

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591616

研究課題名(和文)新規モノクローナル抗体を用いて分離した血液循環メラノーマ細胞の遺伝子解析

研究課題名(英文) Gene analysis in circulating melanoma cells isolated using novel monoclonal antibodies

研究代表者

芦田 敦子 (ASHIDA, Atsuko)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：00596786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：健常人末梢血にメラノーマ細胞を混合し、HMW-MAA抗体単独、B7-H3抗体単独、2つの抗体の併用を用いて標識し、マグネットビーズ法とFACS法にてメラノーマ細胞の回収率を比較した。結果は、両者を混合したものが最もメラノーマ細胞の回収率が高かった。HMW-MAA抗体にB7-H3抗体を組み合わせることで患者の血液循環メラノーマ細胞の採取・分離効率が上がり、今後の臨床への応用が期待できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated an optimized procedure for the efficient isolation of melanoma cells labeled with HMW-MAA (High-Molecular Weight Melanoma-Associated Antigen) -specific antibodies and/or B7-H3-specific antibodies from the peripheral blood using immunomagnetic beads and fluorescence-activated cell sorting (FACS). Compared with the single-labeling method of melanoma cells using HMW-MAA or B7-H3 antibodies, the double-labeling method using HMW-MAA and B7-H3 antibodies earned high yield. These results suggest that the double-labeling method using HMW-MAA and B7-H3 antibodies is useful for isolating melanoma cells from peripheral blood in patients with melanoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 皮膚科学

キーワード：血液循環腫瘍細胞 メラノーマ B7-H3

1. 研究開始当初の背景

進行期メラノーマでは、治療の選択肢がたいへん少なかったが、近年に分子標的薬として、変異 BRAF や KIT を標的としたキナーゼ阻害剤が期待されている。メラノーマ患者毎に有効な分子標的薬を選択するためには、遺伝子変異などを効率的に検索する方法の確立が必要である。我々は血液循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells: CTCs) を用いて遺伝子変異を解析するシステムの構築をはかってきた。

CTCs による遺伝子解析を行うことで、

(1) リアルタイムで体内の腫瘍細胞の状態がわかる、(2) 侵襲の少ない採血で摂取できる、(3) 経時的なモニタリングが可能、という利点があり、患者の予後や再発などを予測できる有用なバイオマーカーとして期待されている。我々はこれまでは患者の末梢血中から有核細胞を分離し、そこに HMW-MAA (Anti-High molecular Weight-Melanoma Associated Antigen) 抗体を標識し、マグネットビーズを用いてメラノーマ細胞のみを分離し、CTCs について BRAF や KIT などの遺伝子解析を行ってきた。しかし、CTCs は病期が進行すれば末梢血に多数出現するため採取しやすいが、病初期の段階は CTCs を分離する効率が大変低いという問題点がある。B7 は T 細胞共刺激因子の一つであり、細胞性免疫には欠かせない分子の一つであるが、このファミリーに属する B7-H3 は転移性メラノーマに高率に発現していることが報告されている。我々はこの抗体を利用して CTCs の採取効率を上げることにより、CTCs のバイオマーカーとしての有用性がより高まると考えた。

2. 研究の目的

メラノーマ患者の末梢血中から CTCs を分離するにあたり、HMW-MAA 抗体単独、B7-H3 抗体単独、2 つの抗体の併用を用い

て CTCs を分離し、その効率を比較して HMW-MAA 抗体に B7-H3 抗体を併用した場合の有用性を検討する。そして、2 つの抗体を用いて分離して得られた CTCs の遺伝子解析することで CTCs が臨床に応用できる有用なバイオマーカーであることを明らかにする。

3. 研究の方法

HMW-MAA 抗体は、メラノーマ細胞に高率に発現していることがわかっている。まず、B7-H3 抗体についても、メラノーマの細胞や組織で高率に発現しているか確認する。次に、健常人の末梢血にメラノーマ細胞を混ぜ、HMW-MAA 抗体単独、B7-H3 抗体、両者の併用で標識し、その回収率を比較する。回収方法は、これまで行ってきたマグネットビーズ法、並びに FACS 法で検討した。

(1) マグネットビーズ法による CTCs の分離方法

5ml 採血する。CTCs を混じた白血球に HMW-MAA 抗体や B7-H3 抗体を混ぜ、さらにマグネットビーズを加え、磁石で分離する。続いて、CD45 抗体と結合したマグネットビーズにより白血球を除去する。さらに CTCs を MART-1 や HMB45 抗体で免疫染色し、メラノーマ細胞であることを確認する。Laser micro dissection 法によりメラノーマ

細胞を取り出し、ダイレクトシーケンスによる遺伝子解析を行う (図 1)。

(2) B7-H3 抗体を用いた免疫染色メラノーマ培養細胞、患者の切除標本で行う。

(3) B7-H3 抗体の併用による回収率の評価

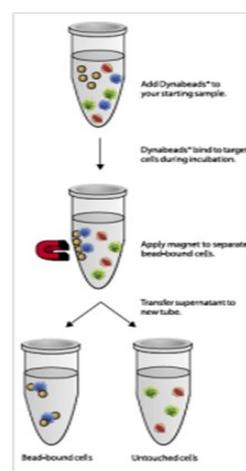


図 1

マグネットビーズ法：健常人の末梢血と

BRAF 変異がある培養細胞(888mel、928mel、MMG1)を混合し、そこに HMW-MAA 抗体単独、B7-H3 抗体単独、もしくは2つの抗体を反応させ、マグネットビーズ法でメラノーマ細胞を回収し、回収率を検討する。

