

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19683

研究課題名(和文)メラノーマ患者末梢血中の腫瘍循環細胞における遺伝子発現の解析

研究課題名(英文)Genetic expression analysis of circulating tumor cells in patients with melanoma

研究代表者

御子柴 育朋(MIKOSHIBA, Yasutomo)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60747153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メラノーマにおけるCTCが転移に関わっているかどうかを検証するために、患者血液からCTCを分離し、どのような分子を発現しているか調べた。その結果、HMW-MAA抗体とB7-H3抗体で標識することにより、セルソーターでCTCを単離する患者血液中に存在するCTCを単一細胞レベルで遺伝子解析することができた。本研究により、腫瘍循環細胞の単離と解析が、治療のモニタリングに役立つ可能性を示した。いっぽうRNA発現解析には、技術的な課題があることが分かった。その要因として、CTC単離からRNA抽出までの過程で、迅速性が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify and analyze circulating tumor cells (CTCs) from patients with melanoma. To this aim, we isolated peripheral blood mononuclear cells and stained them with HMW-MAA antibody and B7-H3 antibody. These antibodies combined with negative selection of white blood cells seemed useful for identification CTCs. DNA sequencing was revealed melanoma-specific gene mutation. However, RNA analysis was failed to evaluate mRNA expression. The major reason of this difficulty may be due to insufficient RNA quality during CTC isolation process.

研究分野：皮膚科

キーワード：メラノーマ 循環腫瘍細胞 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

近年、メラノーマに対する新規の分子標的薬が開発され、治療成績の向上が実感される状況となった。メラノーマは転移臓器数が予後を左右するファクターとして重要であるため、治療成績を更に向上させるために、転移の制御が望まれる。我々は、メラノーマ患者の末梢血中に流れる循環腫瘍細胞（以下 CTC）を検出同定してきた。CTC は、転移や薬物効果予測のバイオマーカーとして、様々な癌腫で研究されている。しかしながら、最適な同定方法はいまだ確立されていないため、バイオマーカー開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、メラノーマにおける CTC が転移に関わっているかどうかを検証するために、患者血液から CTC を分離し、どのような分子を発現しているか調べる。

3. 研究の方法

CTC 検出状況の設定：メラノーマ細胞株を末梢血に混入させ、細胞分析装置 FACS Aria III を用いて、分離する。この際、メラノーマの表面に特異的に発現するタンパク質として、high molecular weight-melanoma associated antigen (以下 HMW-MAA) と B7-H3 に対する抗体を使用して、メラノーマ細胞を標識する。これらの抗体が、メラノーマの標識に適することをフローサイトメトリー、および免疫染色で確認する。また、白血球分画を識別するために、CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 の抗体カクテルである Lineage-1 も用いる。HMW-MAA / B7-H3 に陽性で、Lineage-1 陰性の細胞集団を CTC と想定して分取する。分取した CTC をプレパラートに塗抹し、MART-1 抗体や HMB45 を用いて、免疫染色を行い、メラノーマ細胞であることを確認する。

メラノーマ患者からの CTC の分離：2 名のメラノーマ患者および 1 名の健常人コントロールの血液から、BD バキュテイナ採血管を用いて単核球（以下 PBMC）を分離する。PBMC を上記の抗体を用いて染色したのち、FACS Aria III に細胞を流して設定した条件により解析を行う。CTC と思われる集団を同定したのち、96 穴の丸底プレートに分取する。

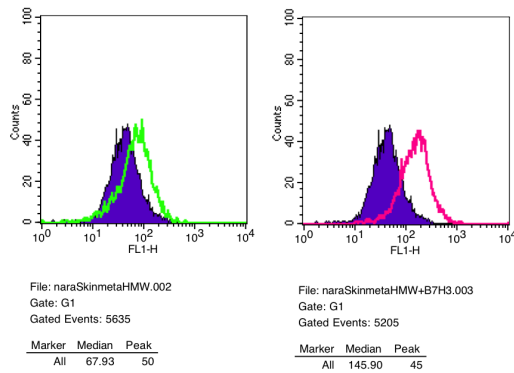
CTC の mRNA 発現解析：CTC を分取したのち、核酸抽出キットをもちいて DNA と RNA を抽出した。RNA から cDNA を合成し、quantitative PCR を行う。

治療経過中の CTC における遺伝子変異と mRNA 変化の解析：間欠的露光部に発生した進行期メラノーマ患者 1 名から PBMC を分離したのち、FACS Aria III で CTC を分取する。治療経過中の 2 回のタイムポイントについてゲノム DNA と RNA とを用いて解析する。

4. 研究成果

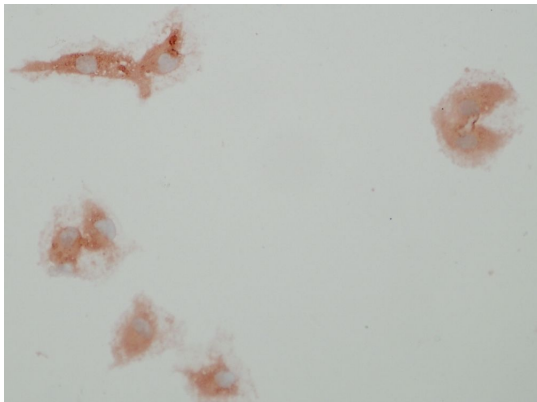
CTC 検出状況の設定：メラノーマの皮膚転移巣の組織を酵素で消化し、単細胞の状態にしたのち、HMW-MAA 抗体と B7-H3 抗体とで標識し、フローサイトメトリーで発現を確認した。2 つの抗体を組み合わせることにより、検出感度が高まった。（図 1）メラノーマ細胞株 888mel は B7-H3 に良く染まった。（図 2）細胞集団は非常に小さく、白血球分画と一部重なりが認められたが、分取する分画に白血球が混在しないようにゲーティングした。

