

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02878

研究課題名(和文)食道癌における血液循環癌幹細胞の免疫応答回避機構解明による転移制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of metastasis control method by elucidation of immune response evasion mechanism of blood circulating cancer stem cells in esophageal cancer

研究代表者

藤井 努 (FUJII, Tsutomu)

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：60566967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：期間全体を通じて食道扁平上皮癌切除標本を用いた静止期癌幹細胞の同定分離を行った。初年度内に癌幹細胞の同定が不可能であった為、次年度より免疫不全マウス皮下移植モデルより採取した細胞の培養条件を再設定し良好な結果を得た。癌細胞の培養を介さずに癌組織から直接、癌幹細胞や腫瘍浸潤リンパ球などの間質細胞を採取する工程やCTC検出をEGFRやPLS3などEMTによって変化しない上皮マーカーをEpCAMに置き換え細胞を分離し、より高い癌幹細胞形質をもつ細胞フラクションを検出するマーカーセットを探索した結果、切除標本の症例について術前の末梢血液を採取しフローサイトメトリーによってp75NTRの発現を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液循環癌幹細胞における特異的免疫回避機構を解析することで、遠隔転移を制御する新たな免疫治療標的を探索する基礎研究である。さらに、リキッドバイオプシーとしての末梢血液循環癌幹細胞検出法を開発することで食道扁平上皮癌に対するテーラーメイド免疫療法の確立および臨床応用が可能となる。難治である食道扁平上皮癌の遠隔転移を制御することで治療を進歩させることができる。

研究成果の概要(英文)：Throughout the study period, we identified and isolated quiescent cancer stem cells using resected esophageal squamous cell carcinoma specimens. Since it was not possible to identify cancer stem cells within the first year, the culture conditions for cells collected from immunodeficient mouse subcutaneous transplantation models were re-established in the next year, and good results were obtained. The process of collecting stromal cells such as cancer stem cells and tumor infiltrating lymphocytes directly from cancer tissues without cancer cell culture, and the replacement of CTC detection with EpCAM for epithelial markers such as EGFR and PLS3 that are not changed by EMT, enabled us to isolate cells and detect cell fractions with higher cancer stem cell traits. In cases of resected specimens, p75NTR expression was detected by flow cytometry in preoperative peripheral blood.

研究分野：消化器外科学

キーワード：静止期癌幹細胞 血液循環癌幹細胞 食道扁平上皮癌 CTC T細胞受容体遺伝子 食道癌

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は代表的な難治性癌である。申請者らは、基盤研究 C-15K10088 において切除検体および末梢血液より静止期癌幹細胞および血液循環癌幹細胞 (CTSC) を同定分離し、同細胞制御因子の機能解析を可能としてきた。更なる次のステップとして、これらの細胞を標的とした反応性 T 細胞の分離と T 細胞受容体遺伝子および特異的抗体遺伝子の取得に基づいた CTSC における特異的免疫回避機構を解析することで、遠隔転移を制御する新たな免疫治療標的を探索する基礎研究を計画した。さらに、リキッドバイオプシーとしての末梢血液循環癌幹細胞検出法を開発することで食道扁平上皮癌に対するテーラーメイド免疫療法の確立および臨床応用を目指す。難治である食道扁平上皮癌の遠隔転移を制御することで治療を革新的に進歩させることを研究目的とするが、近い将来に同分野に重要な貢献をもたらす研究課題であるといえる。

2. 研究の目的

本邦において食道癌の 90%以上を占める食道扁平上皮癌は、全体の 5 年生存率は 40%と非常に予後不良である。手術の精度や補助療法の開発によって局所制御では改善がみられるものの、進行例における遠隔転移制御が最大の課題であり、最新の腫瘍生物学的知見に基づいた新たな診断・治療法の開発が急務である。遠隔転移形成においては、原発巣に少数存在する癌幹細胞の上皮-間葉転換 (EMT)、脈管浸潤、血液循環、標的臓器での着床と間葉-上皮転換 (MET)、転移部位での腫瘍形成の過程を経るが、すべての過程において癌幹細胞特異的腫瘍免疫回避機構を備えていると考えられている。悪性黒色腫など一部の腫瘍においては癌幹細胞に対する免疫抑制機構が報告されているものの、食道癌をはじめ消化器癌における研究は進んでおらず、また転移過程での CTSC における免疫回避機構についての報告はいままでにない。

本研究においては、癌幹細胞における腫瘍免疫回避機構の解析により新たな癌免疫治療標的を探索し、さらに遺伝子スクリーニングとしての血液循環癌細胞検出法の開発により独創的なテーラーメイド免疫療法を開発することを目的とする。血液循環癌細胞 (CTC) の中でもとくに癌幹細胞 (CTSC) に焦点を絞り、その同定分離と腫瘍免疫研究を結びつけて新規診断治療標的を探索するところに特色があり、申請者および分担研究者らがこれまでに蓄積・開発してきた癌幹細胞の分離同定法、CTC 検出法、さらに反応性 T 細胞採取と特異的遺伝子取得法、ポリマーマイクロ流体チップなどの医工連携技術をヒト切除検体を用いた消化器外科研究に応用することにより遂行が可能になる。

