

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591493
 研究課題名（和文） 高機能磁性ナノ粒子を用いた大腸癌に対する高感度高効率診断・検診法の開発
 研究課題名（英文） Development of sensitive rapid diagnostic systems for colorectal cancer by highly functionalized ferrite fluorescent beads
 研究代表者
 長谷川 博俊（HASEGAWA HIROTOSHI）
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：00218455

研究成果の概要（和文）：本研究は、高機能性蛍光・磁性ビーズ（FF ビーズ）に上皮細胞で発現している抗原に対する抗体を固定し、血液中や便中の上皮細胞を効率よく磁気回収を行い、回収した細胞を用いての診断を行うことを目的とした。抗 EGFR 抗体固定化 FF ビーズと A431（EGFR 高発現株）を用い、細胞回収率の検討を行った。回収した細胞を用いてのタンパク質発現や遺伝子異常の検索、癌細胞の同定は臨床検体を用いるには至らなかった。また、大腸癌担癌患者における血清 bFGF と、大腸癌細胞の上皮細胞および血管内皮細胞に発現している PLGF の検討を行った。静脈侵襲および術前 CEA 値との間に有意な相関を認めた。

研究成果の概要（英文）：The aims of this project is to collect cancer cells from blood or kot sample using highly functionalized ferrite fluorescent beads (FF beads), and develop sensitive rapid diagnostic systems for colorectal cancer. Anti EGFR antibody was immobilized onto the surfaces of the FF beads and cell collection rate was measured using A431 (epidermoid tumor cell line). We could not reach to the stage of using clinical samples for diagnosis. Serum bFGF concentration and PLGF from colorectal cancer patients was evaluated and PLGF was correlated with venous invasion and CEA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌・磁性体・スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

大腸癌をはじめとする癌患者では末梢血液中に癌細胞が存在することはすでに知られており、教室でもそれらの結果を報告してきた。しかしながら、従来の方法では血中癌細胞の同定が定性的で煩雑であり、必ずしも臨床的に満足すべきものではない。また、

癌患者の血中には、サイトケラチン、テロメラゼ活性、各種遺伝子異常をマーカーとして、進行癌では癌細胞が検出され、陽性の症例では予後が不良であることを我々は報告してきたが、細胞診と同様に回収率の問題や変性、さらには癌細胞の同定法などの問題がある。さらに我々は便中に含まれる癌細胞の遺伝子異常を PCR-SSCP 法により検出でき

ることを発表してきた。しかしこれらの方法でも回収率や検出率、そして高コストなどが問題となっている。

一方、教室では上記とは別に、フェライトの表面を多様に被覆する技術を構築し、粒径が150~200nmのアフィニティ磁性ビーズの作製技術や、それをを用いた自動化スクリーニング装置を開発・製品化した。その研究開発の過程で、磁性ビーズに新たな機能として蛍光を付加するという、これまでに例のない技術開発に成功した。このビーズは、数個のフェライトと 10^5 個以上の蛍光物質であるユロピウム錯体を内包し、表面がポリGMA(グリシジルメタクリレート)で完全に被覆されており、世界に先駆けて蛍光と磁性の両機能を十分に発揮できるビーズでしかも両者は漏洩することはない。さらに表面にポリGMA由来の反応性に富むエポキシ基を有しているため、多彩な生理活性物質(抗体タンパク質、DNAなど)をそれらの部位特異的に固定化することで多様な機能を付与することができる。

