

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11728

研究課題名(和文) 口腔癌における循環癌細胞の分離による個別化治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Precision Medicine by recovery of CTCs from circulating blood in oral cancer

研究代表者

山下 麻由美 (YAMASHITA, MAYUMI)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：80325802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：循環癌細胞(CTC)は癌の状態、転移、薬剤感受性などの有益な情報を持っている。現在、CTCには多種の検出装置が開発されているが、マイクロ流体チップは従来の磁気ビーズを使用したような方法とは異なり、生きたCTCを捕捉することが可能である。また、本チップは、大掛かりな装置は不要で、安価に使用可能である。我々は、独自のマイクロ流体チップを使用し血液中から癌細胞を回収することを試みた。

まず、培養癌細胞をヒトの健康な血液サンプル中に混入後、チップを還流させ細胞を回収することで、良好な回収率を得られた。次に培養癌細胞をマウスに注入し、循環血液から細胞を回収し、癌細胞の回収が可能であることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTC検出では、Epi-CAM抗体を使用する装置がメジャーであるが、高価であり生きた細胞の回収は不可能である。また、上皮間葉変換(EMT)を引き起こした細胞の検出も不可能である。しかし、マイクロ流体チップは、高価な装置は必要なく、細胞に致命的障害を与えることなく、EMTを引き起こした細胞の回収も可能である。血液中の癌細胞は極めて少量であり、高い回収率が重要である。今回使用したチップは、回収率が90%以上でありCTC回収に有用な方法であった。今後の展望では、回収した細胞の培養法を確立し、CTCの遺伝子解析を行うことで、口腔癌の個別化治療法を開発していくことが可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：CTC has valuable information such as disease state of cancer, metastasis, drug susceptibility. Various detection devices have been developed, microfluidic chip can capture living CTC unlike the method by magnetic beads. This chip does not require a large-scale apparatus and can be used with low cost. We attempted to collect cancer cells in the blood using our own microfluidic chip. First, cultured cells were mixed in a human healthy blood sample and recovered, it was possible to recover with a good recovery rate. Then, cultured cells were injected in the mice, and were attempted to recover from the circulating blood. As a result, a small number of cancer cells could be recovered.

研究分野：口腔外科

キーワード：循環癌細胞 口腔癌 マイクロ流体チップ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

個別化医療は近年の癌治療における緊急の課題である。血液を使用したリキッドバイオプシーは癌の診断、治療法の選択、治療効果の予測について従来の生検より非侵襲的で手早い方法であり、タンパク、DNA、RNA や循環癌細胞 (Circulating tumor cells: CTC) をターゲットとしている。

口腔癌を含む固形癌では、リンパ節転移や遠隔転移が予後を左右する重要な因子である。原発巣の細胞が血管に侵入した結果である CTC は転移のもとであると想像される。従って、血液サンプルからの CTC 回収は癌の診断のみでなく、CTC の遺伝子の特徴の解析にも重要である。

## 2. 研究の目的

CTC の分離はこれまで、細胞表面のマーカーによる分取が主に用いられてきた。しかし、この方法では、上皮間葉転換 (EMT) によりマーカーが減少・消失した癌細胞を分離できなかった。今回、共同研究者である高田らが開発した、特定の細胞表面マーカーによることなくシンプルな流体力の原理を用いた、血液中の CTC を分離・回収するポリマー製 CTC 分離チップを使用することで、血液サンプルからの CTC の新しい回収法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

GFP 遺伝子を導入した高転移型のヒト腺様う胞癌細胞株 (ACCS-M GFP) を用いた。

### (2) 細胞回収装置

共同研究者である高田らが開発した細胞の大きさにより細胞を分離することで、癌細胞や白血球のような大きな細胞から赤血球のような細胞を分離することが可能であるマイクロ流体チップ (Size Sort chip: SS chip) を用いた。本装置は、従来の様に抗体を使用することなく、細胞のサイズにより分離するため、細胞へのダメージが少ない上に、簡便で安価でもあるという特徴がある。

### (3) CTC サンプルの回収

SS chip の回収効果を確認するため、健康なヒトの血液 1.5ml に  $1.5 \times 10^4$  の ACC M GFP を混合しバッファとともに SS チップに還流させ、回収した液体を蛍光顕微鏡検鏡下に細胞数をカウントし、各溶液ごとの回収率を算出した。また、細胞による差異の確認のため、同様の方法でヒト扁平上皮癌由来の SCC、ヒト肺腺癌由来の H1299、乳腺癌由来の MCF-7 の培養細胞を使用した回収実験を行なった。

### (4) 細胞移植した実験マウスからの CTC 回収

マウスは 8 週齢で 20~23g を使用した。局麻下に 200  $\mu$ l の ACC M GFP 細胞が混入した溶液 ( $5.0 \times 10^5$ /ml) をマウスの腹腔内または尾静脈より注入した。腹腔内注射群は 24 時間または 48 時間後、尾静脈群は 30 分後に屠殺し、心臓から 0.5~0.9ml の血液を採取した。採取した血液は希釈後に SS チップに還流させ、回収溶液を蛍光顕微鏡下に観察し、細胞数をカウントした。

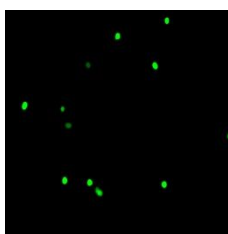
### (5) 回収した溶液の培養

回収された溶液を遠心分離後、培地を加え CTC の培養を行なった。

#### 4. 研究成果

##### (1) CTC サンプルの回収

回収溶液の蛍光顕微鏡下の観察で緑色に発色した多数の細胞片が認められた。(図1)  
培養細胞の回収率の比較では、95.2%と良好な回収率を認めた。(表1)

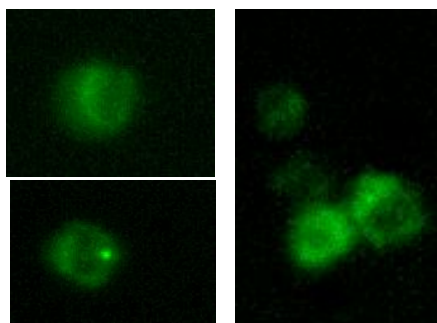


(図1)

	Number of cancer cells		Recovery rate % A/(A+B)×100
	Cell (A)	Blood (B)	
SCC	1739.3	11	99.4
H1299	2402.8	22	99.1
MCF7	638.1	9.75	98.5
ACC-M	5836	294	95.2

(表1)

(2) 細胞移植した実験マウスからの CTC 回収  
癌細胞を移植したマウスから回収した血液からは、少量の緑に発色した細胞が観察された。(図2)



尾静脈

腹腔投与

(図2)

(3) 回収した溶液の培養

数日間は細胞は生存していたが、その後の細胞の成長は確認されなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

(1) 松村吉晃、高田耕児、久米健一、別府真広、山下麻由美、中村康大、杉浦剛 マイクロ流体チップによる CTC の検出 日本航空腫瘍学会 2019

(2) 松村吉晃、高田耕児、久米健一、別府真広、山下麻由美、中村康大、杉浦剛 マイクロ流体チップによる CTC の検出 日本口腔外科学会 2018

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：杉浦 剛

ローマ字氏名：SUGIURA TSUYOSHI

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域歯学系

職名：教授

研究者番号(8桁): 40322292

研究分担者氏名: 高田 耕児

ローマ字氏名: TAKATA KOUJI

所属研究機関名: 富山県工業技術センター

部局名: 生活工学研究所

職名: 主任研究員

研究者番号(8桁): 40530621

(2)研究協力者

研究協力者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。