

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16418

研究課題名（和文）血液サンプルからの肝細胞癌幹細胞の単離と薬剤抵抗性の解明

研究課題名（英文）Isolation of cancer stem cells of HCC from blood samples and clarification of drug resistance

研究代表者

富原 英生（Hideo, Tomihara）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30724231

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）：血液細胞をはじき癌細胞に接着する特殊コーティングを施したスライド上で、肝細胞癌患者の血液中の癌細胞を捉えるシステムを構築した。癌幹細胞を培養するメEDIUM中で培養すると癌幹細胞を含むスフェロイド様の増殖細胞を得ることができる。2年間で肝細胞癌症例11例の血液を分析し、全例で癌細胞を検出できた。血液は20ml採取して4-40個（中央値14個）の癌細胞が見つかった。培養は7-10日間行い、スフェロイド様の細胞を回収し、当初細胞数が少なく、RNAが分解したが、種々工夫し遺伝子発現を半定量的に測定できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌の予後は未だ不良で治療も十分とはいえない。治療抵抗性の原因として癌幹細胞の関与が考えられている。本研究では、手術に比べてはるかに低侵襲な採血だけで、肝細胞癌を捉え、癌幹細胞を培養することで、その性質を分析し治療に応用することを目的として、11人の癌患者からの血液サンプルを分析した。血液中から少数の癌細胞をうまく捉え、それを増殖させて癌幹細胞を捉える、更に分子生物学的に分析するといった各ステップで大きなハードルがあったが、種々の工夫によってクリアできた。本研究の成果は癌患者の血液からリアルタイムに癌細胞を採取し分析する方法を確立したもので、医学的、学術的にも大きな成果である。

研究成果の概要（英文）：Using PMEA coated slides which exclude blood cells and attach to cancer cells, we established a method by which circulating tumor cells (CTC) from patients with hepatocellular carcinoma (HCC) could be efficiently captured. In two years, 11 HCC cases were examined and CTC was detected in all cases (4-40 cells/ 20ml blood samples : median 14). After incubation in ES medium for 7-10 days, spheroid like structures were recovered. In the first cases, RNA contents were readily degraded because of minimal cell number. Using newly developed semi-quantitative PCR for small cell population, RNA contents could eventually be measured.

研究分野：医学、消化器外科学

キーワード：癌幹細胞 肝細胞癌 血中循環腫瘍細胞 PMEAコーティング

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 (World Health Organization: WHO) の附属機関である国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) による GLOBOCAN2018 によると 1800 万人が癌に罹患し、このうち 955 万人は癌が原因で死亡している。肝臓の罹患患者数は 84 万人で全癌種中 6 位、また肝臓による死亡者数は 78 万人で全癌種中第 4 位である。また肝臓は予後不良の疾患であり罹患率に対する全死亡率は 0.93 と極めて高い。肝臓の原因は従来本邦では C 型肝炎、肝硬変を背景とした肝発癌が多かったが、近年肝炎ウイルス治療薬の発達によりウイルス感染に伴う肝臓患者の数は減少傾向である。一方で肝炎ウイルスのない非 B 非 C 型肝炎が増加傾向にあり背景肝疾患の分布は刻々と変化している。

肝細胞癌は大腸癌や肺癌などの他癌に比べて薬物耐性が強く、有効な抗癌剤治療はなく、ソラフェニブ、レンパチニブ、レゴラフェニブなどの分子標的治療薬が利用されるが、その効果は限定的と言わざるを得ない。近年、切除不能肝細胞癌の治療に関して、癌免疫療法や分子標的薬を用いた臨床試験で活路を見出すべく、1 次治療として抗 PD-1 抗体 (ニボルマブ) とソラフェニブを比較した無作為第 3 相試験である Check Mate-459 試験が行われたがニボルマブによる全生存期間の有意な延長は認められなかった。一方で、IMbrave150 試験では、抗 PD-1 抗体 (アテゾリズマブ) と血管新生阻害剤 (ベバシズマブ) の併用療法はソラフェニブに比較して全生存期間と無増悪生存期間を有意に延長したことは一筋の光明である。薬物耐性の解除が求められるが、これまでに治療抵抗性に対する対策はなされていない。

