

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790547

研究課題名（和文） オートスキャン式蛍光顕微鏡を用いた大腸がん自動細胞診実用化研究

研究課題名（英文） Virtual cytology for detection of colorectal cancer cells using an auto-scan imaging cytometry

研究代表者

古賀 宣勝 (KOGA YOSHIKATSU)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・室長

研究者番号：70536086

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞1個レベルでの診断法として、がん特異抗体による蛍光免疫染色を用いた細胞解析法を検討した。便中剥離がん細胞分離にはEpCAM抗体付加ビーズが必須であるが、我々が開発した抗ヒトEpCAMラットモノクローナル抗体を磁性ビーズに直接結合したイムノビーズは自家蛍光もなく自動細胞診に有用であった。今回の研究では臨床検体の検討を行うことができなかったが、がん特異抗体による免疫染色を基本とした細胞解析法への有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the virtual cytology for detection of colorectal cancer cells stained by a cancer specific monoclonal antibody (mAb). Immunomagnetic beads conjugated with anti-human EpCAM mAb were needed to isolate the exfoliated cancer cells from fecal samples. The immunomagnetic beads conjugated with anti-human EpCAM rat mAb developed by us were useful for virtual cytology because of the least auto-fluorescence. We could not analyze the clinical samples in this study; however these results showed the availability of virtual cytology utilized by immunocytochemistry of cancer specific mAb.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：大腸がん、自動細胞診、がん検診、早期診断、イムノビーズ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸がんは世界で年間約107万人が罹患し、約62万人が死亡するがんである。先進国では常にごん死亡率の上位であり、日本でも生活様式の欧米化に伴って増加傾向にあるが、一般的に早期発見し、内視鏡的切除や外科的切除による治療ができれば生存率が極めて良好ながんである。現在、大腸がん検診法として便潜血反応検査が広く普

及しているが、最近の大規模臨床研究において便潜血化学法の感度は10～20%程度であることが分かってきた。一方で抗ヒトヘモグロビン抗体を用いた便潜血免疫法の感度および特異度は便潜血化学法よりも高いと報告されているが、便中の微量なヘモグロビンを診断するものであり大腸がんを特異的には診断していないし、また早期癌の診断率は50%以下である。それゆえ、感度、

特異度が高いことはもちろん、簡便、容易で安価な検査法が実現、普及されることの臨床的意義は大きいと考える。

(2) 研究代表者らは、新しい大腸がんスクリーニング検査法の実現を目指して、自然排泄便から大腸がん細胞を分離、検出する検査手法の研究開発を進めてきた。これまでに、早期や右側結腸がんを含む全ての大腸がんにおいて、1~5g程度の自然排出便から大腸がん細胞を含む剥離細胞を高濃度に分離することが出来る基本手法の確立に成功している。本検査の基本コンセプトは、大腸がんから便中に剥離した大腸がん細胞そのものを検出対象としているため、便潜血法より感度と特異度が高い検査手法の実現が期待できる。

(3) 研究開始までに研究代表者らは、新しい大腸がんスクリーニング検査の開発のために、排便から剥離細胞を回収するまでの最適保存時間と最適保存温度を決定し、便中の剥離細胞を効率よく回収するのに適した磁性ビーズの特徴も明らかにした。便から分離した大腸がん細胞を診断する方法は直接シーケンス法による遺伝子変異の解析を行った。しかし、この方法は手技が煩雑で工程が多く、1検査あたりのコストが高いという欠点があった。そのために、更なる検討として遺伝子変異をSSCPで解析する方法や、mRNAを用いたがん特異遺伝子の発現解析を報告した。現在までに確立した診断手法は、回収した剥離細胞全体のDNAやRNAを対象としているが、大腸がん細胞だけでなく大腸正常粘膜剥離細胞も回収されるため、正常細胞由来のDNAやRNAが含まれている。そのために、がん部の遺伝子変異やがん特異遺伝子の発現が被覆されてしまい、結果として感度が低下してしまう。

## 2. 研究の目的

本研究では細胞1個レベルでの診断法として、がん特異抗体による免疫蛍光染色と、核の性状や細胞質の蛍光強度などのデータを自動で撮像、解析するオートスキャン式蛍光顕微鏡を併用することによる、自動細胞診のがん検診への可能性を検討する。その実用化への検証として、国立がん研究センターを中心に大腸がん患者の便と共に検診受診者の便を集め、検査プロトコルの感度や特異度を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 2009年度の研究方法

