

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 5 日現在

機関番号：32669

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26660243

研究課題名(和文) 犬における血中循環腫瘍細胞検出系の構築と転移予測指標としての有用性の検討

研究課題名(英文) Establishment of detection system for canine circulating tumor cell

研究代表者

盆子原 誠 (Bonkobara, Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50343611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血中循環腫瘍細胞(CTC)の計数は悪性腫瘍の転移を予測する上で有益と考えられる。本研究では、上皮系組織関連タンパク質のmRNAをマーカーとして、モデル癌細胞をスパイクした血液からの定量的なTCT検出系の確立を試みた。解析した35種類の分子中、CK19、AGR2、IRX3、UPKB1、TACC2はモデル癌細胞を加えた末梢血のみから検出された。CK19およびTACC2については1細胞/1mlの精度で検出できた。CK19およびTACC2はCTCマーカーとして有望と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Detection and counting of the circulating tumor cells (CTC) could be one of the potential approaches to predict early metastasis of cancer cells. In the present study, we therefore attempted to establish FACS-based CTC counting system using canine peripheral blood spiked with various number of model cancer cells (MDCK cells); however, the counting accuracy was not sufficient for evaluation of the number of CTC due to white blood contaminations. We then examined quantification of CTC using quantitative PCR method. Among epithelial cell-associated 35 molecules examined, CK19, AGR2, IRX3, UPKB1, and TACC2 were detected by this method only in blood spiked with MDCK cells. Particularly, CK19 and TACC2 were detected at the minimum concentration of 1 MDCK cell/1 ml blood. From these findings, CK19 and TACC2 could be potential markers for detecting CTC by quantitative PCR method.

研究分野：獣医臨床病理学

キーワード：血中循環腫瘍細胞 犬

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に罹患した犬が死の転帰を取る場合、その原因の多くは腫瘍の転移による。従って、原発の悪性腫瘍が転移する可能性の高さを定量的に評価することができれば、正確な予後を予測できるばかりでなく、術後化学療法を必要とする症例を選別して実施することが可能となる。

悪性腫瘍を罹患した状態では、原発巣から剥離したわずかな腫瘍細胞が血中を循環していることがあり、このような腫瘍細胞は血中循環腫瘍細胞 (CTC) と呼ばれている。近年、マウス移植癌モデルや人の臨床例において、この CTC が組織に定着し転移病巣を形成することが明らかとなり、CTC の数的な違いが悪性腫瘍の全身への波及程度と密接に関連すると考えられている。したがって、CTC を高精度に検出し計数することは、今後おこる転移の予測や術後化学療法を実施するか否かの判断材料として、臨床的にきわめて有益である。

2. 研究の目的

本研究では、まず FACS 法を用いた直接的な CTC の計数法ならびに定量的 PCR 法による CTC の定量法を構築することを目的とした。次いで、上皮腫瘍モデル細胞を用いて構築した CTC 計数法あるいは定量法の計測精度を評価し、CTC 計測の臨床的有用性を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

a. FACS 法による TCT 計数法の確立

FACS 法による TCT 計数にはディスポーザブルマイクロ流路チップのフローサイトメーターを用いた。上皮腫瘍モデル細胞として MDCK 細胞を使用し、この細胞をスパイクした血液(50, 25, 10, 5, 1, 0 cell/mL)を用いて様々な条件で anti-CD45 による白血球の除去によるネガティブセレクションを行い、マイクロ流路チップフローサイトメーターによる MDCK 細胞の検出精度を検討した。

b. 定量的 PCR 法による CTC 定量法の構築

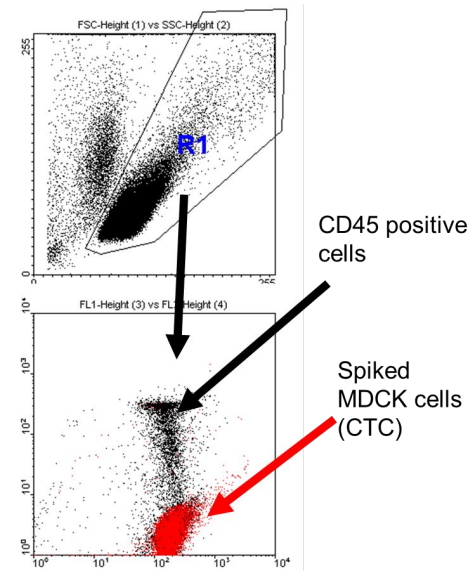
まず、上皮系組織に特異的に発現している上皮マーカー mRNA および腫瘍関連タンパク質の mRNA から、CTC 定量に用いる候補として 35 種類の分子を選定した。これらの分子群に特異的なプライマーを設計し、定量的 PCR 法による検出系を構築した。次いで、上皮腫瘍モデル細胞として MDCK 細胞を使用し、この細胞を様々な条件でスパイクした血液(50, 25, 10, 5, 1, 0 cell/mL)を用いてマーカー遺伝子の定量を行った。

