

テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルスを用いた 転移リンパ節の生体内イメージング

岸本 浩行^{a*}, 児島 亨^a, 渡邊雄一^c, 香川俊輔^{a,b}, 藤原俊哉^a, 宇野 太^a,
寺石文則^a, 京 哲^c, 水口裕之^d, 橋本悠里^e, 浦田泰生^e, 田中紀章^a,
藤原俊義^{a,b}

^a岡山大学大学院医歯薬総合研究科 消化器・腫瘍外科学, ^b岡山大学医学部・歯学部附属病院 遺伝子・細胞治療センター
^c金沢大学医学部 産婦人科学, ^d国立医薬品食品衛生研究所, ^eオンコリスバイオファーマ

キーワード: GFP, アデノウイルス, ヒトテロメラーゼ逆転写酵素

In vivo imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus

Hiroyuki Kishimoto^{a*}, Toru Kojima^a, Yuichi Watanabe^c, Shunsuke Kagawa^{a,b}, Toshiya Fujiwara^a, Futoshi Uno^a,
Fuminori Teraishi^a, Satoru Kyo^c, Hiroyuki Mizuguchi^d, Yuuri Hashimoto^e, Yasuo Urata^e, Noriaki Tanaka^a,
Toshiyoshi Fujiwara^{a,b}

^aDepartment of Gastroenterological Surgery, Transplant, and Surgical Oncology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^bCenter for Gene and Cell Therapy, Okayama University Hospital, ^cDepartment of Obstetrics and Gynecology, Kanazawa University School of Medicine, ^dLaboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, ^eOncolys BioPharma, Inc.

緒 言

がんの診断法として、コンピューター断層撮影 (Computed Tomography; CT) や磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Tomography; MRI) などの画像診断が一般的に行われている。また、ポジトロン放出断層撮影法 (Positron Emission Tomography; PET) は、がんを高感度で選択的に描出するイメージング技術としてがん診断に積極的に活用されている。これらの診断技術は、スクリーニングや手術前のがん

の状態を把握するには有用であるが、手術中にリアルタイムに転移や播種病巣を同定するナビゲーション技術は未だ確立されていない。

より低侵襲な治療の導入は、患者の生活の質 (quality of life, QOL) を維持するためにも必要であり、低侵襲な手術を目指す際に有用な情報の一つとして転移リンパ節の判定が挙げられる。最近、低侵襲手術のナビゲーションとして、センチネルリンパ節 (sentinel node; SN) が注目されている。SN とは腫瘍から最初にリンパ流をうけるリンパ節であり、ここに最初の微小転移が生ずるといふ仮説が SN 理論である。乳がんでは欧米を中心に大規模な臨床試験が開始されているが、その他の固形腫瘍にもこの考え方が通用するかについては未だ不明であり、その検証がはじまったところである。胃がんの単発リンパ節転移部位の解析から

平成20年1月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

岡山大学医学部・歯学部附属病院 遺伝子・細胞治療センター

電話: 086-235-7997 FAX: 086-235-7884

E-mail: kishipon777@yahoo.co.jp

プロフィール



岸本 浩行

平成9年、高知医科大学医学部卒、岡山大学医学部第一外科 (現 消化器・腫瘍外科) 入局。平成13年より消化器・腫瘍外科 田中紀章教授、藤原俊義助教授の下で蛍光タンパク発現制限増殖型アデノウイルスを用いた生体内癌診断の研究を行う。平成18年より、腫瘍細胞のイメージングを目的として初めて GFP などの蛍光タンパクを使用したカリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) Robert M. Hoffman 先生の下に留学し増殖型アデノウイルスのさらなる可能性を研究している。

10%前後の skip 転移,すなわち第1群リンパ節を飛び越した第2群以遠リンパ節への初発転移が報告されており¹⁾,これを根拠として SN ナビゲーションの危険性を唱える意見もある.したがって,転移リンパ節そのものを同定できるように腫瘍細胞を直接ラベリングできる技術があれば,それは確実性の面から極めて実用的になりうる.近年,蛍光蛋白質である GFP の遺伝子をレポーター遺伝子として使用し目的とする細胞を検出する蛍光イメージングが多用されている²⁻⁹⁾.また,われわれは以前,正常細胞においてはほとんど発現していないががん細胞においては85%以上に発現している^{10,11)}ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) のプロモーター特異的に増殖する制限増殖型アデノウイルス (OBP-301) を作成した^{1,12)}.本研究では,OBP-301のウイルスゲノムに GFP 遺伝子を組み込んだ OBP-401を作成し,それによる腫瘍細胞へのラベリングの可能性を検討した.OBP-401は腫瘍特異的に増殖し,腫瘍細胞の GFP 蛍光は *in vitro* では蛍光顕微鏡下に,また,ヌードマウスの皮下腫瘍への局所投与では高感度3 CCDカメラを用いた蛍光観察システム下に検出することが可能であった.さらに,ヌードマウス同所性直腸癌リンパ節転移モデルにおいては OBP-401を原発腫瘍へ投与することでリンパ節内の微小転移巣を直接描出することが可能であった.OBP-401を用いた腫瘍検出技術は,生体内で転移リンパ節を検出する外科ナビゲーション・システムとなる可能性がある.

