

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861042

研究課題名(和文)新規CTC採取マウスモデルの確立と原発巣・転移巣・CTC遺伝子発現の研究

研究課題名(英文)Orthotopic mouse model of gastric cancer which reliably develops CTC

研究代表者

岩田 直樹 (IWATA, Naoki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00719247

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)：マウスはBALB/c-nu、NOD-scidを用い、ヒト胃癌細胞株MKN1、KATO-III、MKN-45を胃壁内に注入することで腫瘍生着を図ったが、腫瘍の生着は確認できなかった。NOD-scidを用いて肝転移モデルの作成を試みた。ヒト胃癌細胞株MKN1 1×10^6 個を門脈内注射し、8週間後に犠牲死させることで肝転移が確認できた。しかしながら、Circulating Tumor Cells (CTC)は確認できなかった。CTCが採取可能な同種移植マウスモデルの作成には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Three gastric cancer cell lines (MKN1, KATO-III and MKN-45) were injected into the gastric wall of BALB/c-nu and NOD-scid mice. However, we could not find any primary tumor on gastric wall. To establish a mouse model with reproducible development of liver metastasis we used NOD-scid mice and 1×10^6 (MKN1) were injected via portal vein. All mice developed liver metastasis. However, none of the mice had detectable Circulating Tumor Cells (CTC). We could not established an orthotopic mouse model of gastric cancer which reliably develops CTC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Circulating Tumor Cell 食道癌 胃癌 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

- (1) 悪性腫瘍の予後は、多くの場合遠隔転移の有無により左右される。遠隔転移は原発巣から癌細胞が血中に流入し、血流に乗って遠隔臓器に漂着し、新たな環境で増殖することで成立する。Circulating tumor cell (以下 CTC) は悪性腫瘍の原発巣あるいは転移巣から遊離し、血中に浸潤した細胞と定義される。多数の癌細胞が血液中に流入すると言われているが、その中のごく一部の細胞のみが血液中で生き抜き、転移巣に生着し増殖することができる。
- (2) 癌細胞は原発巣で上皮の性質を失い、間葉としての性質を新たに獲得する。これを、上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; 以下 EMT) といい、この EMT を来すことで血液中に流入すると考えられている。血液中に浸潤した癌細胞は、転移巣で逆の間葉上皮転換 (Mesenchymal Epithelial transition; 以下 MET) を来し生着するとされる。CTC は原発巣で EMT を来した細胞であり、元の癌細胞とは異なる性質を獲得していると考えられる。この性質の違いを解明していくことが癌の転移・浸潤の解明につながる重要な手がかりである。
- (3) 癌細胞が EMT を来して血液中に浸潤していくと、それまでとは全く異なる環境で生存する必要がある。血液中に浮遊している CTC は単体あるいは数個程度の細胞数で生存しており、それは幹細胞の性質も併せ持っているとも考えられており、CTC の機能解明は癌の転移・浸潤の解明のみならず、幹細胞の研究にも繋がっていくと思われる。
- (4) CTC の存在は大腸がんでは予後不良因子となっており、その意義は臨床においても高い。アメリカでは FDA が大腸癌、乳癌、前立腺癌について CellSearch システムによる CTC 検出を診療として認めている。しかし、CTC が血中に到達する機序やその後転移の形成に至る過程に関しては、いまだに十分に解明されていない。
- (5) その原因の一つは、実際に一度の採血で患者から得られる CTC の数はわずかであり、その細胞を用いた研究を行うことが非常に困難なことが挙げられる。

2. 研究の目的

- (1) 本研究の最終的な目的は、まだ解明されていない CTC の発生の機序、CTC の機能・分子生物学的・遺伝学的性質を追及することである。また、それにより癌の浸潤・転移の機序の解明を目指す。

- (2) しかし、実際の患者から得られる CTC の数には限りがあるため、CTC を確実に採取できる同種移植マウスモデルの作成が必要であると考え、CTC 採取マウスモデルの確立を最初の目的として設定した。

