

## 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：22591767  
 研究課題名(和文) 緑色蛍光タンパク質発現ウイルス製剤による膀胱癌に対する新たな診断法の開発研究  
 研究課題名(英文) Development of new diagnostic methods for bladder cancer using GFP expressing adenovirus vector  
 研究代表者  
 賀来 春紀(KAKU HARUKI)  
 岡山大学・岡山大学病院・講師  
 研究者番号：60346426

## 研究成果の概要(和文)：

癌細胞において特異的に増殖し緑色蛍光蛋白(GFP)を発現させる新規の診断用アデノウイルスベクター製剤Telomescanの、各種膀胱癌細胞の検出における有用性が証明された。さらに、次世代の癌細胞検出試薬としてのluciferase発現プラスミド(hTERT-AdTSTA-luciferase)およびGFP発現プラスミド(hTERT-AdTSTA-GFP)の有用性を、各種膀胱癌細胞において確認し、幅広い癌疾患での遊離・播種癌細胞の検出が可能になると期待される。

## 研究成果の概要(英文)：

Usefulness of a diagnostic novel adenoviral vector Telomescan, which proliferates specifically in cancer cells and expresses green fluorescent protein (GFP), in the detection of various bladder cancer cells, was demonstrated. In addition, the usefulness of the luciferase and GFP expression plasmids (hTERT-AdTSTA-luciferase and GFP) as next-generation cancer-specific expression systems was also demonstrated in a various types of bladder cancer cells. Using these tools, we expect that detection of disseminating cancer cells becomes possible in a wide range of cancer diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：尿路性器悪性腫瘍、遺伝子治療、細胞治療

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：緑色蛍光タンパク質、ウイルスベクター、膀胱癌、プラスミド

## 1. 研究開始当初の背景

近年、分子生物学の進歩や光学機器の発達により、生きている動物の中で起こっている現象を分子レベルで可視化する *in vivo* 分子イメージングが可能になった。われわれは、ウイルスの複製を可視化できるように、各種癌細胞に対する殺細胞効果が確認された Telomelysin (E1 遺伝子の発現を hTERT プロモーターで制御する 5 型アデノウイルス) の E3 領域に緑色蛍光蛋白 (GFP) 遺伝子を組み込んだウイルス「Telomescan」を作製した。Telomescan は感染した癌細胞内で増殖し、癌細胞内で GFP 蛋白が産生され、蛍光顕微鏡あるいは蛍光内視鏡にて蛍光標識された癌細胞を検出することが可能となる。

膀胱癌は尿路に発生する悪性腫瘍の中で最も頻度が高いもので、年間発生頻度は 10 万対約 10 人と考えられている。浸潤性膀胱癌の場合は、膀胱全摘除術が施行された場合でも 5 年生存率は 40 ~ 50% 程度で、リンパ節転移、遠隔転移が伴う症例の予後は非常に不良であり、早期発見、早期治療が必要といわれている。膀胱癌の診断は、主に尿細胞診、膀胱内視鏡検査で行うが、膀胱鏡検査が苦痛を伴う侵襲的検査法であることは否定できない。従来の尿細胞診を凌駕もしくはその診断効率をより高める低侵襲の体外診断法の開発が必要であり、治療に当たり、転移性病変の正確な診断、治療効果の判定において新たな指標の開発が望まれる。

膀胱癌において Telomerase 活性が高いことが知られており、Telomerase を標的とした新規診断法開発の可能性があると考えられる。正確に癌細胞有りと判定することは、治療方針の決定そして治療成績の向上にもつながる。以上により、Telomescan を用いた本研究の着想に到った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、岡山大学において独自に

開発された、癌細胞で特異的に増殖し緑色蛍光蛋白を発現する診断用アデノウイルスベクター製剤 Telomescan を用いて、膀胱癌に対する新たな体外・体内診断法を開発することである。さらに、次世代の癌特異的遺伝子発現プラスミド試薬の開発し、生体内で遊離・播種したごく少数の癌細胞を強力にラベル・検出する新技术を確立する為の研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) Telomescan の体外診断法の開発

#### ①培養細胞における hTERT mRNA の解析

膀胱癌細胞株 (J82、HT1197、TccSup、T24P3 など) を一週間培養し、細胞を収集し、RNA を抽出し、RT-PCR 法にて hTERT mRNA の量を検討した。

