

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09588

研究課題名(和文)新規流体チップデバイスによる尿路生殖器癌の循環腫瘍細胞捕捉に関する研究

研究課題名(英文) Study on circulating tumor cell capture of genitourinary cancer by novel fluidic chip device

研究代表者

近藤 幸尋 (Kondo, Yukihiro)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：80215467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規流体チップデバイスを用いて前立腺癌細胞株(PC3とLNCaP)における抗原発現の確認と細胞捕捉実験を行った。捕捉率は、PC3で83.82%、LNCaPで75.78%の捕捉率であり前立腺癌細胞株で高い捕捉率が実証された。また未治療転移性前立腺癌患者より末梢血2mLを採取し、chip内を通過させ、CTCsの捕捉に成功した。捕捉されたCTCsは各種蛍光免疫染色を施した後、蛍光顕微鏡で観察を行った。本条件で尿路上皮腫瘍および腎細胞癌でも同様に培養細胞を用いて検討したが、捕捉率は前立腺癌より低率であった。それを反映して臨床検体でも2mLの血液では十分に捕捉することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本新規流体デバイスはとても簡易システムであり安価である。また循環腫瘍細胞は癌治療に関してのマーカーになりうるものである。前立腺癌においてはPSAという腫瘍マーカーが存在するがその他の尿路上皮癌や腎癌では、明確な腫瘍マーカーが存在しません。その点で本デバイスを用いることにより新規腫瘍マーカーとなり、捕捉した細胞を解析することにより治療手段を選択可能にするものである。よって簡易で安価なこのデバイスが、広く臨床に応用される期待が高いものである。

研究成果の概要(英文)：Confirmation of antigen expression and cell capture experiments in prostate cancer cell lines (PC3 and LNCaP) were performed using a novel fluidic chip device. The capture rate was 83.82% for PC3 and 75.78% for LNCaP, demonstrating a high capture rate in prostate cancer cell lines. In addition, 2 mL of peripheral blood was collected from a patient with untreated metastatic prostate cancer, passed through the chip, and successfully captured CTCs. The captured CTCs were observed under a fluorescence microscope after being subjected to various fluorescent immunostaining. Under this condition, urothelial tumors and renal cell carcinomas were similarly examined using cultured microparticles, but the capture rate was lower than that of prostate cancer. Reflecting this, 2 mL of blood could not be sufficiently captured even in clinical specimens.

研究分野：尿路生殖器癌

キーワード：genitourinary cancer circulating tumor cell fluidic chip device

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿路性器悪性腫瘍において腫瘍マーカーの存在は診断および治療の経過、再発時に大変有用かつ重要なものである。一部の精巣腫瘍や前立腺癌においては、AFP、HCG、PSA などが使用されている。研究開始当初においては、セルサーチという機器が、循環腫瘍細胞を捕捉する機器として確立されていた。しかし本機器は多量の血液を要し、感度の面で問題があった。そこで本研究は新規流体チップデバイスを用いて、このデバイスに各種癌の細胞膜抗原に対する抗体をあらかじめ処理することにより、循環がん細胞を効率よく捕捉することができ、サンプル量も少なくなる可能性があった。また補足された循環がん細胞数を用いて遺伝子解析を行う可能性もあり、治療ステージに沿ったがん細胞の解析が求められている。本デバイスはそれらの要求を満たす可能性があり、研究材料とした。

2. 研究の目的

尿路腫瘍はバイオマーカーが前立腺癌の PSA のように確立されたものから、腎細胞癌や尿路上皮癌のように存在しないものがある。本研究は新規流体チップデバイスを用いて、このデバイスに前立腺癌、腎細胞癌および尿路上皮癌の細胞膜抗原に対する抗体をあらかじめ処理することにより、循環がん細胞を効率よく捕捉するものである。補足された循環がん細胞数は、抗がん剤の治療マーカーになる。加えて補足されたがん細胞を解析することにより、患者毎の治療後のがん細胞の形質転換や遺伝子解析が可能となる。以上より新規流体チップデバイスを用いた新規の循環がん細胞解析により新規バイオマーカーの確立に留まらず患者毎のオーダーメイド検査を目指すものである。