3. 研究の方法

- (1) CTC 採取同種移植マウスモデルの作成は、申請者がドイツ・ハイデルベルク大学・消化器・胸部・血管外科で行った、ヒト大腸癌細胞株を用いた CTC 採取同種移植マウス作成の方法を応用する (引用文献①)。
- (2) CTC 採取大腸癌マウスモデル作成について：マウスは BALB/c-nu を用いた。ヒト大腸癌細胞株の中から HCT116、HT-29、SW620 を用いた。全身麻酔下に開腹し、マウスの盲腸壁に Corning Matrigel matrix (以下 Matrigel) に懸濁したヒト大腸癌細胞株を注入し、腫瘍の生着を待った。しかし、僅かに腫瘍が生着する程度であった。次に、マウスは NOD-scid mice を用いた。全身麻酔下に開腹し、マウスの盲腸壁に Matrigel に懸濁したヒト大腸癌細胞株を注入し、腫瘍の生着を待った。本方法により、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 においてのみ、1 週間後腫瘍が生着し、HCT116 の注射から 3 週間後に肝転移、4 週間後に肺転移を来した。最終的に 5 週間後に CTC が採取できることが確認できた。
- (3) CTC 採取胃癌マウスモデル作成について：CTC 採取大腸癌マウスモデル作成法に準じた。全身麻酔下に開腹し、マウス胃壁に Matrigel に懸濁した、ヒト胃癌細胞株を注入し、腫瘍生着・増大・遠隔転移・CTC 採取を目指すこととした。
- (4) このマウスモデルの重要な点は、ヒト胃癌細胞株を胃壁に注射して腫瘍を作成している点である。すなわち、胃壁内に注射して作成した腫瘍を原発巣に見立てている点である。「1. 研究開始当初の背景」で記載したように、CTC の性質を追及するためには、原発巣で癌細胞が EMT を来し、血液内に流入し、最終的に遠隔転移を来していくというプロセスを経ること必要である。この過程の中で変化していく細胞の性質をとらえることが極めて重要であると考えられる。
- (5) CTC の検索の方法：全身麻酔を施したマウスの心臓から全血液を採取し、密度勾配遠心法により血液中単核細胞を赤血球・顆粒球から分離して採取する。次に抗ヒト EpCAM 抗体 (EpCAM, anti-human EpCAM mouse IgG2b, Alexa Fluor 488, clone 9C4, Biologend) を用いて蛍光染色し、EpCAM 陽

性細胞を CTC と判定することとした。

- (6) CTC の採取法：蛍光顕微鏡で EpCAM 陽性細胞を観察しながら、極微操作装置 (InjectMan Eppendorf 社) により吸引して回収することとした。

4. 研究成果

- (1) CTC 採取胃癌マウスモデルについて：マウスは BALB/c-nu を用いた。ヒト胃癌細胞株 MKN1、KATO-III、MKN-45 を Matrigel に溶解し 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 個を胃壁内に注入することで腫瘍生着を図った。4 週間の待機時間の後、犠牲死させて腫瘍の有無を確認したが、腫瘍の生着は確認できなかった。その後、さらに待機期間 6 週間、8 週間と延長してみたものの、腫瘍の生着は確認できなかった。

- (2) 次にマウスを NOD-scid mice とした。同様の細胞株を Matrigel に懸濁し 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 個を胃壁内に注入することで腫瘍生着を図った。しかしながら、ごく小さな腫瘍の生着を認めるのみに過ぎなかった。一方で僅かながら腹膜播種が認められた。この原因は注射した Matrigel が針穴から腹腔内にあふれるためであろうと推測された。

- (3) 胃壁に細胞を注射することにより、胃壁に腫瘍の生着は確認できなかった。また、僅かながら Matrigel が胃壁から漏れ、腹膜播種を来すことから、これ以上細胞数を増加させて胃壁内に注入することにより腫瘍生着を期待することは困難であると判断した。そこで、胃壁を切開して粘膜下に注射する方法を試みることにした。しかしながら、胃内の食物残渣が漏出することによる感染、あるいは手術侵襲そのものにより、手術後にマウスが死亡する確率が高かった。また、マウスは術前の絶食管理が行えない点と、手術手技も煩雑であることから、粘膜下へ癌細胞株を注射する方法も困難であると判断した。

- (4) ここまでの間に、手術手技の習熟やマウスの手術・腫瘍増大の待ち時間もかなりの期間を要した。しかし、結果的にはマウス胃壁への腫瘍の生着に至らず、研究の遅れを来した。ここで、CTC 採取同種移植マウスモデルの作成に関しては、胃壁内に癌細胞株を注入して腫瘍を生着させる方法を断念することとした。胃壁内に癌細胞株を注射する方法に代わり、ヒト胃癌細胞株を用いた肝転移モデル・腹膜播種モデルの作成し、その後病態の悪化に伴い CTC の採取が可能かを検討することとした。

- (5) しかし、「3. 研究の方法」で述べたよ

うに、CTC 採取マウスモデルの作成において重要と考えている点は、癌細胞が EMT を来し、血液中に流入していく過程を再現することである。肝転移モデル、腹膜播種モデルともに原発巣に見立てた腫瘍が存在せず、遠隔転移巣のみが存在するモデルとなる。しかし、それぞれの腫瘍から EMT を来して血液中に流入した腫瘍をとらえることができれば、CTC の研究の一助になると考えた。

