

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011 ～ 2012
課題番号：23659651
研究課題名（和文） 消化管間質腫瘍における血中浮遊腫瘍細胞検出とその有用性検討の試み
研究課題名（英文） Circulating Tumor Cell of Gastrointestinal Stromal Tumor
研究代表者
宇野 太 (UNO FUTOSHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：90572503

## 研究成果の概要（和文）：

本研究においてテロメラーゼ活性依存性腫瘍増殖蛍光ウイルス“テロメスキャン”を用いて消化管間質腫瘍(Gastrointestinal Stromal Tumor; 以下, GIST)の浮遊がん細胞(Circulating Tumor Cell; 以下, CTC)の検出を、根拠となる基礎研究の成果をもとに臨床検体で試みた。12症例中6例でCTCが検出できたことで、肝転移やをきたすGISTの新規バイオマーカーとしての臨床的意義の可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We detected circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) patients after some fundamental research using a green fluorescent protein (GFP)-expressing attenuated adenovirus-5 vector, in which the hTERT promoter regulates viral replication (TelomeScan). CTCs were identified in samples from 6 of 12 patients with GIST. These results suggest that CTCs detection with our method might be a new bio-marker for GIST which frequently accompanied liver metastases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：消化管間質腫瘍(GIST), 血中浮遊腫瘍細胞(CTC), 遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

CTCの検出は悪性度評価に基づく予後の予知にも有用であったと報告され、以降様々な検出方法が報告されてきているが、主に用いられる上皮系マーカーによる検出方法では理論的に間質腫瘍を検出することは出来ない。臨床的には肝転移などをきたすことからCTCの存在が充分想定されるGISTでのCTCの報告は実際見当たらない。我々は癌細胞が有するhTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子のプロモーターでア

デノウイルスの増殖に必須のE1遺伝子発現を制御することで、テロメラーゼ依存性に増殖するアデノウイルスにオワンクラゲ由来の蛍光遺伝子GFP (Green Fluorescence Protein)を組み込んだ改変アデノウイルス製剤テロメスキャンを開発しており、この技術を応用して5mlの血液中に浮遊する数個の癌細胞を、テロメスキャンを用いて生存癌細胞を特異的に検出することもすでに開発し得ていた。我々の方法では上皮系の癌細胞に限らず検出可能であり、GISTのCTCも検出

できると考え研究を計画した。また CTC が検出できれば、理論的には CTC の *c-kit* や *PDGFRA* の遺伝子多型解析が可能である。切除不能 GIST 症例では薬物療法が選択されるが、現時点では増悪・不耐容まで継続するとされている。一旦奏効した症例で増悪に転じるメカニズムとして腫瘍の遺伝子変異が予想されるが、多くの場合切除不能・転移 GIST 腫瘍の生検は困難であり、結果として画像診断などで明らかな増悪が見られるまで薬物療法が継続される。CTC の検出から遺伝子多型解析可能となれば、より早い段階で薬物療法の効果判定と効果予測が可能となり、実際の臨床に直結するバイオマーカーとなり得ることが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が開発したテロメスキャンを用いて癌同様に転移をきたす GIST の CTC を高率にかつ再現性をもって、かつ定量的に検出する新規診断システムを開発することを目的とする。また、遺伝子多型などの分子生物学的解析も加えることによって新規バイオマーカーとしての臨床的意義の可能性を探求し、臨床応用への展開に導くための研究基盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) GIST細胞株のhTERT活性測定、テロメスキャンの感染効率検討：

数種類の培養GIST細胞のhTERT活性を、リアルタイムPCRを用いて測定し、テロメスキャンの感染・蛍光が確認できている癌細胞と比較して検討する。また、実際に培養GIST細胞にテロメスキャンを感染させ、GFP蛍光強度測定すると同時に非増殖型のGFP発現アデノウイルスと比較することで感染効率を確認し、培養系での至適ウイルス感染条件を確定させ血液浮遊腫瘍細胞での感染条件を推定・検討する。

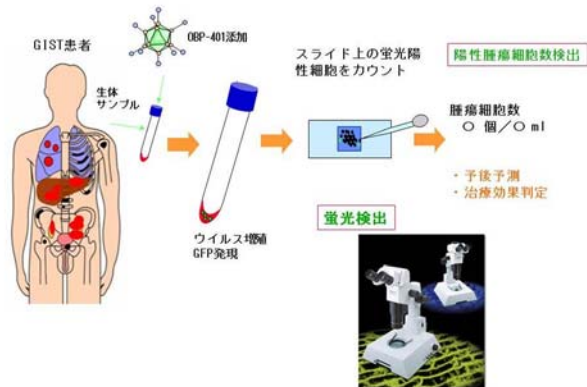
### (2) 健常者血液中に混じたGIST細胞株のテロメスキャンによる可視化の条件設：

