

令和元年9月10日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07091

研究課題名（和文）口腔癌の循環癌細胞分離によるリアルタイム液状細胞診を用いた個別化療法の開発

研究課題名（英文）The development of the precision medicine using the real-time liquid biopsy with the circulation cancer cell separation of oral cancer

研究代表者

別府 真広（BEPPU, MAHIRO）

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：00363648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：口腔癌において血液中の循環癌細胞（Circulating Tumor Cells; CTC）が転移と予後との強い相関が示されている。今回我々は特定の細胞表面マーカーを用いないシンプルな流体力学に基づくポリマー製CTC分離デバイスを用いて血液中のCTCを分離・回収した。マウス尾静脈から蛍光ラベルした接種した口腔癌細胞株を、分離装置を用いて分離した。

以前当科にて開発した口腔癌転移マウスモデルを用い、同マウスの血中からのCTC分離に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法を用いることはCTC分離におけるコストの面でも効率的であり、EMTにより形質転換したCTCを分離できる可能性がある点からも有意義である。今後は回収したCTCシングルセルよりゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーによるシーケンズ解析を行い、接種した口腔癌細胞との比較を行う。さらには口腔癌患者の治療前後の末梢血から分離したCTCシングルセルを用いてシーケンズを行い候補遺伝子をモニタリングし生検組織、摘出組織の細胞および同患者病勢との比較による転移早期診断への応用が可能と考えている。

研究成果の概要（英文）：Circulating Tumor Cells of blood in oral cancer has been shown to have strong correlation with metastasis and prognosis. On this study, we separated and collected blood CTC using CTC separation device made by a polymer based on the simple hydrodynamics that we did not use authorized cell surface marker this time.

We separated the oral cancer cell strain which we inoculated which labelled the fluorescence from a mouse tail vein using a separation device.

We succeeded in CTC Separation from all over the blood of the mouse, with the metastasis mouse model of oral cancer which we developed before in our department.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 CTC 個別化治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 循環血液中には癌細胞が存在し、転移巣を形成する。(学術的背景)

近年、肉腫・前立腺癌・悪性黒色腫・大腸癌などの担癌状態の血液中に**癌細胞（循環癌細胞：Circulating Tumor Cells; CTC）**が存在していることが明らかになった。

口腔および咽頭癌では癌化学療法中の CTC の存在が予後と極めて強く相関することが示された(Inhestern J, et al. PLoS One. 2015).

このような CTC がリンパ節転移や遠隔転移に関与していることは容易に想像できる。このような経緯から、CTC についての研究が各分野で急速に始められている（図1）。

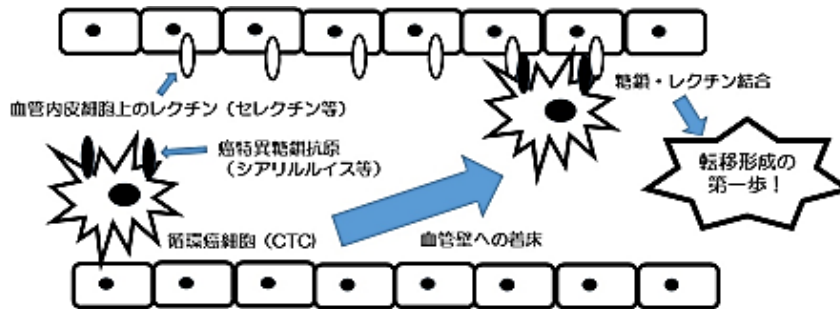


図1：循環癌細胞（CTC）による転移巣の形成
血管中の循環癌細胞（CTC）は血管壁に着床し、転移形成の第一歩となる

(2) 口腔癌の転移・予後は病理組織上の血管密度・リンパ管密度と相関する（研究協力者のこれまでの結果）

われわれも癌細胞の脈管浸潤が転移と強く相関することを明らかにしており、CTC の口腔癌での関与が強く示唆されている。例えば我々はリンパ管密度はリンパ節転移と相関し、リンパ管密度や血管密度が高くなると生存率が低下することを報告している。