- (6) 腹膜播種モデルについて：マウスは BALB/c-nu を用いた。Phosphate buffered saline (以下 PBS) に懸濁した、ヒト胃癌細胞株 MKN1 をそれぞれ 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 個を腹腔内注入した。マウスを観察していくと経時的に腹部膨満と腹水の貯留が認められた (図 1)。8 週間後に犠牲死させることで腹膜播種が確認できた (図 2)。しかしながら、本マウスから採取した血液中には CTC は確認できなかった。

図 1. 腹水貯留を認めるマウスの腹部



図 2. MKN1 5×10^5 個を腹腔内注入後 8 週間経過したマウス腹腔内



- (7) マウス肝転移モデルについて：マウスは BALB/c-nu を用いた。全身麻酔下に開腹し、脾臓を同定した後に Matrigel に懸濁した、ヒト胃癌細胞株 MKN1、KATO-III、MKN-45

をそれぞれ 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 個を脾臓に注射した。4 週間、6 週間、8 週間の待機期間の後犠牲死させて腹腔内を検索したが、肝転移は認められなかった。

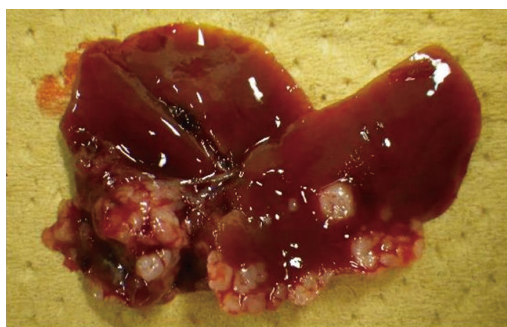
(8) 次にマウスを NOD-scid mice に変更して同様に、肝転移モデルの作成を試みた。Matrigel に懸濁した、ヒト胃癌細胞株 MKN1、KATO-III、MKN-45 をそれぞれ 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 個を脾臓に注射した。4 週間、6 週間、8 週間の待機期間の後犠牲死させて腹腔内を検索したが、肝転移は認められなかった。

(9) 脾臓にヒト胃癌細胞株を注射する方法では腫瘍の生着が認められなかったため、癌細胞株を門脈内注射することで肝転移モデルを作成することを試みた。全身麻酔科に開腹し門脈を同定し、PBS に懸濁したヒト胃癌細胞株 MKN1、KATO-III、MKN-45 をそれぞれ 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 個を門脈内注射し、8 週間後に犠牲死させた。 1×10^6 個門脈内注射したマウスでは肝転移が確認できた (図 3、図 4)。しかしながら、本マウスから採取した血液中には CTC は確認できなかった。

図 3. MKN1 1×10^6 個を門脈内注射後 8 週間経過したマウス腹腔内



図 4. MKN1 1×10^6 個を門脈内注射後 8 週間経過したマウス肝臓



<引用文献>

① Schölch S, Garcia SA, Iwata N, Niemietz T, Betzler AM, Nanduri LK, Bork U, Kahlert C, Thepkaysone ML, Swiersy A, Büchler MW, Reissfelder C, Weitz J, Rahbari NN. Circulating tumor cells exhibit stem cell characteristics in an orthotopic mouse model of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 May 10;7(19):27232-42. doi: 10.18632/oncotarget.8373.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Mitsuro Kanda, Dai Shimizu, Haruyoshi Tanaka, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Masamichi Hayashi, Naoki Iwata, Yukiko Niwa, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Kenta Murotani, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. Significance of SYT8 For the Detection, Prediction, and Treatment of Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer. *Annals of Surgery*. 2016 Dec 6. doi: 10.1097/SLA.0000000000002096. [Epub ahead of print] 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① 神田光郎, 田中晴祥, 田中千恵, 小林大介, 岩田直樹, 山田 豪, 中山吾郎, 藤井努, 杉本博行, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘. 胃癌腹膜播種特異的関連分子の発現、機能および 5-FU 感受性への影響に関する検討. 第 50 回制癌剤適応研究会. 2017 年 3 月 17 日. ホテルクレメント徳島 (徳島県・徳島市寺島本町)

② 神田光郎, 清水 大, 田中晴祥, 小林大介, 田中千恵, 高見秀樹, 林 真路, 岩田直樹, 丹羽由紀子, 山田 豪, 藤井努, 中山吾郎, 杉本博行, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘. 新規胃癌腹膜播種関連分子の同定と、その診断的および治療的意義に関する検討. 第 13 回日本消化管学会総会学術集会. 2017 年 2 月 18 日. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市熱田区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 直樹 (IWATA, Naoki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 00719247