

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592944

研究課題名(和文)新規抗癌ウイルス製剤を用いた末梢循環腫瘍細胞の検出の検討

研究課題名(英文)Detection of carcinoma cells in peripheral circulation by oncolytic virus therapy

研究代表者

鎌谷 宇明(Kamatani, Takaaki)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：00315003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、テロメア伸長酵素であるhTERT遺伝子と緑色蛍光蛋白質のGFP遺伝子を組み込んだアデノウイルスであるテロメスキャンを利用して末梢循環腫瘍細胞の検出について研究を行った。採血した末梢血中に口腔扁平上皮癌細胞を混ぜてテロメスキャンを感染させ、蛍光発光をさせることは可能であったが、SCCAやEGFRのmRNA遺伝子発現や蛋白発現との比較を行ったところ、蛍光発光との間に十分な相関はみられなかった。この原因として、培養条件や細胞の保存状態、ウイルスの感染効率等が考えられた。しかしこれらの結果から血液中で、口腔扁平上皮癌細胞が一定期間存在しうる可能性について示唆することができると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the detection of peripheral circulating tumor cells by an adenovirus included the GFP gene and the hTERT gene infected to oral carcinoma cells in circulating tumor cell model. Although we could confirm fluorescence in oral carcinoma cells, there were no relation between fluorescence and mRNA expression or protein expression. These results indicated that oral carcinoma cells would be circulate in peripheral blood flow in a certain period.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：社会歯学

キーワード：口腔癌

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の遠隔転移の制御は、所属リンパ節転移の制御とともに極めて重要な予後因子である。特に進行癌の予後成績は改善されておらず、早期に転移を発見、治療することが急務となっている。癌細胞は脈管内に浸潤することで血行転移が生じ、遠隔転移の可能性が高くなる。現在、超音波エコー、造影CT検査、造影MR検査、PET-CT検査等により、癌の再発や転移に対して評価を行っているが、検出感度に限界があり、より高精度の検出方法の開発が急務となっている。末梢循環血液中の癌細胞を早期に容易で低侵襲な方法で検出することが可能となると転移の早期の発見の可能性の増大、治療方針の選択に有用な情報となるばかりでなく、転移の可能性の予測も可能となり得る。

2. 研究の目的

これまで、我々の研究グループでは Green Fluorescent Protein(GFP)遺伝子を導入した口腔扁平上皮癌細胞を用いて、血中に循環している癌細胞モデルを作成し、腫瘍マーカーである SCCA 及び EGFR 遺伝子について、RT-PCR 法にて増幅することで癌細胞を検出する方法について癌細胞の蛍光発光強度と比較をしながら研究を行ってきた。しかし、末梢循環血液中の癌細胞を検出することは可能であるも、その感度および特異度が低く、実用化するにはまだ解決すべき多くの課題が残存している状況であった。そこで、我々はテロメラーゼ活性に依存して選択的に癌細胞内で増殖することができるウイルス製剤を応用し、癌細胞を特異的に可視化することができるように研究を行った。

3. 研究の方法

テロメラシンは、アデノウイルスの E1 領域を取り除き、テロメア伸長酵素である human telomerase reverse transcriptase

(hTERT) 遺伝子のプロモーター領域と E1A+internal ribosome entry site (IRES)+E1B の各遺伝子を組み込んだもので、hTERT 遺伝子のプロモーターにより E1A と E1B とが発現し、癌細胞のみで選択的にアデノウイルスの DNA が増殖することができる。テロメラシんに GFP 遺伝子を組み込んだ OBP-401(テロメスキャン®)により、末梢循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) の検出が可能か否か研究を行った。研究期間内には主に、採血した血液中に口腔扁平上皮癌細胞を混和し、テロメスキャンを感染させ、選択的に可視化させることで、本方法の検出限界について検討する。実際の口腔癌患者の末梢血を採血し、テロメスキャンによる CTC の検出を行い、SCCA, EGFR の mRNA による癌細胞の検出感度や特異度との比較や相関を検討することを行った。

4. 研究成果

平成 23 年度には、in vitro における口腔扁平上皮癌細胞内でのテロメスキャンの選択的増殖の可能性についての研究と癌細胞を蛍光発光させその可視化を可能にする高感度蛍光検出システムの開発のための基礎研究を行った。口腔扁平上皮癌細胞とヒト口腔粘膜正常細胞にテロメスキャン®を感染させ、そのウイルス増殖能について E1A 配列に対するプライマーを使用したリアルタイム PCR 法で測定した。さらに抗 E1A 抗体を用いた免疫染色やウエスタンブロッティングによる E1A 蛋白の発現を検索した。その結果、リアルタイム PCR 法で E1A 配列の遺伝子を増殖させることは成功した。また、免疫染色による E1A の発現や、ウエスタンブロッティングによる蛋白の発現を確認することは可能であった。しかし、免疫染色では一部の癌細胞でのみ確認することができたものの、ウエスタンブロッティング法による検出結果とリアルタイム PCR 法

での結果、さらに免疫染色での結果を比較すると、その一貫性や相関が十分に得られなかった。

平成 24 年度には、末梢循環腫瘍細胞モデルを確立させること、さらに前年度に引き続き、ウイルス製剤を用いた癌細胞の選択的可視化について研究を進めた。ボランティアである健康な成人から末梢血を採血し、そこへ口腔扁平上皮癌細胞を混和することで、末梢循環腫瘍細胞モデルとして 7 日間培養した。培養口腔癌細胞にテロメスキャン®を感染させて、高感度冷却 3 CCD カメラにて、その後 3 日間観察した。その結果、テロメスキャンに感染した癌細胞の蛍光を確認することはできた。しかし、癌細胞の数と蛍光強度との間に相関が十分に認められず、この原因として感染効率や培養癌細胞の状態、また癌細胞内でのウイルス内の遺伝子の発現について検討の余地があると考えられた。

口腔癌患者の血液中の末梢循環腫瘍細胞の検出限界に関しては、GFP 陽性細胞である末梢循環腫瘍細胞の数と原発巣の大きさやリンパ節転移、遠隔転移による Stage 分類との比較検討を行った。しかし、Stage 分類と末梢循環腫瘍細胞との相関関係は十分に得られなかった。原因として採血してからの保存状態による末梢循環腫瘍細胞の状態、ウイルスの感染効率等が考えられたが、その原因探求までには至らなかった。

平成 25 年度には、原発の腫瘍細胞と末梢循環腫瘍細胞へのテロメスキャン®の感染率と遺伝子の発現について、GFP 発現強度により比較検討した。テロメスキャン®が感染した両細胞に対して、SCCA、EGFR の mRNA 発現について RT-PCR 法で検討した。いずれの細胞においても遺伝子発現は確認することができたが、Stage 分類と末梢循環腫瘍細胞における遺伝子発現について、相関を示唆させるだけの実験データが得ら

れなかった。

以上より、本研究では、テロメア伸長酵素である hTERT 遺伝子と GFP 遺伝子を組み込んだアデノウイルスである OBP-401 (テロメスキャン®) を利用して末梢循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell:CTC)の検出について研究を行った。口腔扁平上皮癌細胞内でテロメスキャンを感染させ、蛍光発光をさせることは可能であったものの、SCCA や EGFR の mRNA 遺伝子の発現や蛋白の発現との比較を行って見たところ、その蛍光発光と遺伝子発現や蛋白発現との相関に十分な結果は得られなかった。これらの原因として、培養条件やその後の保存状態、さらにウイルスの感染効率等が考えられた。しかし、その原因を探索するまでには至らなかった。これらの結果から血液中で、口腔扁平上皮癌細胞が一定期間存在しうる可能性について示唆することができると考えられた。

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 0 件)

〔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：
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

鎌谷 宇明 (KAMATANI, Takaaki)
昭和大学歯学部・講師
研究者番号：00315003

(2)研究分担者

近藤 誠二 (KONDO, Seiji)
昭和大学歯学部・准教授
研究者番号：10432634

棕代 義樹 (MUKUDAI, Yoshiki)
昭和大学歯学部・助教
研究者番号：50325099

栗原 祐史 (KURIHARA, Yuuji)
昭和大学歯学部・助教
研究者番号：90514969

(3)連携研究者

()

研究者番号：