

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659531

研究課題名(和文) 表面プラズモン共鳴による血管肉腫細胞の機能的診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a functional diagnostic system for angiosarcoma by surface plasmon resonance

研究代表者

秀 道広 (Hide, Michihiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：50284188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：表面プラズモン共鳴(SPR)センサーを用い、末梢血に存在する血管肉腫細胞(Circulating tumor cell; CTC)を検出、評価する方法を検討、開発した。ヒト末梢血1mlあたり2,000個の血管肉腫細胞を混合して抗CD146抗体で標識すると、最大10個の血管肉腫細胞を回収することができた。血管肉腫細胞と正常血管内皮細胞はともに細胞表面にVEGF受容体を発現し、2種類のうちの1つの血管肉腫細胞株ではVEGF刺激により受容体のリン酸化が誘導された。しかし、SPRセンサーでは正常血管内皮細胞のみが反応を示し、血管肉腫CTCを高感度かつ迅速に検出し得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：We applied surface plasmon resonance (SPR) for the analysis of circulating tumor cells (CTC) derived from angiosarcoma. We could recover up to 10 angiosarcoma cells from a mixture of 1 ml of human peripheral blood, mixed with 2,000 angiosarcoma cells and anti-CD146 antibodies. Both angiosarcoma cells and normal vascular endothelial cells expressed VEGF receptors on their surface, and one of two angiosarcoma cell lines phosphorylated their VEGF receptors in response to VEGF. However, only normal endothelial cells showed an SPR signal by VEGF. These results suggest that SPR biosensor may detect CTC of angiosarcoma both sensitively and rapidly.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：血管肉腫 皮膚悪性腫瘍 バイオセンサー 表面プラズモン共鳴 血管内皮細胞 細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) Circulating tumor cells: CTC

近年、悪性腫瘍の予後予測や治療効果判定に、末梢血中存在する腫瘍細胞 (Circulating tumor cells: CTC) の有用性が注目されている。特に血管肉腫は、血管に由来し、高齢者の頭部に好発して高率に血行性転移を起こし、一旦転移が起こると極めて予後不良であり、CTC は腫瘍発生のかかなり早い時期から末梢血液中に出現していると考えられることから、血管肉腫 CTC を検出・評価することは、本腫瘍の診断のみならず、超早期の診断またはそのスクリーニングのためにも極めて有効と考えられる。しかし、これまでに血管肉腫の CTC を同定した報告はなく、また、末梢血より CTC 様細胞を分離しても、現在の光学顕微鏡的な形態観察と遺伝子解析では正常の血管内皮細胞の分離と腫瘍性の増殖を含む血管肉腫細胞の機能的な評価には限界がある。また、もともと血管内皮という間葉系由来の腫瘍であるため、上皮系細胞では転移性の指標とし得る上皮-間葉系転換を機能評価に用いることも期待できない。そこで申請者は、血管肉腫 CTC を生きたまま分離して機能評価し、ステージの進んだ患者のみならず、超早期の血管肉腫患者の細胞機能診断および腫瘍診断のためのスクリーニングの手段として利用することを考案した。

(2) 次元表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance; SPR) バイオセンサーによる細胞機能評価

申請者は、SPR バイオセンサーがセンサーチップ上の金薄膜に接した細胞の反応を無標識・リアルタイムに共鳴角 (AR, Angle of resonance) 変化として検出できることを発見し (Hide M et al. Anal Biochem 302: 28-37, 2002)、その技術により単細胞レベルで細胞応答を検出・解析することに成功した (Yanase Y et al. Biosens Bioelectron 26:674-681, 2010 他)。また、最近、一部の血管肉腫細胞は EGF 受容体を細胞表面に発現することが報告されており、EGF 受容体を血管肉腫細胞を正常血管内皮細胞ないしその前駆細胞と区別するマーカーとして利用できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では以下の 3 つの課題を設定した。

(1) ヒト末梢血からの血管肉腫 CTC の分離

ヒト末梢血液中から血管肉腫細胞 CTC を含む細胞検体を含む検体を分離するための方法を確立する。

(2) 血管肉腫細胞と正常血管内皮細胞を区別する刺激応答システムの探索

上記検体から、血管内皮系の細胞を識別し、かつ SPR シグナルにより正常血管内皮細胞と血管肉腫細胞を識別するための刺激応答システムを探索する。

(3) 次元 SPR バイオセンサーの小型化

CTC による血管肉腫細胞の診断を実用化するためには、検査に必要な血液検体量を最小限にすることが重要である。そのため SPR バイオセンサーに μ TAS 技術を導入してセンサーの小型化を図る。

