

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19925

研究課題名（和文）バイオマテリアルコートによる循環大腸癌細胞の培養と薬剤感受性試験系の構築

研究課題名（英文）Establishment of culture and drug sensitivity test system of circulating tumor cell by biomaterial coating

研究代表者

三宅 祐一郎 (MIYAKE, Yuichiro)

大阪大学・医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：80724260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では誘電泳動法を用いて末梢循環癌細胞（Circulating Tumor Cell; CTC）採取を行い、単一細胞遺伝子解析法の確立を目指した。大腸癌細胞株を用いたスパイク試験の結果、75%程度の細胞を回収した。また、回収したシングルセルの遺伝子変異を高い確率で検出出来た。さらに、患者サンプルを用いた検討においてもシングルセルレベルでの遺伝子変異検出が可能であった。特に上皮性マーカー陰性のCTCでもPIK3CA, KRAS遺伝子に変異が認められたことから、EpCAM抗体のみによるCTCの検出には限界がある事を示している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have challenged the development of single cell gene analysis of circulating tumor cell by using dielectrophoresis. As a result of spike test using colon cancer cell lines, we could collect approximately 75% cancer cells that were mixed in the blood sample. Gene mutations were also detected at the single cell level in both CK-positive and CK-negative CTCs of the patients with colorectal cancer. These findings indicate that detection system using the EpCAM antibody has limitation to collect up all CTCs.

研究分野：消化器外科

キーワード：末梢循環癌細胞 シングルセル 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

原発巣から遊離した癌細胞が血管内に浸潤することで末梢循環癌細胞（Circulating Tumor Cell；CTC）となり、肝臓や肺で血管外に浸潤し転移巣の根源となる。末梢血液中に少数しか存在しない CTC の検出には EpCAM やサイトケラチン（CK）抗体を用いて上皮細胞マーカーを発現する CTC を捉える CellSearch システムがよく知られる。このシステムを用いた臨床研究の結果、乳癌を始めとして CTC の同定数は予後予測や治療効果判定に有用であると報告されている（Hiraiwa et al. Ann Surg Oncol 2008, Cohen et al. Ann Oncol 2009, Tol et al. Ann Oncol 2010, Seebarg et al. Ann Surg 2015）。しかし、CTC を用いた化学療法の in vitro 感受性試験は CTC が少数であることから困難である。

2. 研究の目的

大腸癌の CTC は比較的少数であることから予後マーカーとしての意義は限定的である。一方で、大腸癌治療では新規の分子標的治療薬の開発が進み、手術適応のない高度担癌状態患者の CTC を利用した癌細胞の遺伝子変異の検出や、薬剤感受性試験の需要は益々高まっている。本研究の目的は誘電泳動法を用いた single cell level での CTC 採取を行い、単一細胞遺伝子解析法の確立を目指す。さらに採取した CTC を E-cadherin-FC マトリックスでコーティングしたプレートで培養し、細胞にプレート側から細胞内シグナルを発生させ、少数の細胞を増やす方策を探る。

3. 研究の方法

○大腸癌細胞株

(1)Spike 試験

大腸癌細胞株を用いたスパイク試験を実施する。Healthy donor から採取した末梢血 3ml に大腸癌細胞株を 0 個、10 個、100 個程度スパイクし、Ficoll 法にて濃縮した単核球をホルマリン固定および膜透過処理を行った後に、誘電泳動技術（図 1）を用いて微細孔（図 2）へ single cell level で補足させる。その後、蛍光標識した抗 CK 抗体（pancytokeratin AE1/AE3）、抗 CD45 抗体および DAPI にて染色し、CK 陽性および CD45 陰性細胞の検出率を算出する。

図 1

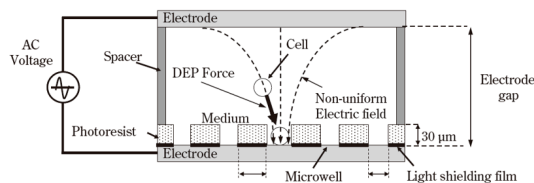
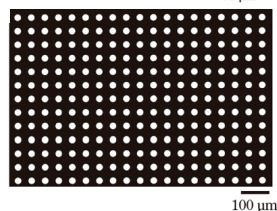