材料と方法

1. 細胞株

がん細胞株としてヒト非小細胞肺癌細胞 H1299, H460, ヒト胃癌細胞 MKN28, MKN45, ヒト大腸癌細胞 SW620, HT-29, ヒト食道癌細胞 TE 8, T.Tn, ヒト前立腺癌細胞 LNCaP, PC-3, ヒト舌扁平上皮癌細胞 HSC-3, HSC-4, SCC-4, SCC-9, ヒト子宮頸癌細胞 HeLa, ヒト肝細胞癌細胞 HepG 2, ヒト膵癌細胞 Panc-1, ヒト乳癌細胞 MCF-7, ヒト骨肉種細胞 U-2 OS を使用した.また,正常細胞としてヒト正常肺線維芽細胞 NHLF, ヒト正常腎上皮細胞 HRE, ヒト胎児臍帯内皮細胞 HUVEC, ヒト正常胎児肺線維芽細胞 WI38を使用した.

2. 組み換えアデノウイルスベクター

テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス OBP-301¹²⁾の E 3 欠損部に,CMV プロモーターで駆動する GFP 遺伝子を組み込んだ OBP-401を作成し使用した (図1).

3. 定量リアルタイム PCR 解析

各がん細胞,正常細胞における hTERT プロモーターの活性を mRNA レベルでリアルタイム PCR により測定し, H1299の発現を1とした相対比で発現レベルを比較した.また,ウイルス増殖能は各細胞に OBP-401を感染させ,経時的に E1A 遺伝子量を測定し,感染2時間後の測定値を1とした相対比で増殖率を求め比較検討した.

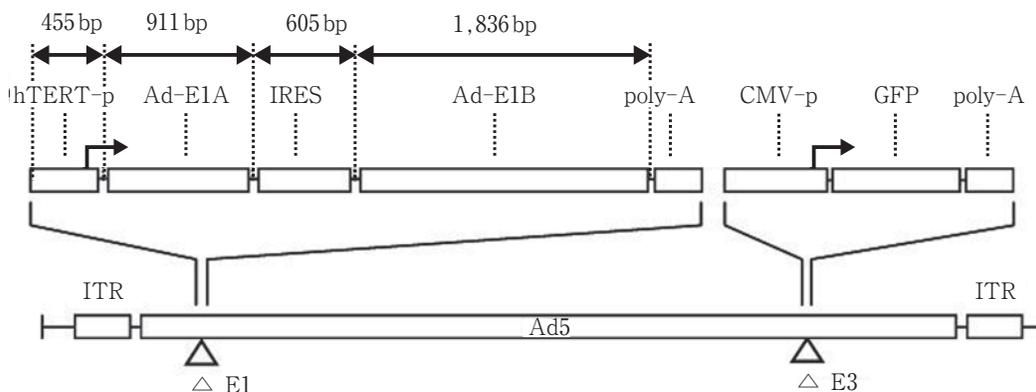


図1 OBP-401の構造

制限増殖型アデノウイルス OBP-401は,ウイルス増殖に必要な E1領域が除去されているアデノウイルスベクターを基本骨格としている. hTERT プロモーターと IRES 配列で結合した E1A, E1B 遺伝子より成る増殖カセットを,ベクターの欠損した E1部分に組み込み, GFP 遺伝子をウイルスゲノムの E3領域に組み込んでいる.

4. *in vitro* における蛍光発現

ヒトがん細胞 H1299, SW620, HT29 と正常細胞 NHLF に OBP-401 を 1 あるいは 10 MOI で感染させ、GFP 遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で観察した。

5. *in vivo* における蛍光発現

SW620 または HT29 細胞をそれぞれヌードマウスの背部に 5×10^6 接種して、腫瘍が直径 7 mm に増大したときに OBP-401 を 10^7 PFU/100 μ l 腫瘍内注射して GFP 発現を経時的に観察した。また、同所性直腸癌モデルはメスヌードマウスの直腸粘膜下層に HT29 細胞を 5×10^6 接種し (図 6 a)¹³⁾、4 週間後に形成された直腸腫瘍に 10^8 PFU/100 μ l の OBP-401 を腫瘍内注射した。OBP-401 投与の 5 日後に腹腔内を観察した。

6. CCD イメージング

GFP 蛍光の撮影には浜松ホトニクス社の蛍光フィルターおよび高感度 3 CCD カメラを用いた。

結 果

1. 各癌細胞，正常細胞における hTERT promoter の発現

テロメラーゼは悪性疾患のマーカーである¹⁴⁾。発現レベルに強弱はあるものの、異なる器官に由来する全ての腫瘍細胞において mRNA レベルで hTERT の発現を認めた。しかし、正常細胞である NHLF や WI38 などのヒト線維芽細胞、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) やヒト腎臓上皮細胞 (HRE) では認められなかった (図 2)。