#### ①細胞分離用ビーズの検討

便中の剥離細胞を回収するビーズについて、研究代表者らは大腸がん細胞および正

常大腸粘膜細胞に発現しているEpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) に対するモノクローナル抗体を結合した1.5 $\mu$ mから5.9 $\mu$ mの異なるサイズのビーズをすでに作製していた。大腸がん細胞株を用いてこれらのサイズの異なるイムノビーズによる細胞分離と自動細胞診のシミュレーション実験を行った。また、市販のイムノビーズとして、磁性ビーズと抗体がDNAリンカーで結合され、DNaseを用いて処理することで一度細胞を回収し観察時には細胞を遊離できるリリース可能なビーズや、自動細胞診に影響を与えないほど小さなナノサイズのビーズ(50nmや250nmの粒子径のビーズ)についてもその回収効率や自動細胞診のシミュレーション実験を行った。シミュレーション研究の最終として、健常者の自然排泄便に1個から1000個の大腸がん細胞株を添加することで得られる疑似大腸がん患者便を用いて、自動細胞診の測定下限(精度)を検討した。

#### ②大腸がん特異抗体の検討

大腸がん細胞の診断には発現が亢進しているCD44 variant 6 (CD44v6) に対する抗体を使用した。大腸がん患者38例の凍結組織切片を用いて、CD44v6の発現を免疫染色にて確認した。新たな大腸がん特異的抗体の探索は、所有する100種類の抗体を網羅的に染色して検討した。

#### ③臨床検体を用いた自動細胞診の検討

46例の大腸がん患者便検体を用いてリリース可能なビーズで細胞を回収し、CD44v6で蛍光免疫染色した細胞の自動細胞診を検討した。

### (2) 2010年度の研究方法

#### ①細胞診に影響を与えないビーズの開発

2009年度までに種々のビーズを検討し、一度細胞を回収し観察時には細胞を遊離できるリリース可能なビーズはリリースの作業により回収した細胞が壊れてしまうことが明らかになり、細胞診に影響を与えない小さなナノサイズのビーズは小さすぎることで細胞の回収自体が行えないことが明らかになった。

2010年度は自動細胞診に影響を与えないビーズの開発・評価を中心に行った。市販されているイムノビーズと独自に作製した抗体を直接結合したビーズについて、自家蛍光の有無を蛍光顕微鏡で観察した。

#### ②抗ヒトEpCAMラット抗体の作製

免疫染色を行う抗体のほとんどはマウス抗体であり、細胞回収用ビーズに結合したEpCAM抗体と重複することで非特異的な染

色が見られていた。そのため、ラットに EpCAM 抗原を感作させ、ハイブリドーマ細胞を作製した。希釈法にて単クローン化を行い、EpCAM に反応を示すラット抗体の作製を行った。

### (3) 2011 年度の研究方法

2010 年度に作製した抗ヒト EpCAM ラットモノクローナル抗体を  $3.0\mu\text{m}$  の磁性ビーズに直接結合し、大腸がん細胞株を用いた細胞回収率と自動細胞診への影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 2009 年度の研究成果

#### ① 細胞分離用ビーズの検討結果

$5.0\mu\text{m}$  を超える大きなサイズのビーズは自動細胞診の際に観察の邪魔となった。そのため、細胞診に影響を与えない小さなナノサイズのビーズ ( $50\text{nm}$  や  $250\text{nm}$ ) を検討した。しかし、小さすぎるビーズは細胞の回収自体が行えなかった (図 1)。

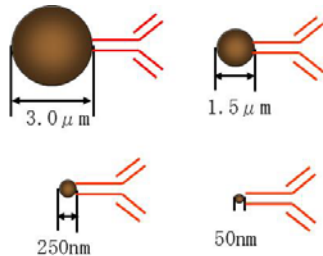


図 1 今回検討したイムノビーズ

細胞の回収に必要なビーズも観察時には不要であるため、一度細胞を回収し観察時には細胞を遊離できるリリース可能なビーズを検討した。培養細胞を用いたのシミュレーション研究では 60% 程度の細胞回収が可能であり、その後 80% 程度の細胞をリリース可能であった (図 2)。

