症例、癌細胞を認めなかった症例、癌細胞を認めなかったものの臨床経過から悪性胸腹水と判断された症例についてそれぞれ検討を行った。その結果、本法による悪性胸腹水の診断精度は感度75%、特異度79%であり従来の細胞診検査と比較しても良好な結果を示した。一方で、細胞診検査では陽性を示しながら本法では検出できなかった症例や逆に明らかな良性疾患であるにもかかわらず本法で明らかに高いルシフェラーゼ活性を示す疾患を認めた。代表的な症例についてそれぞれ検体の種類、細胞診検査結果、臨床診断、本法によるルシフェラーゼ活性をTable 1に示す。

Sample#	Primary disease	Effusion	Cytological diagnosis	Clinical diagnosis	Luciferase activity
1	Ovarian cancer	Ascites	Positive	Malignant	9691850
2	Ovarian cyst	Ascites	Negative	Benign	8392006
3	Esophageal cancer	Ascites	Positive	Malignant	4973694
4	Lung cancer	Pleural effusion	Positive	Malignant	3367039
5	Hepatic cancer	Ascites	Negative	Malignant	1781689
6	Colon cancer	Ascites	Negative	Malignant	1502799
7	Ovarian cancer	Pleural effusion	Negative	Malignant	345152
8	Lung cancer	Pleural effusion	Negative	Malignant	323605
9	Breast cancer	Pleural effusion	Positive	Malignant	100029
10	Dermoid cyst	Ascites	Negative	Benign	30406
11	Lung cancer	Pleural effusion	Positive	Malignant	3636
12	CML	Pleural effusion	Positive	Malignant	1330
13	Ovarian cyst	Ascites	Negative	Benign	666
14	Pneumonia	Pleural effusion	Negative	Benign	524
15	Colon cancer	Ascites	Negative	Benign	488
16	Pulmonary tuberculosis	Pleural effusion	Negative	Benign	235
17	Heart Failure	Pleural effusion	Negative	Benign	166
18	Lung cancer	Pleural effusion	Suspicious	Benign	65
19	Heart Failure	Pleural effusion	Negative	Benign	63
20	Liver cirrhosis	Ascites	Negative	Benign	56
21	Renal Failure	Pleural effusion	Negative	Benign	52
22	Burkitt lymphoma	Pleural effusion	Positive	Malignant	45
23	Malignant mesothelioma	Pleural effusion	Negative	Malignant	37
24	Rectal cancer	Ascites	Negative	Benign	30
25	Pneumonia	Pleural effusion	Negative	Benign	23

感度を低下させる原因の一つは血液癌に合併した悪性胸腹水であり、これは当初より想定されていたとおり元来血液細胞に対してアデノウイルスの感染性が低いことによると考えられる。そのため、本法を用いる際には原疾患としての悪性細胞の種類については注意が必要である。一方、特異度を低下させる原因としては良性細胞に対するアデノウイルスの非特異的な感染が上げられる。Table 1に示すOvarian cystもしくはDermoid cystに伴う腹水検体にGFP発現アデノウイルスを感染させ、感染細胞の同定を試みた。赤血球については溶血処理を行って除去されているため、同検体に存在する細胞成分としては白血球および中皮細胞であった。蛍光顕微鏡下にGFPの発現

細胞とHE染色細胞を比較したところ、一部の中皮細胞に発現がみられ、同細胞への感染が非特異的なルシフェラーゼの活性増加につながっている可能性が示唆された。以上の結果をふまえて、今後さらに診断精度を向上させるためには腫瘍細胞でのみ特異的に活性化されるプロモーターの使用や、腫瘍細胞内で特異的に増殖する制限増殖型ウイルスの共感染等が有用な方法と思われる。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

中垣憲明、高山浩二、内野順治、出水みいる、久末順子、中西洋一、キメラ型アデノウイルスを用いた肺癌診断、第 50 回日本肺癌学会総会、2010

K. Takayama、Cancer Cell Detection using Modified Viral Vector、16th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology、2011

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山浩一 (TAKAYAMA KOICHI)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50274444

(2) 研究分担者

原田大志 (HARADA TAISHI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：10380619

出水みいる (IZUMI MIIRU)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：60336021

(3) 連携研究者

()

研究者番号：