

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16973

研究課題名(和文)メラノーマの転移機序をCirculating tumor cellsから捉える

研究課題名(英文)Isolation of circulating tumor cell from metastatic melanoma mice models

研究代表者

前田 拓 (Maeda, Taku)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：80813542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がんの転移過程において原発巣から遊離し血管内を浮遊する腫瘍細胞は血中循環腫瘍細胞(Circulating tumor cell; CTC)と呼ばれる。メラノーマではCTCの検査手法は確立されておらず、本研究では腫瘍細胞のサイズ、密度、細胞表面マーカーなどの分子生物学的性質を利用してマウスメラノーマモデルにおけるCTC検査手技を検証した。CTC同定のためには複数の検査法の組み合わせが必要であることが考慮されたが、最終的に検査法の確立には至らなかった。検証した検査法のうち密度勾配遠心分離法は、比較的簡便で再現性をもって血液中のCTCを濃縮でき、実験室レベルで有用性が高い検査法と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTCの同定は技術的困難さを伴い、CTC検査法が確立している乳癌や前立腺癌などではCTC値が臨床的に治療の指標として利用されているが、メラノーマでは検査方法が確立されていない。本研究ではマウスモデルを用いて、実験室ベースで可能な比較的簡便で、再現性があるCTC同定手技を確立することを目指した。動物モデルでのCTC検査法の確立は血行性転移のダイナミクスを分子生物学的に検証する点で有用であることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cell(CTC) is a promising cancer biomarker and enables to analysis of metastatic dynamics in the laboratory. However, isolation of melanoma CTC is very challenging. Here, we assessed the ability of multiple techniques with enrichment and detection of melanoma CTC using mice models. We demonstrated several techniques by taking advantage of its biological characteristics such as cell size, cell density, and cell surface marker. We found that density gradient centrifugation was useful in the enrichment of melanoma tumor cells but it was still quite difficult to establish the identification of melanoma CTC.

研究分野：メラノーマ

キーワード：メラノーマ がん転移 血行性転移 血中循環腫瘍細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは悪性度の高い皮膚癌である。血行性に肺などの他臓器へ遠隔転移すると5年生存率は10%前後となり、血行性転移をするかどうかで生命予後は大きく異なる。がんの転移過程において、原発巣から遊離し血管内を浮遊する腫瘍細胞は血中循環腫瘍細胞(Circulating tumor cell; CTC)と呼ばれ、遠隔転移をする前に必ず出現することから、血行性転移を反映するマーカーとしてしられる。¹

近年、担癌患者の血中のCTCを捕捉しこれを分析することで、腫瘍細胞の分子生物学的特性や免疫表現型の変化を非侵襲的に観察できる点で治療に有用であることが期待されている。²しかしCTCの検出は技術的困難さを伴い、CTC検出法が確立している乳癌や前立腺癌などではその値が化学療法の効果判定の指標として利用されているが、メラノーマにおいては検査方法が確立されておらず、臨床応用には至っていない。

2. 研究の目的

メラノーマ動物モデルにおいてCTC検出手技を確立できれば、血行性転移のダイナミクスを分子生物学的に検証する点で大きく有用である。本研究においてマウスモデルを用いて、実験室ベースで可能な比較的簡便で、再現性があり、高い感度でCTCを同定できる検査手法を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

血液細胞中から数個のCTCを同定するためには単一の検出法では技術的に非常に困難である。そのため、(1)濃縮 enrichment: 腫瘍細胞が検出されやすいように細胞を分け腫瘍細胞の濃度を上げる、(2)検出 detection: 標的細胞を同定する、などの複数段階の工程を経た検査法が有用であると考え検討した。³

検査法の検討には、(A)健常マウスの血液に腫瘍細胞を混注したサンプルと(B)担癌マウスの血液サンプルのそれぞれを用いた。(A)は、採取した健常マウスの血液に実験室で培養したマウスメラノーマ細胞を混合した血液検体をサンプルとした。検出法の精度を確認するためメラノーマ細胞はサンプルごとに段階的に混合濃度を変えて検討に用いた。(B)は、腫瘍移植後4~5週のメラノーママウスの血液検体を検討に用いた。

- ・使用動物 C57/BL6N マウス (雄)
- ・血液検体 マウスの全血をヘパリン採血した。

・Cell lines: B16F10-Luc2(Caliper Lifesciences)またはB16F10-RFP (Hopkinton, MA)のいずれかのマウスメラノーマ細胞を用いた。いずれも37°C、5%CO₂下で継代培養後にトリプシン処理した浮遊細胞液(cell viability 90%以上)を(A)血液検体に混合または(B)マウス足部に移植したのち採血しサンプルを得た。

