

Ⅲ-2 ヒト癌細胞を用いたマウス血中循環腫瘍細胞 バイオアッセイモデルの確立

学術研究部医学系 講師 奥村知之

【目的】

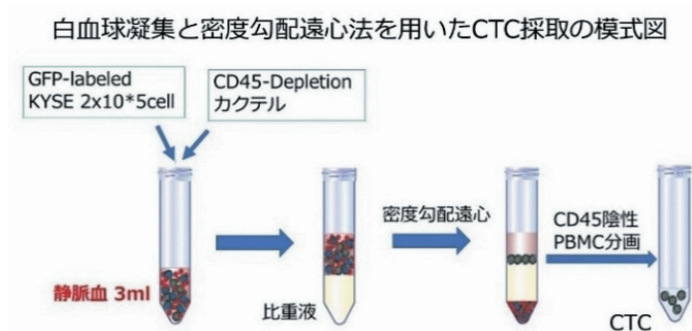
近年、様々な癌種において血中循環腫瘍細胞（CTC）が検出されるようになり Liquid Biopsy の一つとして転移予測や治療効果予測などの診断的意義が検討されている。一方、これまでの CTC 研究は上皮細胞マーカーEpCAM の発現を指標に捕捉した細胞数をカウントすることで癌の臨床病期や治療効果、予後との相関を検討したものがほとんどであり、CTC の悪性形質に関わる分子機構や治療標的としての機能解析は進んでいない。

我々はこれまでに p75NTR や CD44 の発現に基づいて食道癌および胃癌における腫瘍幹細胞を同定分離し分子機構解析を進めるとともに、EpCAM と p75NTR や CD44 を組み合わせて CTC を検出することでより臨床病理学的特性を反映した CTC を検出できることを報告してきた。本研究では、食道癌細胞を用いて CTC における悪性形質制御機構の解明と新規治療開発への応用を目的として、ヒト癌細胞を用いたマウス CTC バイオアッセイモデルの確立とその臨床応用を目指す。

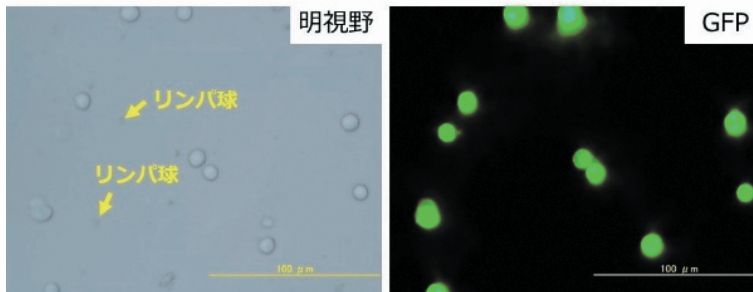
【方法と結果】

① 密度勾配遠心法を用いた CTC 捕捉

健康人ボランティアから抹消静脈血を採取し、KYSE30 および KYSE140 を 1000 細胞/ml 混和したのち白血球抗原 CD45 Depletion カクテルで処理し、密度勾配遠心によって単核球層を採取した。単核球層内には単球およびリンパ球とともに N/C 比が高く大型の細胞を多数確認した。さらに回収した細胞を培養条件に播種したところフラスコへの付着・増殖および継代によって KYSE を生細胞として回収できることを示した。



