

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18563

研究課題名（和文）新規CTC測定系を用いた前立腺癌循環腫瘍細胞測定法の開発

研究課題名（英文）development of new assay for detecting circulating prostate cancer cell using new measuring system for circulating tumor cells

研究代表者

加藤 琢磨 (Kato, Takuma)

香川大学・医学部・学内講師

研究者番号：70625673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：酸素プラズマの表面処理にてプラスチック基板上の親水性を適度にコントロールする技術を開発しました。培養した前立腺癌細胞を疑似血液に添加して作成した溶液をこの基板の上に振りまくと、基板の表面に細胞が単層に付着することが確認されました。細胞が積み重なると腫瘍細胞が血液細胞中に紛れ込むため、腫瘍細胞の確認が困難になりますが、この技術により腫瘍細胞を容易に確認することが出来ます。今後は臨床研究を行い、本実験系の臨床応用が可能か検証を行っていく予定です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌の予後および治療効果判定のマーカーとして循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells; 以下CTC）は近年注目を集めています。その一方で、CTCの解析は高額な費用が必要で、解析に長時間を要するため、一般臨床では普及していません。本研究で開発された手法は手技が簡便で、高額な検査機器は使いません。このCTCの解析方法が通常の診察に用いることができるようになれば、手術や放射線治療、抗がん剤治療などの治療後の再発をより早い段階で発見できるようになります。

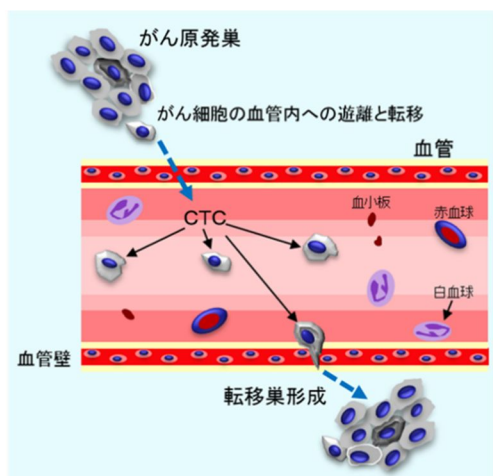
研究成果の概要（英文）：We have developed a technique for moderately controlling hydrophilicity on plastic substrates by surface treatment with oxygen plasma. When a solution of cultured prostate cancer cells added to pseudo-blood was sprinkled on the substrate, it was confirmed that the cells adhered to the surface of the substrate in a single layer. When cells are piled up, tumor cells are mixed in with blood cells, making it difficult to identify tumor cells, but with this technique, tumor cells can be easily identified. We plan to conduct clinical studies to verify the feasibility of the clinical application of this experimental system.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 循環腫瘍細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景



前立腺がんの腫瘍マーカーである PSA (prostate specific antigen) 上昇後に画像検査を行っても、すでに多発転移を呈してしまっている症例も少なくない。また、前立腺癌が進行し神経内分泌癌となれば PSA を分泌しなくなることもあり、PSA は万能な腫瘍マーカーではない。前立腺癌患者数は近年急速に増加しており、厚労省の 2017 年の短期予測では前立腺がん死亡数は年間 12,200 人 (第 6 位) と予測されている。癌死に直結する転移を制御するために、PSA よりも鋭敏に転移を察知する診断方法の開発は急務である。

前立腺癌の好発転移部位に骨、肺、肝臓があり、いずれも血行性に転移巣が形成される。血行性転移の際には CTC が血中に存在していることが予想され、CTC は転移巣の形成において PSA 上昇よりも早期に出現すると考えられる。

有用と考えられる CTC の検出であるが、FDA が認可している CTC 測定装置である CellSearch® system は高価で一般臨床の現場では普及していない。また、CTC の測定は保険診療外の検査であるほか、外部業者に委託せざるを得ず、一人の血液サンプルの解析に 10 万円以上の費用が必要となる。特殊な装置が必要で、費用が高価であることが CTC の測定を一般に普及する妨げとなっている。さらに CTC 検出の一次スクリーニングとして上皮細胞接着分子 (epithelial cell adhesion molecule : EpCAM) 陽性細胞の濃縮過程があり、がん細胞の多様性で EpCAM 発現の少ない CTC の検出は困難である。

