

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462280

研究課題名(和文) 癌検出ウイルスマーカーを用いた肉腫および癌腫骨転移における末梢循環癌細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of circulating tumor cells using telomerase-specific adenovirus in patients with sarcoma and metastatic breast cancer

研究代表者

松尾 俊宏 (Matsuo, Toshihiro)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：90397977

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)：肉腫および乳癌骨転移の末梢血循環癌細胞(CTC)をテロメラーゼ発現癌細胞にのみ増殖するウイルスを用いて検出した。肉腫10例20検体(術前・術後)に対してCTC数と臨床因子との関連を分析した。術前と比較し術後CTC数が増加した症例で肺転移を認め、転移のある症例の術後CTC数は転移のない症例と比較して有意に多かった。死亡症例の術後CTC数は生存症例の術後CTC数と比較し有意に多かった。術後CTC数が肉腫の転移や予後の予測因子になる可能性がある。また乳癌骨転移症例7例中1例にのみCTCが検出された。CTCを検出した症例は治療抵抗性の症例であった。CTCが治療効果の予測因子となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We attempted to detect viable circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood from sarcoma and bony metastatic breast cancer patients using a telomerase-specific viral agent. The number of CTCs postoperatively was significantly higher in sarcoma patients with metastasis than in those without metastasis ( $p = 0.022$ ). The number of postoperative CTCs was significantly higher in dead sarcoma patients than in living patients ( $p = 0.014$ ). A significant relationship was found between the number of CTCs and both occurrence of lung metastasis and prognosis in patients with sarcoma. Detection of CTCs using this method may be useful for prognostic evaluation of sarcoma patients. CTCs were detected in one patient who showed resistance for chemotherapy and hormone therapy in bony metastatic breast cancer patient. The number of CTCs may correlate with sensitivity to chemotherapy or hormone therapy in metastatic breast cancer patients.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：末梢血循環癌細胞 肉腫 乳癌 肺転移 骨転移 テロメラーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

現在、骨・軟部悪性腫瘍(肉腫)に対して5年生存率7割程度の生命予後を得ている。しかし多くの肉腫では肺転移などの病態には既存の治療法では対処できず、満足のいく生存率を得ていないのが現状である。よって従来の治療法に抵抗のある四肢悪性腫瘍に対する新たな治療法の開発が切望されているとともに、早期発見を可能にする簡便な検査法があれば、従来の治療方針を用いても予後の改善が望めると考える。現在の日本において、癌腫患者は増加傾向にあり、2人に1人は癌に罹患すると言われている。40歳以上の骨腫瘍患者の約8割は癌骨転移であるとのデータや、癌骨転移患者数は約10~20万人とのデータもある。今後、癌患者の予後の改善とともにQOLの考慮が重要となり、益々、骨関連事象(skeletal-related event: SRE)の予防・早期発見が必要になると考えられる。ヒトのテロメア構造はTTAGGG配列が繰り返され、通常の細胞ではDNA複製に伴いテロメアの短縮する現象が観察されている。これに対しテロメラーゼは染色体末端に存在するテロメア繰り返し配列をde novoに付加伸長する特殊な逆転写酵素で、癌細胞ではテロメラーゼを発現することにより増殖能および不死化を獲得している。hTERT(human telomerase reverse transcriptase)はテロメラーゼの構成成分で、骨・軟部腫瘍においても我々の研究データでは高率のテロメラーゼ活性およびhTERTの発現を有しており予後予測因子となることを解明してきた。高感度CTC検出システムの診断用ウイルスマーカー(テロメスキャン; OBP-401)は、アデノウイルス由来の癌細胞検出マーカーである。OBP-401のベクターのウイルス遺伝子はテロメラーゼのプロモーターで発現が調節されるように改変されており、またウイルス遺伝子とともにGreen Fluorescent Protein(GFP)の遺伝子が組み込まれているため、細胞内でウイルスが増殖すると緑色蛍光を発するように作成されている。またアデノウイルスは血球系細胞への感染効率が極めて低いことから、癌細胞を含有する末梢血ではウイルスは癌細胞に選択的に感染して増殖する。さらにアデノウイルスは生きた細胞でしか増殖しないため、本ベクターを用いれば“生きたがん細胞”を高感度で特異的に検出することが可能である。我々は現在までに肉腫においてもCTCが存在することを証明してきた。このOBP-401の改良型として、35型ファイバーおよび血液特異的マイクロRNAを導入することにより、アデノウイルス受容体(CAR)陰性癌にも感染し、白血球に対する感染(偽陽性)を更に抑制する、より感度の高い次世代型テロメスキャン(テロメスキャン; F35)を開発した。CTCは遠隔転移巣を形成する腫瘍細胞を含有し、癌幹細胞に近い性質を持つと予測されている。CTCの解析は癌の生物学的特性の解明や、効果的な治療法、より感度の