そこでこの高機能性蛍光・磁性ビーズを用いれば、血中や便中の癌細胞を効率よく回収できると考えた。また、蛍光物質を固定することにより、定量化が容易になるのではないかと考えた。癌細胞に高率に検出される遺伝子異常や過剰量のタンパク質は存在するが、一般的にがん細胞にのみ特異的かつ普遍的に発現している膜タンパクは存在しない。そこで上皮細胞系で発現しているEpCAM、EGFR、c-erb B2等を認識する抗体を高機能性蛍光・磁性ビーズに固定化し、血中や便中の上皮細胞を効率よく磁気回収を行い、大腸癌で高率に認められるタンパク質発現や遺伝子異常を検索し、癌細胞の同定を行うとともに、臨床特性と比較することにより、血液を介した転移との関連につき検討し、治療方針選択肢としての有用性の証明しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、高機能性蛍光・磁性ビーズに上皮細胞で発現している抗体を固定し、血液中や便中の上皮細胞を効率よく磁気回収を行う。そして大腸癌で高率に認められるタンパク質発現や遺伝子異常を検索し、癌細胞の同定を行うとともに、臨床特性と比較することにより、血液を介した転移との関連につき検討し、治療方針選択肢としての有用性を明らかにすることを本研究の目的とした。

また、同様に便中に含まれる癌細胞を効率よく検出し、この方法が便潜血反応に代わって大腸癌検診に応用できるか、潰瘍性大腸炎患者のなかから大腸癌合併を効率よく安価に発見できるかを明らかにすることを目的

とした。

さらに、近年、大腸癌の集学的治療として化学療法が進歩が顕著であり、特に分子標的治療薬の登場で切除不能進行再発大腸癌の予後は、目まぐるしく改善を認め、現時点では、生存期間の中央値は約20か月に到達するほどになってきた。しかし一方で、切除不能進行再発大腸癌に対する有効症例、無効症例の個別化に対してはまだまだ明らかではない。分子標的治療薬である血管新生中和抗体薬は、その治療の有効性を予測する因子にや、血清中に存在する血管新生に関する様々なサイトカインの大腸癌における動向についてもいまだ明らかではない。これらを踏まえ本研究に応用すべく、大腸癌担癌患者における血清basic Fibroblast Growth Factor(bFGF)及びPLGF測定の有効性を臨床的に明らかにすることを合わせて目標とした。

3. 研究の方法

高機能性蛍光・磁性ビーズに上皮細胞のマーカーである抗EpCAM抗体、抗EGFR抗体、抗c-erb B2抗体などを付着させ、付着できたことを及び、非特異吸着をin vitroで確認した。次に血液中に様々な濃度で上皮細胞・癌細胞を混入し、各種抗体等を固定化した高機能性蛍光・磁性ビーズを用いて、磁石にて回収、癌細胞を検出して、回収効率や感度を測定した。

大腸癌患者治療経過中に血液を回収し、研究を行うIRB(倫理申請)を行い、通過させた。具体的には、大腸癌患者35名から文章による同意を得て、血清および血漿を採取し回収した。同患者については、腫瘍切除後の血清動向を観察すべく、術後1日目、3日目、7日目、14日目に血清および血漿を回収した。化学療法施行中の患者4名についても、紙面による同意を得たのち、化学療法投与同日血漿を回収した。

4. 研究成果

高機能性蛍光・磁性ビーズ(FFビーズ)の模式図を図1に示す。このビーズは、前述のように、数個のフェライトと 10^5 個以上の蛍光物質であるユロピウム錯体を内包し、表面がポリGMA(グリシジルメタクリレート)で完全に被覆されている。FFビーズが単粒子で分散していることをSEM画像にて確認した(図2)。ユロピウムを封入させないIFGビーズと粒径はほぼ同等であった。また、FFビーズの非特異吸着の確認をSDS-PAGEにて行ったが、非特異吸着は見られなかった(図3)。ユロ

ピウムの漏洩は磁石でFFビーズを集積させた後の上清をUV励起させ蛍光測定することにより確認した。図4に示す通り、漏洩は全く見られなかった。FFビーズに抗EGFR抗体を固定化した高機能性ビーズを作製し、GFPを発現させたEGFR高発現類上皮癌細胞株A431に作用させ、磁気捕集した細胞の、明視野、GFP、及びUVでの励起像を図5