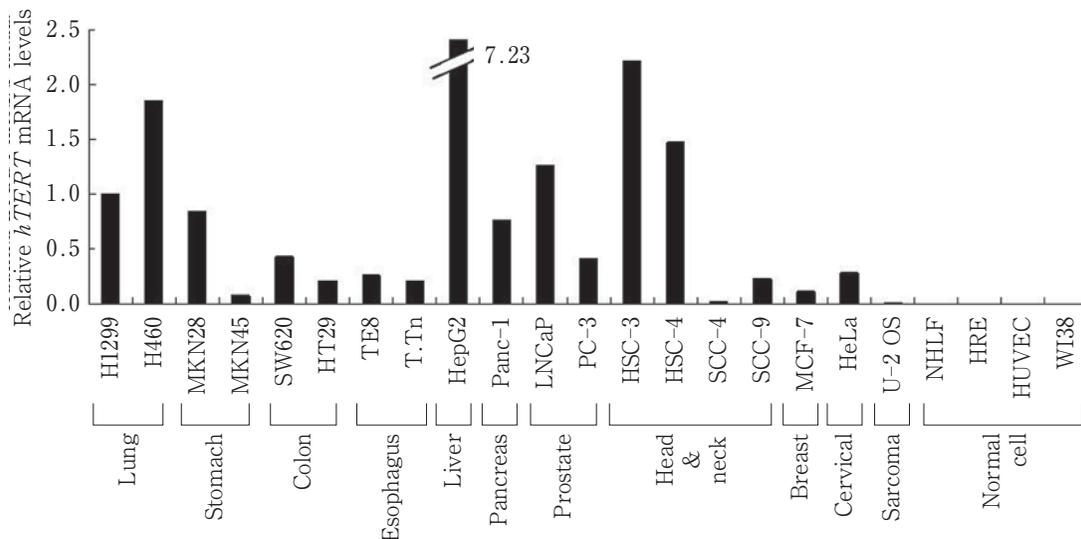


図 2 ヒト腫瘍細胞と正常細胞における hTERT mRNA の発現
ヒト腫瘍細胞と正常細胞の hTERT mRNA レベルをリアルタイム PCR により相対的に比較した。H1299 の発現を 1.0 としている。

2. *in vitro* におけるヒト癌細胞での OBP-401 の選択的増殖

ヒトがん細胞 SW620, H1299 では、OBP-401 は感染後 3 日までに $10^6 \sim 10^8$ 倍のウイルス増殖が認められたが、正常細胞 NHLF では OBP-401 の増殖は 10^3 倍に抑えられていた (図 3)。

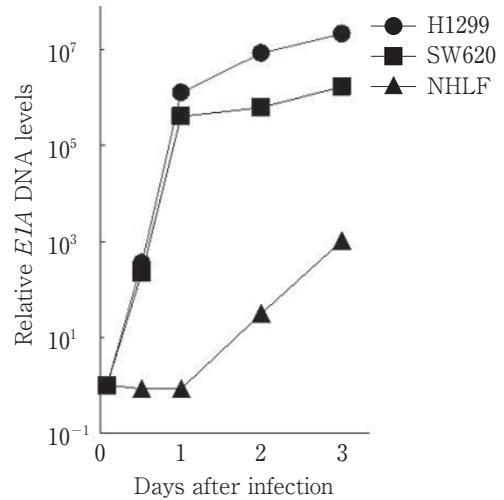


図 3 ヒト腫瘍細胞 SW620 と H1299 細胞と正常細胞 NHLF における OBP-401 の増殖
ヒト腫瘍細胞 SW620 と H1299 細胞では、OBP-401 は感染 3 日後までに $10^6 \sim 10^8$ 倍のウイルス増殖が認められたが、正常細胞 NHLF ではウイルス増殖は 10^3 倍に抑えられていた。

3. *in vitro* におけるヒト癌細胞での選択的可視化

H1299細胞を10MOI で OBP-401に感染させると、12時間後より GFP の発現が認められ、蛍光は3日目まで増強し、その後 cytopathic effect (CPE) が誘導され完全な細胞死が観察された(図 4 a)。また、SW620 と HT29細胞では、10MOI で OBP-401に感染させると、24時間後から GFP 蛍光を認め、3日目には細胞死が観察された(図 4 b, 4 c)。一方、正常細胞 NHLF では GFP 蛍光はほとんど認められなかった(図 4 d)。これらの結果は、OBP-401はヒトがん細胞においてのみ複製し、腫瘍細胞に特異的に GFP 蛍光を発現させることを示している。

4. *in vivo* における皮下ヒト腫瘍の選択的可視化

SW620 と HT29細胞の皮下腫瘍に、OBP-401を 10^7 PFU/100 μ lで腫瘍内投与し GFP の発現を調べた。OBP-401を投与して24時間以内には腫瘍においてのみ GFP 蛍光を認めた(図 5 a)。蛍光強度は OBP-401投与4日後に最大となり、蛍光は少なくとも7日間継続していた。また、OBP-401を腫瘍内投与した14日後に SW620の皮下腫瘍を摘出して観察すると、広範な GFP 発現が連続スライス切片でも観察された(図 5 b)。一方、腫瘍を持たないマウスの皮下に OBP-401を 10^7 PFU/100 μ lを投与しても GFP 蛍光は検出されなかった(図 5 c)。これらの結果から、生体内においても GFP 発現は腫瘍特異的であることが示された。