3. 研究の方法

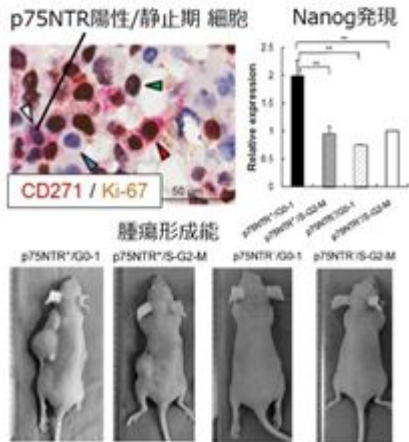
- (1) 食道扁平上皮癌切除標本を用いた静止期癌幹細胞の同定分離
- (2) フローサイトメトリーを用いた CTC の検出と分離
- (3) 微小流路デバイスを用いた CTSC の検出と分離
- (4) 癌幹細胞反応性 T 細胞の単一細胞レベルでの分離と特異的抗体遺伝子および T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の取得

4. 研究成果

当該年度の研究成果は以下の通りである。

- (1) 食道扁平上皮癌切除標本より組織を採取し初代培養細胞を作成した。培養による癌細胞の形質変化を最小限にとどめるため、免疫不全マウス皮下移植を介して細胞採取を行った。この癌細胞を用いて、低親和性神経成長因子受容体 (p75NTR, CD271) と DNA 選択的染色試薬を組合せ p75NTR 陽性/G0G1 細胞をセルソーターを用いて分離し静止期癌幹細胞を同定することができた。癌幹細胞形質の検証には、幹細胞関連分子 (Nanog, p63, Bmi1)、上皮間葉転換関連分子 (E-cadherin, N-cadherin, fibronectin)、薬剤耐性分子 (ERCC1, ABCG2) の発現を RT-PCR 法にて確認した。さらに、EMT によって変化しない上皮マーカー (EGFR と PLS3) を EpCAM に置き換えて細胞を分離した。

図1 p75NTRをマーカーとした
静止期癌幹細胞の同定



- (2) 上記の切除標本の症例について、術前の末梢血液からフローサイトメトリーによって p75NTR の発現を検出した。そして EpCAM/p75NTR に前記にて検証したマーカーを組み合わせ、フローサイトメトリーを用いて標的細胞を検出し臨床病理学的悪性度との相関を検討した。その結果、症例数が多くないものの、PLS3 が悪性度に強く相関するという結果を得た。
- (3) 上記切除標本採取症例について術前の末梢血液を用いて、申請者らが開発したポリマーマイクロ流体チップおよび CTC 捕捉システム (図 2) を用いて前述の癌幹細胞マーカー発現細胞を捕捉した (図 3)。

図2 ポリマーCTCチップ

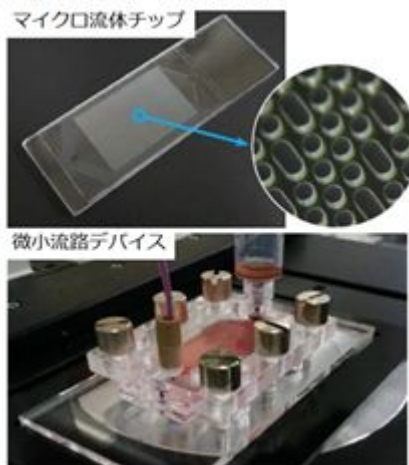
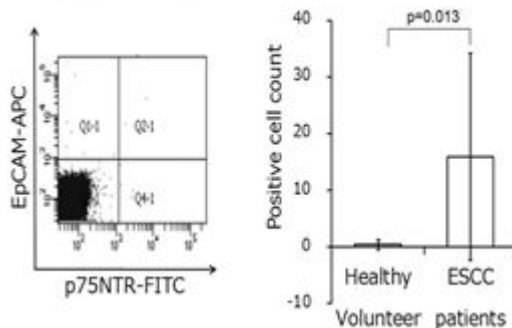


図3 EpCAM / p75NTRを用いたCTC検出



- (4) 癌抗原特異的キラーT細胞1個から抗体遺伝子やT細胞受容体(TCR)遺伝子を取得するシステム(hTEC10)を用いて、癌部および末梢血液からCD8+T細胞をセルソーターを用いて分離、培養し(1)によって分離した癌幹細胞および(2)、(3)にて分離したCTSCと接触させたのち、癌幹細胞反応性T細胞を活性化マーカーであるCD137およびPD-1発現をもとに単一細胞レベルで分離することを試みてきたが、良好な結果を得ることができず、現在も継続して試行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大永 崇 (OHNAGA Takashi) (10416133)	富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・副主幹研究員 (83205)	
研究分担者	奥村 知之 (OKUMURA Tomoyuki) (10533523)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	
研究分担者	吉岡 伊作 (YOSHIOKA Isaku) (30436430)	富山大学・学術研究部医学系・特命講師 (13201)	
研究分担者	平野 勝久 (HIRANO Katsuhisa) (40819405)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	
研究分担者	渋谷 和人 (SHIBUYA Kazuto) (50636248)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	
研究分担者	渡辺 徹 (WATANABE Toru) (50779486)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------