

循環腫瘍細胞観察可能なナノ粒子質量顕微鏡開発に関する研究

研究代表者 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 教授 瀬藤光利

研究要旨

がんが進展するごく早期から血中に存在する循環腫瘍細胞の質的評価は診断・治療に重要である。本研究は、ナノ粒子等を補助剤として活用し、循環腫瘍細胞の質的評価を可能とするための質量顕微鏡を開発することを目的とする。本事業年度は医薬品医療機器総合機構・医療機器戦略相談を利用し、新規医療機器として質量顕微鏡を開発・確立するための方針や方法に関して助言を受けた。そこで機器開発のためには臨床的有用性を持つことが重要であるとの助言を得たことから、乳がん患者末梢血から得られた循環腫瘍細胞の質量顕微鏡解析と網羅的データ解析を行い、病態評価因子との関連性を示す代謝物を質量顕微鏡の循環腫瘍細胞観察によって評価できることを示した。この結果、ナノ粒子等を補助剤として活用した循環腫瘍細胞観察可能な質量顕微鏡が開発された。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

瀬藤光利 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 教授

池上浩司 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 准教授

早坂孝宏 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 特任助教

木村芳滋 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 特任助教

A．研究目的

厚生労働行政においてがん対策及びがん研究の推進は重要な位置を占める。がんの早期診断、予後判定、治療効果判定はいずれも重要な課題であり、その方法が種々議論され開発されてきた。転移に関する分子メカニズムの解明は、これらいずれの課題にも極めて重要な解決の糸口となりうるテーマである。転移に関しては、従来考えられてきたよりもごく早い病期のうちから、がん細胞が血液中に流れ出し、やがて多臓器に生着し転移巣を形成するというモデルが新規に提唱され注目を集めている。この血液中に存在する腫瘍細胞は循環腫瘍細胞と呼ばれ、検出個数と予後の悪さには正の相関関係があることが報告されている。一方で循環腫瘍細胞の質的な評価に関しては細胞表面マーカーや遺伝子発現に着目した報告が行われているのみであり、評価方法は未だ十分に確立されていない。本研究はこの評価方法を確立し病理診断に応用するために、ナノ粒子等を補助剤として活用した一細胞レベルの超高解像度解析能を備えた循環腫瘍細胞観察可能な質量顕微鏡の開発を目的とする。

質量顕微鏡は研究代表者らが開発してきた質量分析手法であり、生体試料を直接的に二次元質量分析することにより、試料組織上生体物質の種類、

位置、相対量を解析する手法である。循環腫瘍細胞観察可能な質量顕微鏡が医療分析機器ジャンルとして成立すれば、国内医療機器産業の振興につながり国内経済にも好影響を及ぼすことが期待できる。

本研究では、循環腫瘍細胞の新規な質的評価方法として用いることのできる一細胞質量顕微鏡法を開発する。質量顕微鏡法ではナノ粒子等を補助剤として用いることにより多くの分子種が観察できることを、研究代表者らは証明してきた。本研究では、新たな循環腫瘍細胞解析機器の確立を目指すために、担がん患者検体から循環腫瘍細胞を回収し統合的解析を行う。末梢血および比較試料である原発巣組織の主な採取対象として乳がんを設定する。乳がんは女性特有のがんであり、中年年齢層における発症が少なくないことから、本研究は厚生労働行政の目指す「女性特有のがん対策の推進」及び「働く世代のがん対策」に貢献すると考えられる。

本事業年度は、臨床検体を用いた循環腫瘍細胞の解析を継続し、質量顕微鏡によって得られた測定データと病態評価因子の関連性について解析することにより、質量顕微鏡の臨床的有用性を調べた。

B．研究方法

医薬品医療機器総合機構（PMDA）の薬事戦略相談において本事業のこれまでの結果を提示して助言を受けて、本事業年度の研究方法を策定した。開発される新規医療機器は臨床的有用性を持つことが重要であるとの助言を得たことから、質量顕微鏡の臨床的有用性を調べるため、1) 担がん患者検体の収集、2) 臨床検体の質量顕微鏡解析、3) 病態評価因子と質量顕微鏡解析データ間での関連性の分析、を行なった。