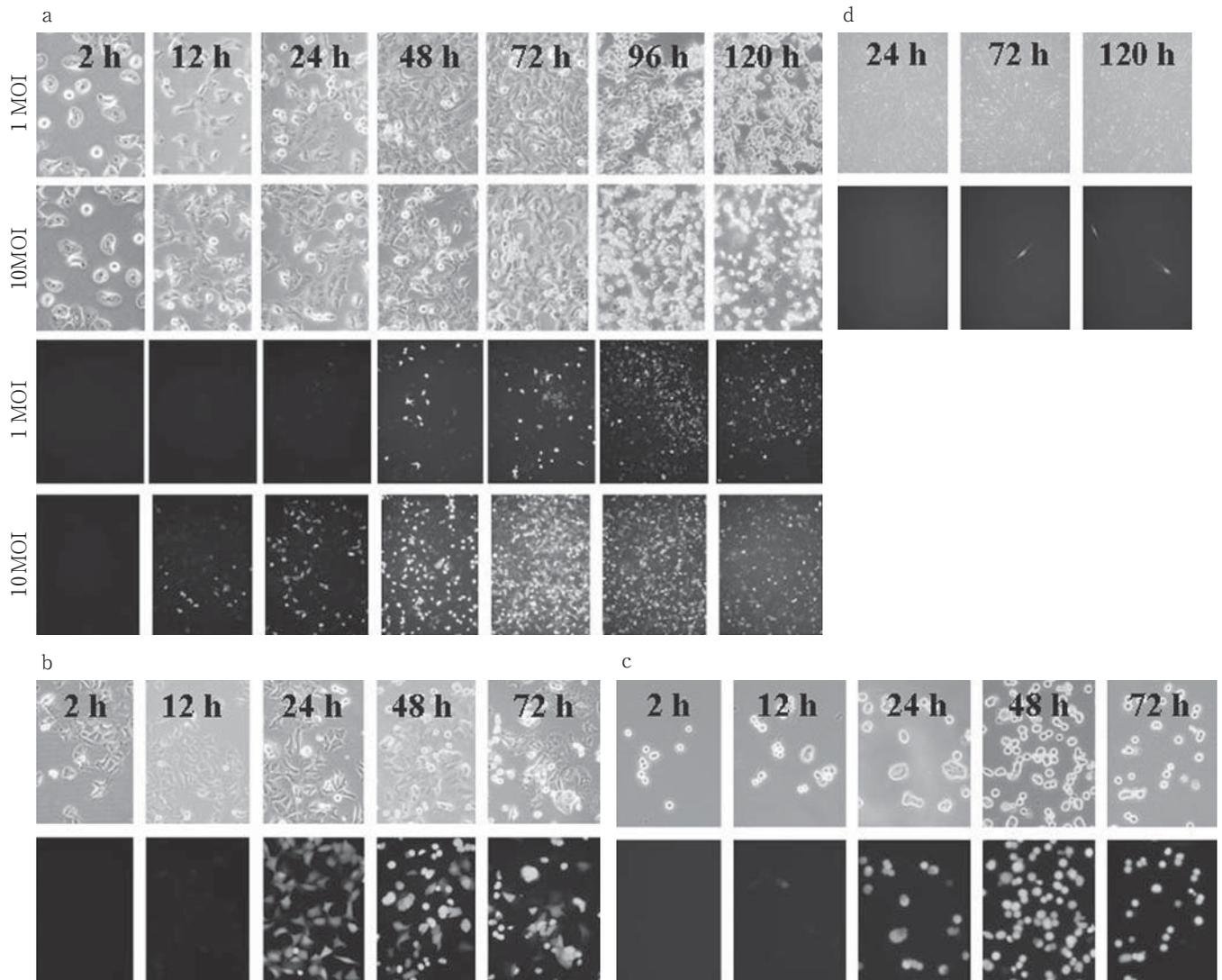


図 4 *in vitro* におけるヒト癌細胞の選択的可視化
ヒト腫瘍細胞 H1299 (a), SW620 (b), HT29 (c) と正常細胞 NHLF (d) に OBP-401 を 1 ないし 10 MOI で感染させ経時的に観察した (上段 明視野観察, 下段 蛍光観察 $\times 200$)。

5. 同所性直腸癌リンパ節転移モデル

予備実験として，ヒト結腸癌細胞 HT29をヌードマウスの直腸粘膜下に同所移植すると，4週間後には直腸腫瘍が形成され（図6a, b），固有筋層内のリンパ管に腫瘍細胞が浸潤することを確認した（図6c）．直腸腫瘍に OBP-401を 10^8 PFU/ $100\mu\text{l}$ 腫瘍内注射すると24時間後から腫瘍部位に GFP 蛍光が認められ，4日

