

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791760

研究課題名(和文) Death Receptor 5を表面マーカーとした末梢循環腎癌細胞検出系の開発

研究課題名(英文) Development of detecting circulating renal cancer cells that have Death Receptor 5 as a surface marker

研究代表者

平間 裕美(Hirama, Hiromi)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50552725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌患者の血液中を循環している極微量の癌細胞(末梢血循環腫瘍細胞Circulating tumor cell:CTC)を腎癌細胞の表面マーカーであるDR-5に対する蛍光標識抗体を用いて検出することを目的として本研究は計画された。

予備実験では、腎癌細胞をCTCとしてカウント可能だった。しかし、限局性および転移性腎がん患者(それぞれ15名および4名)の末梢血において、DR-5陽性癌細胞の検出率は低くCTC検出は困難だった。また、腎臓より最初に流出する腎静脈の血液を用いてCTC測定を13名の患者で行ったが、腎摘出後のためコンタミネーションが非常に多くCTC測定には不適當であった。

研究成果の概要(英文)：This research was planned with the objective of detecting cancer cells at extremely low volumes circulating in the blood of renal cell carcinoma patients (circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood), using fluorescence-labeled antibodies for DR-5, a surface marker of renal cancer cells.

In a preliminary experiment, it was possible to count renal cancer cells as CTC. However, in the peripheral blood of localized and metastatic renal cell carcinoma patients (respectively 15 and 4 patients), the positive detection rate for DR-5 was low, and CTC detection was difficult. Moreover, CTC measurement using the blood in the renal veins that first flowed from the kidneys was performed for 13 patients, but there was significant contamination given that this was subsequent to renal excision, and it was found to be unsuitable for CTC measurement.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：末梢血循環腫瘍細胞 腎癌 Death Receptor 5

1. 研究開始当初の背景

(1) 全国で1年間に約1万人が腎癌と診断され、3000～4000人が死亡している。腎癌は、最近増加傾向のある癌の一つで、治療方針も目覚しく進歩しているところである。腎限局の早期癌では5年生存率が8割を超える反面、診断時に転移を有する進行性腎癌は予後不良であり増加傾向にある。進行性腎癌に対してインターフェロン(IFN)- γ やインターロイキン(IL)-2などの免疫療法に加え、近年分子標的治療薬が登場し治療戦略が大きく変わった。癌転移の早い段階(微小転移段階)での検知と早期治療が治療効果や長期成績の向上につながる可能性が高まっている。

(2) 癌患者の血液中に循環している極微量の癌細胞を分離して個数を視察する末梢血循環腫瘍細胞(Circulating tumor cell:CTC)測定の有用性が確認され、乳癌、大腸癌、直腸癌、前立腺癌では既にFDA(米国食品医薬品局)から承認されている。例えば転移性乳癌の領域において、治療開始前の血液7.5ml中のCTC数が5個未満の患者では、5個以上の患者に比べ無増悪生存期間や全生存期間の中央値が有意に長いという結果が得られた。また、治療後のCTC値も同様に5個未満の患者の方が予後が良い結果であった。さらに治療前後におけるCTC値の変化により治療効果の判定が可能であることが示された。これらの結果より、CTCの臨床応用へ注目が集まっている。

一方、腎癌の領域ではCTC測定に関する報告が未だないのが現状である。その理由は、CTC測定で不可欠なCK(サイトケラチン)発現率が腎癌細胞では高くないためと考えられる。しかし、我々は腎癌細胞の細胞膜にDeath Receptor(DR)-5が発現していることを証明した。

2. 研究の目的

DR-5に対する蛍光標識した抗DR-5抗体を用いて、腎癌患者におけるCTC検出システムを確立すること

3. 研究の方法

CTC測定にはベリデックス社(米国)のCell Search Systemを使用した。



CellTracks オートプレップと CellTracks アナライザー の各々の行程は、総て全自動で行われる。

CellTracks オートプレップの行程では、上皮細胞接着分子であるEpCAMに対する抗体にナノ鉄粒子を結合した磁性粒子(フェロフルード)により、血液中から特異的に上皮細胞を分離する。

未反応の血液成分を排出した後に分離した上皮細胞に蛍光分子で標識した抗CK抗体を反応させると共にDNA蛍光染色物質DAPIで細胞の核を染色し、混入した白血球をCTCと識別するために抗CK抗体とは異なる蛍光分子で標識した抗CD45抗体を加えて白血球に反応させる。

(1) 予備実験として、Bufferに腎癌細胞を混在した検体で、癌細胞が抗DR-5抗体または他の抗体(腎癌に特異的に発現しているとの報告があるCA抗体など)に標識されることの確認

