

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09197

研究課題名(和文) 大腸癌血液サンプルからの癌幹細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of cancer stem cells in blood samples of colorectal cancer patients

研究代表者

井上 彬 (Inoue, Akira)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90645053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の根源とされる「癌幹細胞」は、治療抵抗性で転移や再発の原因となる。申請者らはこれまでに手術で切除された癌組織から癌幹細胞を同定したが、もしも血液から同様のことができれば、手術適応のない「全身癌」の状態でも、血液の採取だけでタイムリーに癌幹細胞を同定し、治療応用へ繋げることができる。本研究の目的は、大腸癌患者の血液から個別の癌幹細胞を同定・解析することである。本研究により、真の癌幹細胞の同定から治療応用までの研究基盤を確立でき、個別化医療を実現できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術標本からは何百万個もの細胞を得ることができ、その中に一定数の癌幹細胞が含まれていることからスフェロイドの形成も容易であるが、進行して他臓器に転移をきたした患者には手術療法は適応されず組織の回収ができないことも多い。本研究では大腸癌患者の血液中に存在する癌細胞を同定、回収し、スフェロイド培養を試みた。独自の方法で血中癌細胞を捉え、培養法を確立し、癌細胞を安定して一定期間生存させることが可能となった。多くの条件を整えて血液からの癌幹細胞の取得に近づくことができたことは学術的に意義があり、今後更にこれらの細胞の性質を詳細に調べることで医学的な応用に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cell (CSC) is considered as a primary source of tumor and it is resistant to cancer therapy and causes metastasis and disease recurrence. We could have encircled and identified CSCs from clinical cancer tissue samples. If we could do so from patients' blood sample, it is convenient in the point that we can identify CSC timely simply by blood collection from patients with even with inoperable systemic disease and we may get some ideas for optimal therapy through analysis of CSCs. In this study we try to pick up CSCs from blood sample of colorectal cancer patients and analyze them, so that we may establish research basement for personalized medicine by obtaining CSCs.

研究分野：消化器癌

キーワード：癌幹細胞 大腸癌 初代培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の根源とされる癌幹細胞は、自己複製能、多分化能、造腫瘍能を有する少数の癌細胞集団で、治療抵抗性を示し、再発や転移の原因となる。癌幹細胞の既存マーカーである Lgr5 を標的とした治療法が開発されたが、治療効果は乏しいと報告され、Lgr5 以外にも癌幹細胞の運命を決めるドライバー遺伝子が存在すると考えられる。癌幹細胞を捉える方法としてこれまで、CD133 などの癌幹細胞表面マーカーを用いた研究が進められてきたが、精度が低く十分な成果が得られていない。申請者らは、大腸癌患者の癌組織をマウスへ移植して PDX を作成し、これを継代培養して「癌幹細胞 1 個からマウスに腫瘍を造る真の癌幹細胞モデル」を樹立する技術を確認してきた。その結果、癌幹細胞をコントロールするドライバー遺伝子は画一的ではなく、個々の腫瘍で多様性があることが分かってきた。手術で切除された癌組織には何百万個という癌細胞が含まれており、これを細胞レベルで分離し 3 次元培養することで足場なく増殖する幹細胞性の高い細胞群を内包するスフェロイドを得ることができる。しかし、手術の適応となるのは、根治の可能性のあるステージ I-III が主であり、全身に癌が広がった状態では手術不能となる場合がほとんどである。これまで、手術で切除された癌組織から癌幹細胞を同定したが、もしも血液から同様のことができれば、手術適応のない「全身癌」の状態でも、血液の採取だけでタイムリーに癌幹細胞を同定し、癌幹細胞のアキレス腱を攻める手掛かりが得られるかもしれない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、腫瘍組織の生検・摘出によらず、採血という低侵襲な方法で、血液中に存在する癌幹細胞をタイムリーに同定・解析することを目的とした。さらに、血液中の癌幹細胞の遺伝子学的な特徴を解明することで、癌患者の癌幹細胞を標的として根治を目指した究極の個別化治療の実現を目指す。

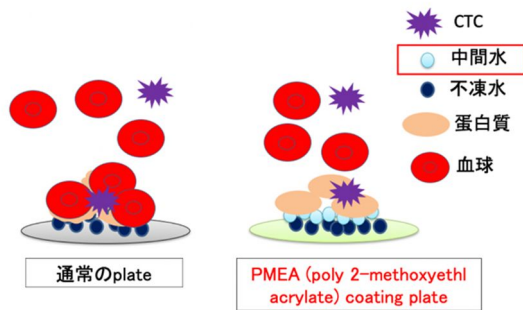
3. 研究の方法

本研究では、大腸癌患者の血液から循環血液細胞を生きたまま採取し、染色と培養を行う。大腸癌患者より 1 回に 10ml の採血を行い、血液中の CTC (circulating tumor cell) を分離して CTC の細胞免疫染色[pan-cytokeratin(AE1/AE3), EpCAM, CSV(Cell Surface Vimentin)]とスフェロイド培養を行う。シングルセル遺伝子解析(KRAS codon12,13, BRAF codon600, PIK3CA codon1047) や RNA シークエンスによって CTC の特徴を明らかとする。