図 2



2)Single cell 遺伝子解析

1)にて検出された細胞をマイクロマニピュレータを用いて single cell として採取した後、全ゲノム増幅を行う。増幅された product を大腸癌に特異的な遺伝子変異（APC, p53, K-ras, B-raf, PIK3CA）領域のプライマーを用いて PCR を行い、最終的に PCR 産物のサンガーシーケンスを行う。読み取られた遺伝子変異が細胞株の遺伝子変異と一致しているかどうかの確認を行う。

3)培養

1)にて検出された細胞をマイクロマニピュレータを用いて、複数個採取した後に非接着培地に播種し EGF と basic FGF (bFGF) を添加した serum free medium に浸して 4%O₂ 下で培養する。EGF や bFGF の細胞培養における至適濃度を条件検討し、最も培養効率のよい条件を決定する。あるいは E-cadherin-FC マトリックス上で培養し、細胞内シグナルの活性化をはかる。

○CTC

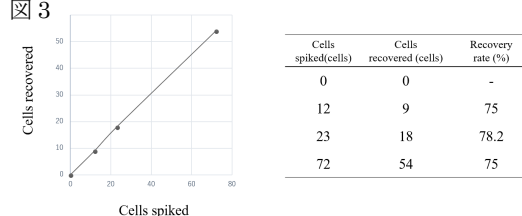
細胞株と同様に免疫染色を行い、CK 陽性細胞を single cell にて採取し、上記の大腸癌に多い遺伝子変異の有無を検索する。さらに採取した CTC の培養を行う上で至適条件を探る。

4. 研究成果

(1)Spike 試験

大腸癌細胞株（HT29）を healthy donor の採血に spike（0, 12, 23, 72 個）し、大腸癌細胞数を含んだ単核球分画のみに濃縮した後に電気泳動法にて微細孔に単核球を捕捉させ、免疫染色を行った。抗 CK 抗体にて染色された細胞をカウントし、回収率を算出した。それぞれ spike した細胞数に対する回収率は 75, 78.2, 75%であり、spike 数と検出数は相関していた（図 3）。

図 3 Spike test



(2)Single cell 遺伝子変異解析：細胞株

染色された細胞株（HCT116, HT29, DLD-1, RK0）をマイクロマニピュレータを用いて single cell にて回収し、K-ras, B-raf, PIK3CA 領域の PCR を行い、その product のサンガーシーケンスを行った。PCR 可能であった sample は 4 細胞株全体で 89%（59/66）であった。サンガーシーケンスは PCR 可能であった細胞のみ行っており、同領域の塩基配列が確認できたのは細胞株全体で 95%（56/59）であった。多数の細胞株（non-single cell）から別に直接抽出した DNA を用いて同様にサ

ンガーシークエンスを行った結果と比較すると non-single cell における遺伝子変異が hetero であった場合、single cell においても同様の結果であった。以上よりホルマリン固定および膜透過処理後の single cell からのシークエンス成功率は高いものであった。

(3) 臨床検体からの CTC の採取とシングルセル変異解析

StageIV 大腸癌および再発大腸癌患者 24 人に対して採血を行い、CTC の検出を試みた。24 症例のうち、CK 陽性細胞を検出できたのは 7 症例のべ 18 個の CK 陽性細胞を確認できた。そのうち採取可能であったのは 14 個であった。14 個全てにおいてサンガーシークエンスは可能であった。またサイズの大きい CK 陰性・CD45 陰性細胞を 8 症例のべ 25 個認め、うち採取可能であったのは 21 個であった。こちらも同様に 21 個全てにおいてサンガーシークエンスが可能であった。

○ CK 陽性細胞

CK 陽性細胞のうち、サンガーシークエンスにおいて遺伝子変異を確認できたのは 2 症例のべ 3 個であった。いずれも PIK3CA 領域の変異であり、K-ras および B-raf については 14 個全て wild type であった。

