

# 遺伝子組換えアデノウイルスを用いたCirculating Tumor Cell検出系の 開発と臨床応用

大阪大学大学院 薬学研究科  
准教授 櫻井 文教

(共同研究者)

大阪大学大学院 薬学研究科 教授 水口 裕之  
岡山大学大学院 医歯薬総合研究科 教授 藤原 俊義

## はじめに

癌（悪性新生物）は、現在我が国における死因の第1位であり、その約30%を占めることから、画期的治療法の開発に加えて、簡便かつ正確な診断法の開発が必要不可欠である。現在、癌の診断方法としては、主に①MRIなど大型検査機器を用いる手法と、②血液中の腫瘍マーカーなどを測定する方法が用いられているが、簡便かつ患者負担の少ない②の方法に期待が集まっている。腫瘍マーカーとしては、これまでにPSA (Prostate-specific antigen) などが臨床応用されているが、既存の腫瘍マーカーの多くは、腫瘍がある程度大きくなると値が上昇しないことや、他の良性疾患や加齢によっても値が上昇するなどの幾つかの問題点を有している。そこでこれらの問題点を克服可能な新規腫瘍マーカーとして、末梢循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells: CTC) が注目されている<sup>(1)</sup>。CTCは、全身転移の危険性を高めることや、CTCが認められた患者の予後が著しく低いことなど臨床症状と密接な関係を示すことから、CTCを予後予測因子やサロゲートマーカーとして利用するために、CTCを簡便かつ高感度に検出可能な手法の開発が期待されている。CTC検出法としてはCellSearch System<sup>®</sup>が唯一アメリカFDAより認可を受けている。この方法は、血液細胞と比較してCTCで高発現しているEpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) に対する抗体を用いて、血液中に含まれる上皮細胞を濃縮し、さらにCytokeratinに対する抗体で染色することでCTCを検出する。しかし、EpCAMは癌の悪性化とともに発現が下がること、またCytokeratinは癌によって発現が一様でないことが知られており、特異性・汎用性に問題を有している。一方、我々はほとんどの癌細胞で高発現しているhTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) 依存的に増殖し、GFP (Green Fluorescent Protein) を発現する制限増殖型アデノウイルス (GFP-expressing Telomerase-specific Replication-competent Adenovirus; TRAD-GFP) を用いてCTCを検出する方法を開発した<sup>(2)</sup>。TRAD-GFPは、アデノウイルス (Ad) の増殖に必須のE1遺伝子をhTERTプロモーターによって発現させることで、hTERT陽性の癌細胞でのみ増殖するように設計されている。さらに、GFP発現カセッ

トを搭載しているため、癌細胞でのみGFPを高発現する。しかし、TRAD-GFPによるCTCの検出にはCTCがAd受容体 (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor; CAR) を発現していることが必要であり、浸潤・転移能の高い癌細胞や増殖能の高い細胞ではCARの発現が低下しているため、TRAD-GFPではこれらの細胞を検出できないという欠点がある。また、リンパ球にも低頻度ながら感染し、偽陽性 (GFP陽性細胞) を生じることが問題となっている。そこで我々は最近、上記を克服可能な改良型TRAD-GFPであるTRADF35-142T-GFPを開発した。このTRADF35-142T-GFPでは、CAR陰性細胞を含め、赤血球以外のすべてのヒト細胞で発現しているCD46を介して感染するように、TRADF35-142T-GFPのファイバーを、CD46を感染受容体とする35型Ad由来のファイバーに置換した (従来のTRAD-GFPは5型Adを基盤として構築している)。また、血液細胞でのGFPの発現を抑制するために、血液細胞で高発現しているmicroRNAであるmiR-142-3pの標的配列をE1遺伝子およびGFP遺伝子の3'非翻訳領域に挿入した。本研究では、TRADF35-142T-GFPを用いたCTC検出法を確立するとともに、その臨床応用を行った。

