

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592439

研究課題名(和文) 癌幹細胞を標的とした婦人科癌治療ならびに腫瘍細胞イメージングシステムの構築

研究課題名(英文) Establishment of cancer virotherapy and imaging system targeting cancer stem cells in gynecologic cancer.

研究代表者

高倉 正博 (TAKAKURA, Masahiro)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：20313661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではテロメラーゼが活性化された細胞でのみ増殖可能な改変型アデノウイルス(Telomerase-specific replication adenovirus:TRAD)が抗癌剤耐性の婦人科癌がん幹細胞候補に対して有効に作用することを示した。

またGFP発現型TRADを用いて末梢血中の腫瘍細胞(circulating tumor cells: CTC)を検出した。初発・再発を含む婦人科癌症例での検討において約40%の症例でCTCが認められた。CTCは臨床進行期や病理組織型といった既存の臨床病理学的因子との間には相関は認められなかったが、治療開始後もCTCが存在し続ける症例は予後不良であった。

研究成果の概要(英文)：We have established telomerase-specific replication-selective adenoviruses (TRAD) which can replicate only in telomerase activated cells. In the present study, we assessed the effectiveness of TRAD to the candidates of cancer stem cells in gynecologic cancer.

We have also developed a detection system for circulating tumor cells (CTCs) using GFP expressing TRAD. CTCs were detected in 40% of patients with gynecological malignancies. There was no significant correlation between CTC counts and tumor types or known clinicopathological factors, such as clinical stage and histological type. The CTCs rapidly vanished after surgery or chemotherapy in most patients whose treatments were effective. In contrast, the persistence of CTCs even after treatments was tightly associated with poor response to the treatments ( $P<0.005$ ).

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

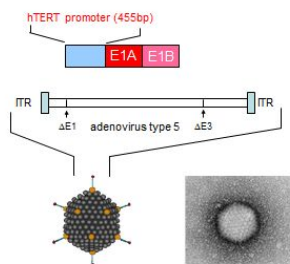
キーワード：癌幹細胞 末梢血中腫瘍細胞 テロメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

近年、癌細胞のごく一部の細胞が高い腫瘍形成能と自己複製能、さらに多分化能を有するという癌幹細胞の概念が急速に受け入れられつつある。一般に癌幹細胞は各種抗癌剤や放射線など既存の治療に抵抗性であるとされ、癌幹細胞に有効な治療法を開発することが難治性癌あるいは進行癌の治療における喫緊の課題である。

テロメラーゼは細胞分裂の都度、短縮を繰り返している染色体末端構造のテロメアを延長することで細胞の無限増殖を可能としている。約80%の上皮性悪性腫瘍で活性化されており、癌幹細胞においてもこの活性は認められていることが報告されている (FEBS Letters 2010; 584:3819-25)。我々はテロメラーゼ活性が逆転写酵素蛋白である human telomerase revert transcriptase (hTERT) の遺伝子発現の有無によって制御されていることを明らかにしてきた (Cancer Res 1998; 58: 1558-61, Int J Cancer. 1998; 78: 539-43)。この研究の過程でクローニングした hTERT プロモーターは癌細胞においては CMV プロモーター等のウイルスプロモーターに匹敵するような極めて強い活性を示す一方で正常細胞では不活化されており極めて癌特異性が高いことが明らかになっている (Cancer Res. 1999; 59:551-7)。TRAD (Telomerase-specific replication adenovirus) はこの hTERT プロモーターを 5 型アデノウイルスの E1A・E1B 遺伝子の upstream に配することで hTERT プロモーターが活性化された細胞すなわちテロメラーゼ陽性細胞でのみ増殖するようにデザインされた改変アデノウイルスである (図 1)。

図 1 Telomerase specific Replication Adenovirus (TRAD)

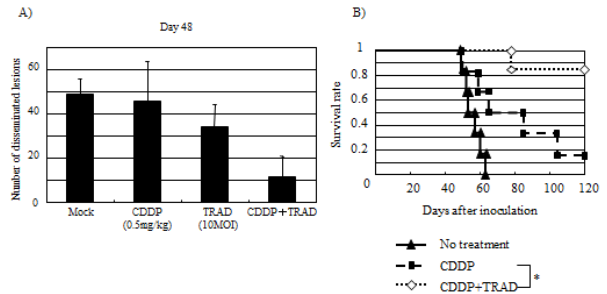


TRAD は細胞内で増殖することによりウイルス増殖自体の毒性でもって細胞傷害効果を発揮する。我々はマウス卵巣癌腹膜播種モデルにおいて TRAD がシスプラチンとの併用時に著効することを明らかにした (Cancer Gene Ther. 2010; 17:11-9, 図 2)。このような現象のメカニズムとして既存の抗癌剤が効きにくい細胞集団に TRAD が効果を発揮している可能性が考えられた。卵巣癌においては CD117 陽性かつ CD45 陽性の細胞集団を癌幹細胞の候補とする報告がなされており (Cancer Res. 2008; 68: 4311-20)、癌幹細胞

候補であるこのような細胞に対して TRAD が有効に作用している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

図 2 マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける TRAD の効果



本研究では臨床応用にむけ、TRAD の有効性の検証並びに投与法の開発を行う。また GFP を強制発現させた TRAD-GFP を用いて腫瘍細胞を可視化も試みる。これは特に血中に存在する癌細胞の検出に有用であると考えられる。腫瘍から末梢血中に侵入した腫瘍細胞 (circulating tumor cells; CTC) の検出は乳癌や大腸癌等で予後マーカーあるいは治療効果の指標として有用である可能性が示唆されている (N. Engl. J. Med. 2004; 351: 781-91, J. Clin. Oncol. 2008; 26: 3213-21)。これらの研究では主に細胞表面の上皮マーカーの発現によって CTC を識別している。この方法では (1) 癌細胞と正常上皮細胞の区別が困難であること、(2) 生細胞と死細胞の区別が時に困難であること、(3) 腫瘍細胞が血管内に移行する際、上皮間葉転換 (EMT) によって組織特異的抗原の発現が減弱する可能性があること等が問題点としてあげられる。特に (3) の問題は重要で EMT を起こした細胞は幹細胞に近い性質を示すことが報告されており (Stem Cells 2010; 28: 1435-45)、従来法では EMT を起こしたより転移を起こしやすい可能性がある癌細胞を見逃す恐れがある。本法ではこれらの問題点を克服して「生きた癌細胞」を特異的に標識できるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) TRAD の婦人科癌幹細胞に対する効果の検討。

卵巣癌細胞株 SKOV3 を FACS により表面抗原 CD117 と CD44 の発現の有無で分画・回収し、増殖能、コロニー形成能、マウスでの造腫瘍能を各々の分画で評価した。各々の分画に対して cisplatin と OBP-301 の効果を in vitro で検討した。また cisplatin ならびに OBP-301 存在下での CD117/CD44 発現分画の変化を観察した。

(2) TRAD-GFP を用いた末梢血中腫瘍細胞 (CTC) の検出

患者から同意のもとに採取された末梢血を溶血処理後、TRAD に感染させ 24 時間後蛍光顕微鏡にて観察する。正常血液 5ml に子宮

頸癌細胞株 C33A 100 個加えたものをコントロールとして至適条件を検討する。予備実験においては溶血ステップを 2 回繰り返すことで検出率の向上が認められた。少数の白血球での非特異的 GFP 発現が認められたが、これに対しては白血球共通抗原である CD45 蛍光染色することで容易に区別することが可能となった。蛍光顕微鏡の観察においても観察方法を標準化することで観察者の熟練度に左右されない系を確立した。

#### 4. 研究成果

(1) TRAD の婦人科癌幹細胞に対する効果の検討。

CD117 陽性 CD44 陽性の細胞分画は他の分画に比べて *in vitro* で高い増殖能とコロニー形成能を示し、またマウスでの造腫瘍能も高く癌幹細胞の候補と考えられた。この分画は cisplatin に対して抵抗性が高かったが OBP-301 には高感受性を示した。また cisplatin 存在下では CD117/CD44 発現分画の増加が認められたが OBP-301 存在下ではこの変化は消失した。CD117 陽性 CD44 陽性の卵巣癌幹細胞は cisplatin 抵抗性を示したが OBP-301 には感受性であり、OBP-301 のプラチナ抵抗制卵巣癌への応用あるいはプラチナ製剤との併用療法の有用性が示された。

(2) TRAD-GFP を用いた末梢血中腫瘍細胞 (CTC) の検出

初発および再発癌症例の約 40% で CTCs が認められた。癌種によって陽性率に差は認められなかった。また臨床進行期や病理組織型といった因子との間にも相関は認められなかったが、治療開始後も CTCs が継続して認められた症例は治療効果が認められないことが有意に多く、予後も不良であった。本法における CTC の検出は非常に特異性が高く臨床応用に有望と考えられた。婦人科癌患者における CTC は治療効果のマーカーとして有用な可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Molecular characterization of CD133+ cancer stem-like cells in endometrial cancer.

Nakamura M, Zhang X, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Kyo S.  
Int J Oncol. 44: 669-77, 2014 査読有り

Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells.

Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Fujiwara H.  
Cancer Lett. 345: 106-14, 2014 査読有り

末梢血中がん細胞の検出とその意義

高倉正博 藤原俊義 京哲  
産婦人科の実際 62(3): 297-305, 2013 査読なし

Circulating tumor cells detected by a novel adenovirus-mediated system may be a potent therapeutic marker in gynaecological cancers.

Takakura M, Kyo S, Nakamura M, Maida Y, Mizumoto Y, Bono Y, Zhang X, Hashimoto Y, Urata Y, Fujiwara T, Inoue M.

Br J Cancer. 107(3):448-54, 2012 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

婦人科癌患者における末梢血中腫瘍細胞 (CTCs) の消長は予後を反映する

高倉正博、京哲、中村充宏、水本泰成、保野由紀子、藤原浩

第 61 回北日本産科婦人科学会学術講演会  
2013 年 9 月 7 日 旭川市

Circulating tumor cells (CTCs) の検出・解析とその臨床応用

高倉正博

第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 シンポジウム

2013 年 7 月 20 日 東京都

Circulating tumor cells (CTCs) の検出・解析とその臨床応用

高倉正博、京哲、中村充宏、水本泰成、保野由紀子、浦田泰生、藤原俊義、藤原浩

第 19 回日本遺伝子治療学会 ランチョンセミナー

2013 年 7 月 6 日 岡山市

テロメラーゼプロモーターを応用した末梢血中腫瘍細胞 (CTCs) の検出

高倉正博、中村充宏、水本泰成、保野由紀子、藤原俊義、浦田泰生、京哲

第 23 回日本サイトメトリー学会 シンポジウム

2013 年 6 月 23 日 東京都

婦人科がん患者における末梢血中腫瘍細胞の回収と遺伝子解析

高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、水本泰成、保野由紀子、井上正樹

第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会  
2013 年 5 月 11 日 札幌市

サイトメトリーの進歩と細胞診断学への応用 テロメラーゼ特異的増殖型ウイルスを用いた末梢血中腫瘍細胞の検出・単離と遺伝子解析

高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、水本泰成、保野由紀子、井上正樹、藤原俊義、浦田泰生

第 51 回日本臨床細胞学会・ワークショップ

2012年11月10日 新潟市

子宮頸癌における腫瘍特異的増殖型アデノウイルス末梢血中腫瘍細胞の単離と遺伝子解析

高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、水本泰成、保野由紀子、張英智、藤原俊義、井上正樹

第71回日本がん学会学術総会

2012年9月19日 札幌市

末梢血中腫瘍細胞の単離と遺伝子解析 - 子宮頸癌症例における検討 -

高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、水本泰成、保野由紀子、藤原俊義、浦田泰生、井上正樹

第52回婦人科腫瘍学会学術講演会

2012年7月19日 東京都

婦人科癌におけるGFP発現テロメラーゼ特異的増殖型アデノウイルスを用いた末梢血中腫瘍細胞の検出

高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、森紀子、水本泰成、保野由紀子、張英智、井上正樹

第70回日本癌学会学術総会

2011年10月3日 名古屋市

婦人科癌におけるGFP発現テロメラーゼ特異的増殖型アデノウイルスを用いた末梢血中腫瘍細胞の検出

高倉正博、京哲、中村充宏、毎田佳子、森紀子、水本泰成、保野由紀子、井上正樹

第63回日本産科婦人科学会学術講演会

2011年8月30日 大阪市

〔その他〕

ホームページ等

<http://obgyn.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高倉 正博 (TAKAKURA, Masahiro)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：20313601

### (2) 研究分担者

京 哲 (KYO, Satoru)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：50272969