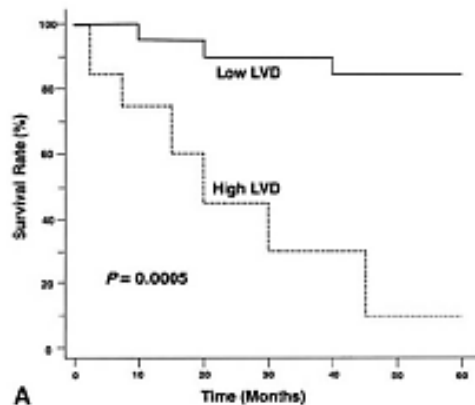


図2：リンパ管密度が高いほど生存率が低下する。
LVD Lymphovessel density

(図2) Miyahara M, et al. Cancer. 2007。

また、研究協力者の杉浦も同様にリンパ管密度および VEGF 受容体発現が口腔扁平上皮癌のリンパ節転移及び予後と相関することを示した。Sugiura T, et al.. Int J Oncol. 2009. .

(3) シンプルな流体力学による循環癌細胞の分離技術

CTC の分離はこれまで、細胞表面のマーカー（例えば EpCAM）による分取が主に用いられてきた。研究協力者の富山県工業技術センターの高田、大永らは、マイクロ流路と抗体によって CTC を高感度かつ簡便に捕捉できるポリマー製 CTC 分離デバイスおよびその低コスト製造法を開発した。(Takata K, et al. Biomed Microdevices. 2013 Aug;15(4):611-6) .しかしながら、細胞表面のマーカーに依存する方法では、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いことから、高田らはさらに、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学により血液中の CTC を分離・回収するポリマー製 CTC 分離デバイスを開発した（図3）。

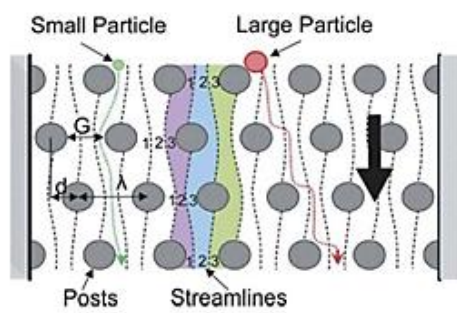


図3 流体力学による癌細胞の分取
癌細胞は細胞サイズにより自動的に右へ移していく。

以上の背景から

口腔癌における CTC の分離を行い、キャラクター解析を行うことを着想した。すなわち、口腔癌の担癌状態において CTC は転移に直接関連すると思われるが、CTC を分取してキャラクター解析・放射線治療および化学療法感受性を解析し、個別化治療につなげるものである。本研究のコンセプトを図に示す（図4）。

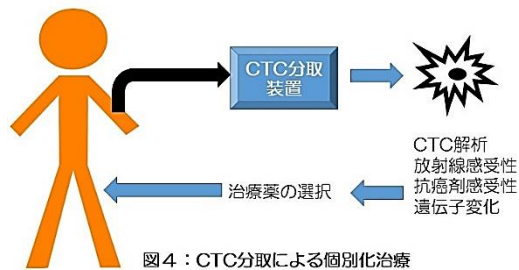


図4：CTC分取による個別化治療

2. 研究の目的

- (1) 循環癌細胞（CTC）の分取技術を確立する。
- (2) CTC 分離による癌診断（特に転移の早期予測）の可能性を検証する。
- (3) CTC の性格分析・治療に対する感受性を検討する。
- (4) CTC 解析による個別化治療への基盤となる知見および技術を確立する。