1) 担がん患者検体の収集

臨床検体の取得にあたっては、浜松医科大学乳腺外科および浜松医療センター乳腺外科で、診断もしくは治療を目的として組織採取を行う乳がん患者を対象とした。脂質解析に関する結果の比較対象として、骨髄腫検体測定による得られるデータも活用した。十分なインフォームドコンセントの後、同意の得られた患者から、生検組織採取とともに循環腫瘍細胞採取のため末梢血の採血を行なった。本事業年度は、予算継続審査の際に評価委員より提示されたコメントに従い、対象疾患として乳がんを優先した。収集検体の背景情報は、研究協力者の所属施設において連結可能匿名化の上管理した。

2) 臨床検体の質量顕微鏡解析

試料の回収と解析にあたっては、本課題において昨年度までに新規に創出された、インジウム酸化スズ—MAS コーティングスライドガラス (ITO-MAS コートスライドガラス) を用いた。

循環腫瘍細胞の選択の基本手法としては、全体計画の通り磁気細胞分離法とフローサイトメトリー法を利用した。測定対照として乳がん細胞株 SKBR-3 およびヒト骨髄腫細胞を使用した。原発巣の単一細胞化には、研究全体計画時に考案した通り、検体組織をメスで小断片化した後に酵素処理する方法を用いた。フローサイトメトリー法により細胞を単離および回収した後、一細胞質量顕微鏡解析した。

3) 病態評価因子と質量顕微鏡解析データ間での関連性の分析

データ解析には専用ソフトウェアである MS Imaging Solution 解析を用いた。各測定領域のデータセットを陰性対照領域のデータセットと統合し、リン脂質のシグナル強度に関して統計有意差を示す測定領域を抽出し、一細胞由来のシグナルを検出した測定領域であると定義した。末梢血中からのソーティング数より少ない検出領域数を示した検体のみを最終的な解析に使用した。抽出された測定領域を統合し、原発巣群—循環腫瘍細胞群間での群間検定、および患者予後で区分した循環腫瘍細胞群の群間検定に用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は浜松医科大学の医の倫理審査委員会による承認の下に遂行された。該当する患者に当研究に関して患者用説明文書を用い、研究への協力の可否が治療の質に影響しないこと、研究への協力が危険を伴わないこと、研究協力者及び家族の意思を第一に尊重することを十分に説明し、インフォームドコンセントを得られた場合、文書による

同意書を得て、疫学研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号) および臨床研究に関する倫理指針 (平成 16 年厚生労働省告示第 4 5 9 号) に厳正に則り研究を施行した。試料は連結可能匿名化を行い情報管理者が適切に管理した。

C. 研究結果

1) 担がん患者検体の収集

本事業年度は、対象疾患として乳がんを優先するとともに、ヒト末梢血及び原発巣検体収集も行なった。平成 25 年度の取得検体数は末梢血 32 検体、原発巣 15 検体であった。また、脂質解析に関する結果の比較対象として、骨髄腫患者から末梢血及び骨髄腫検体を採取し、同様の解析を行なった。検体数は末梢血 1 検体、骨髄 3 検体であった。

2) 臨床検体の質量顕微鏡解析

松浪硝子工業株式会社との共同研究により解析用素材として新たに開発された ITO-MAS コートスライドガラスの製品としての普及を進めた。このスライドガラスは、松浪硝子工業株式会社より販売品目 SI0020M および SI0100M として販売されている。

原発巣・循環腫瘍細胞間の脂質組成比較に際し、引き続き多施設からの検体供与を継続し、平成 25 年度はデータ解析に供する検体数を増やした。

3) 病態評価因子と質量顕微鏡解析データ間での関連性の分析

CD326 陽性、CD45 陰性循環腫瘍細胞の質量顕微鏡解析を行い、MS Imaging Solution 解析ソフトウェアにより原発巣検体試料に由来する細胞の質量顕微鏡法解析結果との比較を行なった。ホスファチジルコリン (PC) (32:4) に相当する質量電荷比 (m/z) 748.5 が循環腫瘍細胞において原発巣の 2.0 倍の平均シグナル強度を示すことを明らかにした。さらに患者予後を代表する因子として採血時点で病態コントロール可能な状態であったかどうかを指標として患者を予後良好群・予後不良群の 2 群に分類したときに、PC (34:3) に相当する m/z 794.5 が予後良好群において予後不良群の 1.7 倍の平均シグナル強度を示すことを明らかにした。これらのことから、PC (32:4) 及び PC(34:3) を病態や患者予後と関連する循環腫瘍細胞の新たな質的評価軸を質量顕微鏡によって示すことが可能となった。また、比較対象として実施した骨髄腫患者検体を用いた一細胞解析においては、末梢血中骨髄腫細胞対骨髄腔内骨髄腫細胞間の比較を行い、骨髄腔内細胞に比べ末梢血中細胞ではパルミチン酸の検出量が大きい傾向にあることを見出した。骨髄腫細胞の由来の違いを質量顕微鏡によって示

すことが可能となった。

D . 考察

1) 担がん患者検体の収集

他施設と連携し症例の収集を継続し、目標検体数である 80 検体を上回る合計 108 検体の収集を達成することができた。収集された検体から循環腫瘍細胞及び原発巣の分子プロファイルを取得し、臨床情報と質量顕微鏡解析結果の統合的解析に結びつけることができた。

2) 臨床検体の質量顕微鏡解析

循環腫瘍細胞の定義領域のバックグラウンドノイズのより少ないものへと変更させ、安定的な解析手法として固定した。ITO-MAS コートスライドガラスは、本研究課題においてナノ粒子等を補助剤として活用する循環腫瘍細胞の質量顕微鏡解析に適した新たな素材を探索する中で創出され、循環腫瘍細胞の高効率での回収と高感度測定に有用に機能した。本事業年度を通して一般販売まで漕ぎ付けることができた。今後も一細胞解析を始めとする微量サンプルの質量顕微鏡解析に広く用いられることが期待される。

3) 病態評価因子と質量顕微鏡解析データ間での関連性の分析

乳がん循環腫瘍細胞の質量顕微鏡解析によって、循環腫瘍細胞を質的に評価するための分子として、PC (32:4)、PC (34:3) が発見された。中でも PC (34:3) は患者病態と関連する新規分子マーカーであることから、循環腫瘍細胞の質量顕微鏡を用いた解析の臨床的有用性が示された。また、骨髓腔中の骨髓腫細胞細胞膜において、末梢血に比べてバルミチン酸含有量が少ない傾向を示すことが、質量顕微鏡を用いることによって可能となった。このことは質量顕微鏡が種類の異なる複数のがんの観察が可能であることを示している。

E . 結論

乳がん患者の原発巣と末梢血から採取された細胞を材料として質量顕微鏡解析を行い、原発巣と循環腫瘍細胞において異なるシグナル強度を示す代謝物を明らかにすることができた。この結果、これまで個数のみで評価されていた循環腫瘍細胞を質的に評価することが質量顕微鏡によって可能となった。この結果、ナノ粒子等を補助剤として活用した循環腫瘍細胞観察可能な質量顕微鏡が開発された。