近年進行肝細胞癌の治療戦略は大きく変わろうとしている。本邦において肝細胞癌の 60% は切除や RFA などの局所治療の対象となる早期癌の状態で見つかり、30% の症例は TACE 治療の対象となる Intermediate Stage (中等度進行癌の状態) で発見される。早期癌で見つかった症例の 60% は最終的に再発を認めるため、肝細胞癌患者の 90% の症例が TACE 療法、分子標的薬による治療の適応となる。本邦より工藤らは Intermediate Stage、Up to seven 基準を超え、Child Pugh A の患者を対象にした多施設共同解析の結果、分子標的治療薬先行後に TACE 療法を行った方が有意に予後を改善したことが報告した。このことは今後肝細胞癌治療において全身療法、特に分子標的治療薬の重要性がますます増してくることを示している。近年、一部の血液癌、固形癌において幹細胞様の特徴を示す「癌幹細胞」が癌の転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関与することが明らかとなり、癌幹細胞の駆逐が究極の癌治療と考えられるようになった。本邦が好発地域である肝細胞癌についても、再発の芽となる癌幹細胞の同定は治療抵抗性の問題を解決するためにも急務である。

2. 研究の目的

肝細胞癌は、肝内転移を含めた血行性転移が多く認められ、肺・骨・副腎・脳への遠隔転移も少なくない。これら遠隔転移を有する「全身癌」患者に対しては手術適応がなく癌組織のサンプルが得られない症例も多く、血液サンプルからの癌幹細胞の単離ができれば理想的である。申請者らは、患者癌組織をマウスへ移植して作成した PDX をばらして、スフェロイドを作成し、癌幹細胞を含む少数の細胞塊からマウスに腫瘍を作成する技術を確認してきた。この技術を発展させて、腫瘍組織の生検・摘出によらない採血という低侵襲な方法で、血中の腫瘍細胞をタイムリーに捕獲することができれば、その中で癌幹細胞を捉えることができるかもしれない。本研究の

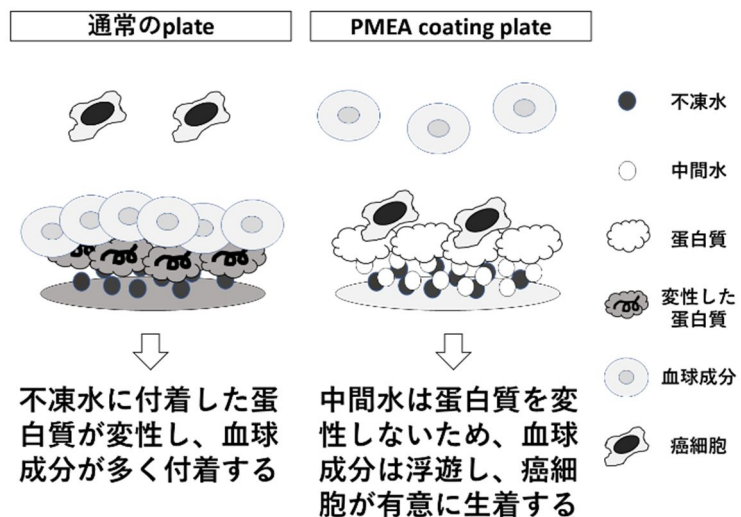
目的は、肝細胞癌患者の血液中の癌細胞 (circulating tumor cell: CTC) を捕捉して、癌幹細胞を含むスフェロイドを作成し、その性質を解明することで治療応用に繋げることである。

3. 研究の方法

- (1) 血液中の肝細胞癌細胞を同定するために、肝細胞癌の細胞株を用いて免疫染色に適した抗体を選別する。
- (2) 血液中の CTC を分離するための条件検討を行う。
- (3) 臨床検体の染色法について最適化する。
- (4) 倫理委員会を通し、患者の血液サンプルから CTC を同定、培養する。
- (5) スフェロイドの分子発現を測定する。