図1 メラノーマ転移巣における HMW-MAA と B7-H3 発現



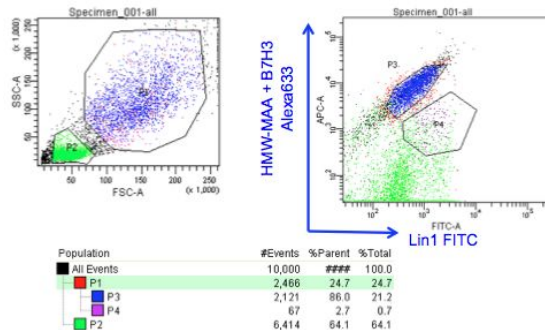
purple ; mlgG-Alexa 488 alone
 green ; HMW-MAA
 pink ; HMW-MAA + B7H3

図2 888mel の B7-H3 発現



PBMC にメラノーマ細胞株を混入させた場合、CTC 分画と白血球分画を識別することができた。(図3)

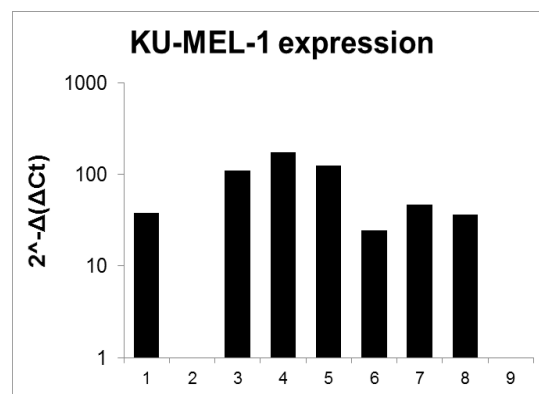
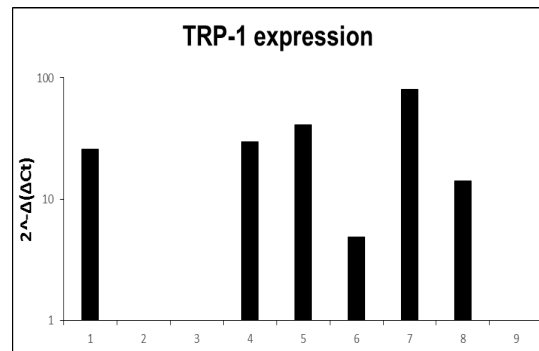
図3 CTC 分画の同定



メラノーマ患者からの CTC の分離：96 穴の丸底プレートに細胞を 1 個ずつ、5 個ずつ、20 個、100 個の単位で分取した。

CTC の mRNA 発現解析：CTC から合成した cDNA をテンプレートとして、gp100、TRP1、および KU-MEL-1 の quantitative PCR を行う予定であったため、これまで発現率が検証されていない TRP1 と KU-MEL-1 について凍結組織での発現を調べた。その結果、いずれも大部分の組織で発現しており、適していると考えた。(図4)

図4 TRP-1 と KU-MEL-1 の mRNA 発現

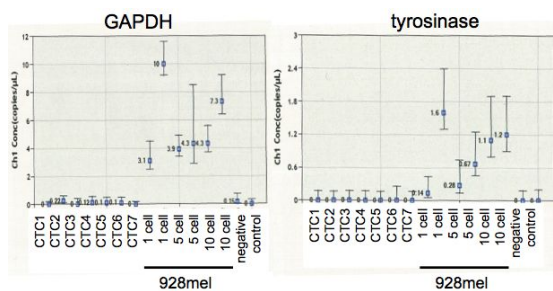


患者1の CTC の single cell において KU-MEL-1 の発現が確認された。患者2からは、いずれのマーカーも発現が認められなかった。2人の患者の白血球の分画から採取した細胞と健常人から採取した細胞には発現を認めなかった。gp100 と TRP1 については特異的な発現を確認できなかった。おそらく発現量が少ないと考えられた。

治療経過中の CTC における遺伝子変異と mRNA 変化の解析：多発転移のある患者 3 から単離した CTC から個々に DNA を抽出した。DNA を用いて、BRAF V600 領域を含むプライマーでサイクルシーケンスを施行した。38 個中 BRAF V600K を 2 個検出した。内訳は、分子標的阻害薬治療前 2 個、治療後 0 個であった。

いっぽう、10 個の細胞から抽出した RNA は RT 反応により cDNA を合成して、mRNA 発現に用いた Digital droplet PCR 法（以下、ddPCR）を用いて、mRNA の発現を調べた。10 個の CTC の total RNA から cDNA を合成し、GAPDH と tyrosinase の ddPCR を行った。GAPDH は 10 個中 2 個のみがシグナルが得られたが、他の 8 個は検出感度以下であった。RNA の質的な問題や cDNA 合成過程の問題と考えられた。よって、mRNA については評価不能であった。（図 5）

図 5 患者 3 から分取した CTC の GAPDH と tyrosinase の mRNA 発現



研究成果のまとめ

HMW-MAA 抗体と B7-H3 抗体で標識することにより、セルソーターで CTC を単離する患者血液中に存在する CTC を単一細胞レベルで遺伝子解析することができた。本研究により、腫瘍循環細胞の単離と解析が、治療のモニタリングに役立つ可能性を示した。いっぽう RNA 発現解析は安定して結果を得ることが困難で、技術的な課題

があることが分かった。CTC 単離から RNA 抽出までの過程で、迅速性が必要であることが示唆された。

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）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

御子柴 育朋 (MIKOSHIBA YASUTOMO)
 信州大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：60747153

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()