3. 研究の方法

(1) 細胞株: 血管肉腫細胞 CTC のモデルとしての 2 種類の血管肉腫細胞株 (ISO-HAS, HAMON) と、正常血管内皮細胞としてヒト臍帯血静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を入手し、実験に供した。

(2) ヒト末梢血からの血管肉腫細胞の分離:

ヒト末梢血より血管肉腫細胞を分離するための細胞表面マーカーを探索するため、HUVEC および 2 種類の血管肉腫細胞 (株) における EGF 受容体、EGF、VEGF、CD44 の mRNA 発現を検索した。また、ISO-HAS 細胞に特異的に発現することが知られている CD146 に対するモノクローナル抗体を用い、ヒト末梢血より ISO-HAS を分離する条件を検討した。

(3) SPR シグナルの探索: 血管肉腫細胞と正常血管内皮細胞で異なる刺激応答を誘導する細胞外刺激を探索した。

(4) SPR バイオセンサーの小型化: 自作した 2 次元 SPR 装置のセンサー部分に高屈折率のプリズムを採用し、センサー上に 9 皿分の小円を残して疎水性加工を施し、同時に 9 つの検体の測定ができるデバイスを作成した。

4. 研究成果

(1) ヒト末梢血からの血管肉腫 CTC の分離

血管肉腫 CTC を物理的に分離する方法として、細胞表面に CD146 を発現することが知られているヒト血管肉腫細胞株 ISO-HAS を健常人ヒト末梢血と様々な割合で混和し、さらに蛍光標識した抗 CD146 とともにインキュベートしてフローサイトメトリーにより検出した。その結果、末梢血 5ml に対して 10^4 個の ISO-HAS 細胞を混合すると、最大 50 個程度の CD146 陽性細胞を検出することができた。一方、2 名の血管肉腫患者の末梢血を用いて同様のフローサイトメトリー解析を行ったところ、患者末梢血中には信頼できる数の CD146 陽性細胞を検出することはできなかった。さらに定量的 PCR を用いて末梢血に生理的に存在する血管内皮細胞マーカー陽性細胞の数を検討することが今後の課題である。

(2) 血管肉腫細胞と正常血管内皮細胞を区別する刺激応答システム

血管肉腫 CTC 細胞膜に発現する受容体分子を探索するため、ヒト末梢血、悪性黒色腫細胞株 (MMG1)、ヒト臍帯血血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト扁平上皮癌株 (A431) を用いて hEGFR、EGF、VEGF、CD44 の mRNA の発現を

検討した結果、ISO-HAS と HUVEC には予想通り VEGFR が、A431 には hEGFR と CD44 が発現していることが確認された。しかし、これまで一部の血管肉腫細胞で報告されている hEGFR の発現は、ISO-HAS、HAMON いずれの細胞株でも検出することができなかった。しかし、2つの血管肉腫細胞株は、いずれも HUVEC 同様、VEGF 受容体を発現することが確認されたので、これらの細胞を VEGF で刺激して起こる細胞内情報伝達ならびに SPR シグナルについて検討した。その結果、HUVEC と HAMON ではともに VEGF 受容体のリン酸化が起こるが、ISO-HAS 細胞ではリン酸化は起こらないことが判明した(図1)。また、解読し得た範