(2) 限局性腎がん患者の末梢血でCTC検出

が可能かどうかを手術前後で検討

末梢血 10ml を採取しそのうち 7.5ml の血液を使用する。

EpCAM 抗体結合ナノ鉄ビーズを用いて上皮性細胞を分離する。

FITC で標識された抗 CK 抗体を用いて細胞質を蛍光染色する。

PE で標識された抗 DR-5 抗体を用いて細胞膜を蛍光染色する。

DAPI を用いて核を蛍光染色する。(核を持つ上皮細胞が染色される)

APC で標識された CD45 抗体を用いて白血球を蛍光染色する。(検体中に混在する白血球を認識でき、DAPI で染色された核が癌細胞由来か白血球由来かを識別できる)

蛍光染色の反応は同時に行い、コンピューターで解析した蛍光画像から CTC を目視判定する。(白血球を排除し、形態のインタクトな癌細胞の核をカウントする)

(3) 限局性腎がん患者の腎静脈血を用いた CTC 検出の検討 (腎摘出術後の腎静脈より血液を採取)

腎静脈血は腎摘出後に腎静脈より採取し、そのうちの 0.1ml を使用する。

- は同様

(4) 転移性腎がん患者の末梢血で CTC 検出が可能かどうかを検討

4. 研究成果

(1) 予備実験

癌細胞が抗 DR-5 抗体に標識されることは確認できたが、抗 CA 抗体では染まらなかった。

(2) 限局性腎がん患者の末梢血

限局性腎がん患者 (患者背景は表 1) で行ったが、DR-5 陽性癌細胞の検出率は低く (CTC5 以上は術前で 15 名中 3 名、術直後で 12 名中

0 名) CTC 検出は困難であった (表 2)。また、術前に CTC を 5 個以上カウント出来た 3 名 (患者 8, 12, 15) は、術後観察期間それぞれ 4 年、3 年 8 ヶ月、3 年 7 ヶ月経過し術後再発転移は認めていない。唯一癌死した患者 2 は、術前術後ともに CTC は 0 であった。予後の指標としての利用は難しいだろう。

表 1: 限局性腎がん患者の背景

患者	年齢	性別	左右	病理組織	pTstage	尿管浸潤
1	75	男	左	clear cell carcinoma	T1a	-
2	64	男	左	clear cell carcinoma	T1b	+
3	76	男	左	clear cell carcinoma	T1a	-
4	72	男	右	clear cell carcinoma	T1a	-
5	78	男	右	clear cell carcinoma	T1b	+
6	50	男	左	clear cell carcinoma	T1a	-
7	61	男	左	sarcoma	T4	不明
8	58	男	右	clear cell carcinoma	T1a	-
9	81	女	左	clear cell carcinoma	T1a	-
10	35	女	左	clear cell carcinoma	T1b	-
11	55	女	左	clear cell carcinoma	T1a	-
12	56	男	左	clear cell carcinoma	T1a	-
13	57	男	右	clear cell carcinoma	T1b	-
14	62	男	右	clear cell carcinoma	T1b	-
15	55	男	左	granular cell carcinoma	T1a	-

表 2: 限局性腎がん患者における手術前後の末梢血 CTC 測定数

患者	術前	術後
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	4	0
6	2	0
7	1	未
8	14	未
9	0	0
10	2	0
11	0	0
12	15	0
13	0	2
14	0	2
15	14	未

(3) 限局性腎がん患者の腎静脈血

腎臓より最初に流出する腎静脈の血液を用いて CTC 測定が可能かもしれないと考え、腎摘出後の腎静脈より血液を採取し 13 名の患者で CTC 測定を行った。しかし、摘出後ということでコンタミネーションが非常に多く CTC 測定には不適當であることが分かった。

(4) 転移性腎がん患者の末梢血

4名の転移性腎がん患者(患者背景は表3)の末梢血7.5mlを用いて行ったが、抗DR-5抗体・抗CK抗体によるCTCは残念ながら検出されなかった(表4)。

表3: 転移性腎がん患者の背景

患者	年齢	性別	左右	病理組織	pTstage	転移部位	脈管浸潤
A	66	男	右	clear cell carcinoma	T2	骨	+
B	24	男	左	clear cell sarcoma	T3b	肺・肝	不明
C	70	女	右	不明	不明	肺	不明
D	69	女	左	clear cell carcinoma	T3a	脾	+

表4: 転移性腎がん患者の治療前における末梢血CTC測定数

患者	抗DR5抗体	抗CK抗体
A	0	未
B	0	0
C	0	0
D	1	0

5. 主な発表論文

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平間裕美 (HIRAMA Hiromi)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50552725

(2) 研究分担者

笥善行 (KAKEHI Yoshiyuki)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 20214273

杉元幹史 (SUGIMOTO Mikio)
香川大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 10243768

張霞 (ZHANG Xia)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 30524061

(3) 連携研究者

()

研究者番号: