

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K24009

研究課題名（和文）循環腫瘍細胞の自然免疫による排除機構に着目した免疫治療ターゲット分子の探索

研究課題名（英文）Exploration of target molecule for immunotherapy focusing on natural immuno-system of circulating tumor cell

研究代表者

奥野 将之（Okuno, Masayuki）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10844011

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では転移性大腸癌患者から術中および術後に循環腫瘍細胞（CTC）採取を行い解析を行う予定であった。術前血液サンプルからはCTCと思われる細胞が分離可能であったが、術後では腫瘍組織の減少によってCTCが減少すると思われる、解析可能なCTCが回収できなかった。よって術前の循環腫瘍細胞のみでRNAシーケンスなどの解析を行った。腫瘍条件や予後、術前化学療法の有無等で層別化を行い比較検討したが、遺伝子発現などに有意差は認められなかった。また、CTCによる肝転移の形成と肝類洞内皮細胞障害の関連について動物モデルを用いて検討したところ、類洞内皮障害モデルでは有意に肝転移の形成個数が多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環腫瘍細胞（CTC）の治療前後の自然排除機構を検討することで、CTCの免疫機構への耐性に関わる新たな分子を発見できるのではないかと考え、研究を行ったが、想定通りの結果は得られなかった。ごく少量のCTCを回収してRNA sequenceなどの解析を行うことが技術的課題であり、今後この問題をクリアすることで予定通りのCTCの免疫機構への耐性に関わる新たな分子の検討を行う必要がある。また、別実験で肝類洞内皮細胞障害の存在下ではCTCによる肝転移形成が促進されることを確認した。化学療法等による類洞内皮障害の予防が肝転移抑制に有効であることが示唆され、今後のメカニズムの解明が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： The current study tried to collect circulating tumor cell (CTC) in patients with metastatic colorectal cancer before and after surgery, and to analyze the differences in number of CTC and gene expression between the time before and after surgery. CTC collection from pre-operative blood sample in patients with colorectal liver metastases (CRLM) was successfully performed. However, CTC was not able to collect from post-operative blood sample. Therefore, CTC from preoperative blood samples in patients with CRLM were collected and analyzed with RNA sequencing. No significant association between gene expression of CTC and tumor characteristics, prognosis, and preoperative chemotherapy was observed.

In addition, the association between CTC induced CRLM and liver sinusoidal injury was investigated by using rat model. The result was that sinusoidal injury promoted CRLM development in CTC rat model. This might be due to the higher incidence of cancer cell implantation into the liver.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：循環腫瘍細胞 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

循環腫瘍細胞 (CTC) は、末梢血中に存在する希少な癌細胞であり、血中に極めて低濃度でしか存在せず、がんの原発・再発・転移に由来する細胞と定義されている。一般的に固形癌の腫瘍細胞は同一の腫瘍内であっても遺伝子変異やタンパク発現が均一でないと考えられているが、CTC も同様に不均一性を持つと報告されている (Grillet F, Gut 2017)。大腸癌根治切除術の術中には血中の循環腫瘍細胞数が増加し、術後は減少して一部の患者では比較的長期に検出されることが報告されている (Bork U, Br J Cancer 2015)。ただ、この術後の CTC の挙動の数的・質的变化の詳細やそのメカニズムについては、あまり研究されていないのが実態である。

根治切除により理論上は CTC の供給源が絶たれており、抗癌剤治療が行われていないにも拘わらず CTC が減少することから、手術操作で一旦血中に放出された癌細胞が自然免疫機構により一部排除され、これに耐性を持つ CTC のみが血中に残存するという仮説が成り立つ。この 2 つの CTC を比較検討することで、免疫機構への耐性に関わる新たな分子を発見できるのではないかと考え、本研究を開始した。

また、臨床血液検体において CTC の分離が予定通りに行えない場合は本研究が成立しないことから、その場合は並行して CTC が肝転移を形成する際に肝類洞内皮細胞がどのように関わるかを動物モデルを用いて検討することとした。

2. 研究の目的

術中採血により回収した CTC と術後採血で回収した CTC 両者を RNA-sequencing を用いた遺伝子発現解析、免疫染色による既知の癌幹細胞マーカー発現や免疫チェックポイント機構に関連する分子の発現の差異などを検討し、新たな免疫治療ターゲット分子を探索することを目的とした。

また、CTC の肝臓への接着に肝類洞内皮細胞の存在がどのように関連するかを検討するため、類洞内皮障害動物モデルを用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 循環腫瘍細胞のダイナミズムの検討

転移性大腸癌 (大腸癌肝転移) 患者からフィルター法により術中および術後に CTC 採取を行い、手術による CTC 検出数の変化、術後の適切な採取時期の検討を行った。

(2) 循環腫瘍細胞の遺伝子発現と腫瘍の進行度や予後との関連の検討

大腸癌肝転移患者から末梢血採血により CTC をそれぞれ採取し、フィルター法を用いて分離する。分離した CTC より RNA を抽出し、RNA-sequencing により遺伝子発現の差異を検討した。この遺伝子発現の差異と腫瘍条件や予後、術前化学療法の有無等の関連について検討した。

(3) 循環腫瘍細胞の肝転移形成と肝類洞内皮細胞の関連についての検討

ラットにモノクロタリンを投与することで薬剤起因性類洞内皮障害モデルを形成した。また大腸癌細胞株をラットに脾注することで循環腫瘍細胞を有する動物モデルを形成した。正常ラットおよび類洞内皮細胞障害モデルにそれぞれ大腸癌細胞株を脾注し、肝転移形成の差異を比較検討した。同様に大腸癌細胞株を肝被膜下に直接注入することで局所肝転移モデルを形成し、これと CTC モデルの肝転移形成の様式を比較することで、肝障害そのものではなく類洞内皮細胞障害が CTC からの肝転移形成に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 循環腫瘍細胞のダイナミズムの検討

転移性大腸癌患者からフィルター法により術中および術後に CTC 採取を行い、手術による CTC 検出数の変化、術後の適切な採取時期の検討を行うことを計画した。市販のフィルター法での CTC 採取キットを用いて CTC 分離を試みたが、術前の血液サンプルからは CTC と思われる細胞が分離可能であったものの、術後血液サンプルからは解析可能な CTC の分離ができなかった。これは術後に CTC が減少することによると思われる。

(2) 循環腫瘍細胞の遺伝子発現と腫瘍の進行度や予後との関連の検討

計画通りの術前術後の CTC 分離が不可能であったことから計画を変更し、転移性大腸癌患者の術前の循環腫瘍細胞のみを回収し、RNA sequence 解析を行った。腫瘍条件や予後、術前化学

療法の有無で層別化を行い遺伝子発現との関連について比較検討したが、有意差は認められなかった。

(3) 循環腫瘍細胞の肝転移形成と肝類洞内皮細胞の関連についての検討

まず、モノクロタリンをラットに経口投与し、肝類洞内皮細胞障害 (SOS) ラットモデルを形成した。HE 染色および RECA-1 免疫染色により類洞内皮細胞障害を確認した (図 1)。

正常ラットおよび SOS モデルラットの脾臓にラット大腸癌細胞株 RCN-H4 を 1.0×10^6 個注入して CTC モデルを形成した (図 2)。同様に正常ラットおよび SOS モデルラットの肝被膜下にラット大腸癌細胞株 RCN-H4 を 1.0×10^6 個注入することで局所肝転移モデルを形成した (図 3)。

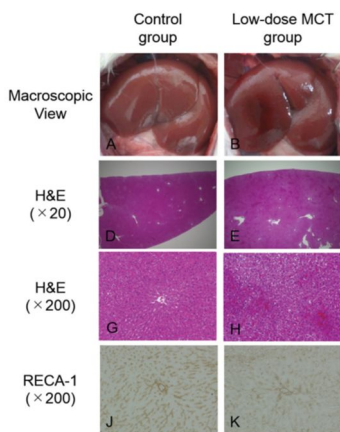


図 1

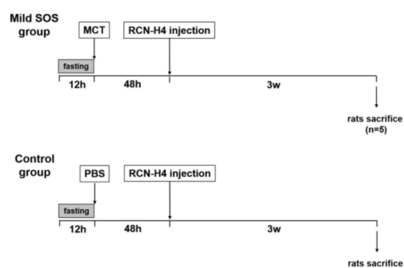


図 2

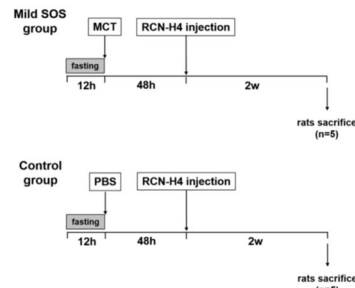


図 3

注入 3 週間後に肝転移の個数を確認すると、正常ラット群と比較して SOS ラット群では有意に肝転移の個数が多かった (図 4、 332 ± 213 個 vs. 16 ± 5 , $p=0.029$)。一方で肝被膜下注モデルでは SOS ラットと正常ラットにおいて肝転移の腫瘍径に有意差を認めなかった (図 5、 6.2 ± 1.8 mm vs. 6.4 ± 2.4 mm, $p=0.87$)。

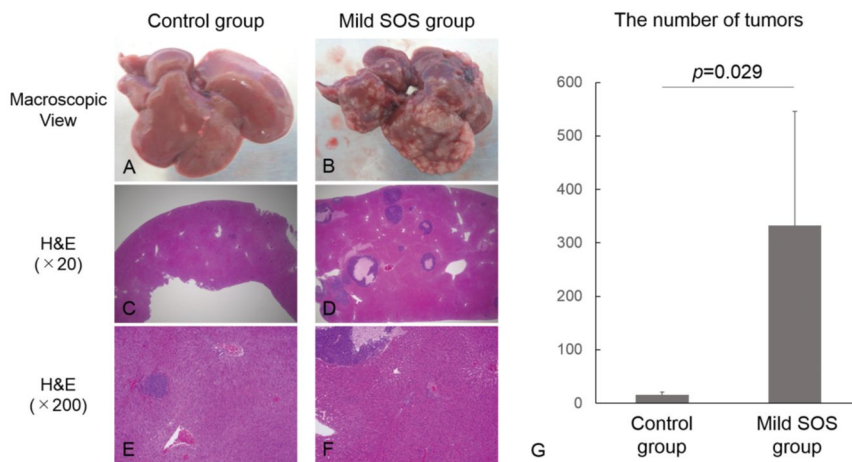


図 4

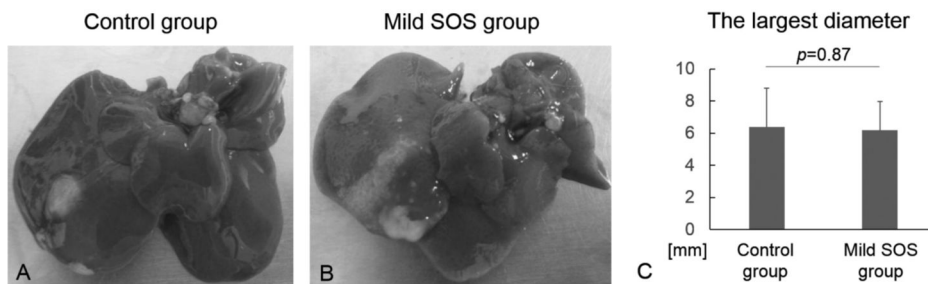


図 5

上記より、肝類洞内皮細胞障害の存在は CTC から形成される肝転移を促進するが、局所に作成した肝転移モデルの腫瘍径には差を認めないことからこれは肝障害が原因ではなく、類洞内皮細胞障害そのものが原因であると考えられた。この現象には CTC の接着因子が関連していると考えられるが、メカニズムの解明のためには今後のさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 NISHINO HIROTO, OKUNO MASAYUKI, SEO SATORU, TODA REI, YOSHINO KENJI, KASAI YOSUKE, SATOH MOTOHIKO, IWASAKO KEIKO, TAURA KOJIRO, HATANO ETSURO	4. 巻 41
2. 論文標題 Sinusoidal Obstruction Syndrome Promotes Liver Metastatic Seeding of Colorectal Cancer Cells in a Rat Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1803 ~ 1810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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

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
---------	---------