3. 研究の方法

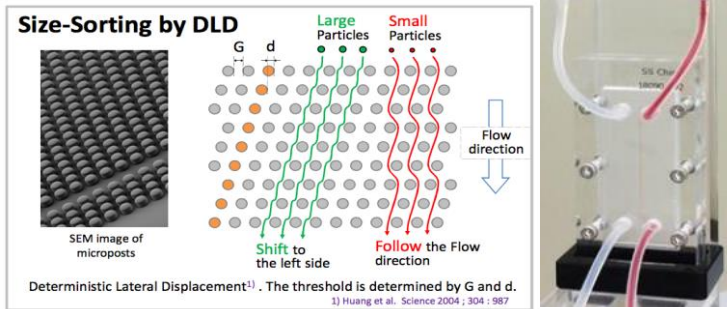
【細胞培養】

GFP 遺伝子を有する高転移性ヒト腺様嚢胞癌（AdCC）細胞株（ACCS-M GFP）を使用した。これらの細胞株は、5%CO₂ インキュベーター中、10%ウシ胎児血清（FBS）、ペニシリンGおよびストレプトマイシンを添加した Dulbecco 's Modified Eagle' s Medium（DMEM）中で37℃で維持した。

【SSChip（size sort chip）を用いた細胞回収システム】

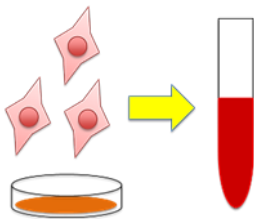
使用した分離デバイスは、チップ内のポストのサイズおよび配置により、細胞をサイズソートする独自に開発されたマイクロ流体チップである。本SSチップの特徴として以下のものが挙げられる。

- (1) 他のCTC分離デバイスの様に大型の設備を必要とせず、運用コストが低く、血液を流すだけで赤血球分画と細胞分画を回収できる。
- (2) 白血球に関しては一部細胞分画に入るが、その大半は赤血球分画へと分離可能である。
- (3) 従来の磁気ビーズ法のように抗体を使用せず、細胞への損傷が少ない。



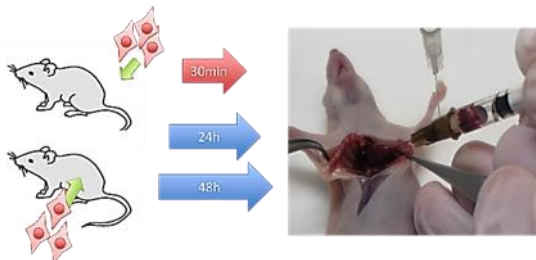
【擬似 CTC サンプルからの癌細胞の回収】

1.5×10⁴ 個の ACC-M GFP 細胞を 1.5ml の健康なヒト血液と混合し、それらの試料と緩衝液を混合した後、SS チップを用いて、各々の分画ごとに回収した。その後、各々の回収した溶液を蛍光顕微鏡を用いて観察、計数した。回収率は各出口の溶液中の細胞数によって決定した。



【担癌マウスモデルからの CTC 回収】

8 週齢のマウス 20 g ~ 23 g を用いて行った。それらのマウスをメドトミジン、ミダゾラム、およびブトルファンールで麻酔した。それらに、ACC-M GFP 細胞の細胞懸濁液 (5.0×10⁵ /ml) 200 μl を腹腔内および尾静脈に注射した。尾静脈に注射されたマウスは 30 分後、腹腔内注射したマウスは 24 時間後または 48 時間後に心腔より採血し血液を回収した。マウス 1 匹あたり約 0.5~0.9ml の血液をマウスから集めた。希釈後の血液試料を SS チップに流し、回収した溶液を蛍光顕微鏡で観察して計数した。