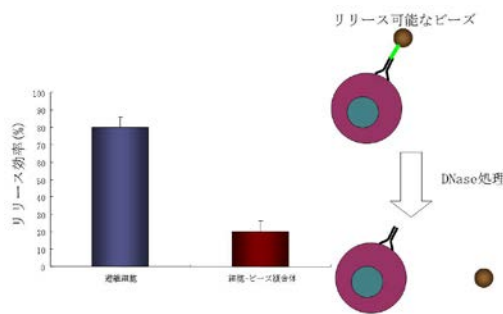


図 2 細胞-ビーズ複合体からの細胞遊離

健常者の自然排泄便に大腸がん細胞株を 1 個~1000 個加えた検体からリリース可能なビーズを用いて細胞を回収、自動細胞診を行い検査の感度を検討した。加えた細胞数に比べて自動細胞診で解析できる細胞数は約 1 割に減ってしまうが、便 1 グラムに約 10 個の細胞が含まれていれば自動細胞診

は可能であることを示した (図 3)。

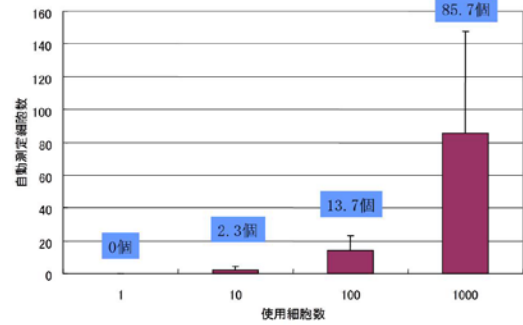


図 3 自動細胞診の測定感度

#### ② 大腸がん特異抗体の検討

大腸がん特異抗体として CD44v6 抗体を検討したが、大腸がん組織の陽性率は 65.8% で、正常大腸粘膜部の陽性率も 18.4% であった (表 1 および図 4)。

表 1 凍結切片の免疫染色結果 (CD44v6)

|      | CD44v6 染色強度 (38 症例) |     |    |     |
|------|---------------------|-----|----|-----|
|      | 陰性                  | 弱陽性 | 陽性 | 強陽性 |
| がん部  | 0                   | 13  | 9  | 16  |
| 非がん部 | 8                   | 23  | 7  | 0   |

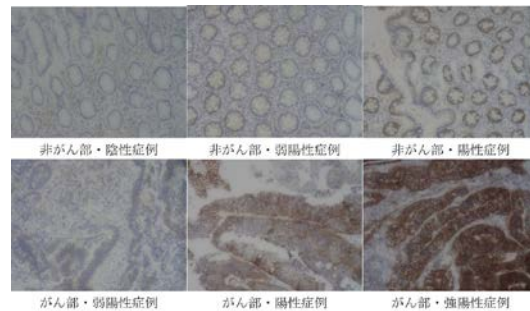


図 4 免疫染色像 (CD44v6)

新たな大腸がん特異抗体を同定するため、凍結組織 (がん部 2 例、非がん部 2 例) に対して、100 種類の抗体を用いた免疫染色を行ったが、がん部で陽性かつ非がん部で陰性となる抗体を見出すことができなかった。

#### ③ 臨床検体を用いた自動細胞診の検討

大腸がん患者 46 名の自然排泄便から剥離細胞を回収しビーズをリリースした後に、CD44v6 による蛍光免疫染色とオートスキャン式蛍光顕微鏡を用いた自動細胞診を行った (図 5)。全症例における自動細胞診の陽性率は 17.4% (8/46) で、凍結組織の CD44v6 染色を行った 18 例に限ると自動細胞診の陽性率は 16.7% (3/18) だった。さらに CD44v6 の免疫組織染色でがん部において陽性だった 13 症例に限定すると自動細胞診の陽性率は 23.1% (3/13) だった。

自動細胞診の陽性率が低い原因は、自然排泄便中の剥離細胞は壊れやすいことが関係していた。ビーズをリリースする際に

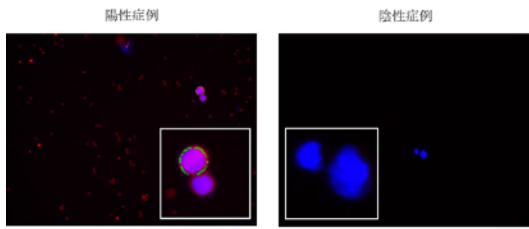


図5 臨床検体実施例

DNase などの化学的な反応と同時にピペッティングなどの物理的な作業を行うが、培養細胞のシミュレーション実験では全く問題なかった。しかし大腸がん患者便中の剥離細胞は物理的な作業により脱核してしまうなどビーズをリリースする作業により回収した細胞が壊れてしまうことが明らかとなった。

