

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591500

研究課題名（和文） 新規直接検出法による乳癌末梢血遊離癌細胞同定と遊離細胞の生物学的分析に関する研究

研究課題名（英文） Detection of circulating tumor cells in breast cancer utilizing new direct method and biological analysis

研究代表者

高橋 将人 (TAKAHASI MASATO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：50374343

研究成果の概要（和文）

原発巣より血中に遊離した乳癌細胞を同定する方法としては、過去に免疫染色や RT-PCR などいろいろなものが提唱されてきたが、癌細胞を間接的に同定するものである。今回我々は、「ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells) のシステム」を確立するための研究を開始した。

まず、ISET システムの感度を測定するために、乳癌細胞株 6 株を用いて、血液中に直接これらの細胞の数を測定して注入し、ISET システムでどの程度その細胞を捕らえられるかどうかを調べた。sensitivity test において、6 種の乳癌培養細胞において約 50% の回収率を得た。ISET filter 上の細胞に対して免疫染色を行ったところ、SK-BR-3 では ER(-)、PgR(-)、HER2(+)、MCF-7 では ER(+)、PgR(+)、HER2(-) を示した。これらの染色結果はいままでこれらの細胞の染色性について報告されてきたものと相違ない。このことから ISET system において細胞の抗原性は損なわれないことが示された。また ISET filter 上の T47-D 細胞 1 個を切り出して p53 exon6 特異的 primer を用いて PCR を実施しその PCR product をシーケンスにて読んだところ、T47-D 細胞が持つ Codon194 の CTT から TTT への point mutation が確認された。SK-BR-3 細胞は HER2 遺伝子の増幅が知られているが ISET filter 上のこの細胞に対して FISH 法を試みたところ確かに HER2 遺伝子の増幅が蛍光シグナルで確認でき、ISET system を実施した細胞では DNA が種々の検査に十分対応できる程度に保存されていることがわかった。

したがって、ISET システムでは、1ml 中に数個しか乳癌細胞がなくても直接検出することが可能で、さらに検出した細胞は、複数の方法で確実に乳癌細胞であることを証明できた。

次に乳癌患者 17 人から得られた血液と骨髄検体について ISET system にて癌細胞の検出を試みた。残念ながら今回検討した乳癌症例では HE 染色で明らかな腫瘍細胞を見つけることができなかった。検出感度を高める工夫が課題として残った。

研究成果の概要（英文）

Exact identification of circulation tumor cells (CTC) brings the choice of patients who should take heavy treatment. As a result, Survival will be improved. At first, we confirmed the detection of very small number of breast cancer cells in blood by the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) method. The next, we compared the sensitivity of ISET method with that of quantitative real-time RT-PCR assay for the evaluation of CK-19 mRNA expression. The sensitivity of ISET was not comparable with those obtained using RT-PCR. Immunohistochemistry of ER, PgR, HER2 on the filter of ISET showed same behavior like the original cell lines. The DNA extracted from ISET-positive filter

could detect the mutation of p53 using direct sequence method. HER-2 amplification could be measured by FISH analysis. Unfortunately none of 17 breast cancer samples from peripheral blood and bone marrow just before surgical operation, showed the presence of CTC cells on the filter of ISET method. Some devices for sensitivity improvement of ISET method should be required in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

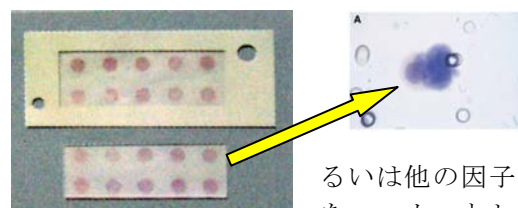
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌, ISET, 遺伝子解析, 遊離癌細胞