4. 研究成果

FACS 法による正確な CTC の計数には、血液サンプルから効率的に白血球を除去するシステムを構築する必要がある。そこで MDCK 細胞をスパイクした血液を用いて

様々な条件で anti-CD45 によるネガティブセレクション (抗体反応時間・抗体濃度) ならびにディスポーザブルフローセルの改良を行ったが、微量な白血球の残存が見られた。この白血球の残存は超微量な CTC 計数に 30 ~ 40% 以上の誤差を生じるものであり、FACS 法は CTC の計数には理想ではないことが明らかとなった (図 1)。これは犬の白血球と利用可能な抗犬 anti-CD45 の親和性の低さ、あるいは犬白血球の基材への接着性の強さによるものと考えられた。

図 1



次いで、上皮系組織に特異的に発現しているタンパク質および腫瘍関連タンパク質の mRNA を末梢血から定量的に検出することで、間接的に CTC の存在を明らかにする方法を試みた。

その結果、解析した 35 種類の分子群中、CK19, AGR2, IRX3, UPKB1, TACC2 の mRNA は健常犬の末梢血から検出されず、モデル癌細胞を加えた末梢血から検出された。とくに CK19 および TACC2 については 1 細胞/1ml の精度で検出できることが示された (表 1)。TACC2 (Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2) は多くの上皮性腫瘍において効率に発現しており、とくに centrosomes に局在している。また、乳癌などの悪性上皮性細胞において細胞周期の制御に重要な分子である。さらに、CK19 (Cytokeratin 19) は正常な重層扁平上皮基底膜に局限して発現するが、異形成上皮や乳腺癌など癌化した上皮細胞にも発現することが知られている。これらのことから、TACC2 および CK19 はそれぞれ上皮性腫瘍と密接に関連した分子であり、上皮性悪性腫瘍の CTC 検出マーカーとして有望であると考えられた。

表 1

Gene	Endogeneous expression in MDCK	Endogenous expression in canine blood	Spiked MDCK (cell/mL)					
			0	1	5	10	25	50
CK5	+	+	-	-	-	-	33	33
CK18	+	+	-	-	-	-	-	-
CK19	+	-	-	35	35	35	32	33
EGFR	+	+	-	-	-	-	-	-
CLDN7	+	+	-	-	-	-	-	-
ERBB2	+	-	-	-	-	-	-	-
ELF3	+	±	-	-	-	-	-	35
Maspin	+	+	-	-	-	-	-	-
ATP8B1	+	-	-	-	-	-	-	-
SLC1A1	-	-	-	-	-	-	-	-
CRYAB	+	+	-	-	-	-	-	-
AGR2	+	-	-	-	-	-	-	35
IRX3	+	-	-	-	-	-	-	32
cF3	+	+	-	-	-	-	-	-
EPCAM	+	+	-	-	-	-	-	-
EPHB4	+	+	-	-	-	-	-	-
CD44	+	+	-	-	-	-	-	-
c-Met	+	+	-	-	-	-	-	-
GABA A α	+	+	-	-	-	-	-	-
MUC-1	+	+	-	-	-	-	-	-
MMP9	+	+	-	-	-	-	-	-
PLAUR	+	+	-	-	-	-	-	-
CLU	+	+	-	-	-	-	-	-
PERP	+	+	-	-	-	-	-	-
OCLN	+	±	-	-	-	-	-	-
TJP1	+	+	-	-	-	-	-	-
UPKB1	+	-	-	-	-	-	35	34
CCND1	+	+	-	-	-	-	-	-
TACC2	+	-	-	34	33	33	31	30
BRCA1	+	+	-	-	-	-	-	-
BRCA2	+	+	-	-	-	-	-	-
RAD51	+	+	-	-	-	-	-	-
hCEA1	-	-	-	-	-	-	-	-
hCEA2	-	-	-	-	-	-	-	-
hCEA3	-	-	-	-	-	-	-	-

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 2 件)

Ochiai K, Ishiguro-Oonuma T, Yoshikawa Y, Udagawa C, Kato Y, Watanabe M, **Bonkobara M**, Morimatsu M, Omi T. Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51 Biomed Res. 2015, 36(2):155-158.

Tomura S, Uchida M, Yonezawa T, Kobayashi M, **Bonkobara M**, Arai S, Miyazaki T, Tamahara S, Matsuki N. Molecular cloning and gene expression of canine apoptosis inhibitor of macrophage.

J Vet Med Sci. 2014 Dec;76(12):1641-1645.

〔学会発表〕(計 2 件)

盆子原誠

獣医療における分子標的薬の展望
獣医内科アカデミー(招待講演)2015.

守口昌吾、佐野文郁、林麻央、小林正人、山下傑夫、小野憲一郎、田村恭一、**盆子原誠**、鷺巢月美
犬肥満細胞腫のイマチニブ耐性化に関する臨床的および細胞生物学的解析
獣医臨床病理学会 2013.

盆子原誠

イマチニブの登場と肥満細胞腫の治療
獣医内科アカデミー(招待講演)2014.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.nvlu.ac.jp/research/005.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
盆子原誠(MAKOTO BONKOBARA)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：50343611

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：