後までに蛍光強度は最大となった．一方，OBP-401を投与しなかった直腸腫瘍には GFP 蛍光は認めなかった（図6d）．

6. *in vivo* におけるヒト癌細胞の転移リンパ節の選択的可視化

ヌードマウスの直腸に HT29細胞を同所性移植すると，4～6週間後には高率に腹部大動脈周囲にリンパ

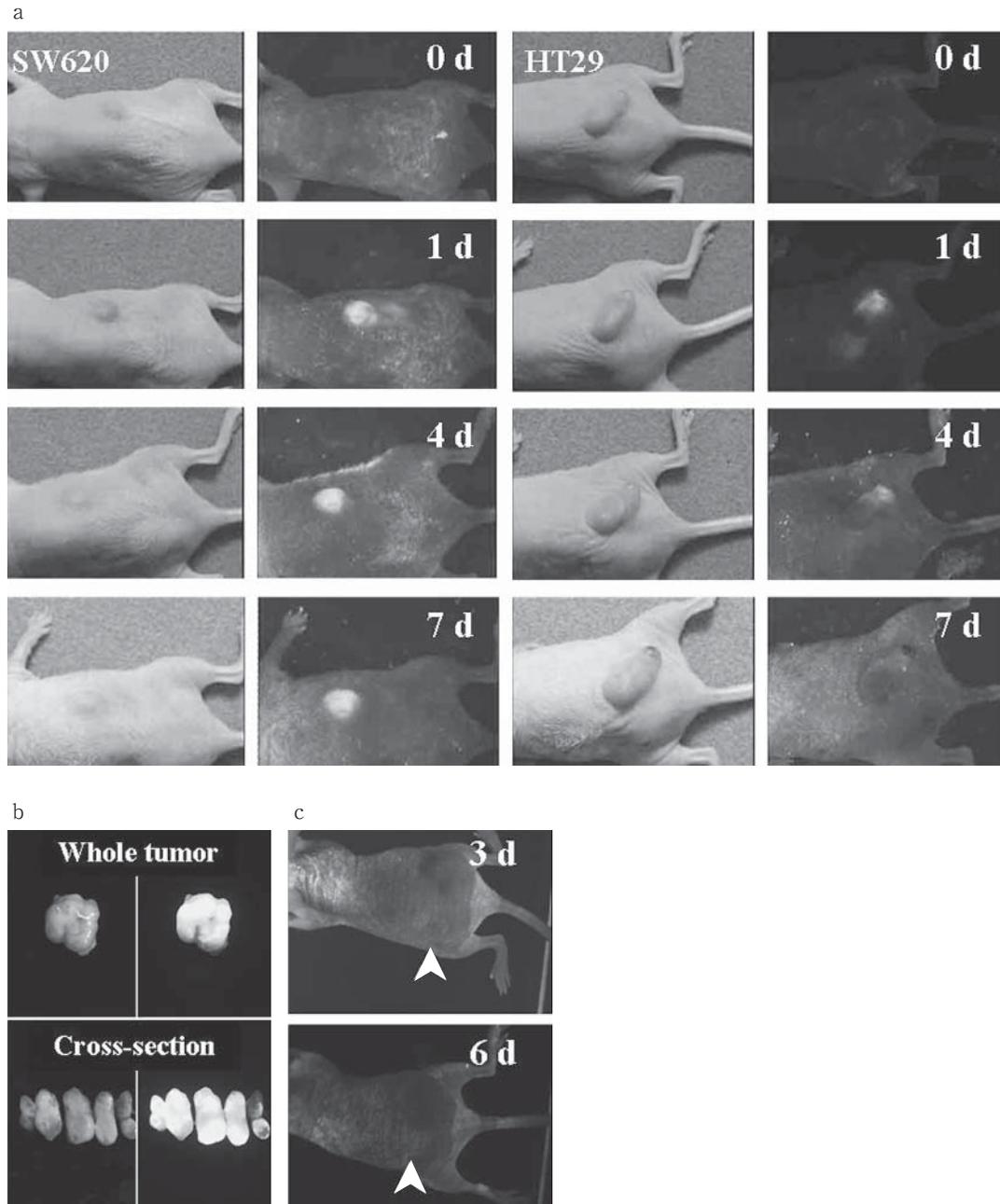


図5 *in vivo* における皮下ヒト腫瘍の選択的可視化

(a) SW620 (5×10^6 /個体)，HT29 (5×10^6 /個体)をヌードマウスの皮下に移植して形成した腫瘍内に OBP-401を 1×10^7 PFU/ $100\mu\text{l}$ 注入し非侵襲的にイメージングした (左列 明視野観察，右列 蛍光観察)．(b) SW620の皮下腫瘍に OBP-401を 1×10^7 PFU/ $100\mu\text{l}$ 注入して14日後に摘出し，腫瘍全景およびスライスによる観察を行った (左列 明視野観察，右列 蛍光観察)．(c) 腫瘍のないヌードマウスの皮下に OBP-401を 1×10^7 PFU/ $100\mu\text{l}$ 注入し3日後または6日後に蛍光観察した．矢頭は注入部位．

節転移を生じる。その頃に原発巣である直腸腫瘍に 10^8 PFU/100 μ l の OBP-401 を腫瘍内投与し、その5日後に開腹して GFP 励起のためのキセノン光を照射し高感度 3 CCD カメラで腹腔内を観察した。

代表的な 2 匹のマウスの分析結果を図 7 に示した。マウス No. 1 では、3 つのリンパ節 (LN 1, LN 2, LN 3) が大動脈周囲に認められ、蛍光イメージングによりリンパ節 (LN 3) だけに部分的な GFP 蛍光を認めた (図 7 b)。マウス No. 2 では、4 つの大動脈周囲リンパ節のうち 3 つで GFP 蛍光を認めた。(図 7 d) 病理組織検査では GFP 蛍光陽性リンパ節には腫瘍細胞を確認できたが、GFP 蛍光陰性リンパ節では腫瘍細胞は認めなかった (図 7 c, e)。また、抗 GFP 抗体による免疫組織化学的分析で、GFP の分布はリンパ節内の転移巣に一致することを確認した。上記以外のマウスにおいても GFP 陽性リンパ節では高頻度に微小

転移が検出され、検出率は感度 92.3%、特異度 86.6% であった (表 1)。これらの結果は、OBP-401 は原発腫瘍内に投与されると所属リンパ節へ拡散し、リンパ節内の転移がん細胞に感染・増殖して腫瘍選択的な GFP 発現を誘導したことを示している。また、OBP-401 の増殖はフロイドアジュバントの直腸粘膜投与で生じさせた炎症性リンパ節腫大では認められず、がん細胞に選択的であることが示された。

考 察

近年、さまざまな画像診断手段が進歩しているが、未だに微小がんを組織学的診断無くして確定することは困難である。外科手術において、リアルタイムに微小がん組織や転移リンパ節を同定する技術は、過不足ない切除を行う「患者にやさしい外科治療」に重要である。われわれは、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素

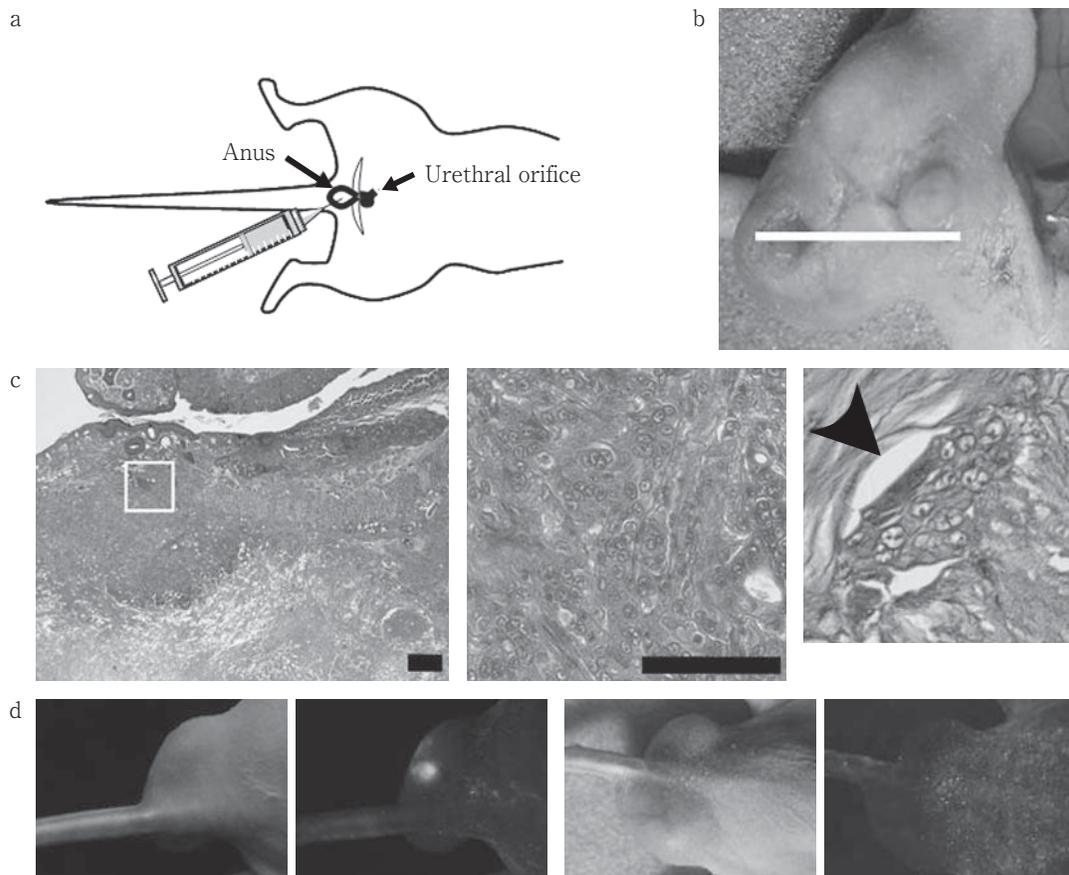


図 6 同所性直腸癌リンパ節転移モデル

(a) 同所性直腸癌リンパ節転移モデルは HT29細胞をヌードマウスの直腸粘膜下に移植して作成した。(b) 腫瘍移植 4 週間後の直腸腫瘍。白線は組織検査のための HT29直腸腫瘍の剖面作成方向を示す。(c) 直腸粘膜下の HT29腫瘍の HE 染色による組織切片。スケールバーは 10 μ m (左 $\times 40$, 中央 左図の白線で囲んだ部分の拡大 $\times 400$, 右 HT29細胞のリンパ管浸潤 (矢頭) $\times 400$)。 (d) HT29直腸腫瘍に OBP-401 を 10^8 PFU/100 μ l 腫瘍内投与した。24時間後から腫瘍部位に GFP 蛍光を認めた (左)。OBP-401 を投与しなかった直腸腫瘍には GFP 蛍光は認めなかった (右)。