#### ②培養細胞における Telomescan の replication competency の解析

膀胱癌細胞株 (J82、HT1197、TccSup、T24P3 など) において Telomescan を各 MOI で添加し、細胞数を経時的にチェックし、また Telomescan の replication competency を解析した。

#### ③In vitro での Telomescan の診断効率の解析

膀胱癌細胞株 (J82、HT1197、TccSup、T24P3 など) に対して Telomescan を各 MOI で添加し、15min、30min、40min、2hr、24hr 後に蛍光顕微鏡で観察した。

### (2) Telomescan の体内診断法の開発

#### ①マウス膀胱癌同所性モデルにて Telomescan の診断効率の検討

8 週齢の SCID マウスを開腹し、膀胱壁に膀胱癌細胞株 J82 を  $1 \times 10^6$  個注入し、膀胱癌同所性モデルを作製した。Telomescan を膀胱内に注入し、12hr、24hr、48hr 後に、生体蛍光顕微鏡にて GFP 蛍光の経時的変化を解析した。

また、病理学的な検査と比較し、Telomescanの診断効率を解析した。

### (3) 次世代 GFP 発現プラスミド試薬の開発

①新規開発した癌特異的遺伝子発現システムを用いたレポーター遺伝子発現プラスミドの作成

hTERT プロモーターを搭載し癌特異的に強力なレポーター遺伝子発現を可能にするプラスミド (hTERT-AdTSTA-luciferase および hTERT-AdTSTA-GFP) を作成した。

② In vitro での各種膀胱癌細胞への luciferase 遺伝子および GFP 遺伝子の導入および各種アッセイ

hTERT-AdTSTA-luciferase プラスミドを用いて、当該システムの膀胱癌での癌特異的遺伝子発現における有用性を検証した。すなわち、ヒト正常尿路上皮細胞 (HUC) およびヒト各種膀胱癌細胞 (KK47, HT1376, UM-UC-3, TCCsup, J82, 5637 細胞) において、Lipofectamine 試薬を用いて hTERT-AdTSTA-luciferase をトランスフェクションし、48 時間後に各癌細胞における luciferase 遺伝子の発現を luciferase アッセイキットを用いてマイクロプレートリーダーで定量した。また、テロメラーゼ活性を測定するために、Telo TAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS キットを用いた。

③作製した hTERT-AdTSTA-GFP プラスミドの癌細胞検出における有用性を検証するために、ヒトの膀胱癌細胞 (KK47 細胞) をヒト正常尿路上皮細胞 (HUC) と共に様々な割合で培養プレートに播種し、hTERT-AdTSTA-GFP をトランスフェクションして、癌細胞における GFP 遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で経時的に観察した。

## 4. 研究成果

(1) Telomescan の体外診断法としての有用性の検討

① 膀胱癌培養細胞における hTERT mRNA の解

析

各種膀胱癌細胞株より RNA を抽出し、RT-PCR 法にて hTERT mRNA の量を検討した。各膀胱癌細胞株の間では若干の差が認められるものの、膀胱癌細胞株では概ね Telomerase 活性が高いことを確認した。

②膀胱癌培養細胞における In vitro での Telomescan の診断効率の解析

各種膀胱癌細胞株に対し、Telomescan を様々な MOI で添加し、15 分、30 分、40 分、2 時間、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。Telomescan の添加 1 時間後で、Telomescan が増殖することによって蛍光蛋白 GFP が産生され、各癌細胞での蛍光の確認ができるようになった。また、Telomescan の導入効率の検討・至適条件・検出法の設定を行った。

(2) Telomescan 体内診断法としての有用性の検討

①マウス膀胱癌同所性モデルにて Telomescan の診断効率の検討

膀胱癌同所性モデルにおいて Telomescan を膀胱内に注入し、12hr、24hr、48hr 後に生体蛍光顕微鏡にて GFP 発光を経時的変化に解析した。また、病理学的な検査と比較し、Telomescan の診断効率を検討した。Telomescan による膀胱腫瘍の描出は Telomescan を膀胱注 4 時間より観察可能であった。当該マウスの各正常臓器を観察したところ、腎臓、脳、肝臓、心臓での GFP 発光が検出されなかった。また、病理学的な解析を加えたところ、GFP 発光により肉眼的に検出困難なマイクロ腫瘍の検出が可能となった。

