

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670649

研究課題名(和文) 循環血液中の悪性骨軟部肉腫細胞をターゲットにした新規予後・再発マーカーの開発

研究課題名(英文) Investigation of new biomarker against circulating tumor cell of sarcoma

研究代表者

町田 崇博 (Machida, Takahiro)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：50644382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：緑色蛍光を呈するテロメラーゼ依存増殖型アデノウイルス(OBP-401, OBP-1101)を用いた血中循環腫瘍細胞(CTC)検出が、骨軟部肉腫患者において有用な新規バイオマーカーとなるかを検討した。悪性骨軟部肉腫患者の55人に対してOBP-401では11/22例(50%)、OBP-1101では2/33(6%)でCTCが検出された。また5種類の骨軟部肉腫細胞株を用いてCTC実験モデルを作成し比較検討したところ、同等のCTC検出度を示した。CTCから腫瘍特異的な遺伝子変異を増幅させ、CTCとして検出された細胞が実際に腫瘍細胞かの確認を試みたが、技術的に困難であった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the usefulness of telomerase specific oncolytic adenovirus containing the green fluorescent protein (GFP), which are OBP-401 or OBP-1101, to detect circulating tumor cells of sarcoma as a new biomarker. 55 sarcoma patients were examined, and CTCs were detected in 11 of 22 patients (50%) with OBP-401 and 2 of 33 patients (6%) with OBP-1101. We compare OBP-401 and OBP-1101 in CTC experimental model with 5 types of sarcoma cell lines, but two virus showed same detection rate. We identified whether CTCs are really tumor cells or not by proliferate the tumor specific genome with PCR, but it was impossible due to technical difficulty.

研究分野：整形外科

キーワード：oncolytic adenovirus circulating tumor cell sarcoma biomarker

1. 研究開始当初の背景

予後予測や再発の指標として腫瘍マーカーなどのバイオマーカーが上皮系悪性腫瘍において一般的に測定されているが、骨軟部肉腫における有用なバイオマーカーはいまだ存在しない。近年、circulating tumor cells(以下 CTC)が予後予測や再発マーカーとして注目されている。我々は以前の研究で上皮系腫瘍における GFP 搭載テロメラーゼ制限増殖型アデノウイルス (OBP-401) を使用した CTC の検出系を確立している。そこで今回同ウイルスによる CTC の検出系が骨軟部肉腫にも応用可能か臨床検体も用いて検討した。

2. 研究の目的

OBP-401 を用いた CTC 検出系を骨軟部肉腫患者に応用し、骨軟部肉腫における予後予測因子として同検出系が利用可能か検証することを目的とした。

また OBP-401 に miRNA を搭載し、より CTC への特異度を高めたウイルスである OBP-1101 を OBP-401 と比較し、CTC 検出系においてどちらがより有用であるかも検討した。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体における CTC 検出と予後

同意の得られた骨軟部肉腫患者 55 例を対象とした。同患者から血液検体を 1 回 7.5ml 採取し、溶血処理後の細胞成分にウイルスを感染させ、24 時間後に GFP により緑色に発光した細胞を GFP 陽性細胞として検出した。さらに GFP 陽性細胞のうち白血球等を除外するため CD45 および Vimentin で多重染色を行い、GFP 陽性、CD45 陰性、Vimentin 陽性を示す細胞を CTC とした。検体採取は CTC が検出された患者においては可能な限り複数回行い、CTC 数の経過と予後との関連を観察した。

今回の研究中に OBP-401 により GFP 陽性であるが CTC ではない細胞が多く検出されたため、ファイバー改変を行い CAR によらない細胞感染と、miRNA を搭載し血球細胞内での増殖をより制限した OBP-1101 を開発し、OBP-1101 による CTC 検出系の検討も行った。臨床検体の前半 22 例は OBP-401 を、後半 33 例は OBP-1101 を用いて CTC の検出を行った。

(2) 骨軟部肉腫に対する CTC 検出系の最適なウイルスの検討

健常者ボランティア 5 人より血液 15ml を採取し、7.5ml x 2 本に分注、それぞれに骨軟部肉腫の cell line 5 種、SY0-1 (滑膜肉腫)、NMFH (悪性線維性組織球種)、EPS (類上皮肉腫)、SK-ES-1 (ユーイング肉腫)、143B (骨肉腫) を 1.0×10^4 個混入させ、CTC 血液モデルを作成した。これらに対して OBP-401 と OBP-1101 をそれぞれ感染させ CTC 検出を行った。また OBP-401 の細胞への感染侵入経路となる coxackie-adenovirus receptor (CAR) の発現と hTERT 活性を相対的に測定し、CAR や hTERT 活性と CTC 検出における関連性

を検討した。

(3) 特異的遺伝子変異を有する肉腫における、検出された CTC からの遺伝子同定

実際に CTC が検出された滑膜肉腫患者由来の CTC を用い、細胞から RNA を抽出し滑膜肉腫に特異的な遺伝子変異である SYT/SSX の primer を用いて PCR を行い、腫瘍特異的な融合遺伝子の検出が可能かどうか検討した。

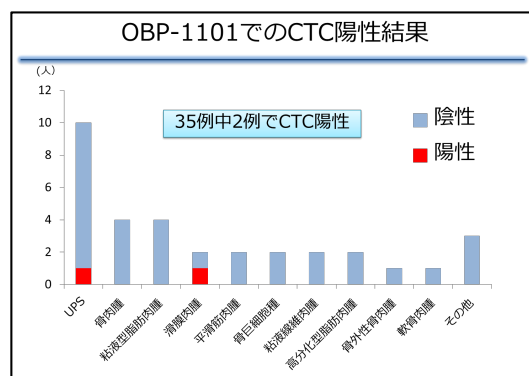
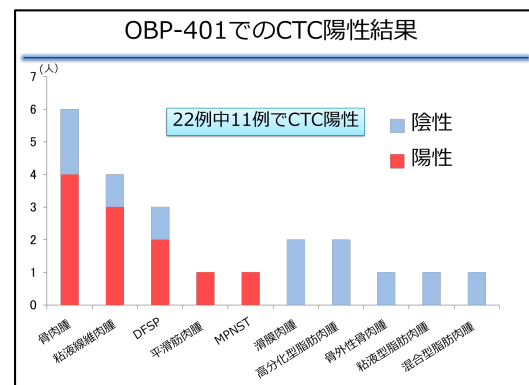
4. 研究成果

(1) 臨床検体における CTC 検出と予後

OBP-401、OBP-1101 により CTC 陽性と判定された患者はそれぞれ 22 例中 11 例 (50%)、33 例中 2 例 (6%) であった。そのうち測定された CTC 数は OBP-401、OBP-1101 それぞれ 1-17 個、1 個のみであった。初回採血時にすでに原発巣以外への転移を認めた症例は OBP-401 群で 2 例、OBP-1101 群で 4 例あったが、そのうち CTC 陽性症例は OBP-401 群 1/2 例 (50%)、OBP-1101 群 0/4 例 (0%) であった。また経過中に、新規転移を起こした症例はそれぞれ 7 例、3 例であったが、初回採血時 CTC が陽性であった症例はそれぞれ 4/7 例 (57%)、0/3 例 (0%) であった。

また OBP-401 群の 1 例において頻回な CTC フォローを行ったが、術後化学療法に抵抗性であり再発を起こした。CTC 数の経過としては術前 2 個、術後 0 個、初回化学療法終了後 2 個、2 回目化学療法後 5 個と上昇し、その後再発を認め、再発に伴い CTC 数が上昇した。

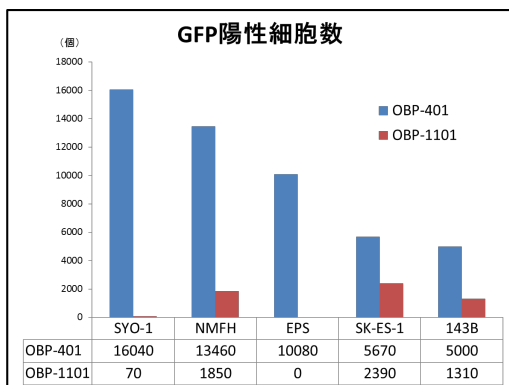
これらの結果から OBP-401 は臨床において予後予測因子として有用なバイオマーカーとして期待できることが示唆された。



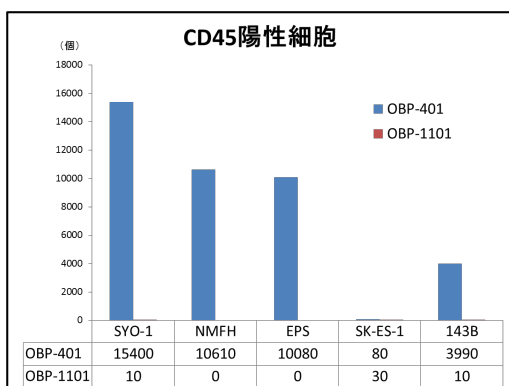
(2) 骨軟部肉腫に対する CTC 検出系におけるウイルスの比較検討

GFP 陽性細胞が数多く存在したため実際の解析は採取血液の 1/10 の細胞を解析した。

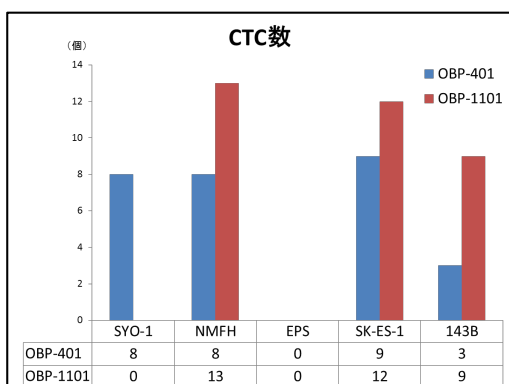
OBP-401 による GFP 陽性細胞数は SYO-1、NMFH、EPS、SK-ES-1、143B においてそれぞれ 16040、13460、10080、5670、5000 個であった。OBP-1101 による GFP 陽性細胞数はそれぞれ 70、1850、0、2390、1310 個であった。