高い早期発見検査法の開発に重要な鍵となる可能性がある。

### 2. 研究の目的

骨・軟部肉腫症例および乳癌骨転移症例の末梢血を採取し、次世代型ウイルスマーカー(テロメスキャン F35)を用いて感染させ、各種免疫染色を行うことにより存在する微量のCTCを検出し解析する。また、術前および術後でのCTCの有無、個数の測定を行い、臨床所見との関連等を検討する。侵襲が少なく簡便な血液検査で肉腫および乳癌骨転移の予後予測などに応用が可能であるか検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 肉腫10患者の術前後の末梢血、計20検体を解析した。男性5例、女性5例で平均年齢73歳(44-86歳)であった。病理診断は粘液線維肉腫5例、脂肪肉腫2例、未分化多形肉腫1例、線維肉腫1例、平滑筋肉腫1例であった。組織グレードはGrade 2が5例、Grade 3が5例であった。すべての症例で腫瘍切除を行い、転移例にはイホスファミドとドキシソルビシンを用いた化学療法を行った。術後経過観察期間は平均37ヵ月(12-49ヵ月)で肺転移を3例に認め、死亡例は2例であった。

(2) 乳癌骨転移7患者の末梢血7検体を解析した。女性7例で平均年齢67歳(60-75歳)であった。全例抗がん剤治療もしくはホルモン療法を受けており、有病生存症例であった。

(3) 研究協力施設であるオンコリスパイオファーマ株式会社と連携し研究を行う。適応患者より同意を得た後に、肘静脈より末梢静脈血7.5mlを採血し、赤血球を溶血・除去する。テロメスキャンを添加し37℃で24時間感染させ、各種マーカーの抗体(CD45, DAPI, ビメンチンもしくはサイトケラチン)で免疫染色する。蛍光顕微鏡を用いてGFP陽性細胞を検出し個数をカウントし、CTCの個数と臨床所見との関連を検討する。

### 4. 研究成果

肉腫CTC数は術前で平均1.9個(0-6個)で術後は平均2.6個(0-18個)で、両群間に有意差を認めなかった( $p=0.704$ )。術前に比べ術後のCTC数が増加した症例は全例に肺転移を認めた。術前CTC数と臨床因子との比較

では有意差を認めなかった (性別,  $p=0.714$ ; 転移の有無,  $p=0.650$ ; 年齢,  $p=0.153$ ; 組織グレード,  $p=0.538$ ; 腫瘍径,  $p=0.882$ ; 生命予後,  $p=0.952$ )。術後 CTC 数と以下の臨床因子との有意差はなかった (性別,  $p=0.338$ ; 年齢,  $p=0.603$ ; 組織グレード,  $p=0.190$ ; 腫瘍径,  $p=0.243$ )。転移症例 ( $8.3 \pm 8.4$ )は転移のない症例 ( $0.14 \pm 0.38$ )より有意に術後 CTC 数が多かった ( $p=0.022$ ) (図 1)。死亡例 ( $10.5 \pm 10.6$ )は生存例 ( $0.63 \pm 1.41$ )よりも有意に術後 CTC 数が多かった ( $p=0.014$ ) (図 2)。よって経時的に CTC 数を解析することにより 転移の早期発見や予測が可能になると考える。乳癌骨転移症例中, CTC を検出できた症例は 1 例で CTC 数は 4 個であった。他 6 例は CTC が検出されなかった。CTC を検出した症例は治療抵抗性であり癌進行症例であった。肉腫において CTC の解析は 適切な術前および術後療法の追加や微小転移の段階での早期治療を開始することへの指標となり, 患者の予後の改善に貢献できると期待される。乳癌骨転移例において, CTC が治療効果の予測因子になる可能性が示唆された。更に本法は侵襲が少なく簡便な血液検査で行う方法であり, 設備費や医療費の軽減にもつながると期待できる。