FACS 法：と同様に、3つの条件で抗体を反応させ、FACS 法を用いてメラノーマ細胞を回収し、回収率を検討する。

4. 研究成果

(1) B7-H3 抗体を用いたメラノーマ細胞(888mel、928mel、MMG1)の免疫染色では、いずれも陽性を示した。

(2) B7-H3 抗体を用いたメラノーマ患者の切除標本では、原発腫瘍、転移腫瘍といずれも陽性を示した。

(3) マグネットビーズ法では、928mel と MMG1 に対して HMW-MAA 抗体単独よりも B7-H3 抗体を組み合わせた方が2~4倍回収率は高くなった。888mel では差が見られなかった(図2)。

	MART1 / HMB45 positive cells	
	new3Abs	new3Abs+B7-H3
888mel	82	66
928mel	24	102
MMG1	16	44

図2

(4) FACS 法での回収率の比較では、HMW-MAA 抗体単独よりも B7-H3 抗体単独や両者の併用の方がメラノーマ細胞の検出率が高かった(図3)。

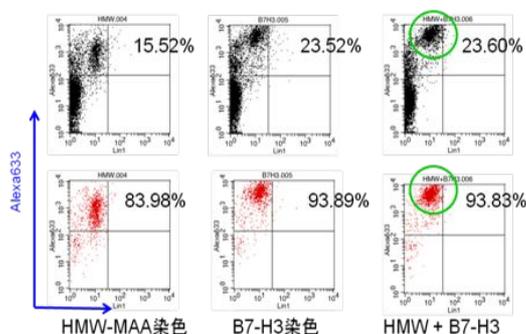


図3

これらの結果から、マグネットビーズ法、FACS 法ともに、HMW-MAA 抗体、B7-H3 抗体をそれぞれ単独で標識するより、両者を組み合わせた方が末梢血からのメラノーマ細胞の分離効率が高くなることが明らかとなった。以上より患者からの血液循環メラノーマ細胞の採取・分離効率上がり、今後の臨床への応用が期待できることが示唆された。

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7件)

1. Uhara H, Ashida A, Koga H, Uchiyama A, Uchiyama R, Hayashi K, Kuniwa Y, Okuyama R. NRAS mutations in primary and metastatic melanomas of Japanese patients. Int J Clin Oncol 2014, in press, 査読あり
2. Uchiyama R, Uhara H, Uchiyama A, Ogawa E, Takazawa Y, Ashida A, Koga H, Hayashi K, Kuniwa Y, Okuyama R. 5-hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi. J Dermatol Sci 73: 161-163, 2014, 査読あり
3. Sato Y, Uhara H, Ashida A, Okuyama R. Combination chemotherapy of carboplatin and paclitaxel for metastatic melanoma. J Dermatol 40: 1050-1051, 2013, 査読あり
4. 芦田敦子、木庭幸子、宇原久、奥山隆平 チロシンキナーゼ：KIT 日本臨床 71 増刊号 4: 134-138 2013, 査読なし
5. 芦田敦子、木庭幸子、宇原久、奥山隆平 MAP キナーゼ：NRAS、BRAF、MEK 日本臨床 71 増刊号 4: 126-129 2013, 査読なし
6. Ashida A, Uhara H, Kuniwa Y, Oguchi M, Murata H, Goto Y, Uchiyama A, Ogawa E, Hayashi K, Koga H, Okuyama R. Assessment of BRAF and KIT mutations in Japanese melanoma patients. J Dermatol Sci 66: 240-242, 2012, 査読あり
7. Sakaizawa K, Goto Y, Kuniwa Y, Uchiyama A, Harada K, Shimada S, Saida T, Ferrone S, Takata M, Uhara H, Okuyama R. Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. British J Cancer 106: 939-946, 2012, 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1. Ashida A, Uhara H, Okuyama R. Assessment of NRAS mutation in Japanese melanoma patients. The 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, JPN, Oct 3- 5, 2013
2. 芦田敦子、宇原久、奥山隆平 日本人のメラノーマ患者における BRAF、NRAS、KIT の遺伝子変異の解析 日本皮膚悪性腫瘍学会 甲府 8月9-10日, 2013
3. Ashida A, Uhara H, Murata H, Goto Y, Okuyama R. Assessment of BRAF and KIT mutation in Japanese melanoma patients. The 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sapporo, JPN, Sep 19- 21, 2012

〔図書〕(計1件)

1. 芦田敦子、奥山隆平, 皮膚の悪性腫瘍
悪性黒色腫：分子標的薬 *KIT* の変異に基づく治療薬, 皮膚科臨床アセット 17 :
59-64, 2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

芦田 敦子 (ASHIDA, Atsuko)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：596786

(2)研究分担者

後藤 康文 (GOTO, Yasufumi)
信州大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：60467181

奥山 隆平 (OKUYAMA, Ryuhei)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80292332

(3)連携研究者

なし