(3) 次世代 GFP 発現プラスミド試薬の開発

①新規の癌特異的遺伝子発現システムを用いて尿中膀胱癌細胞を検出する為、luciferase 遺伝子、GFP遺伝子を発現するhTERT-AdTSTA プラスミドを作成した。当該発現プラスミド試薬の有用性を、各種膀胱癌細胞を用いて確認できた。

②正常尿路上皮細胞 (HUC) および各種膀胱癌細胞 (KK47, HT1376, UM-UC-3, TCCsup, J82, 5637 細胞) のそれぞれのテロメラーゼ活性と hTERT-AdTSTA-luciferase プラスミドによる luciferase 遺伝子の発現量との相関を解析し、両者の間に有意な相関が認められた。結果として、hTERT-AdTSTA-luciferase プラスミドは、テロメラーゼ活性がより高い膀胱癌細胞においてより強く luciferase 遺伝子を発現することが明らかとなった。

③hTERT-AdTSTA-GFP プラスミドの癌細胞検出における有用性を検証するために、ヒトの膀胱癌 KK47 細胞とヒト正常尿路上皮細胞 (HUC) を 1 : 10 で混合して培養した状態で、hTERT-AdTSTA-GFP をトランスフェクションし、24 時間後に GFP 遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で観察した。結果として、一部の膀胱癌 KK47 細胞で強い GFP 遺伝子の発現が観察され、正常尿路上皮細胞 (HUC) 中に存在する膀胱癌細胞を、GFP 遺伝子の発現を確認することにより同定することが可能となった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

① Oishi K, Miyamoto Y, Saito H, Murase K, Ono K, Sawada M, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T, Hayashi S, Noguchi H. In vivo imaging of transplanted islets labeled with a novel cationic nanoparticle. *PLoS One*. 査読有 2013;8(2):e57046.

② Chunxiao Liu, Shaobo Zheng, Haiyan Shen, Kai Xu, Jie Chen, Hulin Li, Yawen Xu, Abai Xu, Binshen Chen, Haruki Kaku, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, Peng Huang, Masami Watanabe Clinical significance of CD24 as a predictor of bladder cancer recurrence. *Oncology Letters*. 査読有 2013. *In press*.

③ Peng Huang, Masami Watanabe, Haruki Kaku, 他 11 人 Cancer stem cell-like

characteristics of a CD133+ subpopulation in the J82 human bladder cancer cell line. *Molecular and Clinical Oncology*. 査読有 2013;1:180-184

④ Sugimoto M, Watanabe M, Kaku H, Li SA, Noguchi H, Ueki H, Sakaguchi M, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical biodistribution and safety study of REIC/Dkk-3 encoding adenovirus vector for prostate cancer gene therapy. *Oncol Rep*. 査読有 2012;28(5):1645-52.

⑤ Huang P, Chen J, Wang L, Na Y, Kaku H, Ueki H, Sasaki K, Yamaguchi K, Zhang K, Saika T, Nasu Y, Watanabe M, Kumon H. Implications of transcriptional factor, OCT-4, in human bladder malignancy and tumor recurrence. *Med Oncol*. 査読有 2012;29(2):829-34

⑥ Hirata T, Watanabe M, Kaku H, Kobayashi Y, Yamada H, Sakaguchi M, Takei K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer. 査読有 *International Journal of Oncology*. 2012;41(2):559-64.

⑦ Hashimoto Y, Tazawa H, Teraishi F, Kojima T, Watanabe Y, Uno F, Yano S, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. The hTERT promoter enhances the antitumor activity of an oncolytic adenovirus under a hypoxic microenvironment. *PLoS One*. 査読有 2012;7(6):e39292.

⑧ Fujiwara T. In vivo imaging of human cancer with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Methods Mol Biol*. 査読有 2012;872:129-39.

⑨ Ueki H, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Li SA, Ochiai K, Hirata T, Noguchi H, Yamada H, Takei K, Nasu Y, Kashiwakura Y, Kumon H. A novel gene expression system for detecting viable bladder cancer cells. *International Journal of Oncology*. 査読有 2012;41(1):135-40.

