

平成 30 年 4 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15718

研究課題名(和文) シングルセル解析による次世代頭頸部癌個別化治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment tailor-made therapy of head and neck cancer by single cell analysis

研究代表者

近藤 悟 (Satoru, Kondo)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：70436822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌組織は非常に不均一な癌細胞集合体で、癌のいわゆる悪性度を規定する細胞はその一部である。しかしPET/miRNA/マイクロアレイなどによる評価は癌組織全体を対象とするため、悪性度を反映する集団の生物学的特性はマスクされてしまう。正確な悪性度評価には癌組織全体でなく悪性度の高い細胞を選別して解析する必要がある。末梢循環癌細胞(Circulating Tumor cell; CTC)は原発巣癌細胞集団の中でも浸潤や転移能力が高く、癌の悪性度・生物学的特性を最も反映する集団と考えられる。本研究では、頭頸部癌のCTCに焦点を当て研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Cancer tissues have various heterogeneity and very few cells indicate its phenotypes of cancer. This variety leads difficulty of assessment of cancer phenotypes by ordinal methods such as PET, miRNA and microarray. Exact assessment of cancer phenotypes is necessary to determine groups which has highly malignant cancer cells. From this aspect, we focused circulating tumor cell (CTC). Because CTC has capacity of high invasion and metastasis. So CTC is considered to reflect cancer grades and phenotypes. In this study, we focused CTC and analyzed detection of CTC.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：シングルセル 血中循環腫瘍細胞 EpCAM

1. 研究開始当初の背景

我々の生体はシングルセルから分化増殖した 60 兆の異なった細胞からなる。同一の構成成分からなると思われる正常上皮細胞でも、隣接する細胞同士は時に競合関係にあり排除される。1つのクローンから発生する腫瘍細胞でも、そのヘテロ不均一性 (heterogeneity) が存在する。「個別化」は近年の癌治療のキーワードであり、純粋に個々の癌の特性を評価する方法の開発は急務である。末梢循環癌細胞 (Circulating Tumor cell; CTC) は、少なくとも、癌組織から逸脱して全身循環に乗る能力を持つ細胞であることから、浸潤や転移能力が高いと考えられる。これらの細胞についてエキソーム解析・ゲノムトランスクリプトーム解析ならびに 3次元培養下に抗がん剤ならびに分子標的薬感受性試験を行うことで、転移巣の形成能力、選択薬剤などの個別化治療が可能となる。従来の原発巣の組織を用いた抗がん剤感受性試験は、全く臨床的有効性を反映しなかった。それは真に造腫瘍能力を持つ細胞や幹細胞に近縁の細胞など、転移再発を促進する可能性の高い細胞に対しての効果ではなく、既に分化した癌細胞や間質を多く含むヘテロな細胞集団を対照としていたためである。本研究では、原発腫瘍の最も悪性度の高い細胞集団としてこの CTC に焦点を当てる。そして、これらの細胞についてのシングルセル解析、そして、CTC から培養して腫瘍塊となった細胞集団におけるヘテロ不均一性の構築過程にアプローチすることで、頭頸部癌の、特に転移に対する個別化治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究で挑戦する課題は、次世代生物学の扉を開く 2 種類の 1 細胞解析法「1 細胞ソーティング: CTC の検出分離」と「1 細胞ゲノム・トランスクリプトーム解析」の臨床応用をめざしたトランスレーショナルリサーチである。具体的には、頭頸部癌における CTC の検出分離について最適化すること、そして、分離された CTC 細胞ごとのシングルセル遺伝子発現解析法を最適化すること、である。現在非侵襲検査として各施設で研究が進んでいる liquid biopsy による miRNA やタンパクプロファイル解析に対して「癌組織由来の核酸やタンパクよりも生きた癌細胞である CTCの方が癌の個別的正確を鋭敏に反映する」を検証する。最初に申請者等が先行して手がけている上咽頭癌に対する CTC と臨床的経過、特に化学放射線の感受性と遠隔転移の出現に関する前向きな基礎データを構築する。次に頭頸部癌全般を対象を拡大し、各癌腫毎の CTC 解析の有効性を評価する。遠隔転移発生に関する追跡調査を必要とするため、本申請研究成果の最終評価は調査終了から約 5 年