F . 健康危険情報

本事業年度、特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

G . 研究発表

1. 論文発表

【原著論文】

- (1) Ide Y, Waki M, Ishizaki I, Nagata Y, Yamazaki F, Hayasaka T, Masaki N, Ikegami K, Kondo T, Shibata K, Ogura H, Sanada N, Setou M. Single Cell Lipidomics of SKBR-3 Breast Cancer Cells by Using Time-of-Flight Secondary-Ion Mass Spectrometry. Surf Interface Anal. in press.
- (2) Nagata Y, Ishizaki I, Waki M, Ide Y, Hossen A, Ohnishi K, Sanada N, Setou M. Glutaraldehyde Fixation Method for Single-Cell Lipid Analysis by Time-of-Flight Secondary Ion-Mass Spectrometry. Surf Interface Anal. in press.
- (3) Uchiyama Y, Hayasaka T, Masaki N, Watanabe Y, Masumoto K, Nagata T, Katou F, Setou M. Imaging mass spectrometry distinguished the cancer and stromal regions of oral squamous cell carcinoma by visualizing phosphatidylcholine (16:0/16:1) and phosphatidylcholine (18:1/20:4). Anal Bioanal Chem. 2014 Feb;406(5):1307-16. doi: 10.1007/s00216-013-7062-3. Epub 2013 Jun 1.
- (4) Ide Y, Waki M, Hayasaka T, Nishio T, Morita Y, Tanaka H, Sasaki T, Koizumi K, Matsunuma R, Hosokawa Y, Ogura H, Shiiya N, Setou M. Human Breast Cancer Tissues Contain Abundant Phosphatidylcholine(36:1) with High Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression. PLoS One. 2013 Apr 16;8(4):e61204. doi:10.1371/journal.pone.0061204. Print 2013.
- (5) Morita Y, Sakaguchi T, Ikegami K, Goto-Inoue N, Hayasaka T, Hang VT, Tanaka H, Harada T, Shibasaki Y, Suzuki A, Inaba K, Murakami M, Setou M, Konno H. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. J Hepatol. 2013 Aug;59(2):292-9. doi: 10.1016/j.jvs. 2013.01.030. Epub 2013 Apr 6.

【和文総説】

- (1) 佐野圭吾、瀬藤光利、質量顕微鏡法を用いた生体組織解析、医学書院「生体の科学」、2013年12月64巻6号 p614-620
- (2) 松下祥子、瀬藤光利、質量顕微鏡を用いた医薬研究の発展、ファルマシア、2013年12月49巻12号 p1159-1163
- (3) 佐野圭吾、瀬藤光利、走査型レーザーイオン化による生体組織の質量イメージング、日本光学会(応用物理学会)、2013年11月42巻11号 p555-561
- (4) 稲見勝朗、瀬藤光利、顕微鏡と画像データ処理：質量顕微鏡、ぶんせき、2013年第8号 p470-471
- (5) 早坂孝宏、瀬藤光利、質量顕微鏡を用いたホメオスタシス破綻の可視化、The Lipid、2013

【英文著書】

- (1) Waki M, Sugiyama E, Kondo T, Sano K, Setou M. Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization for Metabolite Imaging. Methods Mol Biol. in press.

【和文著書】

- (1) 永田泰之、井手佳美、瀬藤光利、最新生理活性脂質研究-実験手法、基礎的知識とその応用-(第 1 章)技術編 質量顕微鏡 遺伝子医学 MOOK、2013 年、24 号 p71-76.
- (2) 近藤豪、瀬藤光利、医用質量分析ガイドブック 疾患のイメージング質量分析、診断と治療社、2013 年 12 月 25 日 p121-126

2. 学会発表

- (1) 井手佳美、脇紀彦、小倉廣之、瀬藤光利、1 価不飽和脂肪酸を含むホスファチジルコリンが乳癌癌部に高集積する 質量顕微鏡法による乳癌脂質解析、第 72 回日本癌学会、横浜、2013 年 10 月
- (2) Yoshimi Ide, Michihiko Waki, Itsuko Ishizaki, Yasuyuki Nagata, Hiroyuki Ogura, Noriaki Sanada and Mitsutoshi Setou, Single-Cell Analysis of Human Breast Cancer Cells by Secondary-Ion Mass Spectrometry, 19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry、韓国、2013 年 9 月
- (3) Yasuyuki Nagata, Itsuko Ishizaki, Yoshimi Ide, Michihiko Waki, Kazunori Ohnishi, Noriaki Sanada and Mitsutoshi Setou, Single Cell Analysis of Multiple Myeloma With Secondary Ion Mass Spectrometry, 19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry、韓国、2013 年 9 月
- (4) 永田 泰之、石崎 逸子、井手 佳美、脇 紀彦、大西 一功、眞田 則明、瀬藤 光利、多発性骨髄腫細胞における脂肪酸組成の変化、日本医用マススペクトル学会、神戸、2013 年 9 月
- (5) 瀬藤光利、細胞・組織の 2 D 質量分析イメージング、日本学術会議公開シンポジウム「医学・生命科学の革新的発展に資する統合バイオイメージングの展望」、東京、2013 年 9 月
- (6) 瀬藤光利、創薬における質量顕微鏡法の可能性、創薬薬理フォーラム 第 21 回シンポジウム、東京、2013 年 9 月
- (7) Mitsutoshi Setou, Advanced Applications of Imaging Mass Spectrometry in Clinical Research, Imaging Mass Spectrometry Workshop、韓国、2013 年 7 月