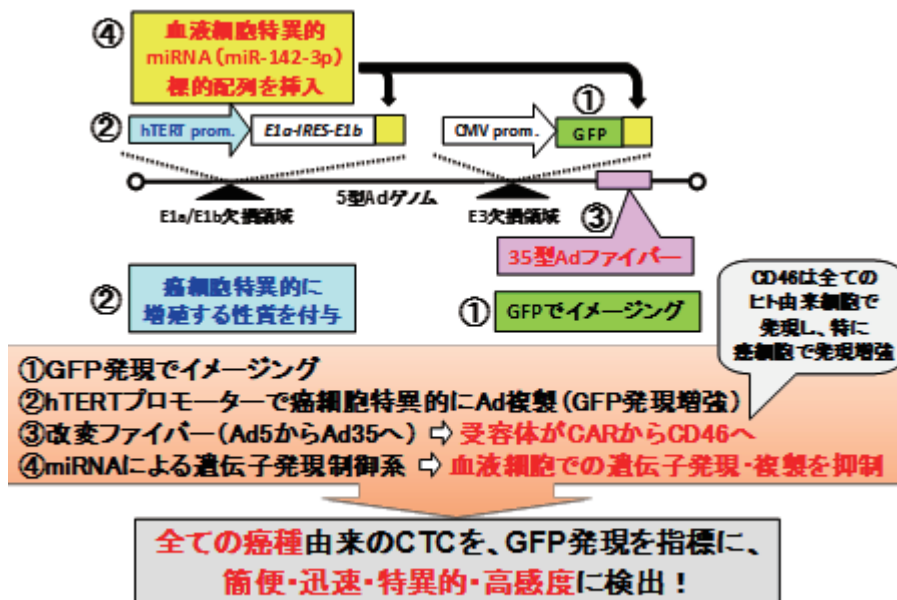


図1. GFP発現変異型アデノウイルス(改良型テロメスキャン)

## 結 果

まず、作製したTRADF35-142T-GFPの各種癌細胞への感染効率 (GFP発現効率) を検討するため、CAR陽性および陰性癌細胞株に上記で作製した各種制限増殖型Ad (TRAD-GFP、TRADF35-GFP、TRADF35-142T-GFP) をMOI (multiplicity of infection) 1もしくは10で作用させた。感染24時間後にGFP陽性率をFlow cytometryにて測定した。各種制限増殖型AdをCAR陽性および陰性癌細胞に作用させ、GFP陽性率を検討したところ、CAR陽性細胞ではTRAD-GFPおよびTRADF35-142T-GFP作用群ともに、高いGFP陽性率を示した。一方でCAR陰性細胞においてはTRAD-GFPでは、約10%がGFP陽性であったのに対し、TRADF35-142T-

GFPでは80%以上がGFP陽性であった。

次に、TRADF35-142T-GFP作用群において偽陽性の出現（GFP陽性の血液細胞）が従来のTRAD-GFP作用群と比較して減少するか否か検討するために、ヒト末梢血単核球細胞（Peripheral blood mononuclear cells; PBMC）に各種制限増殖型AdをMOI 0.1, 1, 10で作用させ、GFP陽性率をFlow cytometryで測定した。さらに蛍光顕微鏡を用いた検討も行った。PBMCにおいてmiR-142-3pが高発現していることは既に確認している。PBMCに各種制限増殖型Adを作用させたところ、TRAD-GFPでは0.004%がGFP陽性であった。ファイバーが35型でmiR-142-3pの標的配列を持たないTRADF35-GFPではGFP陽性率が約0.3%まで大きく上昇した。一方で、miR-142-3pの標的配列を持つTRADF35-142T-GFP作用群のGFP陽性率は大きく抑制されていた。さらに様々なヒトから回収したPBMCに各種制限増殖型Adを作用させ、蛍光顕微鏡下でGFP陽性率を検討したところ、GFP陽性率は各個人により大きなばらつきがあったものの、TRAD-GFPでは多くのGFP陽性細胞が検出されたのに対し、TRADF35-142T-GFP作用群ではGFP陽性細胞がほとんど認められなかった。

次に、実際に作製したTRADF35-142T-GFPを用いてCTCを高効率に検出可能か下記のモデル系を用いて検討した。血液1mLから採取したPBMCにRFP（Red fluorescence protein）を安定発現する癌細胞株（H1299およびT24細胞）を $1 \times 10^5$  cells混入させた。そこにTRAD-GFPおよびTRADF35-142T-GFPを $2 \times 10^7$  IFU（infectious unit）加え、24時間培養したのちに、GFP陽性細胞を顕微鏡下観察した。その結果、CAR陽性細胞であるH1299細胞を混合した場合にはTRAD-GFPおよびTRADF35-142T-GFPとも70%以上の癌細胞が検出できたのに対し、CAR陰性細胞であるT24細胞の場合には、TRAD-GFPでは約10%の癌細胞しか検出できなかったのに対し、TRADF35-142T-GFPでは90%以上の癌細胞が検出可能であった。

最後に作製したTRADF35-142T-GFPを用いて実際に癌患者の血液中のCTCを検出可能か検討した。大腸がん患者より血液7.5mLを回収し、溶血させた後にTRAD-GFPもしくはTRADF35-142T-GFPを $3 \times 10^9$  IFU加え、GFP陽性細胞を顕微鏡下観察した。その結果、TRAD-GFP、TRADF35-142T-GFPの両作用群においてCTCが検出された。しかし検出されたCTC数に関して、TRAD-GFP作用群とTRADF35-142T-GFP作用群との間に有意な差は認められなかった。TRADF35-142T-GFP作用群では偽陽性の出現が大きく抑制されていた。