培養GIST細胞を段階的に希釈して浮遊させ、遠心にて細胞成分を分離、各種濃度のテロメスキャンウイルスと24-48時間混合培養する。回収した細胞をcytospinにてスライドガラス上にspot状に張付け、蛍光顕微鏡下に陽性細胞を確認する。また、FACSにてGFP強度を測定し、定量化する。本実験で、浮遊系のGIST細胞の検出限界を確認することができ、至適ウイルス濃度、および至適反応時間を確定することができる。

### (3) GIST患者血液を用いてのテロメスキャ

ン感染 GFP 陽性細胞の検出：

臨床プロトコールを作成し、倫理委員会で承認の後に臨床研究を開始する。研究参加の同意が得られた GIST 患者より治療前の血液を採取し、上記実験で得られた検出条件で CTC の検出を行う。同時に患者の臨床病理学的背景因子のデータ収集を行い、後に照合できるデータベースを構築する。さらに、実際の臨床応用を想定して、サンプル採取、ウイルスとの混合培養から蛍光検出、解析までの各



工程の至適条件を検証し、SOP (Standard Operation Procedure) を作成する。

### (4) 極少細胞からの DNA、RNA 抽出法とその増幅法の検討：

*p53*, *KRAS* などの遺伝子変異がすでに同定されている癌細胞を用いて、1-1000 個の腫瘍細胞からの遺伝子抽出、変異が判明している exon を PCR 増幅、シーケンスまでの条件を検討し、検出感度の限界を検討する。

### (5) 検出 CTC 細胞からの DNA、RNA 抽出法とその増幅法の検討：

確立させた極少量サンプルからの DNA 抽出法により、血液中 CTC からの遺伝子変異の検出を試みる。GIST で薬物療法の奏効率との相関が既に知られている *c-kit* 及び *PDGFRA* 遺伝子変異を検出 CTC から PCR 増幅・シーケンスの方法を用いて同定できるかの検討を行う。

### (6) GIST 組織と CTC の遺伝子解析と比較と臨床病態的検討：

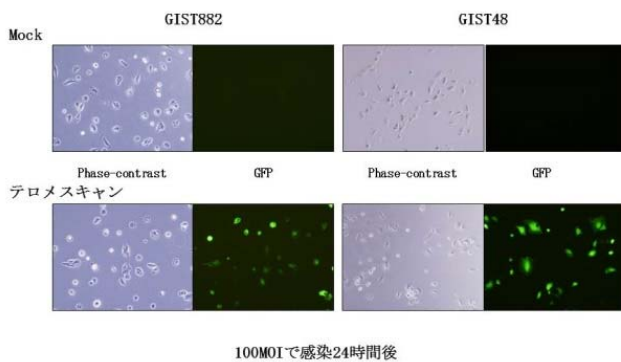
CTC から *c-kit* 及び *PDGFRA* 遺伝子変異の検出を行った症例において可能であれば対応する原発巣から同じ遺伝子異常検査を行うことで、CTC と原発巣での遺伝子異常の相関関係を検証する。さらに研究結果と臨床病態、すなわち再発の有無・薬剤耐性の有無などと CTC 検出の有無・遺伝子変異の有無・原発巣と CTC での遺伝子変異の差異などを症例を重ね

ていき検討する。これらから我々の本 CTC 検出法が GIST のバイオマーカー となり得る可能性を検討していく。

#### 4. 研究成果

- (1) GIST 細胞株の hTERT 活性測定とテロメスキャンの感染効率の検討：  
2 種類 の 培 養 GIST 細胞 (GIST882, GIST48) に hTERT の mRNA 発現があることをリアルタイム PCR で確認した。またアデノウイルス感染効率予測のため、この 2 種類の培養 GIST 細胞のkokusacki アデノウイルスレセプター (CAR) の発現をフローサイトメトリーで確認した。そのうえで実際に GIST882・GIST48 にテロメスキャンを感染させ、GFP 蛍光が観察できることを蛍光顕微鏡下に確認した。これにより、血液中に GIST 細胞が存在すればテロメス

#### テロメスキャンによるGIST細胞株でのGFP発現



キャンで可視化できると予想された。

- (2) GIST 患者血液を用いてのテロメスキャン感染 GFP 陽性細胞の検出：  
GIST 患者血液を用いてのテロメスキャン感染 GFP 陽性細胞の検出を試みた。平成 25 年 3 月 31 日までに、12 名の GIST 患者より研究参加の同意が得られた。10 例が胃 GIST で小腸 GIST が 2 例であった。胃 GIST の 1 例と小腸 GIST の 1 例では肝転移を有していた。全例において原発巣の手術切除前に血液を採取した。採血サンプルは溶血させた後に遠心にて細胞成分を分離して、 $1 \times 10^4$  PFU のテロメスキャンウイルスと 24 時間混合培養した。回収した細胞を cytospin にてスライドガラス上に spot 状に張付け、蛍光顕微鏡下に陽性細胞を確認したところ 12 例中 6 例の症例で GFP 陽性細胞が確認できた。GFP 陽性細胞数は 1 症例あたり 1-7 個の範囲で確認できた。

	Sex	Primary location	GFP+ cell	Fletcher classification	c-kit gene
1	F	Gastric	0	High	wild type
2	F	Gastric	0	High	exon11 deletion
3	F	Gastric	1	Low	exon11 SNP
4	F	Gastric	4	High	exon11 deletion
5	M	Gastric	4	Intermediate	wild type
6	M	Gastric	0	Low	exon11 mutation
7	M	Jejunum	0	Low	wild type
8	F	Gastric	0	Low	exon11 mutation
9	F	Gastric	0	High	exon11 deletion
10	M	ileum	1	High	exon9 mutation
11	M	Gastric	4	Low	exon11 deletion
12	M	Gastric	7	High	exon11 deletion

- (3) 検出 CTC 細胞からの DNA 抽出法とその増幅法の検討：

KRAS などの遺伝子変異がすでに同定されている癌細胞を用いて、血中の 5-10 個の浮遊細胞が回収できれば DNA 抽出と遺伝子解析が可能であることが、予備実験で予想された。臨床サンプルでは GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡下でなくフローサイトメトリーを用いて確認することが 3 例で可能であった。この 3 例で 1 個・4 個・7 個の GFP 陽性細胞が得られたため、極少細胞から DNA を抽出した。全症例で原発巣の c-kit 遺伝子変異解析はできており、CTC とと思われる細胞から抽出された DNA をシークエンスにかけて原発巣の c-kit 遺伝子解析結果と比較する段階まで研究は進展した。

これら結果は GIST 症例においても末梢血中に浮遊腫瘍細胞 (CTC) が存在することを示唆する結果であり、今まで全く報告されていない事実である。また、この結果は採血という非侵襲的に方法によって得られており、臨床的意義の大きい新規バイオマーカーとしての可能性を示唆したと考える。

#### 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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 重安邦俊, 橋本悠里, 宇野 太, 永坂岳司, 田澤 大, 香川俊輔, 水口裕之, 浦田泰生, 藤原俊義, 腫瘍特異的制限増殖型アデノウイルスを用いた血液循環腫瘍細胞の遺伝子解析技術の開発、第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 19 日、ロントイン札幌
- ② Shigeyasu K, Hashimoto Y, Kagawa S, Uno F, Tazawa H, Nagasaka T, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Fujiwara T, New method for investigating genetic

mutations of circulating tumor cells using a telomerase-specific replication-competent adenovirus, 第18回日本遺伝子治療学会年次学術集会、平成24年6月29日、ホテル熊本テルサ

- ③ 宇野太、重安邦俊、永坂岳司、香川俊輔、西崎正彦、岸本浩行、藤原俊義、消化管間質腫瘍における血中浮遊腫瘍細胞検出の試み、第112回日本外科学会定期学術集会、平成24年4月13日、幕張メッセ 国際会議場

- ④ Shigeyasu K, Hashimoto Y, Morikawa T, Mori Y, Sun DS, Kagawa S, Uno F, Tazawa H, Nagasaka T, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Fujiwara T, A highly sensitive detection system of genetic alterations in circulating tumor cells using a telomerase-specific replication-competent adenovirus, AACR Annual Meeting 2012, 平成24年4月2日, 米国シカゴ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇野 太 (UNO FUTOSHI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：90572503

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：00304303

香川 俊輔 (KAGAWA SHUNSUKE)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：00362971

西崎 正彦 (NISHIZAKI MASAHIKO)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：30379789

永坂 岳司 (NAGASAKA TAKESHI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：304525969

田澤 大 (TAZAWA HIROSHI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：90415513

### (4) 研究協力者

重安 邦俊 (SHIGEYAU KUNITOSHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

橋本 悠里 (HASHIMOTO YUURI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生