

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15697

研究課題名(和文) Liquid Biopsy臨床応用に向けた循環腫瘍細胞と循環腫瘍DNAの統合解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of circulating tumor cells and DNA toward clinical application of liquid biopsy.

研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)

東北大学・大学病院・教授

研究者番号：00241597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではシスプラチン抵抗性に関与する分子TIE-1について、エクソソームを介して薬剤耐性に関与するかを検討した。TIE-1強制発現細胞株を樹立し、この細胞から採取したエクソソームを卵巣癌細胞株に添加してシスプラチン感受性の変化を測定した結果、TIE-1発現エクソソームでは用量依存的なシスプラチン感受性低下を認めた。
さらに当院倫理委員会の承認(2017-1-659)を得たうえで文書にて同意を得た5名に対して腹水の採取を行い、エクソソームの分離及びTIE-1の測定を行う予定である。患者は再発卵巣癌に対して通常の抗癌剤治療を受けており、現在はその臨床経過を追跡中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether TIE-1, which is involved in cisplatin resistance, would cause exosome derived drug resistance. A TIE-1 forced expressed cell line was established and the exosome collected from this cell line was added to ovarian cancer cells. As a result, dose-dependent decrease in cisplatin sensitivity was observed in addition of TIE-1 expressing exosome.
In addition, after obtaining the approval of the Ethics Committee of our hospital (No:2017-1 - 659), we have collected ascitic fluid from 5 patients agreeing to the document, and are planning to separate exosomes and measure TIE - 1 levels. These patients have undergone conventional anticancer drug treatment for recurrent ovarian cancer and is currently pursued their clinical courses.

研究分野：産婦人科学

キーワード：Liquid Biopsy 婦人科がん エクソソーム 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

がん治療に分子標的治療薬が導入されるに従い、臨床現場では患者および腫瘍細胞の個性に着目した個別化医療の必要性が増している。適切な個別化医療を行うためにはバイオマーカーとして組織検査が必要になる事が多いが、現在の腫瘍組織生検には侵襲性などの問題点があり、それらの問題を解決するLiquid Biopsy という概念が注目されている。本研究では婦人科がん進行症例を対象としてLiquid Biopsy の臨床的有用性を検討する。

2. 研究の目的

Liquid Biopsy を通じて、婦人科がん患者に侵襲の少ない検査で適切な個別治療を提供する事。

3. 研究の方法

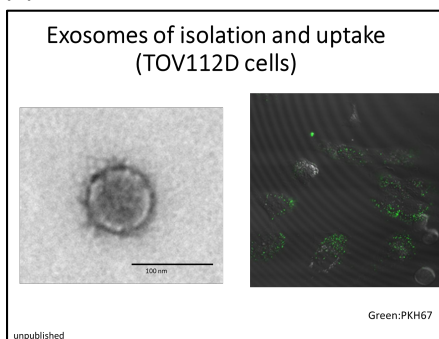
具体的な手段としては(1)末梢血から循環腫瘍細胞を検出し遺伝子変異の有無を調べる、(2)循環腫瘍細胞と原発腫瘍で見られた変異遺伝子を検出するプライマーでPCRを行い、患者血液中の腫瘍由来 DNA の絶対量を測定し治療効果のモニタリングを行う。現時点では患者血液からの循環腫瘍細胞を効率的に採取するプロトコルが技術的に定まっていない。

しかしながら最近 Liquid Biopsy の標的として注目を集める「エクソソーム」に関しては、卵巣癌細胞株を用いた予備検討で効率的に採取が可能となった。さらに卵巣癌細胞株から採取したエクソソームの卵巣癌細胞に対する機能に関しても、in vitro で興味深い知見を得られている。そこで再発卵巣癌患者の腹水および血液からエクソソームを採取して、抗がん剤耐性の有無を早期に検出する研究も上記(1)・(2)に加えて行う。

4. 研究成果

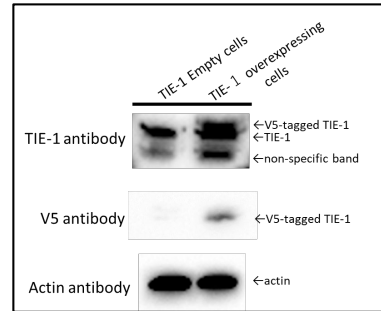
当初は患者末梢血をサンプルとして循環腫瘍細胞を検出し遺伝子変異の有無を調べる予定であったが、技術的な問題により昨年度より卵巣癌患者腹水中の「エクソソーム」をLiquid Biopsy の標的として研究を進めている。まず卵巣癌由来のエクソソームを電子顕微鏡で確認し、さらにそのエクソソームが他の卵巣癌細胞株に取り込まれる様子を蛍光顕微鏡で確認した(図1)