4. 研究成果

大腸癌患者から血液を採取して研究する計画を院内の倫理委員会にかけて承認を得た。採血をしてから、多くのステップの最適化を繰り返した。Ficol 液や Oncoquick による濃度勾配分離では有核細胞である白血球の混在が多く、僅かにしか存在しない癌細胞を見出すのは困難であった。この白血球を除去するために、合成高分子ポリマーの一つである PMEA(poly2-methoxyethyl acrylate)を利用することとした(図 1)。水は、運動性が高く自由に動き回る“自由水”, 高分子に強く結合する“不凍水”、さらに 自由水と不凍水の中間の性質を示す“中間水”に分類される。通常の plate では、高分子に強く結合する不凍水が接着し、不凍水に血中蛋白質が接着するが、この不凍水に接着したタンパク質は変性を起こしやすくなり、そこに接着した血球は plate から剥がれにくくなる。一方、PMEA を塗布した plate では、タンパク質に変性を起こさせにく

い中間水が媒介するため、血球は浮いた状態になり、余分な血球は plate から剥がれ、CTC 細胞のみを plate 接着させることができる。



Hoshiba T., et al. Adv Health Mater. 2014

図 1 .PMEA は中間水を産生し、血球のプレートからの浮遊に貢献する

実際、PMEA をコーティングすると、白血球や血小板が大幅に減少し癌細胞が残り、overnight で培養後に、EpCAM 抗体で染色すると明瞭な核小体とクロマチン増量を示す腫大した核を有する癌細胞が観察できるようになった (図 2)。

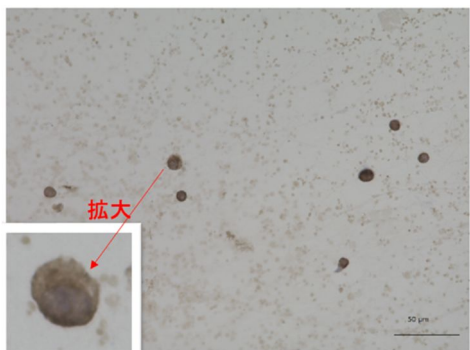


図 2. 膀胱浸潤を来した大腸癌患者から得た CTC の EpCAM 染色

染色で工夫した点として、蛍光顕微鏡下の観察では希少な陽性細胞を見つけることは困難であり、DAB を基質とした peroxidase による発色法が癌細胞の検出に適していた。また癌細胞のスライドガラスからの脱落を防止するには、ABC 法や二抗体法よりもスライドガラスの洗浄回数が少なくすむ peroxidase conjugate EpCAM 抗体を用いたワンステップ法がより適していた、などが挙げられる。症例を重ねるごとに、ノウハウが蓄積され、癌細胞の染色は 33 例中 11 例で陽性となった。培養も 9 例でスフェロイド形成に成功したが(図 3)、大腸癌患者の血中に含まれる癌細胞の個数は少数であることがほとんどであることから、スフェロイドも 1 症例につき数個しか得られず、シングルセル遺伝子解析に準じた方法で遺伝子解析を行うこととした。

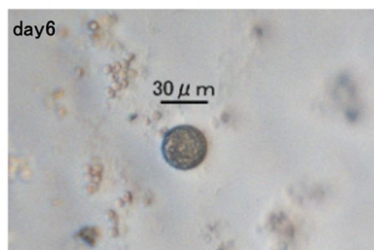


図 3. 大腸癌 CTC 培養後 6 日目のスフェロイド

これまで 6 例において CTC から出来たスフェロイドを一つずつ拾い上げて DNA を回収し、全ゲノム増幅をかけて、大腸癌に特異的な遺伝子変異(KRAS, BRAF, PIK3CA など)をサンガー法で検

索したが変異を認めなかった。たまたま野生型であった可能性もあるが、目的の細胞を手動で確保するのは容易ではなく、周囲の血球細胞やマトリゲルの混入による反応障害も考えられる。今後は確実に細胞を拾い上げるために新たに細胞回収用のマニピレーター機器を導入したので、これを使って細胞を回収し、解析を確かにしてゆく方針である。またスフェロイドのサイズは組織由来のものに比べてそれほど大きくはないのでシングルセル解析用の機器も使用して、遺伝子発現プロファイルを探索する。

3年間のうち2年以上の間、コロナ感染症のために患者サンプルを扱う研究はしばしば規制を受け、思い描いていたゴールには届いていないが、PMEAを用いた独自の方法でステージIVの担癌患者では血中癌細胞を捉えることができるようになった。更に3次元培養する方法を確立し、複数の癌細胞を安定して一定期間生存させることができるようになった。いくつかのハードルを越えて血液からの癌幹細胞の取得に近づくことができたことは学術的な意義があり、今後更にこれらの細胞の性質を詳細に調べることで医学的な応用に繋げるよう本研究を継続してゆきたい。

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	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

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