

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09767

研究課題名(和文) 血中循環口腔癌細胞の分離とその細胞特性解析によるリキッドバイオプシーの確立研究

研究課題名(英文) Establishment study of liquid biopsy by isolation of circulating oral cancer cells in blood and analysis of their cell characteristics

研究代表者

小泉 浩一 (KOIZUMI, KOICHI)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：30335682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：「celsee prep 100」を用いて当科を受診した口腔癌患者のCTCの検出・解析を行った。この方法で健常人ではCTCは検出されないことを確認した。口腔癌患者におけるCTC数と腫瘍の大きさ(T分類)、病期分類(Stage分類)、転移の有無(N分類)の3項目で相関性の有無を検討したが、予後良好な患者で検出されたり、全身転移し予後不良患者で検出されなかったりと相関性が認められなかった。またCTCが検出された口腔癌患者において、治療を通してCTC数を分析し治療効果判定を検討したが、その相関性も見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液循環腫瘍細胞(CTC)の検出は、乳癌、前立腺癌、大腸癌などの転移性症例には有用性が示されており、口腔癌においても新たな腫瘍バイオマーカーとなりうる。口腔癌患者におけるCTCの検出方法を確立させれば、口腔癌において臨床病態及び無増悪生存率(PFS)や全生存率(OS)などの予後予測が行えるようになり、また治療における効果判定にも有用と考える。

研究成果の概要(英文)：I detected and analyzed CTC of oral cancer patients who visited our department using "celsee prep 100" system. By this method, it was confirmed that CTC was not detected in healthy person. We examined the presence or absence of a correlation between the number of CTCs in oral cancer patients, tumor size (T classification), stage classification (Stage classification), and presence or absence of metastasis (N classification). It was detected in patients with a good prognosis, or it was not detected in patients with a poor prognosis due to systemic metastasis, and no correlation was observed. In addition, in oral cancer patients in which CTC was detected, the number of CTCs was analyzed through treatment to examine the therapeutic effect, but no correlation was found.

研究分野：口腔外科

キーワード：CTC リキッドバイオプシー 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

固形癌の特徴は周囲組織への著しい浸潤性増殖と遠隔臓器への転移巣の形成である。腫瘍細胞塊から血管内へ浸潤する癌細胞の大半は自己免疫系により死滅するが、その内ごく少数が免疫系の攻撃をすり抜け、血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell : CTC) として血液内を循環し、転移巣を形成すると考えられている。現在では、血液中の CTC は、乳癌、前立腺癌、大腸癌などの転移性症例において治療効果の判定や予後予測因子として有用性が認められている。

これまで固形癌の病態の経過は、①診察と画像診断による腫瘍の大きさの評価②血清腫瘍マーカー測定の主として2つで診断されている。しかし、CT 検査による画像診断では腫瘍の大きさを測定することは可能なものの、その腫瘍の増殖活性がどうかという病態を知ることは出来ない。さらに腫瘍の大きさの変化を捉えているため、検査は数ヶ月間隔で実施されることが多く、そのため治療効果の判定を随時行うことが難しい。一方、血清腫瘍マーカーは腫瘍の大きさとの関連は乏しく、炎症等により癌の病態とは無関係に上昇することがある。口腔癌においては血清腫瘍マーカーとして SCC を測定するが、肺癌や子宮癌では高い陽性率を示すものの、口腔癌においては信用性に乏しい。

そこで今回我々は、口腔癌患者において新たな腫瘍バイオマーカーとなりうる CTC の検出、さらにその細胞特性解析によるリキッドバイオプシーを確立し、臨床病態及び無増悪生存率 (PFS) や全生存率 (OS) などの予後予測システムの開発を行う。

2. 研究の目的

本研究では、先行実験に引き続き当科を受診した口腔癌患者において CTC の検出・解析を行い、臨床病態との相関性、治療効果の判定基準及び無増悪生存率 (PFS) や全生存率 (OS) などの予後予測システムの開発を行う。さらに DNA micro array や全ゲノム解析などを用いた CTC のプロフィール解析を行い、CTC のリキッドバイオプシー確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 血中循環腫瘍細胞 (CTC) の検出および解析

健常人および当科を受診した口腔癌患者から血液を採血して、専用の CellSave 検体保存チューブに保存。研究室にて血液をセルサーチシステムの機器「celsee prep 100」(8.0µm 以上の径を持つ血中細胞を 56,000 個程度のマイクロウェルに個別にトラップし、免疫染色や細胞回収を行う事のできる装置：当研究室所持) に注入し検討。分離された上皮細胞に蛍光標識したサイトケラチンモノクローナル抗体を反応させると共に蛍光性の DNA 染色物質 DAPI で細胞の核を染色。混入した白血球を CTC と識別するために、同様に蛍光標識した CD45 抗体を反応させる。蛍光画像処理し、検出された細胞で DAPI で染色された核とサイトケラチン抗体で蛍光染色された細胞の形態と CD45 抗体には反応しないものを CTC であると同一。