このような状況であり、新たな CTC 測定系の開発はアンメットニーズとされていた。

2. 研究の目的

現在までに開発されている CTC 検出法を表に示す。

	CTC検出方法	問題点
①	血液サンプルからEpCAMの抗体をコーティングした磁性微粒子に結合する上皮細胞を分離抽出する方法 (Clin Cancer Res. 2004;10:8152-62.)	EpCAM陰性癌細胞あるいはCK陰性癌細胞を捕捉することは出来ないため、がん細胞の多様性に対応することが極めて難しく、唯一認可されているCellSearch® systemではCTCの見逃しが問題となっている。
②	EpCAM抗体をコートした微細流路に血液を流し、CTCを捕獲する方法 (Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:14779-84.)	
③	抗体をコートしたプローブを血管中に挿入して血流中から直接CTCを捕獲する方法 (Int J Oncol. 2012;41:1241-50.)	長時間血管にプローブ針を導入する必要があり、侵襲度が高い。
④	がん細胞のテロメラーゼ活性を利用してがん細胞を蛍光標識する方法 (J Clin Invest. 2009;119:3172-81.)	測定には血液サンプルへのウイルス感染が必要であり、一般病院での日常検査には導入が難しい。
⑤	マイクロ流路や次元フィルターによる細胞サイズに応じた移動度の違いを用いて腫瘍細胞を分離する方法 (Lab Chip. 2011;11:912-20.)	癌細胞通過口の数による制限がかかる。目詰りの可能性がある。血球より小さいサイズの癌の検出が出来ない
⑥	誘電電気泳動力による細胞の浮力や柔らかさの違いを用いて分画を形成し、腫瘍細胞を回収する方法 (Electrophoresis. 2009;30:1388-98.)	がん細胞全般での分画性能が未知であり、実用段階にはない。

上記の通り、様々な検出方法があるが、検査コストや侵襲性、技術的問題点があり、日常臨床で普及するには至っていない。

がん細胞の多様性に対応して一細胞レベルでの定量的な CTC 検出、さらに一般病院でも測定可能、安価で手技が容易な CTC 測定系を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

[単離細胞標本の作製]

(1) 平板状基板の準備

ポリスチレン性のプラスチックプレートに対し、ソフトプラズマエッチング装置を使用し、酸素ガスを流量 : 0 . 2 5 L / 分、内圧 6 から 1 0 P a、出力 5 m A から 2 5 m A の条件で 1 5 分間プラズマ照射を行う。

(2) 観察対象細胞の準備

循環がん細胞モデルとして前立腺がん細胞 (PC-3) を用い、これを少数含む細胞群を観察対象細胞として調製したヒト白血病細胞 (CEM) 観察対象細胞含有液を調製する。

(3) 展開工程

平板状基板の上に、観察対象細胞含有液を、マイクロピペットを用いて 3 m l 滴下し、観察対

象細胞含有液を基板上のほぼ全面に広げる。この操作により基板全面で細胞の単層配列形成(1300~1700万個/基板)ができる。

(4) 細胞除去工程

比抵抗値が18.2M・cmの超純水に、展開工程後の平板状基板を浸漬して、余剰の細胞を洗浄し、平板状基板の表面に付着していない細胞を除去する。

(5) 乾燥工程

細胞除去工程後、一晩かけて平板状基板を自然乾燥し単離細胞標本を得る。

[染色工程]

免疫染色のために、EpCAM(上皮細胞の表面マーカー)、Cytokeratin(上皮細胞の細胞内タンパク質マーカー)、CD45(白血球の表面マーカー)を用いた。なお、CD45をマーカーとすることで、抗体分子の非特異的な吸着による偽陽性を避けることができるので、EpCAM陽性、かつCytokeratin陽性、かつCD45陰性の細胞を特定できる。また、あわせてDAPIによって核染色を行う。

(1) 染色溶液の調製

以下を全て含むPBS溶液を染色溶液として調製する。

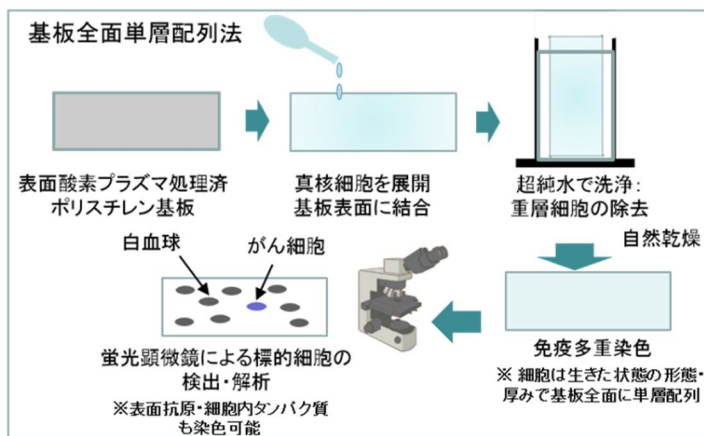
PBS 3000μl, DAPI 60μl, CK-PE 60μl, EpCAM-Alexa488 60μl, CD45-Alexa647 100μl (total 3280μl)