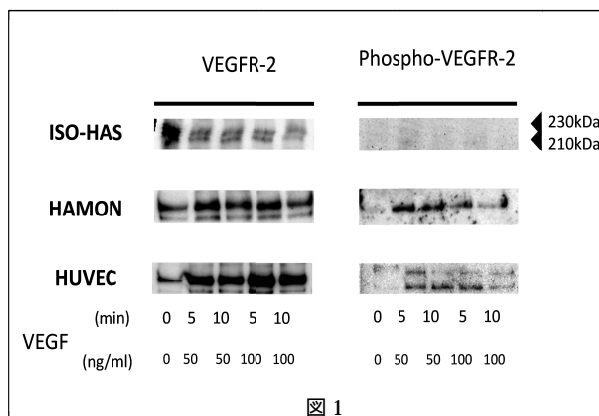


図 1

囲でこれらの細胞の VEGF 受容体の遺伝子配列に異常はなく、ISO-HAS 細胞におけるリン酸化の不良は受容体よりも下流の情報伝達系に起因することが示唆された。このことは、血管肉腫細胞は VEGF 受容体の遺伝子解読では正常血管内皮細胞と鑑別することは不可能であるが、ISO-HAS については VEGF 受容体の発現と VEGF 刺激による無応答性により正常血管内皮細胞と区別できることを意味する。しかし、HAMON についてはこの方法でもなお正常細胞と区別することはできない。そこでさらにこれらの細胞を VEGF で刺激して生じる SPR シグナルについて検討したところ、HUVEC では一過性の共鳴角の増大に続く遷延する低下が起こるのに対し、ISO-HAS および HAMON はいずれも緩衝液を還流した場合と同様の軽度の上昇または無反応であった。また、いずれの細胞も、陽性対照としてイオノマイシン(カルシウムイオノフォア)で刺激した場合は HUVEC を VEGF で刺激した場合に見ら

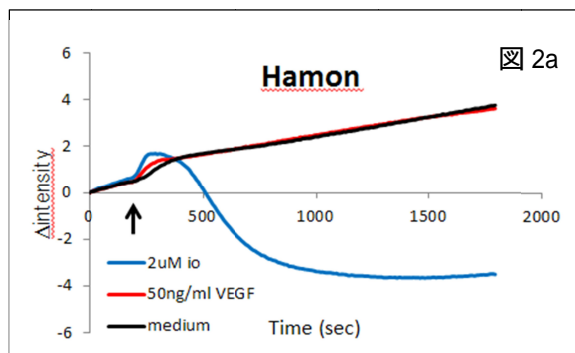


図 2a

れるのと同様の一過性の上昇とそれに続く

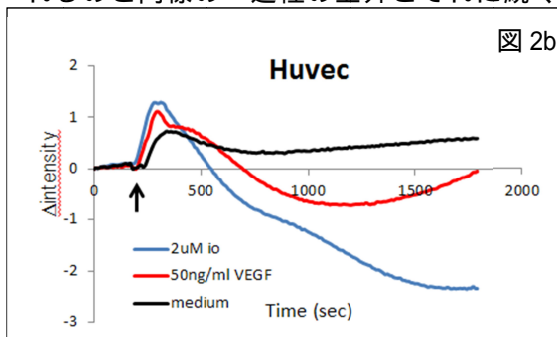


図 2b

長い低下が観察された(図2)。以上より、ISO-HAS、HAMON のいずれも細胞株も細胞表面に VEGF 受容体を発現し、生きたまま SPR センサーチップ上でイオノマイシン刺激すると VEGF 刺激した場合に類似した SPR シグナルを生じるが、VEGF 自体では反応を示さず、正常血管内皮細胞と区別し得ることが示唆された。

(3)2次元 SPR バイオセンサーの小型化

2次元 SPR を臨床検体の評価に用いることを目指して小型化、多チャンネル化するため、高屈折率プリズムを用いてセンサー部分の面積を拡大し、さらに金膜上に直径 2mmx9 皿を生じる様に撥水加工を施し、9つの検体を同時測定できるデバイスを作成した(図3)。

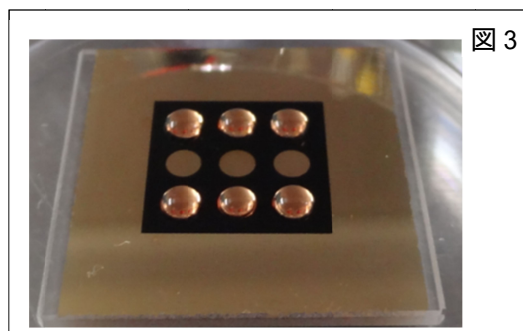


図 3

今後、末梢血より効率的に血管内皮系細胞を分離する方法と、SPR センサー上の細胞を光学顕微鏡で同時観察する装置を開発し、さらに実用化に向けた研究を継続することが必要である。

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 17 件)

1. Nakamura M, Yagami A, Hara K, Sano A, Kobayashi T, Aihara M, Hide M, Chinuki Y, Morita E, Teshima R, Matsunaga K, A New Reliable Method for Detecting Specific IgE Antibodies in the Patients with Immediate Type Wheat Allergy due to Hydrolyzed Wheat Protein: Correlation of Its Titer and Clinical Severity, Allergol Int, 査読有, 63, 2014, pp243-249, doi:

10.2332/allergolint.13-0A-0618.