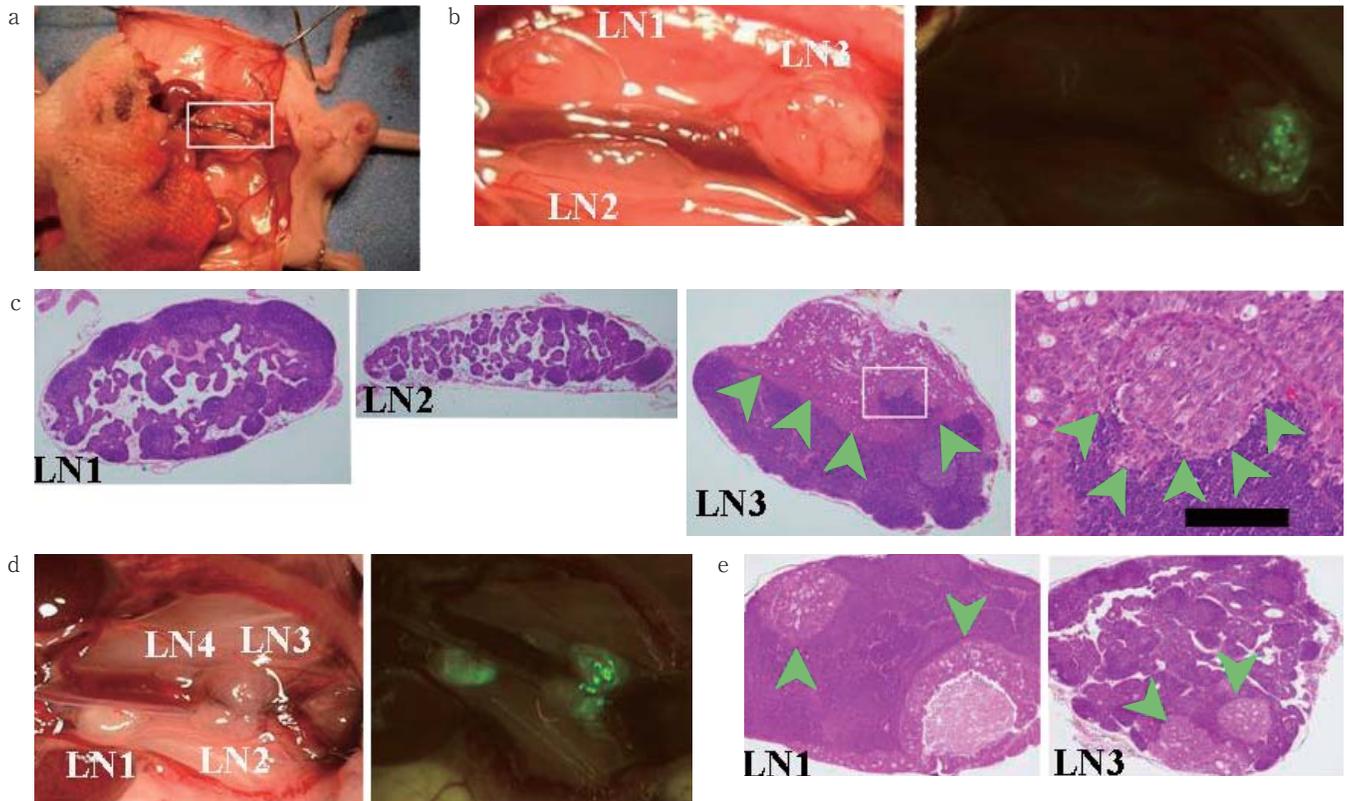


図7 *in vivo* におけるヒト癌細胞の転移リンパ節の選択的可視化
 代表的な2例を提示する。(a) マウスの腹腔内(マウス No 1)。HT29
 直腸腫瘍に 10^8 PFU/100 μ lの OBP-401を腫瘍内注射し、5日後に開腹
 してリンパ節転移の有無を調べた。白線で囲んだ部分は図bの領域
 を示す。(b) マウス No 1では、3つのリンパ節(LN 1, LN 2, LN 3)
 が大動脈周囲に認められた(左)。蛍光イメージングによりリンパ節
 (LN 3)に GFP 蛍光を認めた(右)。(c) リンパ節の HE 染色切片。
 リンパ節(LN 1, LN 2)にはリンパ節転移は認められない。リンパ
 節(LN 3)には転移腫瘍を認めた(矢頭)(左 $\times 200$, 右 スケール
 バーは100 μ m \times 400)。(d) マウス No 2では、4つの大動脈周囲リン
 パ節(LN 1, LN 2, LN 3, LN 4)を認めた(左)。4つのリンパ
 節のうち3つで GFP 蛍光を認めた(右)。(e) リンパ節(LN 1, LN
 3)の微小転移巣(矢頭)($\times 200$)。

表1 GFP fluorescence and histopathology status in para-
 aortic lymph nodes of HT29 tumor-bearing mice

Mouse No.	Metastasis ^a	GFP Fluorescence ^b		Total (%) ^c
		Positive	Negative	
No. 1	Positive	1	0	1 (33.3)
	Negative	0	2	2 (66.6)
No. 2	Positive	3	0	3 (75.0)
	Negative	0	1	1 (25.0)
No. 3	Positive	1	0	1 (33.3)
	Negative	0	2	2 (66.6)
No. 4	Positive	0	0	0 (0)
	Negative	0	4	4 (100)
No. 5	Positive	1	1	2 (66.6)
	Negative	0	1	1 (33.3)
No. 6	Positive	3	0	3 (60.0)
	Negative	1	1	2 (40.0)
No. 7	Positive	3	0	3 (50.0)
	Negative	1	2	3 (50.0)

^aMetastatic foci were detected histologically by hematoxylin and eosin staining.

^bNodes with light emitting spots and GFP fluorescence were evaluated as positive.

^cThe percentage of nodes with or without histologically confirmed metastasis in each mouse.

(hTERT) プロモーター特異的に増殖する制限増殖型アデノウイルス (OBP-301) に GFP 遺伝子を搭載し (OBP-401), それを用いて癌細胞を可視化できるか検討した。

in vitro において OBP-401をヒトがん細胞に感染させると, 3日間でウイルス量は $10^6\sim 10^8$ 倍となったが, その増殖率は正常細胞 NHLF での増殖率よりも $10^3\sim 10^4$ 倍高い結果であった。正常細胞で OBP-401がわずかながら複製した理由は不明であるが, NHLF も20継代程度まで維持できるため, 一般的に行われている PCR 分析では検知できない程度の弱いテロメラーゼ活性を NHLF は持っているのかもしれない。いずれにせよ, 正常細胞での OBP-401の増殖は非常に弱いいため, 生体内での腫瘍細胞の可視化には干渉しないと思われた。事実, ノードマウス皮下にヒトがん細胞を移植して形成した腫瘍に OBP-401を腫瘍内投与すると, 腫瘍の横断面では全体に渡って GFP 蛍光が認められたのに対して, 腫瘍に隣接した正常組織では GFP 蛍光は検出できなかった。このように, OBP-401により生体内で腫瘍細胞を選択的に GFP で標識できる可能性が示唆された。