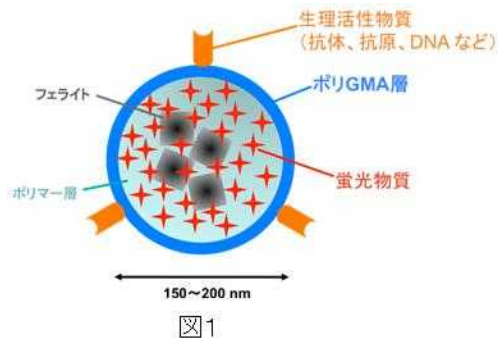
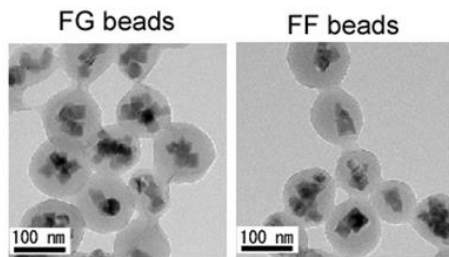


図1



142.2±31.8 nm 147.3±34.9 nm

図2

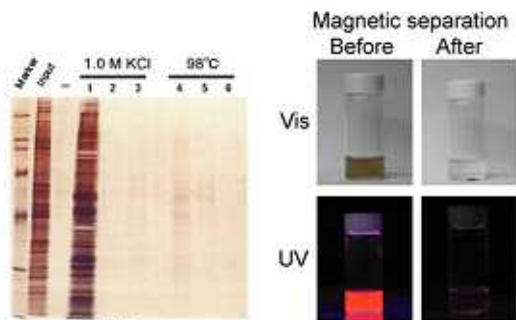


図3

図4

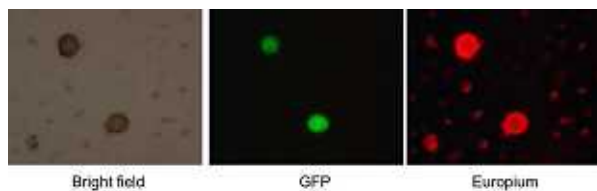


図5

に示す。この抗EGFR抗体固定化FFビーズを 1×10^5 個の細胞に作用させたときの回収率は、ビーズ量が40 μ g、30 μ g、20 μ g、10 μ gの時、それぞれ80%、65%、40%、26%であった。また、20 μ gのビーズに、 1×10^5 個、 1×10^4 個、 1×10^3 個、の細胞を作用させたときの回収率は、それぞれ26%、46%、130%であった。 1×10^2 個の細胞での回

収率は0%であった。

また、回収した細胞を用いてのタンパク質発現や遺伝子異常の検索、癌細胞の同定は臨床検体を用いるに至らなかったが、この高機能性蛍光・磁性ビーズをELISAに応用し、迅速高感度にて血清中タンパクを検出する検討も東京工業大学と共に行っている。

大腸癌担癌患者における血清bFGFと、大腸癌細胞の上皮細胞および血管内皮細胞に発現しているPLGFの検討を行った。腫瘍切除後の血清動向を観察するべく、術後1日目、3日目、7日目、14日目に血清および血漿を採取した。20名の健常人では血清bFGF値は中央値：4.14 pg/mlであった。担癌患者における血清bFGF値は中央値：6.80 pg/mlと有意に高い傾向を認めた(p=0.01)。一方、健常人20名の血清PLGF値は9.9(範囲：7.8 14.6)pg/mlで、根治度A大腸がん術前血清13.1(範囲：7.4 15.3)pg/mlと有意に高値であった(p=0.01)。術後2週間での血清PLGF値は10.1(範囲：8.2 13.3)pg/mlと術前に比して有意に低くなっていった(p=0.01)。術後2週間での血清PLGF値と健常人から得られた血清PLGF値は有意差を認めなかった。大腸がん術前血清PLGF値は、年齢、性別、腫瘍占居部位、リンパ節転移の有無、リンパ管侵襲、腫瘍組織型、CA19-9値とは有意な相関を認めなかったが静脈侵襲および術前CEA値と有意な相関を認めた。