後となる。しかし、初診時の進行病期、特に将来的な遠隔転移出現と密に関連するリンパ節転移の程度や奏効率は本申請の助成終了時に報告できる。

3. 研究の方法

1) 末梢循環癌細胞 (CTC) の回収とシングルセルにおける遺伝子発現解析法の最適化
最初に治療前のがん患者の血中 CTC の最適化を行う。上咽頭癌は頭頸部癌の中で最も高転移能を有する癌である。GFP 発現増殖型アデノウイルスを用いたテロメスキャンによる治療前の血液サンプルからの上咽頭癌 CTC 回収システムを用いる。具体的な手法としては、1) 末梢血 5ml を溶血処理後、テロメラーゼ活性化細胞でのみ増殖能をもつ GFP 発現制限増殖型アデノウイルス (OBP-1101) を感染させる。2) 捕捉した CTC を DAPI (生細胞), 抗サイトケラチン抗体 (上皮細胞), 抗 CD45 抗体 (リンパ球) の各マーカーで染色し、DAPI (+), 抗サイトケラチン (+), 抗 CD45 (-) の細胞を蛍光顕微鏡下にマイクロピペットを用いて回収する。3) 潜在的疑陽性細胞を排除するため、さらに FITC 蛍光反応を示すものを選別し除外する。4) 単離した細胞に対して、3次元初代がん細胞培養キット、96 ウェル (Scivax Life sciences 社製) 下に 3次元培養を行う。がん細胞を含むスフェロイド (細胞集合塊) を形成された時点で、次にシスプラチン、ドセタキセル、5FU に加え、抗 EGFR 抗体であるセツキシマブ、抗 PD-1 抗体を添加する。

2) ゲノムライブラリ調整とシーケンス解析について

癌細胞の 1 細胞ゲノム解析を行い、各細胞が有する変異を比較することで、どのような変異を有する細胞が、がん細胞集団へと進化していったかを解析することが可能である。上咽頭癌原発巣と、前述の方法でソーティングされた CTC におけるゲノム解析から転移に関連する遺伝子 (宿主側および EBV 側) を解析する。1) 現在最も用いられている MDA (multiple displacement amplification) 法により伸長させる方法でゲノムを増幅する。増幅された cDNA を次世代シーケンサーを用い、ゲノムトランスクリプトームについて解析を行う。2) 次世代シーケンサー用のサンプル調整を行い、1 細胞全ゲノムシーケンス解析を行う。3) シーケンス解析は、北海道システムサイエンス社に依頼する。そして全ゲノム増幅ライブラリからコピー数変異、エクソームライブラリーから塩基変異と遺伝子挿入と欠失を評価する。4) 1 細胞のもつ mRNA は、0.1pg 程度であるため、Rolling circle amplification (RCA) を用いて、cDNA 合成を行う。Ahasan らが報告したこの手法により 1 つの分子から何度でも cDNA 合成が起こるため、最適化が

必要な本研究のような反復的実験には非常に有用である (Ahasan and Kondo et al, BBRC 2015)。上記 RCA によって増幅された cDNA を次世代シーケンサーを用い、ゲノムトランスクリプトームについて解析を行う。

これらの CTC の解析は、1)初診時、2)化学療法1コース終了時、3)治療終了時の3点で解析を行い、化学療法感受性と遠隔転移の出現に関する前向きな基礎データを構築する。また同時に初診時の進行病期、リンパ節転移の程度や奏効率との相関性についても検討する。