## 考 察

本研究では、腫瘍細胞特異的に増殖可能な制限増殖型Adを用いることで、高効率にCTCを検出するシステムの構築に関して検討を行った。まず、高効率なCTC検出に向けてはファイバー領域を35型Ad由来のものに置換した。従来のTRAD-GFPは5型Adを基盤としており、CARに結合することで感染する。CARはTight junctionを構成する接着因子であり<sup>(3)</sup>、悪性度の高い癌細胞やEpithelial-Mesenchymal Transition（EMT）を起こした癌細胞では発現が低下することが知られている<sup>(4)</sup>。CTCはがん転移に関与することや、CTCがEMTを起こして

いることが報告されていることから<sup>(5)</sup>、5型Adを基盤としたTRAD-GFPではCTCを効率よく検出できない恐れがある。一方で、35型AdをはじめとするSpecies Bに属するAdは、CARではなくCD46に結合して感染する<sup>(6)</sup>。CD46は、ヒトではほぼ全ての細胞で発現しており、特に癌細胞では発現量が上昇していることが報告されている<sup>(7)</sup>。従って、実際にこれら感染受容体に結合するファイバー領域を35型Ad由来のものに置換することで、CD46を介して感染可能となり、CAR陰性細胞にも感染できる。実際に、各種腫瘍細胞株を用いて検討したところ、TRADF35-142T-GFPはTRAD-GFPが感染できなかったCAR陰性細胞でも高いGFP発現を示した。

一方で、CD46はPBMCをはじめとする血液細胞（赤血球を除く）にも高発現している。従って、ファイバー領域を35型Adのものに置換することで、PBMCなど血液細胞にも感染できるようになり、偽陽性が増加する恐れがある。そこで、血液細胞におけるE1遺伝子ならびにGFP遺伝子の発現を抑制することを目的に、血液細胞特異的なmiRNAであるmiR-142-3pの完全相補配列4コピーを、E1遺伝子ならびにGFP遺伝子の3'非翻訳領域（遺伝子とpoly A signalの間）に挿入した。これによって、もし正常血液細胞においてE1遺伝子およびGFP遺伝子の転写が起こったとしても、miR-142-3pがE1遺伝子およびGFP遺伝子の3'非翻訳領域にあるmiR-142-3pの標的配列に結合することによりmRNAの分解が起こり、その発現が抑制されると考えられる。実際に、ヒトPBMCにmiR-142-3p標的配列を持たないTRADF35-GFPを作用させた場合には、TRAD-GFPよりも多くのGFP陽性細胞が検出された。CTCの数は一般的にPBMC $10^7$ 個に数個と見積もられており、偽陽性が多くなるとCTCの正確な検出が妨げられると考えられる。一方で、miR-142-3pの標的配列を挿入することで偽陽性の数はTRAD-GFP作用群の1/100以下に抑制された。なお、挿入するmiR-142-3pの標的配列のコピー数であるが、これまでの検討から2コピーでは十分な発現抑制が得られないことから本研究では4コピーを挿入した。

癌患者の血液を用いた検討において、CTCの数という点においては、TRADF35-142T-GFPはTRAD-GFPと比較して優位性を示せなかった。一方で、偽陽性の数においては、健康人のPBMCを用いた検討の場合と同様、TRADF35-142T-GFPでは大きく抑制されていた。実際の癌患者血液中のCTCの検出においてはCD45などに対する免疫染色と組み合わせて検出することを計画しているが、抗体を用いた免疫染色では $10^7$ 個以上の血液細胞を抗体で処理するため、100%の細胞を染めることは難しいと思われる。従って偽陽性の細胞が多いと、免疫染色を組み合わせたとしても、正確にCTCを検出することは困難になると思われる。その点においても、TRADF35-142T-GFPは極めて高い有用性を有していると考えられる。

## 要 約

本研究より、改良型テロメスキャンを用いた検出法が、従来のCTC検出システムでは検出不可能であった癌細胞（悪性度の高いCAR陰性癌細胞）を高感度かつ簡便に検出でき、偽陽性の出現を激減できる有用なシステムであることが示された。本研究によりCTCが簡便かつ

高感度に検出・定量可能となれば、CTCをバイオマーカーとして抗がん剤の治療効果の判定や患者の予後の予測などに貢献できるものと期待される。

## 文 献

1. Danila DC, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 17:3903-3912. (2011) .
2. Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, Kagawa S, Uno F, Kuroda S, Tazawa H, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *J Clin Invest* 119:3172-3181. (2009) .
3. Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:15191-6.(2001).
4. Anders M, Vieth M, Röcken C, Ebert M, Pross M, Gretschel S, Schlag PM, Wiedenmann B, Kemmner W, Höcker M. Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression. *Br J Cancer* 100:352-359. (2009) .
5. Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold PL, Crystal RG, de Herreros AG, Moustakas A, Pettersson RF, Fuxe J. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. (Translated from eng) *Nat Cell Biol* 11:943-950. (2009) .
6. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 9:1408-1412. (2003) .
7. Bjorge L, Hakulinen J, Wahlstrom T, Matre R, Meri S. Complement-regulatory proteins in ovarian malignancies. *Int J Cancer* 70:14-25. (1997) .