3. 研究の方法

1. 前立腺癌に於ける検討：前立腺癌において細胞株における基礎的検討を行った上で、未治療のハイステージの前立腺癌症例の CTCs 捕捉を検討する。2020 年を中心に各ステージの症例において CTCs の捕捉を行い、ステージよる CTCs が腫瘍マーカーと成りうるのかを検討する。また去勢抵抗性前立腺癌においては PSA が腫瘍マーカーとならない例もあり、CTCs と PSA の関連についても検討する。以上に加えて効果判定因子としても検討を各ステージで検討する。2. 腎細胞癌に於ける臨床的検討：2020 年には、まず腎細胞癌に関して細胞株を用いて癌細胞膜抗原発現の検討を行う。EpCAM やビメンチンなどの捕捉抗体をコーティングしたチップに PBS に懸濁した各種腫瘍細胞を通過させ、1 時間程度で CTCs の捕捉を行う。捕捉された CTCs は PEAnti EpCAM や DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、FITCAnti CK (Cytokeratin)8、CK9、CK18、APC-

CD45 などの各種蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で同定及び計測を行う。ここでは条件検討のため抗体の濃度や chip 内通過時間を変えて検討する。次に血液に懸濁した状態の腎細胞癌株 (Caki-1 と ACHN) に対して捕捉抗体でコーティングした chip 内を通過させ、1 時間程で CTCs の捕捉を行う。条件検討のため抗体の濃度や chip 内通過時間を変えて検討する。3. 尿路上皮癌に於ける臨床的検討：尿路上皮癌に関して培養細胞 (T24 および EJ) を用いて腎細胞癌と同様に基礎実験を行う。捕捉抗体に関しては EpCAM やビメンチンなどの捕捉抗体をコーティングしたチップを用いる。以上の実験で補足率を検討し 70%以上の補足率が認められた条件を選択する。以上の条件で臨床検体の検討を行う。臨床検体の検討において尿路上皮癌はリンパ行性転移が中心で血行性転移が少ない可能性もあり、血中および尿中の検討も行う。

