

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590736

研究課題名（和文） 新規循環がん細胞検出による肝細胞癌テーラード治療法の確立

研究課題名（英文） Circulating tumor cell-based tailor-made therapy for hepatocellular carcinoma

研究代表者

中村 進一郎 (NAKAMURA SHINICHIRO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：70514230

研究成果の概要（和文）：テロメスキャンという新たな手法を用いて、肝細胞癌患者の血液中に循環するテロメラーゼ陽性細胞を検出した。同細胞は、癌転移の指標となる循環癌細胞であると確認された。この細胞は早期肝細胞癌症例でも発現が認められ、単に循環癌細胞が存在するのみでは転移は成立せず、他の因子の関与が必要であると考えられた。一方、テロメスキャンにより検出されない癌組織や白血球による偽陽性の細胞を完全に除外するには至らず、今後の課題と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We detected telomerase-positive cells in the peripheral blood of hepatocellular carcinoma using a new method “TelomeScan”. We confirmed that most of the cells we detected were circulating tumor cells, which was a promising marker of metastasis. Interestingly, we detected the cells even in early stages, indicating another factor is needed to form metastatic lesions. We could not completely overcome the problems of false-positive and false negative and they must be addressed in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：消化器病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：テロメスキャン、肝細胞癌、circulating tumor cell

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) circulating tumor cell 研究

近年、癌の悪性度や転移能を評価する方法として、患者血液中を循環する癌細胞 (circulating tumor cell) を捕らえ、切除や移植などの治療方針の決定に用いる試みがなされている。すでに乳癌など他の多くの癌で化学療法の効果予測に有用であることが明らかとなってきた。しかし、検出感度・特異度とも不十分で状況であり、また circulating tumor cell の検出の有無のみを判断材料としているに過ぎない。

### (2) テロメラーゼ 研究

肝癌細胞では主として $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) の発現を circulating cancer cell の検出に利用してきた。しかし肝癌組織での AFP 発現細胞は少数であり非癌患者でも発現が認められる (Hepatology 1998;27:599-607)。これに変わるターゲットとして、癌細胞の不死化に参与しているテロメラーゼを利用する方法が開発されている。我々は、テロメラーゼ活性が9割の肝細胞癌で認められること、その発現規定因子が hTERT 蛋白であること、また大半の肝癌細胞に hTERT mRNA が検出されること、その発現に遺伝子のコピー数増加は関与していない事を見だし、テロメラーゼの肝癌細胞のマーカーとしての有用性を明らかにしてきた (J Gastroenterol Hepatol 2004; 19:1300-4, J Gastroenterol Hepatol 2003;18:1168-74, Br J Cancer 2000 ;82:833-7, Cancer 1996;78:232-36)。

### (3) 問題点

血中テロメラーゼ DNA や RNA を直接測定する方法は、検出感度は高いが、遊離癌細胞の

みならず血中に存在する DNA や RNA や、白血球中のテロメラーゼも検出されるため、overestimation する問題点を抱えている。また、上皮マーカーでセレクトしてから mRNA を RT-PCR で検出する方法も報告されているが、必ずしも癌細胞が上皮細胞マーカーを発現していない可能性もあり、今までの方法論には解決すべき課題が多かった。

### (4) テロメスキャンの応用

テロメスキャンは本学内で開発されたテロメラーゼ活性の規定因子である hTERT を効率的にとらえる方法で、アデノウイルスに hTERT プロモータを組みこみ、hTERT 陽性細胞の GFP を発現させ、可視化するシステムであり、血中の肝癌細胞が検出可能である (J Clin Invest 2009;119:3172-81)。このシステムを応用すれば、単に血中の癌細胞の多寡の検討のみならず、その細胞における幹細胞や上皮間葉転換マーカー等の治療反応性を予測しうる、蛋白などの発現を検出することが可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではテロメスキャンを応用し、単に血中の癌細胞の多寡の検討のみならず、その細胞における蛋白・遺伝子発現 (幹細胞や上皮間葉転換マーカー等) を解析し、臨床データとの比較を行い、生検に頼らない、予後や治療反応性を予測するシステムの構築を試みる。

## 3. 研究の方法

岡山大学で治療された進行肝細胞癌患者を対象とした。各患者の治療前の血液及び生

検組織を用い、テロメスキャンによる癌細胞の検出を行い、臨床背景、予後と比較した。

本研究は参加病院の倫理委員会の承認を得て施行されている。検討項目は以下の通りである。テロメスキャンにより同定される細胞の個数や抗原特性と臨床所見とを対比させ、テロメスキャンの臨床的有用性を検討した。