2. 小原隆之, 柳瀬雄輝, 隈崎修孝, 秀道広, SPR イメージングによるアレルギー診断法, Bio Clinica, 査読有, 29, 2014, pp68-73.

3. Choi H, Tanaka M, Hiragun T, Hide M, Sugimoto K, Non-tumor mast cells cultured in vitro on a honeycomb-like structured film proliferate with multinucleated formation, Nanomedicine, 査読有, 10, 2014, pp313-319, DOI: 10.1016/j.nano.2013.08.011.

4. Hide M, Hiragun M, Hiragun T, Diagnostic tests for urticarial, Immunol Allergy Clin North Am, 査読有, 34, 2013, pp53-72, DOI: 10.1016/j.iac.2013.09.009.

5. Matsuo H, Yokooji T, Morita H, Ooi M, Urata K, Ishii K, Takahagi S, Yanase Y, Hiragun T, Mihara S, Hide M, Aspirin augments IgE-mediated histamine release from human peripheral basophils via Syk kinase activation, Allergol Int, 査読有, 62, 2013, pp503-511, DOI: 10.2332/allergolint.13-0A-0536.

6. Hiragun M, Ishii K, Hiragun T, Shindo H, Mihara S, Matsuo H, Hide M, The sensitivity and clinical course of patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized to hydrolyzed wheat protein in facial soap, Allergol Int, 査読有, 62, 2013, pp351-358, DOI: 10.2332/allergolint.13-0A-0553.

7. Yoshimura N, Arihiro K, Takahagi S, Hide M, An autopsy case of metastatic extramammary Paget's disease treated with multimodality treatment including anti-HER2 therapy: What is the clinical and pathological significance of trastuzumab to the patient?, Modern Chemotherapy, 査読有, 2, 2013, pp66-68, DOI: 10.4236/mc.2013.24008.

8. Yanase Y, Hiragun T, Yanase T, Kawaguchi T, Ishii K, Hide M, Application of SPR Imaging Sensor for Detection of Individual Living Cell Reactions and Clinical Diagnosis of Type I Allergy, Allergol Int, 査読有, 2013 Feb 25. [Epub ahead of print] doi: 10.2332/allergolint.12-RA-0505

9. 菅 崇暢, 柳瀬哲至, 河合幹雄, 秀道広, 間所直樹, 野田英貴, 岩崎泰政, 広島大学皮膚科における血管肉腫の治療経験, 西日本皮膚科, 査読無, 75, 2013, pp100-101.

10. 堀 郁子, 坂本 旭, 森本謙一, 米原修治, 松阪由紀, 河合幹雄, 秀道広, 壺井ひとみ, 好酸球性蜂窩織炎を合併した皮膚悪性リンパ腫の1例, 西日本皮膚科, 査読無, 75, 2013, pp100.

11. Bhattacharyya J, Mihara K, Morimoto K, Takihara Y, Hide M, Elevated interleukin-18 secretion from monoclonal IgM+ B cells in a patient with Schnitzler syndrome, J Am Acad Dermatol, 査読有, 67, 2012, pp e118-20, DOI: 10.1016/j.jaad.2011.10.002.

12. 菅 崇暢, 中村千春, 柳瀬哲至, 河合幹雄, 秀道広, Cutaneous myoepithelial carcinoma の1例, 日本形成外科学会誌, 査読無, 32, 2012, pp504-505.

13. 高坂卓馬, 原 武, 間所直樹, 秀道広, 大原直樹, 顆粒球コロニー刺激因子産生有棘細胞癌の1例, 皮膚科の臨床, 査読有, 54, 2012, pp1017-1020.

14. 高坂卓馬, 信藤 肇, 秀道広, 原 武, 行徳英一, 西阪 隆, 下腹部に生じた皮下腫瘍, 日本皮膚病理組織学会誌, 査読無, 27, 2012, pp63.

15. 戸田さゆり, 田中麻衣子, 河合幹雄, 秀道広, 唐川修平, 青木恵美, 宮本義洋, プロプラノロールが有効であった巨大な乳児血管腫の1例, 西日本皮膚科, 査読有, 74, 2012, pp394-398.