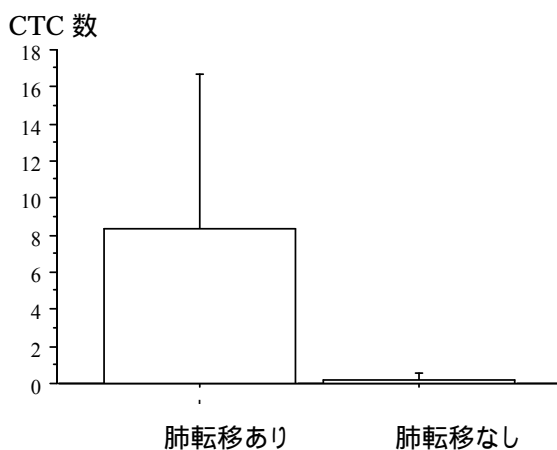


図1 CTC 数と肺転移

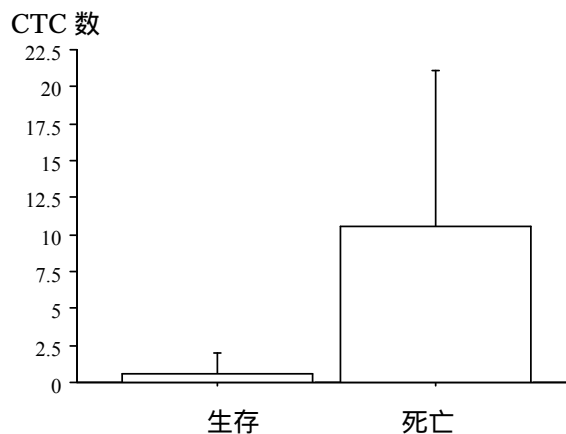


図2 CTC 数と予後

## 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 1 件)

1. Toshihiro Matsuo, Masataka Deie, Takashi Sugita, Shoji Shimose, Yasuo Urata, Norimitsu Wakao, Katsuhisa Kawanami, Mitsuo Ochi. Circulating tumor cells using hTERT-specific replication-selective adenovirus in patients with soft tissue sarcoma. Int J Clin Exp Med. 査読あり 出版中

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Toshihiro Matsuo, Masataka Deie, Shoji Shimose, Yasuo Urata, Katsuhisa Kawanami, Keiji Sato. Circulating tumor cells using hTERT-specific replication-selective adenovirus as a prognostic factor in soft tissue sarcoma. Connective Tissue Oncology Society 2016 Annual Meeting, Lisbon Portugal, November 9-12, 2016.
2. Toshihiro Matsuo, Takashi Sugita, Shoji Shimose, Norikazu Hamada, Masataka Deie, Yasuo Urata. Detecting circulating tumor cells by hTERT-specific replication-selective adenovirus in postoperative sarcoma patients. ESMO-ASIA 2015, Singapore, 12.18-21, 2015.
3. Toshihiro Matsuo, Norikazu Hamada, Hiroki Hachisuka, Takahiko Hamasaki, Yasunori Izuta, Ryo Mori, Shingo Okawa,

Takahiro Harada, Yasuo Urata, Takashi Sugita. Evaluation of human circulating tumor cells by hTERT- specific replication-selective adenovirus in soft tissue sarcoma. 39<sup>th</sup> European Society for Medical Oncology 2014 Congress, Madrid Spain, 9.26-30, 2014.

4. 松尾俊宏, 杉田孝, 濱田宜和, 蜂須賀裕己, 濱崎貴彦, 泉田泰典, 仁井谷学, 大川新吾, 原田崇弘, 片桐伸悦, 浦田泰生, 谷山清己: hTERT 依存性アデノウイルス製剤を用いた軟部肉腫における末梢血循環癌細胞の検討: 第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 大阪, 7.17-18, 2014.

〔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

松尾 俊宏 (MATSUO, Toshihiro)  
愛知医科大学・整形外科・講師  
研究者番号: 90397977

##### (2) 研究分担者

谷山 清己 (TANIYAMA, Kiyomi)  
呉医療センター・院長  
研究者番号: 50163639

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

#### (4) 研究協力者

( )