

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19718

研究課題名（和文）頭頸部癌末梢循環腫瘍細胞の量的質的解析を目的とした捕捉チップ開発に関する研究

研究課題名（英文）Development of CTC capture chip for head and neck cancer patients

研究代表者

吉崎 智一（Yoshizaki, Tomokazu）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70262582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：癌の正確な悪性度評価には悪性度の高い細胞を選別して解析する必要がある。末梢循環腫瘍細胞（CTC）は原発巣癌細胞集団の中でも上皮間葉移行（EMT）を生じた浸潤や転移能力が高い、悪性度を最も反映する集団と考えられる。各種抗体とマイクロ流体デバイスとを組み合わせたポリマー性マイクロチップを用いて臨床検体からCTC捕捉を試みた。抗EpCAM抗体は回収効率が悪いこと、細胞の量的評価は臨床的な癌悪性度を反映しないことが示唆された。さらに再現性にばらつきが生じること、抗体の染色強度が一定でないことなどから臨床応用にはCTC採取方法の改善が課題であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内で市販されていたEpCAM発現細胞を標的としたFDA認可のCTC定量システムは正確に頭頸部扁平上皮癌の悪性度を反映しないことが判明した。その理由として、頭頸部癌のCTCがEpCAMを発現していない可能性と頭頸部癌患者においてはCTCが少ない可能性の2つが考えられた。今日期待されている採決による腫瘍悪性度評価において、CTCは体内の腫瘍組織における悪性度の高い細胞集団と考えられているので、今後はヒメンチンなどの間葉系のマーカーを組み合わせたマイクロチップによる捕捉、もしくはサイズによるソーティングなどの捕捉システムの改良と検体採取法の最適化に向けた研究が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Malignant potential of the tumor is defined by the cancer cell fraction with highly malignant potential. Circulating tumor cells (CTC) are considered to contain tumor cells with metastatic property. And thus, they represent metastatic potential of the parental tumor tissue. We developed polymeric CTC capture microchip by combining antibodies and micro fluid device. And we analyzed the efficacy of these chips. Global standard anti-EpCAM antibody chip showed high affinity for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines. However, it showed quite low affinity for the CTC in HNSCC patients. Moreover, the reproducibility was not stable. These results suggest that improvement of CTC capturing system is required for clinical application of CTC capture system.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：末梢血循環腫瘍細胞 CTCチップ 頭頸部癌 悪性度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

個別化治療は現在から次世代癌治療のキーワードである。そのためには臨床病期による治療層別化以外に個体毎の癌の多様性、特に悪性度の評価が必要不可欠である。しかし、腫瘍内の癌細胞不均一性が強いため、薬剤耐性や転移能といった悪性度を規定する細胞集団の正確な評価は腫瘍塊からは困難なことが明らかになってきた。一方、原発巣から離脱し末梢血中に存在する末梢循環癌細胞 (Circulating Tumor cell; CTC) は浸潤や転移能力が高く癌の悪性度を最も反映する集団と考えられ、いくつかの癌腫で先行研究が始まっている。CTC 定量装置として唯一米国食品医薬局 FDA が認可したのは米国 Veridex 社が開発した EpCAM 発現細胞を CTC として定量する Cell Search システム[®]である。しかし、上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal transition; EMT) を生じた最も悪性度の高い癌幹細胞形質を有する CTC は細胞表面に EpCAM を発現していないと想定される。したがって Cell Search システム[®]による CTC 定量は肺癌などで一定の評価を得たもののこの最も悪性度の高い CTC を捕捉できないという質的解析における問題点を抱えている。そして、これまで様々な CTC 捕捉システムが考案されたが頭頸部癌 CTC 評価に適した方法は確立されていない。富山県工業技術センターでは表面抗原を標的とする微量細胞捕捉用ポリマーチップが開発された。本チップは従来の CTC 定量装置より廉価で簡便である上に各種抗体をコートする事が可能である。これまでも遺伝子発現と病態解析から開発された診断用チップの普及が肝炎や各種の癌の個性を可視化し、医学的社会的な変革に多大な貢献をしたことから新規診断用チップの開発が望まれていた。

2. 研究の目的

研究開始当初、頭頸部癌においては CTC の質的解析どころか量的解析についても手つかずの状態である。その原因として、CTC 定量のために最適なマーカーが確立されていないこと、いろいろな CTC 捕捉装置が高価格であること、があげられる。本研究では、将来各種の癌に応用可能な CTC 捕捉システム開発の第一段階として頭頸部癌の CTC に焦点を当て、「1) 頭頸部癌 CTC 捕捉に適したマーカーの同定と捕捉用チップを開発し、頭頸部癌 CTC 捕捉システムを最適化する。2) CTC の量的臨床的意義を解析する。3) つづいて生物学的機能と遺伝子解析を最適化し頭頸部癌個別化治療法を開発する」ことを目的とする。

3. 研究の方法

I. CTC 捕捉法の最適化

1) 当初の手法：治療前の癌患者 CTC 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ィルス (OBP-1101) を感染させる。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 (-) 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。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。

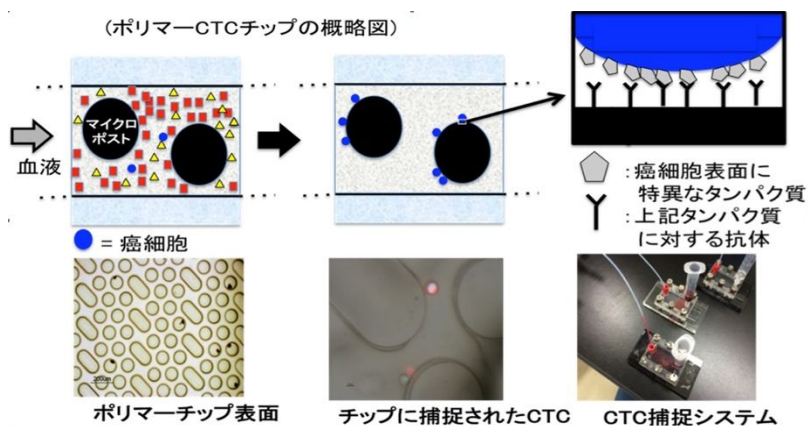
本法は回収細胞数では優れるものの手技が煩雑であるため、臨床応用には不適當である事が課題として浮上してきた。

2) 富山県工業技術センターで表面の特異的マーカーをターゲットとし血中の微量細胞を捕捉するため、抗体とマイクロ流体デバイスとを組み合わせたポリマー性マイクロチップが開発された。本技術は患者末梢血をそのままチップに通すという簡便なシステムに応用することで CTC 捕捉が可能となる(以下、CTC チップ)。29 年度には CTC マーカーとして最も多くの研究で使用されている抗 EpCAM 抗体を用いて CTC チップによる頭頸部癌 CTC 捕捉システムの最適化を行った。

上咽頭正常上皮細胞株 NP69、上咽頭癌細胞株 C666-1、舌癌由来 OSC19 を健常ドナー末梢血 7.5ml に、それぞれの細胞ごとに 1 細胞/ml、10 細胞/ml、100 細胞/ml となるように混入し、抗 EpCAM 抗体のコーティング条件と感度、特異度を最適化する。

患者血液を用い、テロメスキャン法と CTC チップ法とで捕捉される CTC の定量性について評価する。

3) 抗 EpCAM 抗体に加え EMT マーカー抗体カクテル(抗 Vimentin, Fibronectin, N-cadherin 抗体) 癌幹細胞マーカー候補(抗 CD44v, CD133, CD271 抗体) さらに上咽頭癌では Epstein-Barr ウイルス膜蛋白 LMP1 に対する抗体でコートしたチップ、を用いてそれぞれのチップにより捕捉される細胞を定量し、EMT が生じている CTC 定量のための条件設定をさらにチューンアップする。



4. 研究成果

癌治療の「個別化」という近未来の癌治療キーワードに対して、CTC は理想的ターゲットであるものの量的評価についてすら一定の方法が確立されていない。本チップは各種抗体をコートする事が可能なため理論上、任意の表面マーカー発現細胞の捕捉が可能となる。また、同時に複数の抗体をコートすることも可能であるため、最も最適な CTC チップマーカーは何か、簡便に検討ができる。EpCAM 陽性細胞に加え、最も悪性度が高いことが予想される EpCAM 陰性 EMT マーカー陽性細胞定量システム開発員は至らなかった。

一方で、当初は抗 EpCAM 抗体を用いることで臨床検体においても CTC が捕捉可能と考えてい

たが、この方法は極めて回収効率が悪いことが判明した。さらにこのシステムで回収された細胞の量的評価は臨床的な癌悪性度を十分反映しないことが示唆された。一方で抗体をコートした CTC チップは回収効率は改善することかが判明した。さらに同一患者からの検体であっても再現性にばらつきが生じること、抗体の染色強度が一定でないことなどから、従来臨床で応用されていた Cell Search System がカウントする CTC は真の CTC サロゲートマーカーではないことを示唆する結果を得た。