(2) 染色の方法

染色溶液3mlを、各標本表面の細胞と接触するように展開し、室温、遮光下で1時間染色する。次いで、デカンテーションで余剰な染色液を除去した後、各標本をPBSに浸漬して洗浄する。標本上のPBSが乾燥する前に、速やかにカバーガラスを被せる。

[観察]

cellSens Dimension (オリンパス社)を用いて、基板上的の細胞について網羅的に撮影を行い、疑似血液に混在させた腫瘍細胞を同定する。

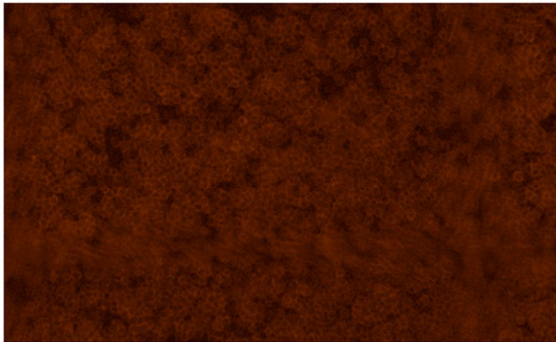
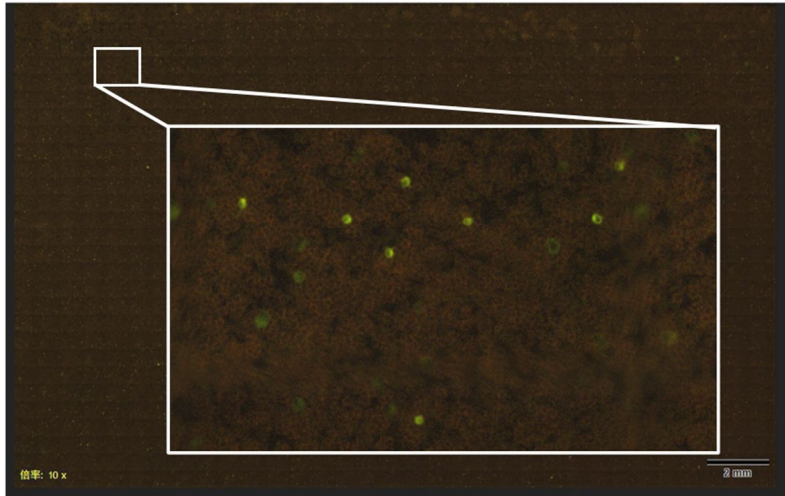


4. 研究成果

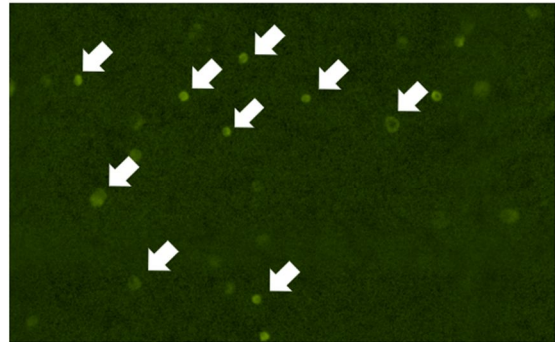
【スライドガラスの全スキャン画像】



【拡大画像】



〈CEM；白血病細胞株〉



〈PC-3；前立腺癌細胞株〉

新しく開発した CTC の解析手法により疑似血液中の前立腺癌細胞を確認することが出来た。本実験系を用いれば簡便で低コストに前立腺癌の循環腫瘍細胞が確認できる可能性が示唆された。

本研究課題は研究期間内で基礎研究を実施することが出来たが、臨床検体での解析には至らなかった。実臨床の患者検体を用いた研究を展開すべく、基盤研究 C「新規 CTC 測定系を用いた前立腺癌循環腫瘍細胞測定法の開発と臨床応用」として研究を継続している。

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

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 単離細胞標本、単離細胞標本の製造方法、及び目的細胞の検出方法	発明者 片岡正俊、梶本和昭、橋本宗明	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/-27690	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 単離細胞標本、単離細胞標本の製造方法、及び目的細胞の検出方法	発明者 片岡正俊、梶本和昭、橋本宗明	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/027690	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------