

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462478

研究課題名(和文) 播種性癌細胞を検出・分離する新技術の開発とその応用基盤の確立

研究課題名(英文) Development of a novel technique for the detection and isolation of disseminated cancer cells, and establishment of its application foundation

研究代表者

植木 英雄 (UEKI, HIDEO)

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：90537218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、岡山大学で開発された新規遺伝子発現システムを用いて蛍光蛋白を発現させ、播種性尿路性器癌を検出する体外診断技術の実用化に向けた基盤的研究を実施することである。当該システムによる遺伝子発現を各種細胞で調査した結果、癌細胞特異的に遺伝子発現を高めることを確認した。また、浮遊癌細胞を含む血液を模した培養液中の細胞成分に、当該システムによるGFP遺伝子発現プラスミドを導入することで、癌細胞の検出・識別が可能であった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to conduct foundational research for development of a novel technique for the detection and isolation of disseminated cancer cells with our original gene expression systems. The reporter gene, GFP expression under the system was investigated in various cancer and normal cells and it was confirmed that the system can increase the cancer cell-specific gene expression. It was also confirmed that the GFP encoding plasmid system allowed in vitro selective visualization of floating human cancer cells in mixed cell culture containing 10000-fold more normal blood cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：腫瘍 細胞検出

1. 研究開始当初の背景

岡山大学では、日本で初めて前立腺癌に対する遺伝子治療の臨床試験を開始して以来、その実績を加速度的に集積してきた。癌遺伝子治療では、癌細胞特異的に治療遺伝子を発現させることが重要となるが、癌特異的プロモーター活性の弱さは治療上大きな問題である。癌特異性を保ちつつプロモーター活性を上昇させる手段として、GAL4-VP16 融合蛋白を用いた two step transcription activation (TSTA) system (Lyer et al. Proc Natl Acad Sci U S A., 98:14595-600, 2001) があるが、TSTA システムでは逆に転写活性を減少させる癌細胞もあることが確認されている。そこで、我々は広範囲な癌細胞に適応できるよう hTERT プロモーターを使用すると同時に、転写活性を上昇させるようグルコシルチコイドレセプターとポリグルタミンを組み合わせたモチーフ (Gerber HP et al. Science., 263:808-11, 1994) を TSTA 内部に挿入することで転写活性を飛躍的に高めた改良型 TSTA を開発した。

我々は、このシステムの、癌特異的かつ転写活性を飛躍的に高める点、および広範囲な癌細胞に適応できる点に着目し、安全性の高いプラスミドを導入することで、転移に関係すると言われる血液や尿中に遊離した癌細胞を検出する新技术に活用できると考えた。癌は転移すると患者の予後が非常に悪くなることから、転移の可能性を早期に判断することが重要であるが、血清腫瘍マーカー検査や CT スキャンなどの既存の転移検査は、いずれも転移巣が一定のサイズ以上でないと検出できず、早期の診断は困難である。血液中に遊離したごくわずかな生きた癌細胞を強力に発光・ラベルさせる本技術は、幅広い癌種について、癌転移の可能性を今まで以上に早期に正確に予測できる診断法につながるものと考えられる。また、本技術の確立により、生きたまま遊離癌細胞を採取してセルラインとして樹立することが可能となる。遊離癌細胞と原発巣の癌細胞とを比較することができれば、患者の予後診断、新規転移関連マーカーの探索を行って癌ワクチン等への応用も考えられる。

これまでに行われた研究の最新の知見を元に、さらに新規の遺伝子高発現システム SGE が開発された。広範囲な癌細胞に適応できるよう、このシステムにも hTERT プロモーターを使用し、hTERT-SGE システムを作成した。まずは、この新規システムが改良型 TSTA と同様に遊離癌細胞を検出する新技术に有用であるかを検討することが必要であると見え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究課題の最終的な目的は、播種性尿路

性器癌を検出する体外診断技術の実用化と、浮遊癌細胞を分離しセルライン化する技術の開発である。

このためにまず、岡山大学で開発された新規の癌特異的遺伝子高発現システム hTERT-SGE について、これらの技術開発に関する有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現の高効率化の調査

改良型 TSTA システム及び hTERT-SGE システムを用いて作成した GFP 発現プラスミドと従来の hTERT プロモーターや開発段階の新システムの候補となるプロモーターを持つプラスミドを、hTERT 活性の高い HEK293 細胞にトランスフェクションして、GFP 遺伝子の発現強度を比較した。一過性遺伝子発現のためのトランスフェクションには、FuGENE HD 試薬 (Promega 社) を用いた。蛍光顕微鏡での観察および、ウエスタンブロット法により遺伝子発現強度の解析を行った。

(2) 癌特異性の確認

hTERT-SGE システムを用いて作成した GFP 発現プラスミドをトランスフェクションして、ヒトの各種癌細胞 (HeLa, PC3, HepG2, HCT116, MCF7) および正常細胞 (OUMS24, MCF7) における GFP 遺伝子の発現強度を比較した。一過性遺伝子発現のためのトランスフェクションには、FuGENE HD 試薬 (Promega 社) を用いた。蛍光顕微鏡で GFP 発現を観察した。また、ウエスタンブロット法により、telomerase および GFP の発現強度の解析を行い、当該システムの癌特異的発現について調査した。