- ⑩ Huang P, Chen J, Wang L, Na Y, Kaku H, Ueki H, Sasaki K, Yamaguchi K, Zhang K, Saika T, Nasu Y, Watanabe M, Kumon H. Implications of transcriptional factor, OCT-4, in human bladder malignancy and tumor recurrence. *Med Oncol*. 査読有 2012;29(2):829-34.
- ⑪ Kishimoto H, Aki R, Urata Y, Bouvet M, Momiyama M, Tanaka N, Fujiwara T, Hoffman RM. Tumor-selective, adenoviral-mediated GFP genetic labeling of human cancer in the live mouse reports future recurrence after resection. *Cell Cycle*. 査読有 2011;15;10(16):2737-41.
- ⑫ Watanabe M, Ueki H, Ochiai K, Huang P, Kobayashi Y, Nasu Y, Sasaki K, Kaku H, Kashiwakura Y, Kumon H. Advanced two-step transcriptional amplification as a novel method for cancer-specific gene expression and imaging. *Oncol Rep*. 査読有 2011;26(4):769-75.
- ⑬ Kojima T, Watanabe Y, Hashimoto Y, Kuroda S, Yamasaki Y, Yano S, Ouchi M, Tazawa H, Uno F, Kagawa S, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. In vivo biological purging for lymph node metastasis of human colorectal cancer by telomerase-specific oncolytic virotherapy. *Ann Surg*. 査読有 2010 251(6):1079-86.
- ⑭ Huang P, Kaku H, Chen J, Kashiwakura Y, Saika T, Nasu Y, Urata Y, Fujiwara T, Watanabe M, Kumon H. Potent antitumor effects of combined therapy with a telomerase-specific, replication-competent adenovirus(OBP-301)and IL-2 in a mouse model of renal cell carcinoma. *Cancer Gene Ther* 査読有 2010;17(7):484-91.

[学会発表] (計 10 件)

- 克己, 渡部昌実, 江原 伸, 那須保友, 公文裕巳 前立腺癌に対するREIC遺伝子治療-自己癌ワクチン化療法の確立を目指して-, 泌尿器科分子・細胞研究会, 20130308、高知市
- ② 渡部昌実 那須保友 公文裕巳 新規がん治療遺伝子REIC/Ckk-3 -がんワクチン機能を有する遺伝子医薬-, BioJapan 2012 World Business Forum, 20121012、横浜
- ③ 佐々木克己、那須保友、渡部昌実、賀来春紀、公文裕巳 前立腺癌に対する遺伝子治療 -新たな免疫療法の開発をめざした取り組み-第63回日本泌尿器科学会 西日本総会:福岡 2011年11月11日
- ④ 賀来 春紀 前立腺癌の治療(総論):「前立腺癌早期発見早期診断プロジェクト」フォローアップ協力セミナー:中国・長春 2011年10月15日
- ⑤ 賀来 春紀 前立腺癌の治療(各論):「前立腺癌早期発見早期診断プロジェクト」フォローアップ協力セミナー:中国・長春 2011年10月15日
- ⑥ 黄 鵬, 渡部昌実, 賀来春紀, 陳 潔, 那須保友, 公文裕巳 前立腺癌に対するREIC 遺伝子治療 癌免疫外科研究会:和歌山市, 2011年5月19日
- ⑦ Sasaki K, Nasu Y, Kaku H, Watanabe M, Nose H, Kanbara D, Saika T, Kumon H. A phase I/II study of adenovirus mediated interleukin-12 gene therapy for hormone refractory prostate cancer: An interim report American Society of Clinical Oncology 2010 Genitourinary Cancers Symposium: Orlando, Florida, U.S.A. 2011年2月3日
- ⑧ Hirata T, Watanabe M, Kaku H, Ebara S, Watanabe T, Nasu Y, Kumon H. REIC/Dkk-3 encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer、日本泌尿器科学会西日本総会、徳島 2012年11月9日
- ① 有吉勇一, 平田武志, 谷本竜太, 佐々木

日

〔図書〕（計 2 件）

- ① 渡部昌実、賀来春紀、黄 鵬、那須保友、公文裕巳 前立腺癌（第 2 版）－基礎・臨床研究のアップデート－ REIC/Dkk-3 遺伝子治療 日本臨牀社, 2011 年:p559－563
- ② 那須保友、佐々木克己、賀来春紀、渡部昌実、公文裕巳 前立腺癌の治療 遺伝子治療 自殺遺伝子・免疫遺伝子を用いた遺伝子治療 日本臨牀社, 2011 年:p554-558

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

賀来 春紀 (KAKU HARUKI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：60346426

### (2) 研究分担者

渡部 昌実 (WATANABE MASAMI)  
岡山大学・岡山大学病院・准教授  
研究者番号：70444677

### (3) 連携研究者

藤原 俊義 (HUJIWARA TOSHIYUKI)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：00304303

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