現在、非侵襲検査として研究が進む liquid biopsy による miRNA やタンパク解析は組織総体としての解析となるため「癌組織由来の核酸やタンパクよりも CTCの方が癌の個別的正確、特に転移能に代表される悪性度を鋭敏に反映する」と考えられている。そのため CTC 捕捉システム、表面マーカーと生物学的特徴に焦点を当てた研究はまだ核酸やタンパクを標的とした liquid biopsy 研究よりも黎明期にあるものの引き続き研究を継続する価値がある分野と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Seishima Noriko, Kondo Satoru, Wakae Kousho, Wakisaka Naohiro, Kobayashi Eiji, Kano Makoto, Moriyama-Kita Makiko, Nakanishi Yosuke, Endo Kazuhira, Imoto Tomoko, Ishikawa Kazuya, Sugimoto Hisashi, Hatano Miyako, Ueno Takayoshi, Koura Miki, Kitamura Koichi, Muramatsu Masamichi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression and subcellular localisation of AID and APOBEC3 in adenoid and palatine tonsils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18732-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kobayashi E., Aga M., Kondo S., Whitehurst C., Yoshizaki T., Pagano J. S., Shackelford J.	4. 巻 3
2. 論文標題 C-Terminal Farnesylation of UCH-L1 Plays a Role in Transport of Epstein-Barr Virus Primary Oncoprotein LMP1 to Exosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00030-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00030-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Iguchi Taku, Takaori Koji, Mii Akiko, Sato Yuki, Suzuki Yasunori, Yoshifuji Hajime, Seno Hiroshi, Ogawa Osamu, Omori Koichi, Bessho Kazuhisa, Kondo Satoru, Yoshizaki Tomokazu, Nakashima Hitoshi, Saito Takao, Mimori Tsuneyo, Haga Hironori, Kawano Mitsuhiro, Yanagita Motoko	4. 巻 31
2. 論文標題 Glucocorticoid receptor expression in resident and hematopoietic cells in IgG4-related disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 890 ~ 899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41379-018-0036-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wakisaka Naohiro, Endo Kazuhira, Kitazawa Tomohiro, Shimode Yuzo, Kato Koroku, Moriyama-Kita Makiko, Koda Wataru, Ikeda Hiroko, Ishikawa Kazuya, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Sugimoto Hisashi, Yoshimura Kenichi, Tsuji Hiroyuki, Kawashiri Shuichi, Omoto Kiyoka, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 139
2. 論文標題 Detection of sentinel lymph node using contrast-enhanced agent, Sonazoid?, and evaluation of its metastasis with superb microvascular imaging in oral and oropharyngeal cancers: a preliminary clinical study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 94 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2018.1535193	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aga Tomomi, Endo Kazuhira, Tsuji Akira, Aga Mitsuharu, Moriyama-Kita Makiko, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Hatano Miyako, Kondo Satoru, Sugimoto Hisashi, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 46
2. 論文標題 Inhibition of autophagy by chloroquine makes chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma more efficient	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 443 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2018.10.013	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo S, Endo K, Wakisaka N, Aga M, Kano M, Seishima N, Imoto T, Kobayashi E, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Muroto S, Pagano JS, Yoshizaki T	4. 巻 67
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 461-466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tomokazu Yoshizaki
2. 発表標題 Distinct mode of invasion in HPV associate and non-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma
3. 学会等名 17th Japan KoreaJoint Mmeeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomokazu Yoshizaki, Satoru Kondo, Yoshitaka Aoki, Harue Mizokam
2. 発表標題 Role of Epstein-Barr virus and Alternating Chemoradiotherapy In Nasopharyngeal Carcinoma.
3. 学会等名 International conference on EBV & KSHV 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomokazu Yoshizaki, Satoru Kondo
2. 発表標題 Human papillomavirus genome integration is associated with the expression of ABOBEC3 in oropharyngeal carcinomas.
3. 学会等名 6th IFNOS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉崎智一
2. 発表標題 耳鼻咽喉科領域におけるIgG4関連疾患 嗅覚障害との関連も含めて
3. 学会等名 第31回日本口腔咽頭科学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉崎智一、センチネルリンパ節生検術共同研究班
2. 発表標題 頭頸部癌センチネルリンパ節生検術臨床試験
3. 学会等名 第20回SNNS研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshizaki T
2. 発表標題 The Expression of APOBEC3A Associates with Human Papilloma Virus Genome Integration in Oropharyngeal Carcinomas
3. 学会等名 4th Congress of European ORL-HNS (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T
2. 発表標題 Relationship between APOBEC3 expression and viral genome hypermutation and integration in HPV-related oropharngelial cancers
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

〔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	中西 庸介 (Nakanishi Yousuke) (20623648)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	