- (1) 進行肝細胞癌患者血液を用い、テロメスキャンの肝細胞癌症例における血中 circulating tumor cell 検出能について検証した。
- (2) テロメラーゼ陽性細胞に対して免疫染色を行い、同細胞の癌抗原発現の有無を検討した。
- (3) 肝細胞癌組織の臨床検体を用い、テロメスキャンの肝細胞癌組織に対する検出率を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) テロメスキャンによる循環血液中のテロメラーゼ陽性細胞の検出

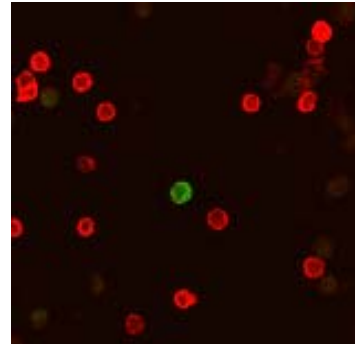
初期の検討時、30 症例の新規肝細胞癌患者に対してテロメスキャンを施行し、27 例に 1 個以上のテロメラーゼ陽性細胞を検出した。このうち、小径の細胞はテロメラーゼ活性を持った白血球の可能性があるため、直径  $8.7\mu\text{m}$  未満の細胞を除外したところ、5 例に直径  $8.7\mu\text{m}$  以上のテロメラーゼ陽性細胞が検出され、これを circulating tumor cell 陽性症例と仮定した。circulating tumor cell 陽性症例の進行度の内訳は、stage I : 2 例、stage II : 1 例、stage III 2 例であり、circulating tumor cell と早期の肝細胞癌症例から発現が認め

られた。

##### (2) テロメラーゼ陽性細胞の抗原性の同定

テロメラーゼ陽性細胞が癌細胞特性を持つことを同定するために、テロメスキャン感染後に免疫染色をおこなった。テロメラーゼ陽性細胞に対して、癌抗原として肝細胞癌で同定される Cytokeratin, HepPar1, EMT マーカーとして Vimentin, Osteopontin に対する染色を行ったところ、これらの抗原をもつテロメラーゼ陽性細胞は検出されなかった。一方、白血球抗原である CD45 でも染色したところ、CD45 陰性テロメラーゼ陽性細胞が検出され (図 1)、これらは CTC であることが示唆された。一方、テロメスキャン陽性 CD45 陰性細胞の出現頻度は非常に低率であり、検出感度を高める必要性が示唆された。

(図 1)



Green : GFP (テロメラーゼ陽性細胞)

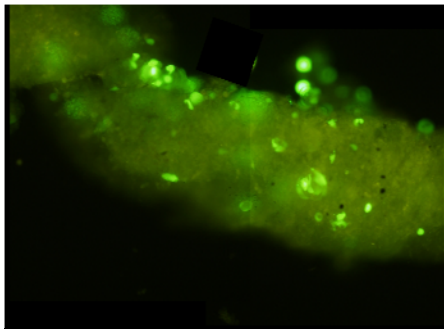
Red : CD45 (白血球)

##### (3) テロメスキャンの臨床組織への感染性の確認

テロメスキャンは、Hep3B, HepG2 などの肝細胞癌株に対してはほぼ 100% 感染し、GFP を発現させるが、臨床検体における肝細胞癌に対しても同様に、GFP を発現させるかどうかの確認するため、10 検体の原発巣肝癌組織を用いてこれを検討した。10 検体中 8 検体に GFP の発現が認められたが (図 2)、2 検体で

は GFP 発現は明らかではなかった。GFP 発現を認めない肝癌組織では、テロメスキャンの感染に必要な Cocksackie-adenovirus receptor の発現を認めず、Cocksackie-adenovirus receptor 発現低下がテロメスキャン陰性の原因となる症例の存在が明らかとなった。

(図 2)



#### 5. 主な発表論文等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 進一郎 (NAKAMURA SHINICHIRO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：70514230

##### (2) 研究分担者

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

能祖 一裕 (NOUSO KAZUHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授

研究者番号：10314668

白羽 英則 (SHIRAHA HIDENORI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：40379748

##### (3) 連携研究者

なし