1. 研究開始当初の背景

再発の risk の高い患者に、化学療法や内分泌療法などの適切な補助療法を行い少しでも遠隔再発を防ぐことが、乳癌治療成績向上のために必要である。遠隔転移は、原発巣より癌細胞が血液や骨髄液中に遊離することより始まり、この癌細胞の一部がある時期を経て遠隔組織に着床、再増殖し転移巣が形成される。したがって、これら着床し再増殖可能な遊離した癌細胞を同定できれば、乳癌術後の遠隔再発の可能性を正確に同定可能となる。遊離細胞の同定には mRNA レベルでがん細胞を同定する real-time RT-PCR 法や、免疫組織染色で微小がん細胞のみを染色し同定するがん細胞を indirect に同定する方法などが試みられて、ある程度遠隔再発を予測可能となった。たとえば、Braun ら (N. Engl. J. Med , 2000) は、原発乳癌 552 症例の骨髄組織から、サイトケラチンを用いた免疫染色で 36% の症例で ITC を確認し、独立した強力な予後因子 (DFS, OS) であることを報告した。他にも同様な報告がされた (Geber J. Clin. Oncol , 2001)。これらの研究はすべて上皮のマーカであるサイトケラチンあ



るいは他の因子をマーカーとして遊離乳がん細胞を同定したものであるが、その検出感度や擬陽性の問題など解決出来ていない点も多かった。

2. 研究の目的

遊離癌細胞を同定する新規の方法として ISETsystem (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells) が開発された。この方法は、細胞の大きさをフィルターで分け、がん細胞のみを抽出しそれを direct に同定する。抽出した細胞をさらに分析し、その細胞が再増殖可能かどうかを確認可能である。本研究の目的は、real-time PCR 法で検出された indirect な微小癌転移と新規に導入する ISET system での direct な検出率とを比較し感度、特異度などを検討する。

3. 研究の方法

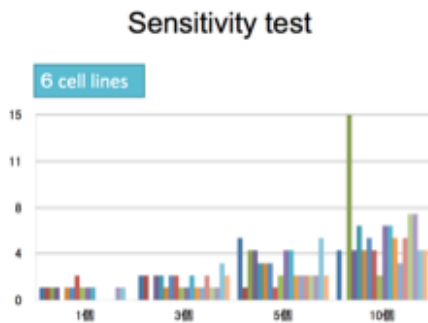
末梢血中に混入する遊離癌細胞を形態学的特徴から直接同定する。従来行われていた indirecto の方法に比較して、抗体やマーカーに検出率は依存しない。

- 1) 定量性の確認
- 2) indirect method との比較
- 3) 検出された細胞の性状分析
- 4) 臨床検体での検討

4. 研究成果

1) 定量性の確認

まず最初に抗体に依存せず細胞の大きさをフィルタで分け、癌細胞のみを抽出しそれをダイレクトに観察できる ISET system の導入を試みた。使用するフィルタには 8um の穴が開いており、そこに血液や骨髄などを通過させることで血球細胞よりも大きな癌細胞のみをより分けかつ直接その細胞を観察できる。6 種の乳癌細胞株を用いて sensitivity test を行いました。PBS 1ml を入れたチューブを 5 本用意し、そこにマイクロピペットでとった培養細胞を各々 0, 1, 3, 5, 10 個入れ、約 50% の細胞が検出可能であった。

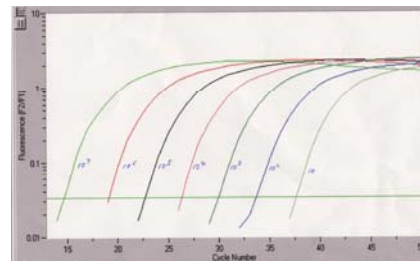


血液 5ml → ISET 機器 → ホルマリン細胞固定 → フィルターに転写

2) indirect method との比較

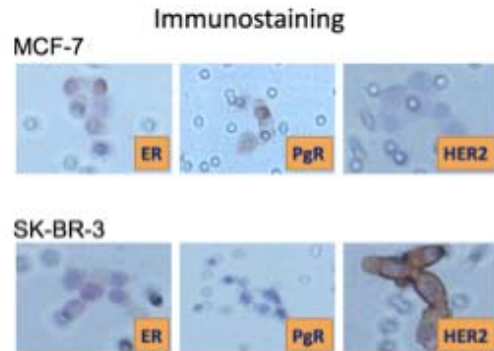
ISET で行った定量性の確認と同じ比率の細胞を注入した血液より totalRNA を抽出し、realtime PCR での定量性と比較する。もちいる分子マーカーは、サイトケラチン 19 と CEA である。右図 CK19 の例を示すが、検出感度

