

令和元年5月29日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11339

研究課題名(和文) 小児固形がんにおける循環腫瘍細胞を用いた新規診断・評価法の開発

研究課題名(英文) New diagnosis and evaluation method using circulation tumor cells in pediatric solid tumors

研究代表者

鈴木 信 (SUZUKI, makoto)

群馬大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40431704

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)：複数のヒト神経芽腫細胞株を用い様々な補足抗体を用いCTCチップで検出可否を検討し、補足条件が最も良い抗体を同定し、その捕捉抗体によるそれぞれの細胞株での補足率向上のための調整を行った。

ヒト血液中に細胞株を混入させた状態で、末梢血単核球層のみを対象検体としてCTCを検出することに成功し、臨床検体での捕捉率向上のための様々な調整を行った。

現行のCTCシステムの問題点を解消するために、圧較差で細胞、試薬をCTCチップ内に流す手法によりシリンジポンプなしに短時間でのCTC捕捉が可能なシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により各種小児がんを血液検体で低侵襲かつ迅速に確定診断する手法が確立できれば患者QOLの向上に寄与すると考えられる。また新型CTCチップ内の細胞は固定、染色、輸送、その後の分子生物学的解析が可能であることから中央病理診断システムの構築も可能となる。本手法で治療に伴う経時的な腫瘍細胞の変化をリアルタイムに解析することで新たな治療プロトコル、治療耐性メカニズムの解明・克服へとつながることが期待され、実臨床に即した研究、あるいは前臨床的な基礎研究として非常に重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We considered the condition of CTC chip using several Neuroblastoma cell lines and several antibodies, and identified the best antibody. It was adjusted for captured rate improvement by each cell lines.

In the state which made a cell line get mixed in the man blood, we succeeded to detect CTC in the peripheral blood mononuclear cell layer.

We built the system that CTC capture by a short time is possible by the pressure amplitude without syringe pumps.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：小児 固形がん 循環腫瘍細胞 神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

小児がんの治療は化学療法に主体が置かれ、縮小化をはかってから外科的治療がなされることが現在、多くなってきている。しかしながら、治療前の診断には侵襲的に腫瘍を採取し、確定診断を得る必要がある。そこで低侵襲かつ迅速に体液検体を用いた腫瘍マーカーの開発が求められているが、腫瘍細胞そのものを用いた検査の代替法となりうるかは不明である。

より低侵襲に腫瘍細胞そのものを診断利用することを期待し、Nagrath ら (Nature 2007: 1235-9) により報告された全血からの CTC 検出が可能なマイクロ流体デバイスである CTC チップに注目した。しかし、この CTC チップはシリコン製で非常に脆く、上皮マーカーである EpCAM 抗体をチップ内に固定化する作業が非常に煩雑であることから、その有用性にもかかわらず実臨床への応用は進んでいない。そこで本研究では連携協力者の大永崇博士が開発したプラスチック CTC チップ (出願番号: 2011-164897) を使用することとした。この新型 CTC チップの特徴として プラスチック製で大量生産が可能、輸送運搬に耐えられる十分な強度、チップ表面に抗体と親和性の高い官能基を配置することで CTC 検出抗体を容易に固定化などが挙げられる (添付資料 1, 2)。その特徴に加え、研究協力者である横堀ら (Cancer Res. 2013: 2059-69) が報告したすべての固形腫瘍で発現しているにも関わらず、血液中で全く発現しない T-plastin (PLS3) にも注目し、この PLS3 特異的抗体を新型 CTC チップに固定化することで小児がん細胞の CTC をより効率的に検出する計画を立案した。この新たな検出法により実臨床への応用性がより高まり、低侵襲で迅速な診断のための代替法となることが期待できるため、小児がん患児に対して非常に有益と考えられ、本研究を着想した。

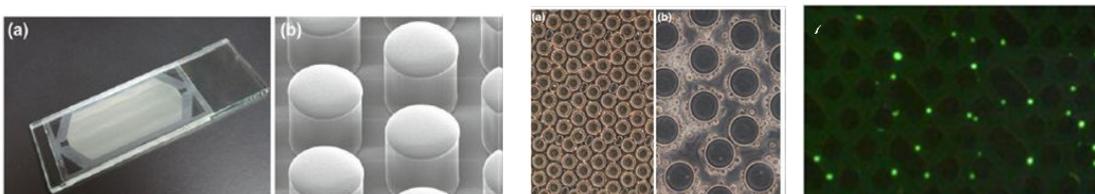
2. 研究の目的

小児がんの診断には侵襲的な生検・切除手術が必要であり、より低侵襲で簡便な代替診断法の確立が望まれる。近年、癌病巣から血中に侵入し体内を循環する循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) が、がんの治療・診断・研究において高い有用性が認められてきている。CTC は上皮性腫瘍ではその利用可能性が示されてきているが、小児がんの多くは非上皮性腫瘍であり現行法では十分に捕捉できない。そこで、非上皮性腫瘍における CTC を高感度に検出、評価するキットを開発することで、より低侵襲な診断・評価が可能かどうかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CTC チップ調整

本研究で使用するプラスチック製 CTC チップは捕捉抗体の固定化が容易である点が最大の特徴であり、プラスチック表面の官能基に抗体そのものが結合する性質を利用している。新型 CTC チップに以下に示す捕捉抗体を固定化し神経芽腫細胞株、肝芽腫細胞株、腎芽腫細胞株の捕捉率を測定する。各種細胞株に対する捕捉率の中で腫瘍特異性の高い捕捉抗体を明らかにすることで、その抗体を固定化した各種小児固形がん CTC 検索チップを作成し、臨床検体を用いた研究に使用する (添付資料 4)。(検討予定の捕捉抗体: 癌幹細胞マーカー IRG 抗体、固形組織マーカー PLS3 抗体、上皮細胞マーカー EpCAM 抗体、表面マーカー CD44 抗体、CD133 抗体、細胞表面受容体 EGFR 抗体、ERBB2 抗体、ERBB3 抗体など)