(1) 濃縮 enrichment

① 密度勾配遠心分離法

細胞密度の違いを利用して、遠心管内に密度勾配を発生させ血液中から血球・血漿を分画として分離する方法である。密度1.084±0.001g/mlのFicoll®を分離液として使用し、1,600rpm、30分間遠心分離をして血液サンプルを赤血球、末梢血単核球(PBMC; peripheral blood mononuclear cells)、血漿などの各層に分画した。回収した各層を顕微鏡下に観察し、メラノーマ細胞がいずれの細胞層に分画されるかを確認した。またそれによって得られたメラノーマ細胞が分画される細胞層を以降のアッセイに用いた。

② 免疫磁性分離 (CD45 depletion)

細胞表面マーカーの違いにより細胞を分離する方法であり、PBMCのマーカーCD45に特異的に結合する磁気ビーズを添加し、磁力によりサンプルからPBMCを選択的に分離・回収できる。サンプルにビオチン標識マウス抗体を混合しインキュベーション後、磁気を持ったマグネットと静置し抗原抗体複合体を吸着させたのちに反応後のサンプルを回収した。試薬: BD IMag™ Streptavidin Particles Plus, BD Pharmingen™ CD45 Biotin。機器: IMagnet (BD IMag)を用いた。

(2) 検出 detection

① ルシフェラーゼアッセイ法

マウスメラノーマ細胞 B16F10-Luc2 はホタルの発光遺伝子であるルシフェラーゼが導入されており、発光基質である Luciferin を添加して生じる生物発光を検出することで蛍光強度を検出でき、腫瘍細胞量の定量的評価が可能である。試薬: Cell Culture Lysis Reagent, Luciferase Assay Reagent II (Promega)。機器: GloMax 20/20 Luminometer (Promega)を用いた。

② 細胞浸潤アッセイ、蛍光顕微鏡観察

血清に反応し腫瘍細胞が遊走する性質 (Chemotaxis) を利用し well の層の上下で細胞を分離するキットを用いた。肺がん細胞で密度勾配遠心分離法と本法の組み合わせで CTC が検出可能であることが既報で報告されており、これに準じたプロトコルを用いた。⁴本実験ではサンプルを血清フリー培地とともに上部 well に添加し、血清培地を下部 well に添加して 37°C、5%CO₂ 下で 48 時間インキュベートした。インキュベート後に遊走細胞を回収し蛍光顕微鏡下 (RFP 条件)

に観察した。試薬：10%FBS（血清），RPMI 1640 Media（培地、Sigma-Aldrich, St Louis）。アッセイキット：CytoSelect™ 細胞遊走アッセイ kit（Cell Biolabs, Inc）を用いた。

③ 共培養、蛍光顕微鏡観察

フィブリン膜でコーティングをした 100mm ディッシュにて 37°C、5%CO₂ 下でサンプルを 72 時間インキュベートする。サンプル中の PBMC は浮遊細胞であり、メラノーマ細胞は接着細胞であることからメラノーマが選択的に培養可能であると考え、インキュベート後に蛍光顕微鏡下（RFP 条件）に生細胞を観察した。

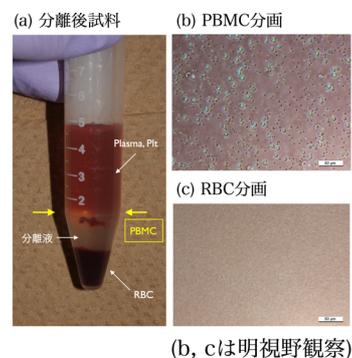
4. 研究成果

(1) 結果と考察

① 密度勾配遠心分離法→顕微鏡下観察 (Fig 1)

サンプルを密度勾配遠心分離法後に顕微鏡下に各分画を観察した。サンプル(A)の観察ではPBMC分画中に腫瘍細胞が観察された。また赤血球、血漿の分画中には腫瘍細胞は観察されなかった。メラノーマ細胞の大きさ・密度に関する過去の報告によれば、メラノーマ細胞は正常PBMCと比較すると大きく (>20 μm)、密度はPBMCと同程度であった。⁵そのため、メラノーママウスではPBMCの層に腫瘍細胞が分画されるものと考えられた。サンプル(B)では腫瘍細胞はいずれの分画でも観察されなかった。

Fig 1. 密度勾配遠心分離後の試料

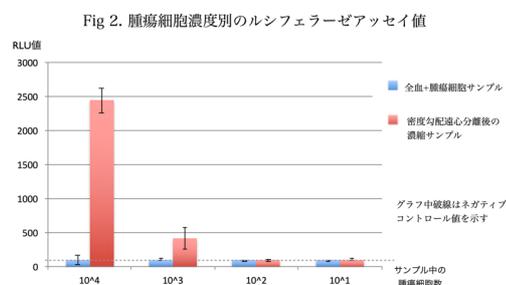


② 密度勾配遠心分離法→ルシフェラーゼアッセイ法 (Fig 2)