さらには、頭頸部癌全体を対象に、CTC の捕捉と臨床病期や腫瘍体積、そして、リンパ節ならびに遠隔転移との関連について明らかにする。

4 . 研究成果

本研究開始後、患者血中より CTC を検出するシステム構築を目指した。当初予定していたテロメスキャンでは、臨床検体を用いても培養癌細胞株を用いても安定して CTC を検出できないことが判明した。そこで富山工業センターとの共同研究で、EpCAM 抗体をマイクロチップに固定し、CTC を検出する方法を用いて検出を行った。上咽頭癌 C666-1 および舌癌 SAS, HSC3 などのがん細胞株の検出は問題なく行うことができた。5ml 程度の血液にこれらの癌細胞株を混ぜて、同システムを検討したところ、80%以上の回収率で CTC を検出することに成功した。しかしながら、実際のがん患者の血液のみを検討すると、安定して CTC を検出することは難しいことが判明した。特にがん細胞株は検出抗体に使用した EpCAM の発現が高いのに比して、実際のがん細胞は細胞株ほど EpCAM の発現が高くないことが予備実験によって判明した。したがって、抗 EpCAM 抗体単独での CTC 検出は限界があり、したがって、抗 EpCAM 抗体単独での CTC 検出は限界があり、EGFR などの違う検出抗体を用いたものの、検出は難しかった。現在、細胞サイズによって CTC を検出するシステム Clear cell FX システムを用いて、CTC を検出するシステムを開発中である。このシステムは細胞表面マーカーによらず、細胞のサイズによって、白血球などの血液細胞と CTC を選択するシステムであり、2時間程度の解析で CTC を検出することを可能としたシステムである。

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 6件)

1. Seishima N,Kondo S, Wakae K, Wakisaka N, Kobayashi E, Kano M, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Endo K, Imoto T, Ishikawa K, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Koura M,

Kitamura K, Muramatsu M, Yoshizaki T. Expression and subcellular localisation of AID and APOBEC3 in adenoid and palatine tonsils. Sci Rep 8:918, 2018.査読有

2. Yoshizaki T, Kondo S, Endo K, Nakanishi Y, Aga M, Kobayashi E, Hirai N, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Ishikawa K, Wakisaka N. Modulation of the tumor microenvironment by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Sci 109:272-278, 2018.査読有

3. Nakanishi Y, Wakisaka N, Kondo S, Endo K, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Ishikawa K, Yoshizaki T. Progression of understanding for the role of Epstein-Barr virus and management of nasopharyngeal carcinoma. Cancer Metastasis Rev. 36:435-447, 2017.査読有

4. Kondo S, Endo K, Wakisaka N, Aga M, Kano M, Seishima N, Imoto T, Kobayashi E, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Muroso S, Pagano JS, Yoshizaki T. Expression of interferon regulatory factor 7 correlates with the expression of Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 and cervical lymph node metastasis in nasopharyngeal cancer. Pathol Int 67:461-466, 2017.査読有

5. Yoshida H, Muroso S, Ueno T, Nakanishi Y, Tsuji A, Hatano M, Endo K, Kondo S, Sugimoto H, Wakisaka N, Yoshizaki T. Usefulness of human papillomavirus detection in oral rinse as a biomarker of oropharyngeal cancer. Acta Otolaryngol. 137:773-777, 2017.査読有

6. Seishima N, Kondo S, Wakisaka N, Kobayashi E, Imoto T, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Endo K, Muroso S, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Yoshizaki T. EBV infection is prevalent in the adenoid and palatine tonsils in adults. J Med Virol 89:1088-1095, 2017.査読有

7. Hirai N, Wakisaka N, Kondo S, Aga M, Moriyama-Kita M, Ueno T, Nakanishi Y, Endo K, Sugimoto H, Muroso S, Sato H, Yoshizaki T. Potential Interest in Circulating miR-BART17-5p As a Post-Treatment Biomarker for Prediction of Recurrence in Epstein-Barr Virus-Related Nasopharyngeal Carcinoma. PLoS One 2016 11:e0163609, 2016.査読有

〔学会発表〕(計 1件)

1. 近藤 悟、吉崎 智一、上咽頭癌と免疫療法、第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2017 年旭川グランドホテル(北海道)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

近藤 悟 (KONDO SATORU)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：70436822

(2)研究分担者

吉崎 智一 (YOSHIZAKI TOMOKAZU)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：70262582