(2) 血液サンプル集積

新規、再発を問わず各種小児固形がんにおいて患者、家族にインフォームドコンセントを行い、臨床血液検査検体の残血液から CTC 解析を行う。

(3) CTC 解析

捕捉された CTC 数を評価し捕捉率を評価する。

CTC の検証: CTC チップ内の循環腫瘍細胞から DNA を採取し、生検検体等から得られている各種既存検査結果と比較評価する。

(3) 診断キット化に向けた試み

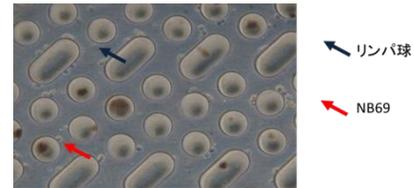
本研究で得られた成果をもとに診断キット開発、検討、PMDA への相談を行う予定である。

4. 研究成果

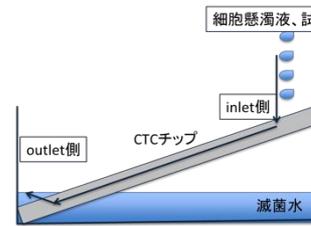
・CTC チップ調整：複数のヒト神経芽腫細胞株を用い様々な補足抗体を用い CTC チップで検出可否を検討し、補足条件が最も良い抗体を同定し、その捕捉抗体によるそれぞれの細胞株での補足率向上のための調整を行った。また臨床摘出組織中の同抗体発現も確認、蛋白レベルでの発現も確認した。

抗体	捕捉可否
EpCAM：上皮マーカー	×
N-Cadherin：神経マーカー	×
NCAM1：神経マーカー	×
L1CAM：神経マーカー	△
PLS3：固形組織マーカー	×
CD47：癌幹細胞マーカー	○

・血中における神経芽腫細胞株の捕捉：ヒト血液中に細胞株を混入させた状態での検出方法の検討では、全血中の補足は血球成分も凝集してしまい十分な回収条件が得られなかったため、末梢血単核球層のみを対象検体として CTC を検出することに成功し、臨床検体での捕捉率向上のための様々な調整を行った。



・簡便化を目指し、現行の CTC システムの問題点として送液のためにシリンジポンプが必要なこと、送液中の細胞塊形成を防止するために継続的なサンプル振動が必要なことの点を解消するために、圧較差で細胞、試薬を CTC チップ内に流す手法によりシリンジポンプなしに短時間での CTC 捕捉が可能なシステムを構築した。



・CTC 解析：神経芽腫細胞株をヒト血液中に混入させた検体での捕捉率は現在 80% 程度まで向上しているが、臨床検体中の捕捉率評価方法を検討中である。体外診断ツールとしての可能性を検討するために、MYCN 増幅の評価等、現在摘出組織にて通常行っている検査を CTC で行う実験系の確立が必要であり、捕捉細胞の FISH による評価方法の調整および培養系の確立のための研究を行っている。

	滴下前	Wash out後	捕捉率
NB16	1.02×10^4	7.31×10^3	71.7%
NB69	1.09×10^4	7.28×10^3	66.8%
NB1	1.14×10^4	6.18×10^3	54.2%
TN1	1.21×10^4	8.82×10^3	72.9%
SCCH26	9.23×10^3	6.21×10^3	67.3%

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

大竹紗弥香, 横堀武彦, 小山亮太, 内田康幸, 大串健二郎, 鈴木信, 調憲, 桑野博行. CTC チップを用いた神経芽腫の循環腫瘍細胞の検出. 第 118 回日本外科学会定期学術集会, 2018 年 4 月

大竹紗弥香, 横堀武彦, 内田康幸, 大串健二郎, 鈴木信, 桑野博行. CTC チップを用いた神経芽腫の循環腫瘍細胞の検出. 第 54 回日本小児外科学会学術集会, 2017 年 5 月

横堀武彦, 解良恭一, 大永崇, 高田耕児, 大竹紗弥香, 鈴木信, 浅尾高行, 桑野博行. 新型 CTC チップの臨床応用を目指して. 第 117 回日本外科学会定期学術集会, 2017 年 4 月

大竹紗弥香, 横堀武彦, 内田康幸, 大串健二郎, 鈴木信, 桑野博行. CTC チップによる神経芽腫株の捕捉. 第 53 回日本小児外科学会学術集会, 2016 年 5 月

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：茂木 晃

ローマ字氏名：(MOGI, akira)

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10323362

研究分担者氏名：緒方 杏一

ローマ字氏名:(OGATA, kyoichi)

所属研究機関名:群馬大学

部局名:医学部附属病院

職名:助教

研究者番号(8桁):10448897

研究分担者氏名:桑野 博行

ローマ字氏名:(KUWANO, hiroyuki)

所属研究機関名:群馬大学

部局名:大学院医学系研究科

職名:非常勤講師

研究者番号(8桁):90186560

(2)研究協力者

研究協力者氏名:横堀 武彦

ローマ字氏名:(YOKOBORI, takehiko)

研究協力者氏名:大竹 紗弥香

ローマ字氏名:(OHTAKE, sayaka)

研究協力者氏名:大永 崇

ローマ字氏名:(OHNAGA, takashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。