16. 田中麻衣子, 柳瀬哲至, 河合幹雄, 信藤肇, 秀道広, 青木恵美, 宮本義洋, 唐川修平, プロプラノロール内服療法が奏効した顔面の巨大なイチゴ状血管腫の1例, 西日本皮膚科, 査読無, 74, 2012, pp363.

17. 柳瀬哲至, 菅 崇暢, 河合幹雄, 秀道広, 悪性黒色腫のダーモスコピー所見と tumor thickness との関連の検討, 日本皮膚科学会雑誌, 査読無, 122, 2012, pp1189.

[学会発表](計13件)

1. Michihiro HIDE, Surface plasmon resonance for cell-based diagnosis, 5th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 12 Oct 2013, Higashihiroshima-shi, Hiroshima.

2. Michihiro HIDE, Application of SPR imaging for detection of individual living cell reaction and clinical diagnosis, International Workshop on Nanodevice and Bio Systems Technologies 2013, 3 Apr

2013, Higashihiroshima-shi, Hiroshima.

3. Yuhki Yanase, Takaaki Hiragun, Tomoko Kawaguchi, Kaori Ishii, Michihiro Hide, Development of SPR imaging sensor for detection of individual living cell reactions and application for clinical diagnosis of type I allergy, 3rd International conference on Bio-sensing technology, 13-15 May 2013, Sitges Spain.

4. Yuhki Yanase, Tomoko Kawaguchi, Kaori Ishii, Michihiro Hide, Visualization of individual cell activation by means of SPR imaging, 7th International conference on molecularelectronics and bioelectronics, 18 Mar 2013, Fukuoka-shi, Fukuoka.

5. 柳瀬雄輝, 川口智子, 坂本憲児, 秀道広, 微量血液を利用したアレルギー診断のためのマルチウェルSPRIの開発, 第60回応用物理学会春季学術講演会, 2013.3.29, 厚木市, 神奈川県.

6. 柳瀬雄輝, 石井 香, 川口智子, 隅崎修孝, 小原隆之, 平郡隆明, 秀道広, SPRによる好塩基球応答解析を利用したI型アレルギー診断法の開発, 第26回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2013. 8.2-8, 東京.

7. 柳瀬雄輝, 石井 香, 川口智子, 隅崎修孝, 小原隆之, 平郡隆明, 秀道広, マルチウェルSPRイメージングによる即時型アレルギー診断法の開発, 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2013.11.28-30, 東京.

8. Yuhki Yanase, Tomoko Kawaguchi, Kaori Ishii, Kenji Sakamoto, Ryo Miyake, Michihiro Hide, Application of SPR imaging for detection of individual cell reaction and clinical diagnosis of allergy, Biosensors 2012, 18 May 2012, Cancun Mexico.

9. Yuhki Yanase, Tomoko Kawaguchi, Kaori Ishii, Kenji Sakamoto, Ryo Miyake, Michihiro Hide, Application of SPR imaging for detection of individual cell activation, ISMM2012, 12 Jun 2012, Hsinchu Taiwan.

10. Yuhki Yanase, Takaaki Hiragun, Tomoko Kawaguchi, Kaori Ishii, Michihiro Hide, Visualization of human basophil activation by means of surface plasmon resonance imaging, Label free technologies 2012, 1 Nov 2012, Amsterdam The Netherlands.

11. 菅 崇暢, 柳瀬哲至, 河合幹雄, 秀道広, 80歳以上の患者における血管肉腫の治療経験, 第28回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2012.6.30, 札幌市, 北海道.

12. 柳瀬哲至, 菅 崇暢, 河合幹雄, 秀道広, 上口唇から口腔粘膜まで広範囲に散在する悪性黒色腫に対しferon療法が奏効した1例, 第28回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2012.6.30, 札幌市, 北海道.

13. 柳瀬哲至, 菅 崇暢, 河合幹雄, 秀道広, 当科における高齢者の皮膚がんに対する治療の現状, 第64回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 2012.10.28, 広島市, 広島県.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: マルチウェル解析方法および刺激用マルチウェルチャンバチップ

発明者: 秀道広, 柳瀬雄輝, 石井 香, 川口智子

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-159020

出願年月日: 平成 25 年 7 月 31 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

秀道広(HIDE, Michihiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 50284188

(2)連携研究者

柳瀬 雄輝(YANASE, Yuhki)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 40452586