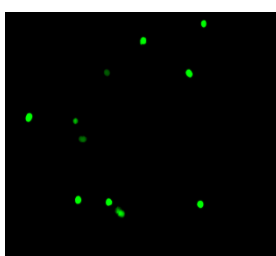


4. 研究成果

【擬似 CTC サンプルからの癌細胞の 回収】

回収液の細胞画分には多数の細胞が観察された。蛍光視野で観察すると緑色に輝く細胞を認めた。赤血球画分は蛍光視野にて数個の緑色の細胞を認めた。

各画分中の蛍光細胞の数を数え回収率を求めた結果、95%以上であった。

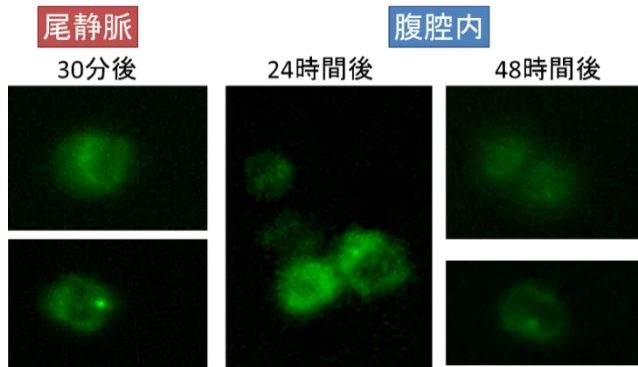


	Number of cancer cells		Recovery rate % A/(A+B)×100
	Cell (A)	Blood (B)	
SCC	1739.3	11	99.4
H1299	2402.8	22	99.1
MCF7	638.1	9.75	98.5
ACC-M	5836	294	95.2

【担癌マウスモデルからの CTC 回収】

癌細胞を注射したマウスからの血液サンプルをチップで分離し、そして回収溶液の細胞画分中

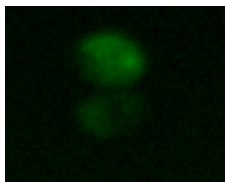
に少数の緑色細胞を認めた。



【回収液からの CTC 培養】

回収液を遠心分離し、緩衝液を吸引し、培地を加えて再培養した。

その結果、生存細胞は数日間観察されたが、細胞の増殖は観察されなかった。



その後マウス背部に培養細胞を接種し、腫瘍塊の形成を確認した後に、心腔より回収した血液からの CTC 回収にも成功している (data not shown)。

以上の結果より以下にまとめを示す。

(1) これまで主流であった EpCAM 抗体を用いた CTC 回収方法に比べ、本研究で用いたマイクロ流体チップは高価な装置を必要とせず、生細胞を集めることができる可能性さらには、EMT を引き起こしている細胞を検出できる可能性が示唆された。

(2) 今回は用いた SS チップにより赤血球と口腔癌細胞の分離が、簡便かつ安価で行える上に、90%以上という他のマイクロ流体チップや他の方法に匹敵する高い回収率で得られることが示された。

今後の予定としては

- (1) 担癌マウスモデルから回収した癌細胞の培養
- (2) 回収した CTC を用いたシングルセルの遺伝子解析
- (3) 癌患者の血液サンプルから回収した CTC シングルセルを解析し、治療前および治療後と比較することによりキャラクター解析・放射線治療および化学療法感受性を解析し、個別化治療への展開を目標とする。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 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 (circulating tumor cells) の検出. 第 37 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2019 年 1 月 25 日. 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

(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. Detection of CTC (circulating tumor cells) using SS-Chip. 第 63 回日本口腔外科学会総会・学術大

会. 2018年11月3日. 幕張メッセ国際会議場・国際展示場 (千葉県千葉市)

(3) 松村吉晃, 高田耕児, 久米健一, 別府真広, 中村康大, 杉浦剛. Detection of CTC using SS-Chip. 第77回日本癌学会学術総会. 2018年9月28日. 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究協力者

杉浦 剛 (SUGIURA Tsuyoshi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系 教授

研究者番号: 40322292

高田 耕児 (TAKATA Kouji)

富山県産業技術研究開発センター, 主任研究員

研究者番号: 40530621

大永 崇 (OHNAGA Takashi)

富山県産業技術研究開発センター, 副主幹研究員

研究者番号: 10416133

※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。