ヒト直腸腫瘍をノードマウスに同所性移植したモデルを使った実験では, OBP-401の原発腫瘍内投与後の開腹観察で, リンパ節内の微小転移巣を高感度に検出することができた。従来の組織学的検査では, リンパ節転移の有無を通常1枚か2枚の切片で判定するため, リンパ節中の微小な転移巣の検出は難しい場合がある。また, 術中迅速診断で用いられる凍結切片では組織構造がかなり破壊されてしまうため, 判定はより困難と考えられる。乳癌や黒色腫では術中凍結切片でリンパ節転移の有無が検討されることが多いが, 検出感度は38%~74%と言われている¹⁵⁻¹⁸⁾。われわれの実験では, GFP 蛍光を示したリンパ節の33.3%で微小転移巣を見つけるために連続切片を追加する必要があった。このことから, 本アプローチは標準的な病理組織検査よりも感度が高いと言えるかもしれない。腫瘍細胞が組織学的に見つからなかった2個の GFP 陽性リンパ節でも, 切片をさらに追加すれば微細な転移を確認できたかもしれない。

OBP-401を使ったイメージングはその有用性が期待されるが, GFP の励起光の波長は短いため, 対象物が厚い組織で覆われているような場合では GFP を励起することができない。また, 励起光の照射野の反対

側のリンパ節表面に腫瘍塊が存在している状況では, GFP 蛍光は検出できない。しかし, SN 生検で用いられるガンマプローブのように, 励起光を照射するとともに GFP 蛍光を感知できるような携帯プローブを開発できれば, 術中に転移リンパ節を GFP 蛍光で同定できるかもしれない。少なくとも, ハンディサイズの GFP 蛍光を励起させるフラッシュライトはすでに報告されている¹⁹⁾。

結論として, 同所性直腸腫瘍モデルにおいて, GFP 発現テロメラーゼ特異的制限増殖型アデノウイルス OBP-401は, 原発腫瘍に投与すると所属リンパ節内の腫瘍細胞に到達し, GFP 蛍光を発しながら増殖できることを証明した。OBP-401を用いた腫瘍検出技術は, がんの外科的療法の新しいナビゲーション・システムとなる可能性がある。

結 論

テロメラーゼ依存性制限増殖型アデノウイルスに GFP 遺伝子を搭載して作成した OBP-401を用いて, がん細胞を特異的に可視化することができた。また, ノードマウスの直腸癌モデルにおいて, OBP-401を原発腫瘍内投与することにより, 転移リンパ節を特異的に検出することに成功した。

文 献

- 1) Umeoka T, Kawashima T, Kagawa S, Teraishi F, Taki M, Nishizaki M, Kyo S, Nagai K, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T: Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res* (2004) 64, 6259-6265.
- 2) Misteli T, Spector DL: Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol* (1997) 15, 961-964.
- 3) van Roessel P, Brand AH: Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat Cell Biol* (2002) 4, 15-20.
- 4) Ehrhardt D: GFP technology for live cell imaging. *Curr Opin Plant Biol* (2003) 6, 622-628.
- 5) Rashidi B, Yang M, Jiang P, Baranov E, An Z, Wang X, Moossa AR, Hoffman RM: A highly metastatic Lewis lung carcinoma orthotopic green fluorescent protein model. *Clin Exp Metastasis* (2000) 18, 57-60.
- 6) Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, Li L, Hasegawa S, Bouvet M, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, et al.: Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and

- metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97, 1206-1211.
- 7) Hoffman RM : Visualization of GFP-expressing tumors and metastasis in vivo. *Biotechniques* (2001) 30, 1016-1026.
 - 8) Bouvet M, Wang J, Nardin SR, Nassirpour R, Yang M, Baranov E, Jiang P, Moossa AR, Hoffman RM : Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model. *Cancer Res* (2002) 62, 1534-1540.
 - 9) Yamamoto N, Yang M, Jiang P, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM : Real-time GFP imaging of spontaneous HT-1080 fibrosarcoma lung metastases. *Clin Exp Metastasis* (2003) 20, 181-185.
 - 10) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* (1994) 266, 2011-2015.
 - 11) Shay JW, Wright WE : Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* (1996) 8, 66-71.
 - 12) Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N, Fujiwara T : Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* (2004) 10, 285-292.
 - 13) Tsutsumi S, Kuwano H, Morinaga N, Shimura T : Animal model of para-aortic lymph node metastasis. *Cancer Lett* (2001) 169, 77-85.
 - 14) Shay JW, Wright WE : Telomerase : a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* (2002) 2, 257-265.
 - 15) Koopal SA, Tiebosch AT, Albertus Piers D, Plukker JT, Schraffordt Koops H, Hoekstra HJ : Frozen section analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients. *Cancer* (2000) 89, 1720-1725.
 - 16) Tanis PJ, Boom RP, Koops HS, Fanevte IF, Peterse JL, Nieweg OE, Rutgers EJ, Tiebosch AT, Kroon BB : Frozen section investigation of the sentinel node in malignant melanoma and breast cancer. *Ann Surg Oncol* (2001) 8, 222-226.
 - 17) Gulec SA, Su J, O'Leary JP, Stoler A : Clinical utility of frozen section in sentinel node biopsy in breast cancer. *Am Surg* (2001) 67, 529-532.
 - 18) Chao C, Wong SL, Ackermann D, Simpson D, Carter MB, Brown CM, Edwards MJ, McMasters KM : Utility of intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Am J Surg* (2001) 182, 609-615.
 - 19) Yang M, Luiken G, Baranov E, Hoffman RM : Facile whole-body imaging of internal fluorescent tumors in mice with an LED flashlight. *Biotechniques* (2005) 39, 170-172.