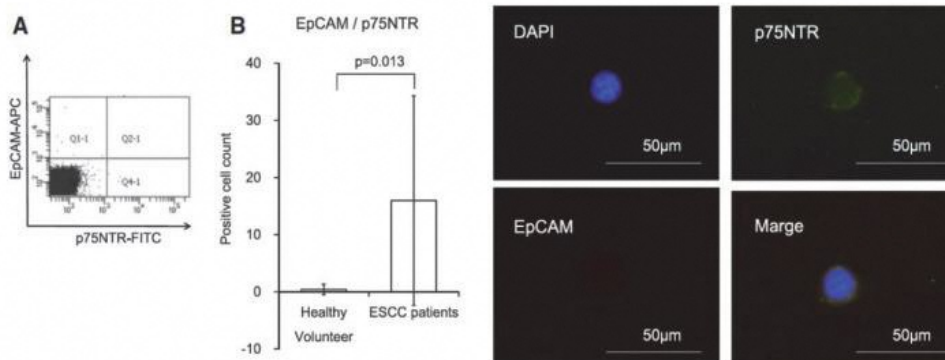
血液に混和したGFP標識-KYSE140の回収と画像取得



② 捕捉細胞を用いた多重染色

上記①によって捕捉した細胞を用いて、CD45-PE、EpCAM-APC、p75NTR-FITC および DAPI 染色を行い、蛍光顕微鏡画像を検討したところ、CD45 陰性/EpCAM 陽性/p75NTR 陽性細胞、CD45 陰性/EpCAM 陽性/p75NTR 陰性細胞、CD45 陰性/EpCAM 陰性/p75NTR 陽性細胞、CD45 陰性/EpCAM 陰性/p75NTR 陰性細胞、CD45 陽性/EpCAM 陰性/p75NTR 陽性細胞、CD45 陽性/EpCAM 陰性/p75NTR 陰性細胞に分別できる可能性が示された。これまでに KYSE を用いた癌幹細胞(CSC)分離に関する当科からの報告 (Int J Oncology 2017、Int Surgery 2018) と比較すると、上記細胞フラクションはそれぞれ MET-CSC、non-CSC、EMT-CSC、non-CSC、リンパ球、単球に相当する可能性が考えられた。

食道癌患者血液を用いたフローサイトメトリーによるCTC検出と細胞分離

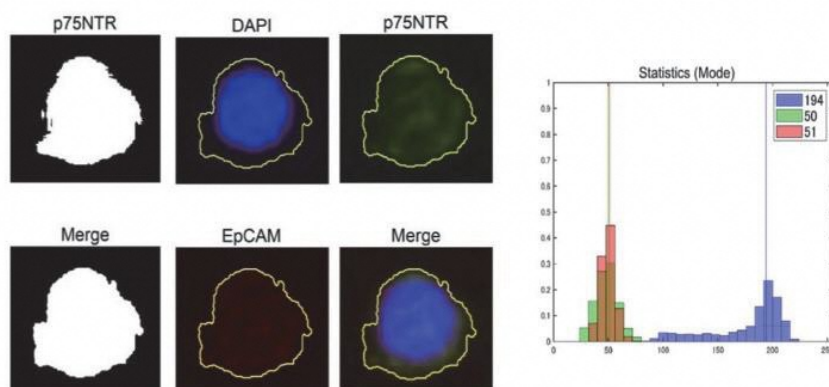


③ 捕捉細胞の画像解析

画像解析システムの確立に向け、KYSE30, KYSE140, 白血球, 正常食道細胞を用いて CD45-PE、EpCAM-APC、p75NTR-FITC および DAPI 染色を行い蛍光顕微鏡画像を取得したところ、各細胞における輝度値分布の違いが確認でき、高い精度で細胞フラクショ

ンを識別するアルゴリズムを確立できる可能性が考えられた。現在、上記②にて染色した捕捉細胞の画像解析を進めている。

食道癌患者血液から分離したCTC画像を用いた画像判別



【考察と今後の展望】

上記①-③の結果から、抹消血液中の単核球層から CTC およびその細胞フラクシオンを画像解析によって判別するシステムを構築できる可能性が示された。

今後はマウス皮下および後胃に食道癌細胞株を移植し、血行性転移モデルを作成したうえで、抹消血液を採取し、上記①-③にて確立した CTC 捕捉・画像解析システムによる検討を行い、EMT-CTC および MET-CTC など CTC 内の細胞フラクシオンを同定するシステムを確立する。さらに確立したシステムを用いた臨床研究立ち上げを目指す。

本研究の利点は、低侵襲で容易に採取できる患者血液を用いた Liquid Biopsy の一つとして CTC の分離・培養によって、血行性転移が問題となるあらゆる癌種において細胞生物学的特性解析と遺伝子発現解析の両方に使用可能な試料を提供することができることである。また、このシステムは新規薬剤候補分子のスクリーニング、効果・安全性試験および POC 取得にも応用できるものと考えられる。今後、医薬品開発全般に寄与することが期待される。