○ CK 陰性細胞

CK 陰性細胞のうち、遺伝子変異を 2 症例 2 個で確認された。一つは PIK3CA 領域に変異を認め、もう一つは k-ras 領域に変異を認め、CK 陰性の CTC が存在することが示唆された(図 4)。

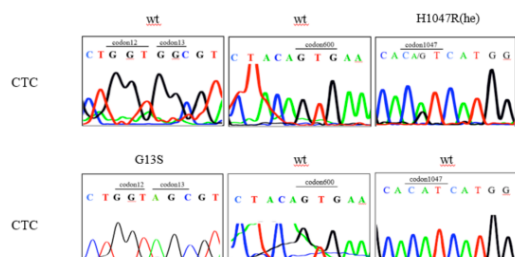


図 4. 上段が PIK3CA 領域に変異を認めた CTC で、下段が k-ras 領域に変異を認めた CTC。wt:wild type。

(4) CTC の培養

電気泳動装置において、生細胞の状態 CTC を採取することが困難であったために、培養技術の構築はできなかった。代わりに大腸癌の細胞株 SW480, HCT116 を用いて E-cad-FC マトリックス上で培養を行った。Preliminary な結果であるため、詳細は控えるが、ウエスタンや免疫染色から EMT (epithelial mesenchymal transition) の変化が誘導され、1 個の細胞では死にやすいが、EMT のシグナルが入った細胞は生き残る傾向がみられ、今後の応用が期待できる。

血中の癌細胞らしき大型の細胞は、上皮性細

胞マーカー陽性、間葉系細胞マーカー陰性を目安に採取されることが、セルサーチシステムでも前提とされている。しかし、大型の細胞でも真の癌細胞かどうか悩ましい細胞は少なくなく、真の癌細胞の同定には癌に特徴的な遺伝子変異が十分条件となる。本研究では、シングルセルレベルでの遺伝子解析法を細胞株、ついで臨床検体で確立し、真の癌細胞の同定した。その結果、従来の上皮マーカー陰性の細胞の中にも、遺伝子変異が同定されるものが混じっていることが明らかとなった。細胞培養の基礎検討では E-cadherin-FC プレートを利用することで、大腸癌細胞株に人工的に EMT の細胞内シグナルを発生させることが分かり、今後の CTC 培養の方法として試用してゆく予定である。

<引用文献>

- ① Hiraiwa K, Takeuchi H, et al. Hasegawa H, Saikawa Y, Suda K, Ando T, Kumagai K, Irino T, Yoshikawa T, Matsuda S, Kitajima M, Kitagawa Y. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol.* 15(11), 2008, 3092-100. DOI: 10.1245/s10434-008-0122-9.
- ② Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 20(7), 2009, 1223-9. DOI: 10.1093/annonc/mdn786.
- ③ Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJ, Vos AH, Nagtegaal ID, Terstappen LW, Punt CJ. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol.* 21(5), 2010, 1006-12. DOI: 10.1093/annonc/mdp463.
- ④ Seeberg LT1, Waage A, Brunborg C, Hugenschmidt H, Renolen A, Stav I, Bjørneth BA, Brudvik KW, Borgen EF, Naume B, Wiedswang G. Circulating tumor cells in patients with colorectal liver metastasis predict impaired survival. *Ann Surg.* 261(1), 2015, 164-71, DOI: 10.1097/SLA.0000000000000580.

5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

三宅祐一朗、山本浩文、高橋秀和、原口直紹、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹 大腸癌患者における血液循

環癌細胞の単細胞遺伝子変異解析の検討、日本消化器外科学会総会、2017、金沢

野村雅俊、原口直紹、三宅祐一郎、高橋秀和、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹、山本浩文 大腸癌細胞の single cell 遺伝子解析法の検討、日本癌学会学術総会、2017、横浜

野村雅俊、原口直紹、三宅祐一郎、野田菜央、高橋秀和、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹、山本浩文 ホルマリン固定後大腸癌細胞の single cell 遺伝子解析法の確立、日本外科学会定期学術集会、2017、横浜

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 祐一郎 (MIYAKE, Yuichiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・
招へい研究員
研究者番号：80724260

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()