(2) 臨床病態との相関性

健常人 CTC 数と口腔癌患者 CTC 数を①腫瘍の大きさ (T 分類) ②病期分類 (Stage 分類) ③転移の有無 (N 分類) の 3 項目で比較検討し相関性の有無について検討する。

(3) 治療効果の判定基準

口腔癌患者の CTC 数を①手術前後での CTC 数の変化②放射線化学療法前後での CTC 数の変化 (放射線療法単独の場合は治療前、2 週間後、4 週間後、6 週間後、8 週間後の 5 回 CTC 数測定。化学療法単独もしくは放射線化学療法の場合は治療前、1 クール終了後、2 クール終了後) にて比較し、治療効果の判定基準の検討をする。

(4) 口腔癌の予後予測

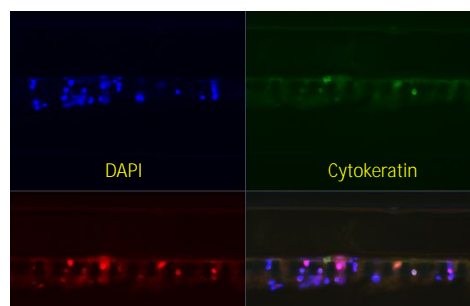
口腔癌患者の CTC 数を治療後経時的に測定し、視診や CT 検査等による臨床病態との相関性について比較し、無増悪生存率 (PFS) や全生存率 (OS) などの予後予測の検討を行う。

(5) DNA micro array や全ゲノム解析などを用いた CTC プロフィール解析

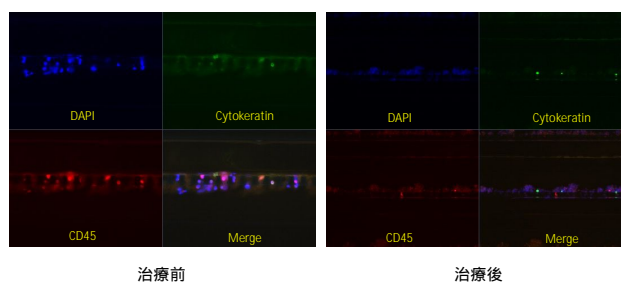
得られた CTC のプロフィール解析を行うため、CTC より直接 DNA を抽出し、illumina 社の次世代シーケンサー (NGS) HiSeq あるいは Miseq システムを用いて CTC に含まれる全ゲノム配列を検討し、固有の変異と細胞学的特徴を検討する。さらに CTC より total RNA を抽出し、mRNA に相補的な標識 RNA を合成する。これを DNA micro array 解析を行うことで CTC における遺伝子発現状態を網羅的に解析する。

4. 研究成果

「celsee prep 100」に血液 2ml を注入し、分離された上皮細胞に蛍光標識したサイトケラチンモノクローナル抗体を反応させると共に蛍光性の DNA 染色物質 DAPI で細胞の核を染色。さらに蛍光標識した CD45 抗体を反応させ蛍光画像処理し、検出された細胞で DAPI (+)、サイトケラチン (+)、CD45 (-) を CTC であると同一化した (右図)。



健常人では CTC は検出されないものの、④腫瘍の大きさ (T 分類) ⑤病期分類 (Stage 分類) ⑥転移の有無 (N 分類) の 3 項目で比較検討し相関性の有無を検討したが、予後良好な患者で検出されたり、全身転移し予後不良患者で検出されなかったケースも散見され相関性が見いだせなかった。また同一患者で複数回の測定を同時に行うも結果にばらつきがあった。さらに CTC が検出された口腔癌患者において、治療を通して CTC の個数を分析、治療効果判定を検討したところ、右図のように治療が奏功した症例で、治療前後で CTC 数が減少したものが認められたが、全体的にはその相関性は見いだせなかった。現在は CTC の検出方法を再検討している。



また得られた CTC より直接 DNA を抽出し、illumina 社の次世代シーケンサー (NGS) HiSeq あるいは Miseq システムを用いて CTC に含まれる全ゲノム配列を解析し、固有の変異と細胞学的特徴を検討中であるが、有意義な結果は得られていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI) (00169153)	東亜大学・その他の研究科・教授 (35503)	
研究分担者	吉岡 幸男 (YOSHIOKA YUKIO) (20335665)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	林堂 安貴 (HAYASHIDO YASUTAKA) (70243251)	広島大学・病院(歯)・講師 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関