

プログラム名： セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名： 合田 圭介

プロジェクト名： 細胞刺激技術開発

委 託 研 究 開 発

実施状況報告書(成果)

平成 28 年度

研究開発課題名：

結合誘起蛍光発生プローブの開発

研究開発機関名：

公益財団法人がん研究会

研究開発責任者

芝 清隆

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

理化学研究所の鶴澤専任研究員との共同研究として、「単一細胞レベルでの光学的検出」のターゲットとする「血中循環腫瘍細胞における EpCAM」に関して、がん研では「実用に耐えうる EpCAM に結合する結合誘起蛍光発生プローブの改変」の部分を担当した。既に、平成 27 年度中に血中循環腫瘍細胞にみられる EpCAM に結合するペプチドの結合誘起蛍光発生プローブへの変換に成功したので、平成 28 年度ではこれらのプローブを、実際にセレンディピターミニに実装させながら、「①EpCAM に結合する結合誘起蛍光発生プローブが他チームでの使用に耐えるように改良を進める。」ことと「② 27 年度中に EpCAM に結合する既存のペプチドを結合誘起蛍光発生プローブへの変換に成功した。①と併せて EpCAM に結合する結合誘起蛍光発生プローブの改変を目指す。」ことを目標とした。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

血中循環腫瘍細胞のマーカーとして、現在唯一 FDA 認可を受けているのは EpCAM 分子である。EpCAM 分子に強い結合活性をもつ、12 残基からなるペプチド・アプタマーをベースとした、ペプチド性のプローブをセレンディピターによる CTC 検出に利用可能なレベルにまで改良するのがわれわれの目的である。既に、昨年度の後半には、PJ3「細胞計測技術開発」で開発の進んでいた、セレンディピターのプロトタイプに、ペプチド性の EpCAM プローブを利用し、模擬 CTC を用いながら、装置の検出能力を評価し、取得した画像を PJ4「細胞同定技術開発」の画像解析グループに送り、その時点での問題点を明らかにし、次に取り組むべき課題などを絞るなどの、順調なチーム間連携が始まっていた。

しかしながら、その後、いわゆる「セレンディピターミニ」への蛍光観測ユニットの実装が見送られ、残念ながらチーム間連携によるペプチド性の EpCAM プローブを進めることができなかった。しかしながら、本年度は、新たに CTC の存在様式として注目されてきた「クラスターCTC」について、ペプチド性の EpCAM プローブの利用可能性を中心に、主にごん研究所内で研究を進めた。

「クラスターCTC」とは、CTC と思われる細胞が、2 個以上の集合体を形成して血液内を循環しているものである。かならずしもがん細胞だけで凝集しているわけではなく、他の血球細胞や、血小板なども含んだ形で凝集体を形成している可能性があり、「クラスターCTC」と共に「Circulating Tumor Microemboli, CTM、循環腫瘍微小塞栓」と呼ばれることもある（ここでは、以下、クラスターCTC と呼んでおく）。クラスターCTC は、むしろ単細胞で循環している CTC よりも、よいがんの転移に関わっているのではないかとする研究が、近年急激に増えてきており、このような背景のもと、「セレンディピター」においても、クラスターCTC への対応を考慮しておく必要がある。そこで、ペプチド性の EpCAM プローブが、クラスターCTC を認識できるのか、また、その場合、どのような染色像が得られるのかを知るために、模擬クラスターCTC を用いた実験から評価してみた。

EpCAMの発現量の異なる、HT-29、MCF-7、HT1080の3つのがん由来細胞株を用い、これらを細胞接着を抑制した培養条件で培養し、機械的剪断力で数個の細胞がクラスターした「模擬グラスターCTC」を試験管内で調製した。次に、これら「模擬グラスターCTC」を、ペプチド性のEpCAMプローブで染色し、その染色像を「非洗浄」の状態、共焦点蛍光顕微鏡を用い観察した。その結果、クラスター化したCTCの場合でも、そのクラスターの輪郭を、ペプチド性のEpCAMプローブでうまく染色できることが分かった。単細胞CTCの場合と同じように、細胞全体が強く染色される細胞がいくつか検出されるが、これらは、死細胞であることを、死細胞特異的に染色する蛍光染色剤を用いることで確認している。生きているCTC細胞、クラスターCTCは、細胞周辺、あるいは、細胞塊の輪郭がペプチド性のEpCAMプローブで染色されるのに対し、死細胞は細胞質を含めた細胞全体が染色され、これらはPJ4「細胞同定技術開発」の画像解析技術で、容易に区別できる性質である。このように、ペプチド性のEpCAMプローブを用いたCTC同定は、セレンディピターの特徴をフルに引き出せる染色法である。

その他、金ナノ粒子にペプチド性のEpCAMプローブを提示させ、金ナノ粒子のもつ表面プラズモンを利用したCTCの検出方法の開発も進めていたが、金ナノ粒子の凝集の問題などが未解決のまま残り、期間内には完成することができなかった。

2-2 成果

(1) 模擬クラスターCTCに対してもペプチドEpCAMプローブが使えることを示した。

2-3 新たな課題など

第2フェイズで開発されるセレンディピターには蛍光検出ユニットが実装され、再びペプチド性のEpCAMプローブが利用されると期待している。赤血球などの自家蛍光が強い夾雑物が存在する状況で、ペプチド性のEpCAMプローブでいかにCTCの候補細胞を検出できるのか、実際の患者検体を用いながら、トライアンドエラーで条件を最適化していく作業が必要だと考える。また、EpCAM陰性のCTCをどう同定していくかも、新たな課題として取り組まなければならないかもしれない。

3. アウトリーチ活動報告

該当無し