PMEA を用いた CTC の濃縮法について

臨床検体を用いた培養技術はここ数年で着実に進歩しているが、血液中の CTC の培養は極めて困難とされる。私達は、Oncoquick を用いた濃度勾配遠心分離を利用した通常の癌細胞濃縮の行程に加えて、合成高分子ポリマーの一つである PMEA に着目した。通常培養皿には不凍水が多く血液中の蛋白成分が変性し、多数の血液細胞が付着するが、PMEA コーティングには中間水という水分子が接着する。中間水に接着したタンパクは変性を来しにくいため血液細胞が接着しにくく少数の癌細胞だけを選択的に抽出することができる。



K. Tanaka et al. 化学工業(2016)

4. 研究成果

- (1) 血液中の肝細胞癌を検出するための免疫染色の条件検討に、Huh7 や PLC などの肝細胞癌の細胞株を用いて、EpCAM, CK8, CK18, CK8/18 カクテル抗体で比較染色した結果、検出率の高い CK8/18 カクテル抗体を使用することとした。
- (2) CTC の選択的収集法の検討: 採血の後、速やかに Oncoquick 細胞分離液を用いて赤血球、白血球、血小板を可及的に除去し、特殊ポリマー-PMEA をコーティングしたスライド上で一晩培養した。翌日にはスライドガラス上から血球成分が遊離して癌細胞が残り、CK8/18 抗体を用いてワンステップ法により免疫染色すると血球よりもサイズが大きく、いびつな形態の腫大した核を有する肝細胞癌細胞が観察できる。細胞株を用いたスパイク試験を行い、この検出系での癌細胞回収率は 75-80% 程度と許容範囲であった。当初は二抗体法や ABC 法による染色法

も試したが、二抗体法ではシグナルが弱く癌細胞を見つけるのに難渋し、ABC法ではステップが多く、スライド上の癌細胞のロスがみられたため、最終的にペルオキシダーゼ活性を可視化するワンステップ法で染色法が適切と判断した。

倫理委員会の承認のあと、患者同意を取得した上で2021年に4例、2022年には8例の肝細胞癌患者から20mlの血液サンプルを回収し、1例を除く11例が解析可能であった。血液中の細胞染色は免疫染色と形態的特徴から全例で癌細胞と思われる細胞を認め、20ml中に4-40個（中央値14個）の癌細胞様の細胞が存在すると判断した。培養は癌幹細胞性を反映するスフェロイド培養を行った。7-10日間の培養と観察を行い、血球細胞が脱落してゆく中、多くの症例でサイズの大きな癌細胞様の球体形成を認めた。はじめの数例でスフェロイドを集めてRNAを抽出したが、サンプル量が少なくRNA抽出段階で核酸の分解が起こり解析ができなかった。しかし、超微量PCR法を導入し、最終的には半定量的ではあるが各種の遺伝子発現を定量することに成功した。これら肝細胞癌のCTC染色と培養の結果の一部は、他の癌の結果と共に論文報告した。更にシングルセル解析を行うために自動マニピュレーターでの細胞捕獲法を習得し、シングルセル遺伝子増幅装置C1で培養細胞をトラップさせる条件の最適化についての検討を経てシングルセルレベルでの分析も可能となった。

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 1件）

1. 著者名 Nomura M, Yokoyama Y, Yoshimura D, Minagawa Y, Yamamoto A, Tanaka Y, Sekiguchi N, Marukawa D, Ichihara M, Itakura H, Matsumoto K, Morimoto Y, Tomihara H, Inoue A, Ogino T, Miyoshi N, Takahashi H, Takahashi H, Uemura M, Kobayashi S, Mizushima T, Anada T, Mori M, Doki Y, Tanaka M, Eguchi H, Yamamoto H.	4. 巻 24(4)
2. 論文標題 Simple Detection and Culture of Circulating Tumor Cells from Colorectal Cancer Patients Using Poly(2-Methoxyethyl Acrylate)-Coated Plates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 3949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24043949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
---------	---------