サンプル(A)を用いた検討で、密度勾配遠心分離法による濃縮後にルシフェラーゼアッセイによる検出をした実験系では、サンプル中の腫瘍細胞は 10³ 個まで検出可能であった。

一方で密度勾配遠心分離法をしないサンプルでは腫瘍細胞は 10⁵ 個以上で検出可能であり、密度勾配遠心分離法によりサンプル中の腫瘍細胞の濃縮が可能であり、結果検出精度を上げることが示された。

サンプル(B)では腫瘍は検出されなかった。



③ 密度勾配遠心分離法→免疫磁性分離法→ルシフェラーゼアッセイ法

密度勾配遠心分離法によって得られたPBMC分画層を免疫磁性分離法で濃縮したのち、ルシフェラーゼアッセイによる検出をした。サンプル(A)では、血中メラノーマ細胞の検出は一部のサンプルで可能だったものの、安定した検出結果は得られなかった。この原因を追究するために、密度勾配遠心分離法によって得られたPBMC分画に追加で腫瘍細胞を混合したのち免疫磁性分離法による濃縮を試みた実験も試行したが、結果にばらつきが多く、免疫磁性分離法による安定した濃縮がなされていないことがわかった。この原因として、サンプル中に存在する腫瘍細胞がPBMCなどのその他の細胞と比較し極めて少数であるため、用いた抗体ビーズとPBMCの集合体にメラノーマ細胞が付着してしまい最終的に回収されなかった可能性や、抗体濃度などの条件が不十分であり純粋な濃縮ができず濃縮効率が落ちた可能性が考えられた。サンプル(B)では腫瘍は検出されなかった。

④ 密度勾配遠心分離法→細胞浸潤アッセイ→蛍光顕微鏡観察

サンプル(A)、サンプル(B)ともにメラノーマ細胞は同定されなかった。予備実験として行った同キットを用いた腫瘍細胞のみの細胞浸潤アッセイでは、腫瘍細胞はアッセイ後に観察可能であった。本細胞浸潤アッセイキットは癌腫によらない細胞の走化性を利用しており、過去の肺がん細胞を用いた報告では検出が可能であったことから今回メラノーマ細胞でも検出可能であると予想したが、今回試行した範囲では検出が不可能であった。

⑤ 密度勾配遠心分離法→共培養法→蛍光顕微鏡観察

サンプル(A)、サンプル(B)ともにメラノーマ細胞は同定されなかった。培地・血清濃度等の条件を変更してもメラノーマ細胞の培養は確認できなかった。

(2) まとめ

マウス血液サンプルを用いて細胞密度、免疫磁性、走化性などの細胞の分子生物学的性質を利用して複数のアッセイを組み合わせて試行した。なかでもフィコールを用いた密度勾配遠心分離法によってマウスメラノーマ細胞 B16F10 は PBMC の層に分画され、RBC、血漿の層には分画されないことが明らかとなった。また同法は実験室ベースでの CTC の濃縮検査として有用であることが示唆された。一方で担癌マウスの血液を用いたアッセイではいずれの方法でも CTC は同定できなかった。本来担癌マウスの全血中には赤血球は 1000 万個、白血球は 5000 個程度存在し、そのなかから数個～数十個の CTC を同定することは技術的に困難を極め、今回の研究計画の範囲内では CTC 同定手技の確立には至らなかった。

引用文献

1. Wang H, Wu X. Detection and Enumeration of Circulating Tumor Cells with Invasive Phenotype. *Adv Exp Med Biol.* 2017: 133-141.
2. Lim SY, Lee JH, Diefenbach RJ, Kefford RF, Rizos H. Liquid biomarkers in melanoma: detection and discovery. *Mol Cancer.* 2018: 8.
3. Hong X, Sullivan RJ, Kalinich M, et al. Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018: 2467-2472.
4. Wang H, Hara Y, Liu X, et al. Detection and enumeration of circulating tumor cells based on their invasive property. *Oncotarget.* 2015: 27304-27311.
5. Clawson GA, Kimchi E, Patrick SD, et al. Circulating tumor cells in melanoma patients. *PLoS One.* 2012: e41052.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田 拓、草島 英梨香
2. 発表標題 マウスモデルを用いた血中循環腫瘍細胞捕捉の試み
3. 学会等名 第39回北大形成外科アカデミー
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----