- (8) 瀬藤光利、質量顕微鏡研究とトランスレーショナルリサーチ、第 21 回日本乳癌学会学術総会、浜松、2013 年 6 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- (1) 出願番号：2013-177105 出願日：2013/8/28
タイトル：骨髄腫細胞死誘導剤及びこれを含む骨髄腫治療用医薬組成物、発明人：永田泰之、瀬藤光利

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌【原著論文】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ide Y, Waki M, Ishizaki I, Nagata Y, Yamazaki F, Hayasaka T, Masaki N, Ikegami K, Kondo T, Shibata K, Ogura H, Sanada N, Setou M.	Single Cell Lipidomics of SKBR-3 Breast Cancer Cells by Using Time-of-Flight Secondary-Ion Mass Spectrometry.	Surf Interface Anal.	in press.	in press.	2014
Nagata Y, Ishizaki I, Waki M, Ide Y, Hossen A, Ohnishi K, Sanada N, Setou M.	Glutaraldehyde Fixation Method for Single-Cell Lipid Analysis by Time-of-Flight Secondary Ion-Mass Spectrometry.	Surf Interface Anal.	in press.	in press.	2014
Uchiyama Y, Hayasaka T, Masaki N, Watanabe Y, Masumoto K, Nagata T, Katou F, Setou M.	Imaging mass spectrometry distinguished the cancer and stromal regions of oral squamous cell carcinoma by visualizing phosphatidylcholine (16:0/16:1) and phosphatidylcholine (18:1/20:4).	Anal Bioanal Chem.	406(5)	1307-16	2014
Ide Y, Waki M, Hayasaka T, Nishio T, Morita Y, Tanaka H, Sasaki T, Koizumi K, Matsunuma R, Hosokawa Y, Ogura H, Shiiya N, Setou M.	Human Breast Cancer Tissues Contain Abundant Phosphatidylcholine(36:1) with High Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression.	PLoS One.	8(4)	e61204	2013
Morita Y, Sakaguchi T, Ikegami K, Goto-Inoue N, Hayasaka T, Hang VT, Tanaka H, Harada T, Shibasaki Y, Suzuki A, Inaba K, Murakami M, Setou M, Konno H.	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression.	J Hepatol.	59(2)	292-9	2013

雑誌【和文総説】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐野圭吾、瀬藤光利	質量顕微鏡法を用いた生体組織解析	医学書院「生体の科学」	64巻6号	p614-620	2013
松下祥子、瀬藤光利	質量顕微鏡を用いた医薬研究の発展	ファルマシア	49巻12号	p1159-1163	2013
佐野圭吾、瀬藤光利	走査型レーザーイオン化による生体組織の質量イメージング	日本光学会(応用物理学会)	42巻11号	p555-561	2013
稲見勝朗、瀬藤光利	顕微鏡と画像データ処理：質量顕微鏡	ぶんせき	第8号	p470-471	2013
早坂孝宏、瀬藤光利	質量顕微鏡を用いたホメオスタシス破綻の可視化	The Lipid	24巻3号	p4-11	2013

書籍【英文著書】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Waki M, Sugiyama E, Kondo T, Sano K, Setou M.	Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization for Metabolite Imaging.	Walker, John M.	Methods Mol Biol.	Springer	ドイツ	2014	in press.

書籍【和文著書】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
永田泰之、井手佳美、瀬藤光利	最新生理活性脂質研究-実験手法、基礎的知識とその応用- (第1章) 技術編 質量顕微鏡	青木淳賢、杉本幸彦、村上誠	遺伝子医学MOOK	株式会社メディカルドゥ	日本	2013	p71-76
近藤豪、瀬藤光利	疾患のイメージング質量分析	丹羽利充、野村文夫	医用質量分析ガイドブック	診断と治療社	日本	2013	p121-126