は indirect 法の方が高いことがわかった。



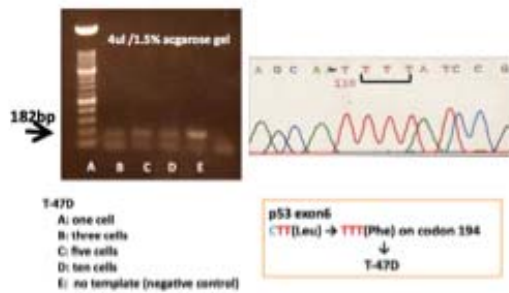
3) 検出された細胞の性状分析

ISET フィルタ上に検出された細胞が親株の性状を反映しているかどうかを確認した。ER、PgR、HER2 の免疫染色を行いました。染色性については病理組織診断での判断基準に従い ER、PgR では核が染まったものを陽性、HER2 では細胞質が染まったものを陽性と判断した。MCF-7 細胞では ER、PgR は核が染まっており、HER2 では陰性であった。同様に SK-BR-3 についても行ったが、ER、PgR が陰性で HER2 が陽性であった。検出された細胞は、親株の染色態度と一致した。



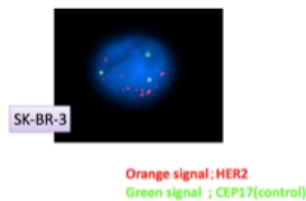
次に ISET で検出された細胞の遺伝子変異の検索が可能であるかを調べた。ISET filter 上の細胞 1, 3, 5, 10 個が乗ったフィルタを切り分け lysis solution にて DNA を抽出し p53 exon6 領域の PCR を行いました。使用した乳癌細胞は T-47D であり、codon 194 にて CTT が TTT に変化していることが判明されている。結果 細胞 1 個からでも PCR を行うことが可能であり、そのシーケンスも確認できたことから ISET システムによる DNA のダメージは少ないことが示唆された

DNA extraction and the confirmation



さらに正常人血液と乳癌細胞 SK-BR-3 を混ぜて作成した ISET フィルタに対して、FISH 法を用いた HER2 遺伝子の増幅の確認を行った。セントロメア 17 のコントロール緑シグナルに対して、HER2 のオレンジシグナル増幅しているのが確認できた。

Fluorescence in Situ Hybridization



4) 臨床検体での検討

基礎的な検討で ISET システムの有用性が示唆されたため、乳癌患者 17 人から得られた血液と骨髄検体について ISET system にて癌細胞の検出を試みた。血球に比べてサイズが大きいこと、N/C 比が高いこと、細胞塊となっていることなどを基準に各検体 10well のうち 2well の全視野について検索したが残念ながら今回検討した乳癌症例では HE 染色で明らかな腫瘍細胞を見つけることができなかった。CTC と思われる細胞の検出率が非常に低かった理由としては、今回検討した症例は悪性度が低く、血中や骨髄中に癌細胞が環流していなかったという可能性と、癌細胞は環流していた症例は存在していたのだが、ISET システムではそれを同定できなかった、という二つの可能性がある。Indirect より感度が低かったことを考えると②の理由である可能性が高い。

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)

- 1) Miyoshi Y, Kurosumi M, Kurebayashi J, Matsuura N, Takahashi M, et al Topoisomerase IIalpha-positive and BRCA1-negative phenotype: association with favorable response to epirubicin-based regimens for human breast cancers. *Cancer Lett.* 264: 44-53, 2008
- 2) Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, et al KIF1Bbeta functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 283(36) 24426-24434, 2008

[学会発表] (計 1 件)

小林希、上徳ひろみ、佐々木彩美、細田十種、高橋将人、高橋弘昌、藤堂省：新規 ISET system を用いた乳癌遠隔遊離細胞の検出 第 17 回日本乳癌学会学術総会 2009 年 7 月 3 日、4 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 将人 (TAKAHASHI MASATO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：5037434

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし