

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591932

研究課題名(和文) 蛍光発現ウイルスを用いた血中循環がん細胞の分離による高感度遺伝子解析技術の開発

研究課題名(英文) Fluorescence-guided detection and genetic analysis of circulating tumor cells

研究代表者

香川 俊輔 (Kagawa, Shunsuke)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：00362971

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)：一般の臨床検査情報に加えて、癌組織からの遺伝子診断が癌治療の選択に利用されるようになってきた。癌患者の血液中に循環している腫瘍細胞から遺伝子解析ができれば患者の体に傷をつけることなく、重要な情報が得られると考えた。癌細胞を蛍光色素で検出できるウイルスを用いて血液中の腫瘍細胞を捕捉し、遺伝子解析を行った。遺伝子変異が検出できたことから癌治療上有用な新たな診断方法になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In addition to the conventional clinical information, molecular information obtained from cancer tissue is being used for proper selection of cancer therapy. The circulating tumor cells in the blood of cancer patients, if available, might be valuable source for such molecular information. We tried and succeeded to capture and analyze the rare tumor cells in the blood using a virus that can detect cancer cells with a fluorescent dye. This technology must be a novel molecular diagnostic method for cancer.

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：末梢血循環腫瘍細胞 アデノウイルス 遺伝子解析 消化器癌

1. 研究開始当初の背景

当時、担癌患者の末梢血中から腫瘍細胞 (circulating tumor cells : CTC) が検出され、その検出個数と予後の相関が報告されていた。一般に EpCAM など上皮系細胞マーカーを用いる CTC 検出法が注目されていたが、上皮系マーカーによる検出方法では、癌細胞以外の上皮系細胞を検出する疑陽性の問題があり、改善が求められていた。さらに検出された細胞が癌細胞であることの確定的な証明がなされていなかった。我々が開発した TelomeScan はテロメラーゼ活性を有する癌細胞で特異的に増殖するウイルスに蛍光色素遺伝子を組み込んでおり、癌細胞を蛍光色素で可視化することができる。その可視化を利用すると、単なる検出だけでなく、その細胞を捕捉できることから、その細胞の遺伝子情報などの分子生物学的解析を行う本研究を計画した。

2. 研究の目的

TelomeScan が発現する蛍光色素により担癌患者の血液中に存在する癌細胞を検出し、その遺伝子解析まで可能となるシステムを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 血液中の消化器癌細胞を TelomeScan によって検出する条件設定の確立

健康人血液中に癌細胞を混入させた検体において TelomeScan で癌細胞に GFP を発現させ、フローサイトメトリーを用いて癌細胞検出。

- (2) TelomeScan による癌細胞の捕捉とその癌細胞の遺伝子変異の検出

既知の遺伝子変異を持つ癌細胞を健康人血液に混じり、フローサイトメトリーを用いて、GFP 発現細胞を他の白血球細胞から分離し、ソーティング。

さらに極少数の細胞からの核酸抽出と、シーケンス解析、変異特異的 PCR 増幅。

一定の割合である遺伝子が野生型のもので、変異型のを混ぜ、変異遺伝子配列が検出できる純度を同定。

- (3) 大腸癌患者からの臨床検体における CTC 解析の可能性の確認。

学内倫理委員会で承認されたプロトコルに則り、患者の同意を得て、血液を採取し、担癌患者における原発癌の遺伝子変異と同一の遺伝子変異を CTC において検出する。

4. 研究成果

- (1) 血液中の既知の消化器癌細胞が TelomeScan による蛍光を発することで、

フローサイトメトリーで検出できること、蛍光顕微鏡でも観察できることが確認された。(図1)

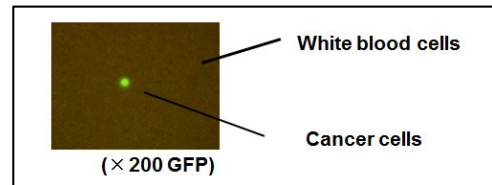


図1 健康人血液中に混じた大腸癌 SW480 細胞を蛍光顕微鏡で観察。

- (2) TelomeScan による癌細胞の捕捉  
フローサイトメトリーを用いて、GFP 発現細胞が捕捉でき、KRAS、BRAF 遺伝子変異が確認され、捕捉した細胞が癌細胞であることを確認した。(図2)

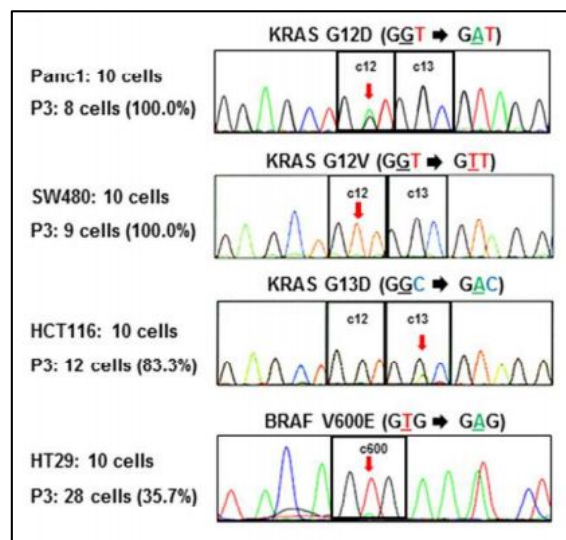


図2 捕捉された癌細胞のシーケンス解析により既知の KRAS、BRAF が検出された。

ただし、シーケンスで遺伝子変異を検出するには 30%以上の割合で癌細胞が含まれる必要があり、フローサイトメトリー法による癌細胞の抽出、捕捉には高い純度が必要であることが判った。(図3)

SW480 (G12V)	FEF3 (wild)	Purity of SW480	KRAS (codon 12 & 13)	KRAS status
500 cells	500 cells	50%		G12V
400 cells	600 cells	40%		G12V
300 cells	700 cells	30%		G12V
200 cells	800 cells	20%		wild
100 cells	900 cells	10%		wild

図3 癌細胞 SW480 と正常細胞 FEF3 を一定の割合で混ぜてシーケンス解析。

一方、変異時的プライマーを用いた PCR では、純度 5%まで遺伝子変異が検出可能であることを確認した。

- (3) 大腸癌患者からの臨床検体において CTC 解析を試みた。8 名に患者において、原発癌の遺伝子変異を確認し、同一の遺伝子変異を CTC において解析したところ、KRAS、BRAF の遺伝子変異がそれぞれ 1 名ずつ検出された。(表 1)

Patients				FACS analysis		Genetic analysis			
Tumor site	Stage	Gene status of primary tumor	Metastasis	Date	Number of GFP-positive cells	Primer	Amplification	Cl values 1st PCR	2nd PCR
Colon	I	KRAS G13D	None	P2	6	KRAS G13D	-	NA	NA
Colon	II	KRAS G13D	None	P2	20	KRAS G13D	-	NA	NA
Colon	II	KRAS G12D	Liver	P2	95	KRAS G12D	+	55.1	51.0
Colon	III	KRAS G13D	None	P2	913	KRAS G13D	-	NA	NA
Colon	III	BRAF V600E	Lung, Spleen, Ovary	P2	138	BRAF V600E	+	53.0	NA
Colon	IV	KRAS G12D	Liver	P2	14	KRAS G12D	-	NA	NA
Colon	IV	KRAS G12V	Liver	P2	74	KRAS G12V	-	NA	NA
Colon	IV	KRAS G12V	Lung	P2	53	KRAS G12V	-	NA	NA

NA, not amplified.

表 大腸癌患者 8 名における CTC 解析

### 考察

本研究課題を通して、上皮マーカー発現の有無に関わらず、TelomeScan を用いた CTC 検出システムは、フローサイトメトリー法や遺伝子解析技術と組み合わせる事で高感度かつ簡便に CTC の遺伝子変異を検出できる新たなツールとなる事が示唆された。ウイルス製剤によるイメージング技術を利用した CTC 診断は他に類を見ず全く新規のアプローチである。多くの正常細胞である血球系細胞の中から癌細胞を生きたまま選択的に捕捉し解析できる技術は、今後の発展していく癌治療の個別化に寄与する新たな診断技術へ進化するものと期待される。

### 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)

#### [雑誌論文](計 13 件)

Yano S, Tazawa H, Hashimoto Y, Shirakawa Y, Kuroda S, Nishizaki M, Kishimoto H, Uno F, Nagasaka T, Urata Y, Kagawa S, Hoffman RM, Fujiwara T. A genetically engineered oncolytic adenovirus decoys and lethally traps quiescent cancer stem-like cells in S/G2/M phases. *Clinical Cancer Research* 有り Vol.19, 2013, 6495-6505 DOI:10.1158/1078-0432

Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T. Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy. Expert opinion on biological therapy. 有り Vol.13, 2013, 1569-1583 DOI:10.1517/14712598.2013.845662.

Ohara T, Noma K, Urano S, Watanabe S, Nishitani S, Tomono Y, Kimura F, Kagawa S, Shirakawa Y, Fujiwara T. A novel synergistic effect of iron depletion on antiangiogenic cancer

therapy. *International Journal of Cancer* 有り, Vol.132, 2013, 2705-2713, DOI: 10.1002/ijc.27943.

#### [学会発表](計 7 件)

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, テロメラーゼ活性を指標とする血中遊離癌細胞の高感度検出法の開発と遺伝子解析技術への応用, 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013 年 4 月 13 日, 福岡市

重安邦俊, 橋本悠里, 竹原清人, 宇野 太, 永坂岳司, 田澤 大, 香川俊輔, 浦田泰生, 藤原俊義, 蛍光標識による血中遊離癌細胞の Liquid Biopsy 技術のバイオマーカー解析への応用, 第 51 回日本癌治療学会学術集会, 2013 年 10 月 26 日, 京都市

重安邦俊, 香川俊輔, 藤原俊義, 他, 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, 2012 年 09 月 19 日 ~ 2012 年 09 月 21 日, 札幌市

重安邦俊, 香川俊輔, 藤原俊義, 他, 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, 2012 年 06 月 28 日 ~ 2012 年 06 月 29 日, 熊本市

Shigeyasu K, Kagawa S, Fujiwara T, 他, A highly sensitive detection system of genetic alterations in circulating tumor cells using a telomerase-specific replication-competent adenovirus, AACR annual meeting 2012, 2012 年 03 月 31 日 ~ 2012 年 04 月 04 日, シカゴ

香川俊輔, 藤原俊義, 他, 胃癌幹細胞に対するテロメラーゼ特異的腫瘍融解ウイルス治療, 第 49 回日本癌治療学会学術集会, 2011 年 10 月 27 日, 名古屋市

香川俊輔, 藤原俊義, 他, 消化器癌診断治療におけるサイトメトリーの役割 胃癌幹細胞に対するテロメラーゼ特異的腫瘍融解ウイルス治療とその作用機序の解析, 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会, 2011 年 6 月 26 日, 京都市

#### [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

香川 俊輔 (KAGAWA SHUNSUKE)

岡山大学病院・講師

研究者番号：00362971

(2) 研究分担者

藤原 俊義 (FUJIWARA TOSHIYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学研究科・教授

研究者番号：00304303

(3) 研究協力者

田澤 大 (TAZAWA HIROSHI)

岡山大学病院・助教

研究者番号：90415513

(4) 研究協力者

重安 邦俊 (SHIGEYASU KUNITOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学研究科・大学院

生