図1



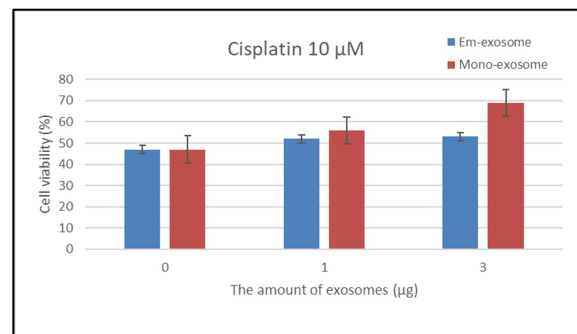
次に卵巣癌細胞株を用いた検討で、シスプラチン抵抗性に関与する分子として我々が大規模スクリーニングで同定した分子TIE-1について、エクソソームを介して薬剤耐性に関与するかを検討した。卵巣癌細胞株にTIE-1発現ベクターを組み込み、TIE-1強制発現細胞株を樹立した。その細胞株から採取したエクソソームではTIE-1発現量が増加していることをmRNAおよびタンパク質レベルで確認した(図2)

図2



この細胞から採取したエクソソームと通常の卵巣癌細胞株から採取したエクソソームを、それぞれ卵巣癌細胞株に添加してシスプラチン感受性の変化を測定した結果、TIE-1発現エクソソームでは用量依存的なシスプラチン感受性低下を認めた(図3)

図3



上記の結果より、TIE-1発現増加によりシスプラチン抵抗性となった卵巣癌細胞株がエクソソームを介して周囲の細胞にシスプラチン抵抗性を伝搬している可能性があると考えている。

さらに本研究に関して当院倫理委員会の承認(2017-1-659)を得たうえで、対象患者のリクルートを行った。文書にて同意を得た5名に対して腹水の採取を行い、腹水を分注して-80フリーザーで冷凍保存してある。患者は再発卵巣癌に対して通常の抗癌剤治療を受けており、現在はその臨床経過を追跡中である。Liquid Biopsy を通じて、婦人科がん患者に侵襲の少ない検査で適切な個別治療を提供する事が本研究の意義だと考えている。

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)

[雑誌論文](計6件)

① Zhang X, Kitatani K*, Toyoshima M* (*corresponding authors), Ishibashi M, Usui T, Minato J, Egiz M, Shigeta S, Kester M, Yaegashi N
Ceramide nanoliposomes as a MLKL-dependent, necroptosis-inducing, chemotherapeutic reagent in ovarian cancer, *Molecular Cancer Therapeutic*(2018), 査読有、17(1) January, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0173

Hasegawa-Minato J, Toyoshima M*(*corresponding authors), Ishibashi M, Zhang X, Shigeta S, Grandori C, Kitatani K*, Yaegashi N
Novel cooperative pathway of c-Myc and Furin, a pro-protein convertase in cell proliferation as a therapeutic target in ovarian cancers, *Oncotarget*(2018) 査読有、9(3):3483-3496, doi:10.18632/oncotarget.23322

Kaiho-Sakuma M, Toyoshima M* (*corresponding author), Toki A, Kameda S, Minato T, Watanabe M, Niikura H, Yaegashi N
Aggressive Neuroendocrine Tumor of the Ovary with Multiple Metastasis treated with Everolimus: a case report, *Gynecologic Oncology Reports*(2018), 査読有、23; 20-23, doi:10.1016/j.gore.2018.01.002

Toyoshima M* (*corresponding author), Tsuji K, Shigeta S, Tokunaga H, Ito K, Watanabe Y, Yoshinaga K, Otsuki T, Niikura H, Yaegashi N
Leptomeningeal metastasis from gynecologic cancers diagnosed by brain MRI, *Clinical Imaging*(2017), 査読有、41;42-47, doi:10.1016/j.clinimag.2016.09.013

Shibuya Y, Toyoshima M* (*corresponding author), Yaegashi N
ASGO 4th International Workshop on Gynecologic Oncology, *J Gynecol Onco*(2017), 査読なし、28(2), doi:10.3802/jgo.2017.28.e24

Nishimoto M, Toyoshima M* (*corresponding author), Shiga N, Utsunomiya H, Tsuji K, Suzuki F, Nagase S, Suzuki T, Sasano H, Ito K, Yaegashi N
Steroid Sulfatase Inhibitor Reduces Proliferation of Ishikawa Endometrial Cancer Cells in Co-Culture Systems,