## (2) 2010 年度の研究成果

### ①細胞診に影響を与えないビーズの開発

2009 年度までに大きすぎたり小さすぎたりしたビーズは自動細胞診に不向きで、リリース可能なビーズは培養細胞レベルでは利用可能であったが便中剥離細胞では使用できなかった。そのため大きさ  $3\mu\text{m}$  程度のイムノビーズで回収し、リリースなど行うことなく細胞に結合したままの状態ですべての自動細胞診が可能かどうかの検討を行った。

市販されているイムノビーズと研究代表者らが作製したイムノビーズを比較した。市販されているイムノビーズでは自家蛍光が強く、蛍光免疫染色を用いた自動細胞診には不向きであった。一方で、我々が開発した粒子径が  $3.0\mu\text{m}$  で EpCAM 抗体を直接結合したビーズは自家蛍光もなく有用であることが分かった (図6)。

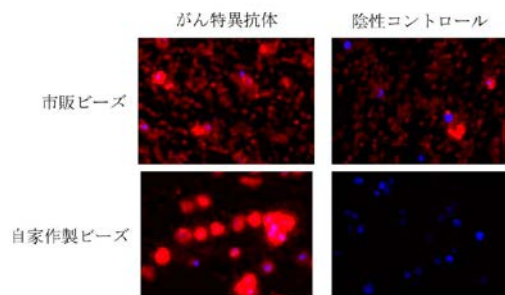


図6 イムノビーズの自家蛍光

### ②抗ヒト EpCAM ラット抗体の作製

すでに作製している抗ヒト EpCAM マウスモノクローナル抗体を結合したイムノビーズは、がん特異抗体 (マウス抗体) での診断に悪影響を及ぼすために、自動細胞診には不向きであった (図7)。そのため、細胞回収用ビーズに適した EpCAM 抗体 (ラット抗体) の作製を行った。ハイブリドーマ上清について、EpCAM 抗原を用いた ELISA、EpCAM 陽性細胞と陰性細胞を用いた Flow cytometry (FCM) および免疫染色を行い、

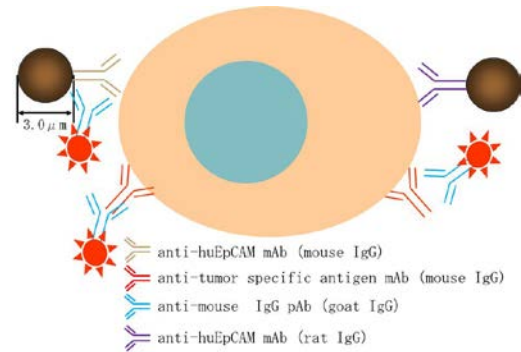


図7 ラット抗体の必要性

ELISA で陽性、FCM および免疫染色では EpCAM 陽性細胞のみ陽性となり陰性細胞では陰性となる抗ヒト EpCAM ラットモノクローナル抗体を樹立した (表2)。

表2 抗ヒトEpCAMラット抗体の性能

|               | ELISA | FCM        |            | 免疫染色       |            |
|---------------|-------|------------|------------|------------|------------|
|               |       | EpCAM 陽性細胞 | EpCAM 陰性細胞 | EpCAM 陽性細胞 | EpCAM 陰性細胞 |
| 抗ヒトEpCAMマウス抗体 | ++    | ++         | -          | ++         | -          |
| 抗ヒトEpCAMラット抗体 | ++    | ++         | -          | ++         | -          |

## (3) 2011 年度の研究成果

大腸がん細胞株を用いた細胞回収効率は以前我々が作製した抗ヒト EpCAM マウス抗体付加イムノビーズと比較してやや劣るもののほぼ同等の性能を有していた (図8)。

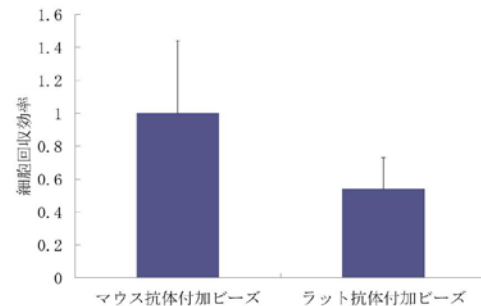


図8 抗ヒトEpCAM抗体付加ビーズの細胞回収効率

大腸がん細胞株をイムノビーズで回収し、がん特異抗体で免疫染色を行った後に自動細胞診を検討した。マウス抗体付加ビーズを用いた検体ではがん特異抗体との交差が見られたが、ラット抗体付加ビーズでは交差が見られず、大腸がん細胞をはっきりと確認できた (図9)。

