

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659775

研究課題名(和文)腫瘍増殖型ウイルスを用いた血中循環がん細胞の検出と卵巣癌再発予測への応用

研究課題名(英文)Development of novel detection system of circulating tumor cells with tumor-specific replication adenovirus and its clinical application for predicting the recurrence of ovarian cancer

研究代表者

京 哲 (KYO, SATORU)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：50272969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では患者の血液検体に、GFP遺伝子を組み込んだテロメラーゼ特異的増殖型アデノウイルス(OBP-401)を感染させ、GFP発光する細胞を検出することで簡便に血中の循環癌細胞(Circulating Tumor Cell: CTC)を可視化して検出する技術を開発し、これを卵巣癌の再発モニタリング等に応用することを目的とした。偽陽性の主因である白血球による非特異的GFP発光を、CD45抗体2重染色にて除外する方法を確立し得た。実際の患者検体からも婦人科癌の約40%にCTC検出を認めた。CTC検出は治療効果判定マーカーとなるのみならず、予後マーカーとしても有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We established the novel detection system for circulating tumor cells (CTC) with telomerase-specific replication adenovirus in which GFP cDNA was integrated for GFP fluorescence. Infection of these viruses with 5ml of blood samples from the patients with gynecological cancers successfully identified CTC, while no CTC was detected in the samples from healthy volunteers. While the number or the presence of CTCs were not significantly correlated with clinicopathological characteristics, they were tightly related to the treatment outcome as well as the overall survival. Thus, the present study clearly found the clinical utility of this novel detection system for CTC.

研究分野：医歯薬学

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：CTC gynecological cancer ovarian cancer telomerase adenovirus GFP

### 1. 研究開始当初の背景

我々が開発したテロメレース特異的増殖型アデノウイルスは、テロメレースプロモーターの性質により癌細胞でのみ特異的に複製増殖する。この結果、このウイルスに感染した癌細胞はオートファジーを起こして死滅する。すなわちこのウイルスは癌治療に応用できる。我々はこのウイルスを OBP-301 と名付け、新たな癌治療薬として国際特許を取得し、米国での臨床試験 (FDA 承認済み: phase I/II study) に挑んできた。我々は OBP-301 をさらに発展させ、オワンクラゲ由来の遺伝子 GFP を組み込んで、複製時に蛍光を発するキメラウイルス OBP-401 を開発した。OBP-401 は癌細胞で特異的に増殖して蛍光により癌細胞をマーキングする。我々はこれを利用した生体内イメージングによるリンパ節転移診断法を開発してきた (*Nature Medicine* 12:1213-1219, 2006)。

### 2. 研究の目的

本研究はこの OBP-401 の特性に着目し、卵巣癌患者から採取した血液サンプルを OBP-401 に感染させ、蛍光を発する細胞を蛍光顕微鏡下に観察し、その発光様式や強度などの criteria を満たす細胞を CTC として計測し、卵巣癌患者の再発予測やモニタリングに応用出来るかどうかを検討する。

### 3. 研究の方法

CTC 検出のための予備実験として、癌細胞株を健常人ボランティアの血液 5ml に混入させた後に OBP-401 に感染させ、蛍光を発する細胞を蛍光顕微鏡下に観察し、その発光様式や強度などの criteria を満たす細胞を CTC として計測し、感度、特異度等を評価の上で至適条件を決定する。その条件で、実際の婦人科癌患者の血液 5ml を採取し、OBP-401 に感染させ CTC として検出する。CTC 検出数あるいは有無と臨床病理学的特徴の相関や生存率を解析の上で、CTC 検出の臨床的意義と再発リスク予測が可能性かどうかを検証する。

### 4. 研究成果

(1) 癌細胞株を健常人ボランティアの血液 5ml に混入させた予備実験から、CTC 検出のための至適ウイルス titer と incubation 時間等の条件を決定した。同条件で、健常人ボランティアの採血検体からは CTC は全く検出されなかった。婦人科癌患者からの血液検体では約 40% の患者に CTC を検出し得た。CTC の数あるいは有無と臨床病理学的特徴の間に有意な相関は認めなかった。

(2) 主治療前後の CTC の消長を各患者で検討したところ、手術あるいは抗癌剤が奏効した患者では例外なく CTC が消失したのに対し、治療が奏効しなかった患者では CTC が検出される例が認められた。CTC が治療後も検出された症例は全て主治療の効果としては progressive disease (PD) であった。治療後