OJEMD(2016), 査読有、6;193-204, doi:10.4236/ojemd.2016.69025

[学会発表](計10件)

① Egiz M, Kitatani K, Toyoshima M, Ishibashi M, Shigeta S, Minato J, Yaegashi N
Novel implications of La-Related Protein 4, an RNA chaperon, in ovarian cancer metastasis suppression, 第69回日本産科婦人科学会学術総会、2017/4/13-16、広島グリーンアリーナ(広島市)

Zhang X, Kitatani K, Toyoshima M, Ishibashi M, Shigeta S, Minato J, Yaegashi N
Anti-tumor activities of ceramide nanoliposomes in ovarian cancer, 第69回日本産科婦人科学会学術総会、2017/4/13-16、広島グリーンアリーナ(広島市)

Ishibashi M, Toyoshima M, Zhang X, Minato J, Shigeta S, Kitatani K, Yaegashi N
Tyrosine kinase receptor TIE-1 mediates platinum resistance by promoting nucleotide excision repair in ovarian cancer, 第69回日本産科婦人科学会学術総会、2017/4/13-16、広島グリーンアリーナ(広島市)

Kitatani K, Zhang X, Toyoshima M, Egiz M, Minato J, Ishibashi M, Shigeta S, Yaegashi N
Ceramide synthase 2-ceramide synthesis pathway modulates the metastatic potential of ovarian cancer, 第69回日本産科婦人科学会学術総会、2017/4/13-16、広島グリーンアリーナ(広島市)

北谷和之、張雪薇、臼井利典、豊島将文、重田昌吾、石橋ますみ、湊純子、小木曾英夫、岡崎俊朗、八重樫伸生
卵巣がん転移制御へのセラミド合成酵素2の関与、第5回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会、2017/2/25、大阪医科大学本部北キャンパス(大阪府高槻市)

張雪薇、北谷和之、豊島将文、石橋ますみ、臼井利典、湊純子、重田昌吾、Mark Kester、八重樫伸生
卵巣がんに対するセラミドナノリポソーム製剤の抗腫瘍作用、第5回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会、2017/2/25、大阪医科大学本部北キャンパス(大阪府高槻市)

湊純子、豊島将文、北谷和之、重田昌吾、石橋ますみ、八重樫伸生
卵巣癌におけるc-Mycと合成致死作用を持つ治療標的分子の探索、第5回婦人科がん

バイオマーカー研究会学術集会、2017/2/25、
大阪医科大学本部北キャンパス（大阪府高槻
市）

徳永英樹、岡本 聡、渡部 洋、重田昌吾、
辻 圭太、海法道子、豊島将文、新倉 仁、八
重樫伸生

フローサイトメトリーを利用した腹水細胞
診断法のパイロットスタディ、第 55 回日本
臨床細胞学会秋期大会、2016/11/18-19、別
府国際コンベンションセンターB-Con Plaza
（大分県別府市）

佐藤いずみ、岡本 聡、新倉 仁、重田昌
吾、橋本千明、辻 圭太、徳永英樹、豊島
将文、三浦弘守、渡部みか、八重樫伸生
子宮体癌のセンチネルリンパ節生検におけ
る捺印細胞診の診断精度についての検討、第
55 回日本臨床細胞学会秋期大会、
2016/11/18-19、別府国際コンベンションセ
ンターB-Con Plaza（大分県別府市）

張 雪薇、北谷和之、豊島将文、石橋ま
すみ、臼井利典、湊 純子、重田昌吾、Mark
Kester、八重樫伸生
セラミドナノリポソーム製剤によるネクロ
プトシスの誘導、第 9 回セラミド研究会
学術集会、2016/10/27-28、東京ユビキタス
協創広場 CANVAS（東京都中央区）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/laboratory/category01/m-toyoshima.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八重樫 伸生 (YATEGASHI, Nobuo)

東北大学・大学病院・教授

研究者番号：00241597

(2) 研究分担者

豊島 将文 (TOYOSHIMA, Masafumi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70451581

(3) 連携研究者

高尾 雅 (TAKAO, Masashi)

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号：70216612

北谷 和之 (KITATANI, Kazuyuki)

東北大学・東北メディカル・メガバンク

機構・講師

研究者番号：40539235

(4) 研究協力者

石橋 ますみ (ISHIBASHI, Masumi)

湊 純子 (MINATO, Junko)