4. 研究の成果

新規流体チップデバイスを用いて前立腺癌細胞株 (PC3 と LNCaP) における抗原発現の確認と細胞捕捉実験の後、未治療転移性前立腺癌患者より末梢血 2mL を採取し、輸液ポンプで陰圧をかけながら、捕捉抗体である EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) 抗体をコーティングした chip 内を通過させ、1 時間程で CTCs を捕捉に成功した。捕捉された CTCs は PE-Anti EpCAM や DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)、FITC-Anti CK (Cytokeratin) 8、CK9、CK18、APC-CD45 などの各種蛍光免疫染色を施した後、蛍光顕微鏡で観察、同定、計測を行った。本実験は病院内倫理委員会の審査を通しており、全患者には十分な口頭と書面による内容説明を行い、了承が得られた上で行われた。培養した前立腺癌細胞株 (PC3 と LNCaP) の EpCAM や CK18 などの抗原発現を蛍光免疫染色で確認後、血液の代用として PBS (リン酸緩衝生理食塩水: Phosphate Buffered Saline) 約 2mL に培養した前立腺癌細胞を混濁させて捕捉を試み、PC3 で 94.6%、LNCaP で 82.73% と高い平均捕捉率を既に確認した。健常者から末梢全血 2mL を採取し、培養した前立腺癌細胞を混濁させて同様の方法で捕捉を試み、PC3 で 83.82%、LNCaP で 75.78% 以上の平均捕捉率を確認。前立腺癌細胞株で高い捕捉率が実証されたため、未治療転移性進行前立腺癌患者から末梢全血を 2mL 採取し、同様の方法で CTCs を捕捉、観察を開始している。少数であるも全例で CTCs を確認することができ、平均捕捉細胞数は 48 (1~81 個/mL) であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akatsuka Jun, Numata Yasushi, Morikawa Hiromu, Sekine Tetsuro, Kayama Shigenori, Mikami Hikaru, Yanagi Masato, Endo Yuki, Takeda Hayato, Toyama Yuka, Yamaguchi Ruri, Kimura Go, Kondo Yukihiro, Yamamoto Yoichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 A data-driven ultrasound approach discriminates pathological high grade prostate cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-04951-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yanagi Masato, Hamasaki Tsutomu, Akatsuka Jun, Endo Yuki, Takeda Hayato, Kondo Yukihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Risk factor analysis of intravesical recurrence after retroperitoneoscopic nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Urology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12894-021-00932-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Misawa Aya, Kondo Yukihiro, Takei Hiroyuki, Takizawa Toshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Long Noncoding RNA HOXA11-AS and Transcription Factor HOXB13 Modulate the Expression of Bone Metastasis-Related Genes in Prostate Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 182 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12020182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 YASUOKA SHOTARO, YUASA TAKESHI, FUJIWARA RYO, KOMAI YOSHINOBU, NUMAO NOBORU, YAMAMOTO SHINYA, KONDO YUKIHIRO, YONESE JUNJI	4. 巻 40
2. 論文標題 Efficacy and Safety of Axitinib Therapy After Nivolumab for Patients With Metastatic Renal Cell Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6493 ~ 6497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14671	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hussain Maha, Mateo Joaquin, Fizazi Karim, Saad Fred, Shore Neal, Sandhu Shahneen, Chi Kim N., Sartor Oliver, Agarwal Neeraj, Olmos David, Thiery-Vuillemin Antoine, Twardowski Przemyslaw, Roubaud Guilhem, Corcoran Claire, Adelman Carrie A., de Bono Johann	4. 巻 383
2. 論文標題 Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 2345 ~ 2357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMoa2022485	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fizazi Karim, Shore Neal, Tammela Teuvo L., Ulys Albertas, Vjaters Egils, Polyakov Sergey, Jievaltas Mindaugas, Luz Murilo, Alekseev Boris, Kuss Iris, Le Berre Marie-Aude, Petrenciuc Oana, Snapir Amir, Sarapohja Toni, Smith Matthew R.	4. 巻 383
2. 論文標題 Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer and Survival with Darolutamide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 1040 ~ 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMoa2001342	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Shunichiro, Suzuki Yasutomo, Akatsuka Jun, Endo Yuki, Shimizu Akira, Hamasaki Tsutomu, Kimura Go, Kondo Yukihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Expression of epithelial-Mesenchymal transition related markers in Plasmacytoid Urothelial carcinoma of the urinary bladder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Urology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12894-020-00641-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kishikawa Hiroaki, Suzuki Norihito, Suzuki Yasutomo, Hamasaki Tsutomu, Kondo Yukihiro, Sakamoto Atsuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of robot-assisted surgery on anesthetic and perioperative management for minimally invasive radical prostatectomy under combined general and epidural anesthesia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2021_88-304	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagi Masato, Kimura Go, Sekine Tetsuro, Takeda Hayato, Akatsuka Jun, Endo Yuki, Hayashi Tatsuro, Hamasaki Tsutomu, Kondo Yukihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Factors associated with prolonged surgical duration of laparoscopic radical nephrectomy using retroperitoneal approach by non-expert surgeons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2021_88-302	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Endo Yuki, Akatsuka Jun, Obayashi Kotaro, Takeda Hayato, Hayashi Tatsuro, Nakayama Satoko, Suzuki Yasutomo, Hamasaki Tsutomu, Kondo Yukihiro	4. 巻 104
2. 論文標題 Efficacy of Laparoscopic Partial Cystectomy with a Transurethral Resectoscope in Patients with Bladder Endometriosis: See-Through Technique	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Urologia Internationalis	6. 最初と最後の頁 546 ~ 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000503795	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木村 剛 (Kimura Go) (20234354)	日本医科大学・医学部・教授 (32666)	
研究分担者	大林 康太郎 (Obayashi Koutaro) (30857579)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	
研究分担者	鈴木 康友 (Suzuki Yasutomo) (90297911)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------