に CTC が検出される症例と検出されない症例の生存率を比較解析したところ、治療後に CTC が検出される症例は有意に予後不良であった。

以上の結果から、本方法による CTC 検出報は治療効果の判定および予後の予測に有用である可能性が示唆された。再発の予測因子として使えるか否かに関しては現在 follow up 中の患者の症例数が十分ではなく、引き続き検討を続けている。

### 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 19 件)

1. Nakamura M, Takakura M, Fujii R, Maida Y, Bono Y, Mizumoto Y, Zhang X, Kiyono T and Kyo S.

The PRB-dependent FOXO1/IGFBP-1 axis is essential for progesterin to inhibit endometrial epithelial growth.

*Cancer Lett.* 査読有 336: 68-75, 2013.

2. Itoh F, Komohara Y, Takaishi K, Honda R, Tashiro H, Kyo S, Katabuchi H, Takeya M.

Possible involvement of signal transducer and activator of transcription-3 in cell-cell interactions of peritoneal macrophages and endometrial stromal cells in human endometriosis.

*Fertil Steril.* 査読有 99:1705-1713, 2013.

3. Zhou K, Koike C, Yoshida T, Okabe M, Fathy M, Kyo S, Kiyono T, Saito S, Nikaido T.

Establishment and Characterization of Immortalized Human Amniotic Epithelial Cells.

*Cell Reprogram.* 査読有 15: 55-67, 2013.

4. Kyo S.

Endometrial cancer stem cells: Are they a possible therapeutic target?

- Curr. Obstet. Gynecol. Rep.* 査読有 2:1-10, 2013.
- 5 . Yokoyama T, Enomoto T, Serada S, Morimoto A, Matsuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Kyo S, Iwahori K, Fujimoto M, Kimura T and Naka T. Plasma Membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer. *Int. J. Cancer.* 査読有 132: 472-484, 2013.
- 6 . Teng Z, Yoshida T, Okabe M, Toda A, Higuchi O, Nogami M, Yoneda N, Zhou K, Kyo S, Kiyono T, Nikaido T. Establishment of Immortalized Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* 査読有 22: 267-278, 2013.
- 7 . Takakura M, Kyo S, Nakamura M, Maida Y, Mizumoto Y, Bono Y, Zhang X, Hashimoto Y, Urata Y, Fujiwara T and Inoue M. Circulating tumor cells detected by a novel adenovirus-mediated system may be a potent therapeutic marker in gynecologic cancers. *Br. J. Cancer.* 査読有 107: 448-454, 2012
- 8 . Shinohara A, Kutsutake M, Takahashi M, Kyo S, Tachikawa E and Tamura K. Protease-activated receptor-stimulated interleukin-6 expression in endometriosis-like lesions in an experimental mouse model of endometriosis. *J. Pharmacol. Sci.* 査読有 19: 40-51, 2012.
- 9 . Kyo S, Takakura M, Nishida S, Ozaki S, Oda M and Inoue M. Massive hemothorax due to diaphragmatic endometriosis after a laparoscopic cystectomy of an ovarian endometrioma in a patient without a history of thoracic endometriosis. *Arh. Gynecol. Obstet.* 査読有 286: 411-414, 2012.
- 10 . Bono Y, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Nomura K, Kiyono T and Inoue M. Creation of immortalized epithelial cells from ovarian endometrioma. *Br. J. Cancer.* 査読有 103: 1205-1213, 2012.
- 11 . Mita S, Shimizu Y, Notsu T, Imada K, Kyo S. Dienogest inhibits Toll-like receptor 4 expression induced by co-stimulation of lipopolysaccharide and high-mobility group box 1 in endometrial epithelial cells *Fertil. Steril.* 査読有 96:1485-1489, 2011.
- 12 . Ohno S, Takano F, Ohta Y, Kyo S, Myojo S, Dohi S, Sugiyama H, Ohta T, Inoue M. Frequency of myeloid dendritic cells can predict the efficacy of wilms' tumor 1 Peptide vaccination. *Anticancer Res.* 査読有 31:2447-2452, 2011.
- 13 . Dohi S, Ohno S, Ohno Y, Takakura M, Kyo S, Soma G, Sugiyama H, Inoue M. WT1 Peptide Vaccine Stabilized Intractable Ovarian Cancer Patient for One Year: A Case Report. *Anticancer Res.* 査読有 31:2441-2445, 2011.
- 14 . Kyo S, Maida Y and Inoue M. Stem cells in endometrium and endometrial cancer:

- Accumulating evidence and unresolved questions. Review article.  
*Cancer Letters* 査読有 308: 123-133, 2011.
15. Ohno S, Sumiyoshi Y, Hashine K, Shirato A, Kyo S, and Inoue M.  
Phase I Clinical Study of the Dietary Supplement, *Agaricus blazei* Murill, in Cancer Patients in Remission.  
*Evid Based Complement Alternat Med*, 査読有 vol. 2011, Article ID 192381, 9 pages, 2011.  
doi:10.1155/2011/192381
16. Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H and Inoue M.  
Activation of NF- B is a novel target of *KRAS*-induced endometrial carcinogenesis.  
*Clin. Cancer Res.* 査読有 17: 1341-1350, 2011.
17. Mori N, Kyo S, Nakamura M, Hashimoto M, Maida Y, Mizumoto Y, Takakura M, Ohno S, Kiyono T, Inoue M.  
Expression of HER-2 affects patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer.  
*Br. J. Cancer*, 査読有 103: 889-898, 2010. Expression of HER2
18. Shimizu Y, Mita S, Takeuchi T, Notsu T, Mizuguchi K, Kyo S.  
Dianogest, a synthetic progestine, inhibits prostaglandin E2 production and aromatase expression by human endometrial epithelial cells in a steroid culture system.  
*Steroids*, 査読有 76:60-67, 2011.
19. Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M, Miyake M, Sakamoto M and Inoue M.  
Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth.  
*Clin.Cancer Res.* 査読有 17: 525-537, 2011.
- 〔学会発表〕(計6件)
1. サイトメトリーの進歩と細胞診断学への応用  
高倉正博、京 哲、中村充宏、毎田佳子、水本泰成、保野由紀子、井上正樹、藤原俊義、浦田泰生  
テロメラゼ特異的増殖型ウイルスを用いた末梢血中腫瘍細胞の検出・単離と遺伝子解析  
第 51 回日本臨床細胞学会・ワークショップ  
平成 24 年 11 月 10 日 新潟市
2. 子宮頸癌における腫瘍特異的増殖型アデノウイルス末梢血中腫瘍細胞の単離と遺伝子解析  
高倉正博、京 哲、中村充宏、毎田佳子、水本泰成、保野由紀子、張英智、藤原俊義、井上正樹  
第 71 回日本がん学会学術総会  
平成 24 年 9 月 19 日 札幌市
3. 子宮頸癌症例における末梢血中腫瘍細胞の単離と遺伝子解析  
高倉正博、京 哲、中村充宏、毎田佳子、水本泰成、保野由紀子、張秀智、藤原俊義、浦田泰生、井上正樹  
第 11 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会  
平成 24 年 6 月 22 日 日光市
4. 子宮頸癌における末梢血中腫瘍細胞の単離と単一細胞からの遺伝子解析  
高倉正博、京 哲、中村充宏、毎田佳子、

水本泰成、保野由紀子、井上正樹  
第 64 回日本産科婦人科学会総会学術講  
演会

平成 24 年 4 月 13 日 神戸市

- 5 . 婦人科癌における GFP 発現テロメラーゼ  
特異的増殖型アデノウイルスを用いた  
末梢血中腫瘍細胞の検出

金沢大学 産婦人科

高倉正博、京 哲、中村充宏、毎田佳子、  
森紀子、水本泰成、保野由紀子、張秀智、  
井上正樹

第 70 回日本癌学会学術総会

平成 23 年 10 月 3 日 名古屋市

- 6 . GFP 発現テロメラーゼ特異的増殖型アデ  
ノウイルスを用いた末梢血中腫瘍細胞  
の検出

金沢大学 産婦人科

高倉正博、京 哲、中村充宏、毎田佳子、  
水本泰成、保野由紀子、井上正樹

第 28 回日本臨床細胞学会北陸支部連合  
学術集会

平成 23 年 9 月 4 日 金沢市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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

京 哲 (SATORU KYO)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：50272969

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：