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)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Ishii Y, Hasegawa H, Endo T, Okabayashi K, Ochiai H, Moritani K, Watanabe M, Kitagawa Y. Medium-term results of neoadjuvant systemic chemotherapy using irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with locally advanced rectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2010 Nov;36(11):1061-5. doi: 10.1016/j.ejso.2010.05.017. Epub 2010 Jun 9. 査読あり

〔学会発表〕(計 8件)

平田玲, 長谷川博俊, 石井良幸, 遠藤高志, 落合大樹, 岡林剛史, 代永和秀, 星野大樹, 星野好則, 松永篤志, 北川雄光. 大腸癌に対する cetuximab の治療効果と KRAS, BRAF のバイオマーカーとしての有

用性. 第 48 回日本癌治療学会学術集会, 2010.10.28-30, 国立京都国際会館(京都)

平田玲, 林田哲, 長谷川博俊, 石井良幸, 遠藤高志, 落合大樹, 岡林剛史, 内田寛, 北川雄光. 大腸癌の進展における転写因子 H0XB9 の影響 A transcriptional factor H0XB9 promotes disease progression in colorectal cancer. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010.9.22-24, 大阪国際会議場(大阪)

石井良幸, 長谷川博俊, 遠藤高志, 岡林剛史, 平田玲, 代永和秀, 森谷弘乃介, 北川雄光. 大腸癌に対する抗癌剤感受性試験と分子標的薬 cetuximab の効果予測に基づいた治療戦略. 第 65 回日本消化器外科学会総会, 2010.7.14-16, 海峡メッセ下関(山口)

Uchida H, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Okabayashi K, Masugi Y, Kitagawa Y. Tumor Budding in Submucosa: An Optimal Predictive Factor for Clinical Outcome in Colorectal Cancer. The American Society of Colon & Rectal Surgeons Annual Meeting, 2010.5.15-19, Hilton Minneapolis Hotel & Minneapolis Convention Center (Minneapolis, Minnesota).

平田玲, 長谷川博俊, 北川雄光. 進行・再発大腸癌における KRAS, BRAF 遺伝子 mutation と cetuximab の治療効果の医療経済的検討. 第 96 回日本消化器病学会総会, 2010.4.22-24, 新潟県民会館(新潟)

代永和秀, 長谷川博俊, 石井良幸, 遠藤高志, 岡林剛史, 飯田修史, 内田寛, 林竜平, 平田玲, 森谷弘乃介, 星野大樹, 星野好則, 松永篤志, 北川雄光. 進行再発大腸癌における KRAS/BRAF 遺伝子変異から見た 1 次治療の効果の検討. 第 96 回日本消化器病学会総会, 2010.4.22-24, 朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)(新潟)

内田寛, 長谷川博俊, 石井良幸, 遠藤高志, 岡林剛史, 飯田修史, 林竜平, 森谷弘乃介, 平田玲, 代永和秀, 星野好則, 星野大樹, 松永篤志, 真杉洋平, 北川雄光. pT2 大腸

癌における粘膜下層 budding: リンパ節転移予測因子としての意義. 第 110 回日本外科学会定期学術集会, 2010.4.8-10, 名古屋国際会議場(名古屋)

岡林剛史, 長谷川博俊, 石井良幸, 遠藤高志, 北川雄光. 進行再発大腸癌に対する化学療法均てん化へ大学病院が果たすべき役割. 第 110 回日本外科学会定期学術集会, 2010.4.8-10, 名古屋国際会議場(名古屋)

〔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〕
ホームページ等なし

6. 研究組織
長谷川 博俊 (HASEGAWA HIROTOSHI)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 00218455