GFP 陽性細胞をさらに CD45 により標識し、CD45 陽性細胞を検出した。OBP-401 による CD45 陽性細胞数は SYO-1、NMFH、EPS、SK-ES-1、143B においてそれぞれ 15400、10610、10080、80、3990 個であった。また OBP-1101 による CD45 陽性細胞数はそれぞれ 10、0、0、30、10 個であった。



さらに Vimentin により細胞を染色し CTC を同定した。OBP-401 を用いた CTC 検出系で最終的に CTC と判定されたものはそれぞれ 8、8、0、9、3 個であった。OBP-1101 を用いた CTC 検出系で最終的に CTC と推定されたものはそれぞれ 0、13、0、12、9 個であった。

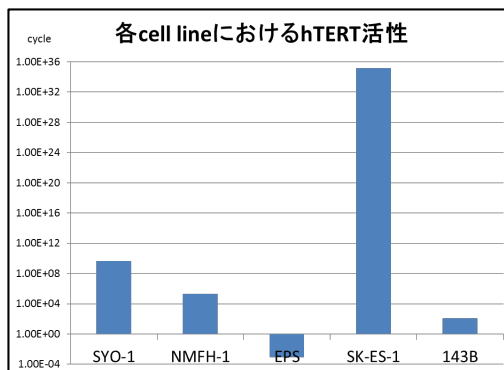
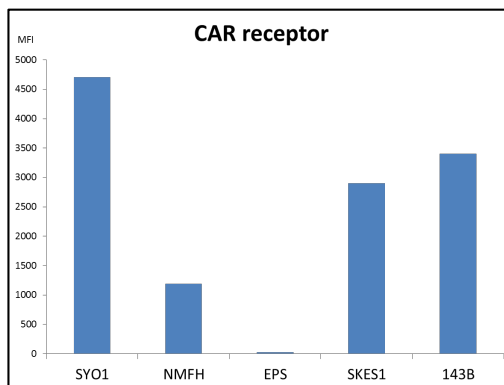


OBP-401 において問題となっていた CD45 陽

性細胞（白血球による GFP 陽性細胞）は OBP-1101 により減少した。最終的な CTC 数を考えると OBP-1101 により CTC 特異性が上がったと考えられた。

また各 cell line における CAR の発現は、EPS において CAR 発現を認めなかったがほかの 4 種の cell line については発現を認めた。

hTERT 活性については EPS、143B において活性が低い傾向にあった。



CTC と CAR 発現、hTERT の関連性について、EPS は CTC とされた細胞が検出されなかった。EPS は CAR 発現のほとんど見られない細胞であり、hTERT 活性も低い。OBP-401 により GFP 陽性細胞は多数検出されるが、そのほとんどが CD45 陽性細胞であり、白血球と推定される。また hTERT 活性の低い場合、細胞内にウイルスが感染してもどちらのウイルスにおいても増殖することができず GFP 陽性とならない。これらのことより EPS などの CAR 発現および hTERT 活性ともに低い骨軟部肉腫においてはどちらのウイルスもバイオマーカーとしての利用は難しいことが示唆された。

また SYO-1 において OBP-401 では CTC が 8 個検出されたが、OBP-1101 では検出されなかった。OBP-1101 では白血球特異的な miRNA によりウイルス増殖を制御しているが、この miRNA が腫瘍細胞内に存在し、OBP-1101 の増殖が細胞内で抑制された可能性が考えられた。

(3) 特異的遺伝子変異を有する肉腫における、検出された CTC からの遺伝子同定

臨床検体から得られた CTC として同定された細胞を用いて、細胞から RNA を抽出することが技術的に困難であった。今後細胞数を増

やすなどの実験を行い少数の細胞から RNA 抽出可能となるように実験を継続する予定である。

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)

長谷井 嬢, 尾崎 修平, 山川 泰明, 大森敏規, 武田 健, 国定 俊之, 浦田 泰生, 藤原俊義, 尾崎 敏文
肉腫患者における血中循環腫瘍細胞(CTC)の検出と臨床経過との相関
第 87 回日本整形外科学会学術総会
神戸 2014.5.22-25

長谷井 嬢, 尾崎 修平, 山川 泰明, 武田健, 国定 俊之, 浦田 泰生, 藤原 俊義, 尾崎敏文
肉腫患者におけるGFP搭載テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス OBP-401を用いた血中循環腫瘍細胞(CTC)の検出
第28回日本整形外科学会基礎学術集会
千葉 2013.10.17-18

〔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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

町田 崇博 (MACHIDA, Takahiro)
岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：50644382

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

山川 泰明 (YAMAKAWA, Yasuaki)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：90636953