

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：蛍光ウイルス試薬を用いた進行胃癌患者の腹腔内浮遊がん細胞の生物学的悪性度評価に基づく早期再発症例の診断技術の開発
2. 研究開発代表者：藤原俊義（国立大学法人岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学）
3. 研究開発の成果

TelomeScan（テロメスキャン、OBP-401）は、平成17年より岡山大学で開発してきた癌特異的蛍光標識アデノウイルス製剤であり、テロメラーゼ構成成分であるhTERT遺伝子のプロモーターにより、癌細胞のみで選択的に増殖してGFP緑色蛍光を発する（Kishimoto et al, Nature Med., 2006）。現在までに、*ex vivo*で進行癌患者の末梢血にTelomeScanを暴露することで、血中循環癌細胞（circulating tumor cells; CTC）を可視化できることを明らかにしてきた（Kojima et al, J. Clin. Invest., 2009）。本研究では、胃癌を中心とする消化器癌患者の腹腔洗浄液中の細胞分画から、TelomeScanで遊離癌細胞を可視化して検出する新しい技術を確立し、細胞診陽性患者の中で早期に進展・再発する患者を検出し層別化できるかどうかを検討し、革新的なバイオマーカーとしての臨床的有用性を検証することを目的とする。

平成27年度は、トランスレーショナル・リサーチとしての臨床研究を推進し、岡山大学病院の症例を集積することで本技術の臨床的有用性を検証した。前年度の検討から高感度蛍光検出マイクロプレートリーダーを用いたGFP蛍光強度による定量的検出システムを採用し、より簡便かつ再現性のある測定法を確立した。SpectraMax i3を用いてGFP陽性細胞の蛍光強度の定量性を検討し、1~10e6個のGFP陽性細胞をパルスした検体でGFP強度を測定することでGFP陽性細胞数を算出する検量線を求め、臨床検体の解析に応用した。

現在までに68例の胃癌患者の解析を行っており、細胞診陽性の21例は細胞診陰性の47例に比して有意に（ $p=0.0011$ ）予後不良であった。また、TelomeScan陽性の25例はTelomeScan陰性の47例より、有意に（ $p=0.0126$ ）予後不良であった。さらに、細胞診陽性の21例をTelomeScan陰性の7例、陽性の14例に分けて解析すると、細胞診陽性でTelomeScan陰性の7例の生存期間中央値（median survival time: MST）は663日であるのに対し、細胞診陽性かつTelomeScan陽性の14例のMSTは195日と極めて予後不良であった（ $p=0.0062$ ）。病理学的な組織型では、TelomeScan陽性群では低分化（sig/por/pap）12例、分化型（tub）2例、TelomeScan陰性群ではそれぞれ7例、0例と有意差を認めなかった。肉眼的播種（P1）はTelomeScan陽性群9例、陰性群1例であったが、顕微鏡的播種症例（CY1P0）にかぎった5例と6例の比較でも、TelomeScan陽性症例は有意に（ $p=0.0086$ ）予後不良であった。以上の結果から、TelomeScanによって細胞診陽性患者の中でさらに予後不良な患者集団を選別できる可能性が示された。

また、腹腔洗浄液中に検出されるGFP蛍光発現陽性細胞の形質と起源を明らかにするために、腹腔洗浄液中に浮遊する細胞の多重蛍光免疫染色を実施した。標的とする表面マーカーとしては、白血球を同定するCD45、胃癌細胞などの上皮系細胞を同定するcytokeratin、腹膜組織を構成する中皮細胞を同定するcalretininを用いた。TelomeScanは上皮間葉移行（EMT）癌細胞も含めて生きた癌細胞のみを検出することで、症例のより臨床的な悪性度評価に有用であることが示唆された。