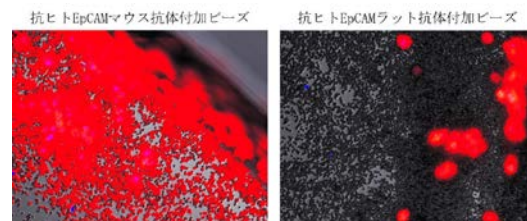


図9 ラット抗体付加ビーズの自動細胞診像

今回の研究では臨床検体まで検討を行うことができなかったが、自然排泄便から剥離がん細胞を効率よく回収するイムノビー

ズを開発し、大腸がん特異抗体による免疫染色を基本とした細胞解析法への有用性が示された。

#### 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古賀宣勝、松村保広、糞便中の剥離癌細胞を対象とした大腸癌検診法の開発、大腸癌 Frontier、査読無、5巻、2012年、p45-49、
- ②古賀宣勝、便中剥離細胞の microRNA 発現解析、消化器内科、査読無、53巻、2011年、p652-659、
- ③古賀宣勝、松村保広、便中 microRNA と大腸癌診断について教えてください、Surgery Frontier、査読無、18巻、2011年、p77-79、  
[http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ailsrfre/2011/001802/016&name=0189-0191j&UserID=160.190.244.6&base=jamas\\_pdf](http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ailsrfre/2011/001802/016&name=0189-0191j&UserID=160.190.244.6&base=jamas_pdf)
- ④ Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Yoshihiro Moriya, Takayuki Akasu, Shin Fujita, Seiichiro Yamamoto, Yasuhiro Matsumura, Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. Journal of Gastrointestinal Oncology, 査読有, 2巻, 2011年, p215-222, DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.015
- ⑤ Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Amane Takahashi, Junichiro Kuroda, Yoshihiro Moriya, Takayuki Akasu, Shin Fujita, Seiichiro Yamamoto, Hideo Baba, Yasuhiro Matsumura, MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening. Cancer Prevention Research, 査読有, 3巻, 2010年, p1435-1442, DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0036
- ⑥古賀宣勝、松村保広、便 DNA 検査が大腸がん検診として推奨、Medical Technology、査読無、37巻、2009年、p1247-1248、  
[http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=aa7mdteh/2009/003712/003&name=1247-1248j&UserID=160.190.244.6&base=jamas\\_pdf](http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=aa7mdteh/2009/003712/003&name=1247-1248j&UserID=160.190.244.6&base=jamas_pdf)

[学会発表] (計8件)

- ①古賀宣勝ほか、大腸がん検診における便

RNA 検査の可能性、JDDW 2011、2011年10月20日、福岡。

- ②古賀宣勝ほか、Fecal RNA test of miRNA expressions in the fecal samples and the exfoliated colonocytes from feces、第70回 日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋。
- ③Yoshikatsu Koga, et al., Fecal RNA test using microRNA expressions of exfoliated colonocytes for colorectal cancer screening. 102nd AACR Annual Meeting, Apr/4th/2011, Orlando.
- ④古賀宣勝ほか、便中剥離細胞の microRNA 発現解析、JDDW 2010、2010年10月15日、横浜。
- ⑤Yoshikatsu Koga, et al., New methods for colorectal cancer diagnosis using colonocytes isolated from natural evacuated feces. BIT Life Sciences' 3rd World Cancer Congress-2010, Jun/23rd/2010, Singapore.
- ⑥Yoshikatsu Koga, et al., A new method of colorectal cancer screening using microRNA expression profiles of colonocytes isolated from feces. 101st AACR Annual Meeting, Apr/21st/2010, Washington DC.
- ⑦古賀宣勝ほか、オートイメージングシステムによる剥離がん細胞同定、第25回 日本 DDS 学会学術集会、2009年7月4日、東京。
- ⑧古賀宣勝ほか、自然排泄便中の剥離がん細胞を用いた新しい大腸がん診断法、第25回 日本 DDS 学会学術集会、2009年7月3日、東京。

[図書] (計1件)

- ①古賀宣勝、松村保広、羊土社、がん生物学イラストレイテッド、2011年、p325-330。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古賀 宣勝 (KOGA YOSHIKATSU)  
独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・室長  
研究者番号：70536086