

令和元年5月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11004

研究課題名(和文) hTERTプロモーターに基づく癌検出・分離技術の最適化とその応用基盤の確立

研究課題名(英文) Optimisation of a cancer detection and isolation technique using hTERT promoter, and establishment of its applicational 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞において癌特異性を保ちつつプロモーター活性を飛躍的に上昇させる新規遺伝子発現システムにより、GFP遺伝子等をレポーターとして用いた場合に、ごくわずかな頻度で存在する癌細胞を強力にラベルし検出できることが、確かめられた。その最適な条件についての検討を行い、体外診断法の実用化に向けた基盤となるデータが得られた。また、検出した遊離癌細胞を採取してセルラインとして樹立する技術への当該システムの応用に関する検討を実施し、成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該システムを用いることで、血液や尿中に遊離したごくわずかな生きた癌細胞を発光・ラベルさせることが可能となる。今後、臨床の現場において、幅広い癌種について癌転移等の可能性を早期に予測できる診断法につながる事が期待される。また、当該システムを応用することにより、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等とを比較して新規転移関連マーカーの探索を行うことや、患者の予後診断、治療に利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A novel gene expression system that dramatically increases promoter activity while maintaining cancer specificity can be used as a new technology to strongly label and detect very few free cancer cells. The optimum conditions were also examined, and data for practical use of in vitro diagnostic methods were obtained. In addition, its usefulness has been confirmed as a technique for collecting detected free cancer cells and establishing them as cell lines.

研究分野：腫瘍学

キーワード：腫瘍 細胞検出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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、hTERT プロモーター等の癌特異的プロモーターの活性は弱く、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を検討し、申請者らは改良型 TSTA システムを開発した。これまでに、このシステムをプラスミドに導入することにより、癌の転移・播種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術の開発に向けた研究を進めてきている。

さらに、これまでに行われた我々の研究の知見を元に、新規の遺伝子高発現システムである SGE システムが開発された。この SGE システムに、広範囲な癌細胞に適応できるように、hTERT プロモーターを搭載させた hTERT-SGE システムの確立に向けた研究も実施されている。予備研究として、この hTERT-SGE システムを組み込んだプラスミドを正常細胞および癌細胞に導入することで、癌細胞特異的に、飛躍的に高い遺伝子発現が可能であることを確認している。

血中循環癌や尿中の癌細胞をレポーター遺伝子発現プラスミドを用いてリアルタイムに検出する方法は、現時点で確立されておらず、これら遺伝子発現システムに基づく新技術を用いることで初めて可能となると期待される。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。これら遺伝子発現システムを用いることで、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・ラベルさせることが可能となれば、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と考えられる。遊離癌細胞と原発巣の癌細胞等とを比較して新規転移関連マーカーの探索を行うことや、患者の予後診断や治療に利用できる可能性がある。

2. 研究の目的

多種類の癌細胞において癌特異的プロモーター活性を飛躍的に上昇させる新規遺伝子発現システムである改良型 TSTA システムおよび hTERT-SGE システムを利用した新技術の開発を行うことを目的とする。まず、血液や尿中に遊離したごくわずかな癌細胞を強力にラベルし検出する新技術を確立する。具体的には、hTERT-SGE システムにより GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子を発現するプラスミドを尿路性器癌細胞に導入し、各種分析を行うことで、癌の体外診断技術の実用化に必要なデータを集める。

また、hTERT 活性のある癌細胞のみ GFP が発現しているため、検出した遊離癌細胞をセルソーターで採取することが可能である。セルライン化するために、当該システムを使った癌細胞の分取を行い、その方法を検証する。セルソーターで採取した細胞に関する実験として、テロメラーゼ活性の異なる同一セルライン中の細胞ごとの特性を比較するなどの実験も行う。

3. 研究の方法

(1) 体外癌診断技術実用化に向けた研究

hTERT-SGE システムによる遺伝子発現量と細胞の hTERT 活性の関係の調査

細胞の hTERT 活性の違いが、hTERT-SGE システムによる遺伝子発現の高効率化とどのような関係があるか調査することとした。このために、作製した hTERT-SGE システムでルシフェラーゼ遺伝子が発現するプラスミドを hTERT 活性の異なるさまざまな細胞に導入して、その発光強度をマイクロプレートリーダーで測定した。次に、定量的リアルタイム PCR により測定

した hTERT 活性とルシフェラーゼ遺伝子の発現量の相関を調査した。

hTERT-SGE システムを利用した癌検出技術の適応癌種、導入条件等の検討

ヒトの尿路性器癌細胞(前立腺癌, 腎癌, 精巣腫瘍)を含む癌細胞セルラインを様々な割合でプレートに播種し、作製した hTERT-SGE-GFP プラスミドを DNA 導入試薬を用いてトランスフェクションして、癌細胞における GFP の発現を蛍光顕微鏡で経時的に観察した。また、細胞ごとのトランスフェクションの最適な条件の調査を行った。さらに、細胞をはがして、フローサイトメーターを用いて蛍光強度の測定・定量化を行った。感度、再現性について蛍光顕微鏡との比較を行い、検出至適時間についても解析を行った。

(2) 遊離癌細胞の採取に関する研究

テロメラーゼ活性の強さによる癌細胞の採取

蛍光活性化セルソーター(FACS)を使って、標識された癌細胞を分取する。まずは、当該システムがテロメラーゼ活性依存的に転写することを利用して、癌細胞株の中で、テロメラーゼ活性の強さの異なる細胞を分取した。また、その特徴を比較解析することとした。前立腺癌細胞(LNCap, PC3)に当該システムプラスミドを導入し、FACS で、GFP 発現の強いものと弱いものをそれぞれ回収した。次に、どのような遺伝子に発現の差が見られるかをウエスタンブロットを行って調査し、テロメラーゼ活性との相関を解析した。

4 . 研究成果

(1) hTERT 活性とルシフェラーゼ遺伝子の発現量には正の相関があることが明らかとなった。

これらの実験により、hTERT-SGE システムによる癌細胞検出に関する有用性がさらに確かめられた。

この結果、調査したすべての癌種において、遺伝子発現の上昇が観察された。また、それぞれの細胞において最適なトランスフェクション条件を決定することができた。これらの実験により、臨床検体を用いた hTERT-SGE システムによる体外診断法の研究を立案する際の準備データが得られた。

(2) アポトーシス、細胞増殖、癌転移などに関連する遺伝子である Phospho-Akt, Phospho-PDK1, c-myc 等の発現を調査したが、調査した遺伝子の中では、細胞群間で差があるものがないことが確認された。しかしながら、セルソーターを使って癌細胞を分取し、セルラインとして樹立する技術としての原理的な実現性は確認された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Robust cancer-specific gene expression by a novel cassette with hTERT and CMV promoter elements.

査読有り

Sakaguchi M, Sadahira T, Ueki H, Kinoshita R, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Nasu Y, Ochiai K, Kumon H, Huh NH, Watanabe M.

Oncol Rep. 2017 Aug;38(2):1108-1114.

doi: 10.3892/or.2017.5710. Epub 2017 Jun 12.

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：那須 保友
ローマ字氏名：Nasu Yasutomo
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：20237572

研究分担者氏名：渡邊 豊彦
ローマ字氏名：Watanabe Toyohiko
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：30432644

研究分担者氏名：定平 卓也
ローマ字氏名：Sadahira Takuya
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：20733322

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。