また、各細胞の hTERT 活性を調べるために、TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (SIGMA-ALDRICH 社) を使って、telomerase 活性を測定することも行った。

(3) 浮遊癌細胞の検出実験

まず、浮遊癌細胞を含む血液を模した培養液を作成する。あらかじめ癌細胞 (HeLa) を色素 CellTracker Orange CMTMR Dye (ThermoFisher SCIENTIFIC 社) で標識する。この色素標識した癌細胞を、培養中のヒト末梢血単核細胞 (PBMC) に段階的に希釈して浮遊させた。こうして作成した培養液中の細胞成分に、プレート上で hTERT-SGE システムを用いて作成した GFP 発現プラスミドを導入した。一過性遺伝子発現のためのトランスフェクションには、FuGENE HD 試薬 (Promega 社) を用いた。翌日、細胞の状態を蛍光顕微鏡で観察し、血液細胞中に各割合で含まれる癌細胞

胞が検出できるかを調査した。

4. 研究成果

従来の hTERT プロモーターや、hTERT-SGE システムを使った GFP 遺伝子発現ベクターを作製し、これらを hTERT 活性の高い細胞に導入して、遺伝子の発現強度を比較した。その結果、新システムの候補となるものの中で、hTERT-SGE システムが、癌細胞において目的発現遺伝子の転写活性を最も高めることを確認した。

また、ヒトの各種癌細胞および正常細胞での hTERT-SGE システムによる遺伝子発現を調査した結果、正常細胞では、検出できないレベルであるのに対し、癌細胞では強いシグナルが検出された。すなわち、当該システムが癌特異的プロモーター活性を持つことを確認した。

浮遊癌細胞の検出実験では、あらかじめ色素で標識したため、多くの末梢血単核細胞の中に存在する癌細胞を識別できるが、そのほとんどで GFP の発現が見られた。癌細胞：末梢血単核細胞 = 1:10000 の割合であっても、GFP 発現細胞を検出することで、癌細胞を識別することが可能であった。

これらのことから、尿路性器癌の早期診断、転移の可能性を早期に検出する体外診断技術の実用化に、hTERT-SGE システムが有用であることが明らかになった。血中循環癌をプラスミドを用いてリアルタイムに検出する方法は、現在のところ確立されておらず、これを可能にする新規 SGE システムは、改良型 TSTA システムとともに、非常に価値のあるものと言える。

本研究によって課題の原理的な実現性は実証できたと考える。今後は、改良型 TSTA システムとともに体外診断法の実用化に向けた実験と、セルライン化等のそれ以外の応用技術の開発についてもさらに進展を図りたい。

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 6 件)

Tumor suppressor REIC/DKK-3 and co-chaperone SGTA: Their interaction and roles in the androgen sensitivity.

査読有り

Ochiai K, Morimatsu M, Kato Y, Ishiguro-Oonuma T, Udagawa C, Rungsuriyawiboon O, Azakami D, Michishita M, Ariyoshi Y, Ueki H, Nasu Y, Kumon H, Watanabe M, Omi T.

Oncotarget. 2016 Jan 19;7(3):3283-3296.

doi: 10.18632/oncotarget.6488.

A vaccine strategy with multiple prostatic acid phosphatase-fused cytokines for prostate cancer treatment.

査読有り

Fujio K, Watanabe M, Ueki H, Li SA, Kinoshita R, Ochiai K, Futami J, Watanabe T, Nasu Y, Kumon H.

Oncol Rep. 2015 Apr;33(4):1585-1592.

doi: 10.3892/or.2015.3770.

Significant association between the Axin2 rs2240308 single nucleotide polymorphism and the incidence of prostate cancer.

査読有り

Ma C, Liu C, Huang P, Kaku H, Chen J, Guo K, Ueki H, Sakai A, Nasu Y, Kumon H, Shimizu K, Watanabe M.

Oncol Lett. 2014 Aug;8(2):789-794.

Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene.

査読有り

Sakaguchi M, Watanabe M, Kinoshita R, Kaku H, Ueki H, Futami J, Murata H, Inoue Y, Li SA, Huang P, Putranto EW, Ruma IM, Nasu Y, Kumon H, Huh NH.

Mol Biotechnol. 2014 Jul;56(7):621-30.

doi: 10.1007/s12033-014-9738-0.

A novel gene expression system strongly enhances the anticancer effects of a REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector.

査読有り

Watanabe M, Sakaguchi M, Kinoshita R, Kaku H, Ariyoshi Y, Ueki H, Tanimoto R, Ebara S, Ochiai K, Futami J, Li SA, Huang P, Nasu Y, Huh NH, Kumon H.

Oncol Rep. 2014 Mar;31(3):1089-1095.

doi: 10.3892/or.2013.2958.

Cancer stem cell-like characteristics of a CD133+ subpopulation in the J82 human bladder cancer cell line.

査読有り

Huang P, Watanabe M, Kaku H, Ueki H, Noguchi H, Sugimoto M, Hirata T, Yamada H, Takei K, Zheng S, Xu K, Nasu Y, Fujii Y, Liu C, Kumon H.

Mol Clin Oncol. 2013 Jan;1(1):180-184.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植木 英雄 (UEKI Hideo)

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：90537218

(2) 研究分担者

那須 保友 (NASU Yasutomo)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

授

研究者番号：20237572

(3) 連携研究者

なし