

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659607

研究課題名(和文) 消化器癌の末梢遊離癌細胞の精製と培養

研究課題名(英文) Purification and culture of circulating tumor cells in gastrointestinal cancer patients

研究代表者

西村 潤一 (Nishimura, Junichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20379209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血遊離癌細胞をPercoll、FACSにより解析した。EpCAM陽性CD44陽性細胞はCD45陽性であった。CD45陰性EpCAM陽性細胞は 4×10^5 個のうち10個検出された。しかし、健常症例の血液にも存在していることからこれらの細胞が遊離癌細胞であるとは結論付けられなかった。そこで遊離癌細胞から排出されていると考えられる血液中の遊離miRNAの解析を行った。大腸癌手術症例の術前術後の血液を用いてマイクロアレイ解析を行うことにより大腸癌症例に特異的ではないかと考えられる候補miRNAが4個検出された。

研究成果の概要(英文)：We sorted circulating cells in blood of colorectal patients using Percoll treatment and FACS analysis. EpCAM+CD44+ cells were all CD45 positive. CD45-EpCAM+ cells were detected 10 cells of 4×10^5 cells. However, these cells were detected also in healthy volunteer, indicating that all these cells were not circulating cells originated from cancer cells. Next, we analyzed blood circulating miRNA in colorectal patients. miRNA expression of preoperative and postoperative blood samples were analyzed using microarray analysis. Four miRNAs were detected to be a colorectal cancer specific miRNA.

研究分野：消化器外科・下部

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：遊離癌細胞 miRNA

1. 研究開始当初の背景

(1)血中に存在する癌細胞

原発巣から血管に浸潤した癌細胞が転移先の組織に生着し、栄養血管などを増生しながら癌細胞が増殖し転移巣を形成する。この過程において原発巣から離脱した癌細胞が循環血中に移行するものを末梢循環癌細胞 (circulating tumor cell) と呼ばれる。担癌患者の血中には原発巣・転移巣より遊離した癌細胞が循環していることが知られている。遊離した癌細胞の生理的意義は明確ではないが、遊離癌細胞を検出する技術の向上により他施設共同研究の研究結果などから予後予測因子や治療効果予測因子としての有用性が示されている。門脈からの肝転移を来しやすい大腸癌に関しては CTC が存在するのことは最近まで不明であったが、近年大腸癌症例においても CTC が存在し、CTC の有無が予後予測因子となることが多数報告されている。また、米国では転移性の乳癌患者、前立腺癌患者、大腸癌患者において CTC を測定することが FDA の認可を受けている。このように CTC は現在バイオマーカーとしての地位を築いている。

(2)CTC の検出方法

現在 FDA の認可を受けた CTC 測定方法は CellSearch system を用いた方法である (Cristofanilli M, *N Engl J Med*, 2004)。これは患者の全血から磁気ビーズ標識 EpCAM 抗体を用いて上皮性細胞を分離し、さらにその中からサイトケラチン陽性 CD45 陰性の CTC を光学的に検出する方法である。細胞の分離・染色工程は自動化されているが最終判断は目視にゆだねられる。また、その発展技術として CTC の phenotype (HER2、EGFR など) や genotype (FISH 法) の解析も開発されている。分子生物学的手法としては qPCR や DNA アレイ (Expression アレイ、CGH アレイ) を用いて遺伝子発現を指標に CTC を測定する方法がある。近年、癌細胞を培養しその産生タンパクにより CTC を同定する EPISPOT 法 (Alix-Panabieres C, *Clin Chem*, 2007) や、未標識の CTC をマクロチップ (CTC chip) を用いて検出する方法などが開発されている。

(3)抗癌剤感受性試験と CTC

特に再発症例においては再発した部位の組織を得られないままに化学療法を施行しなければならない局面に遭遇する。癌細胞に対する抗癌剤感受性を解析する方法としては CD-DST 法などがあるが、解析するためにはある程度の癌細胞量が必要である。しかし CTC は血液 10ml 中に 1-100 個程度であり十分ではない。また、現在の CTC の検出方法

では癌細胞を増殖させることは不可能であり、現状では CTC を抗癌剤感受性試験に用いることはできない。

2. 研究の目的

今回血中に存在する遊離癌細胞を分離し、in vitro で増殖させることを目的としている。研究開始後には CTC に由来すると考えられる miRNA に注目して解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

末梢血遊離癌細胞の精製・培養

対象

当科において 20 歳以上の消化器癌担癌患者を対象とする。また、他癌の併存、既往のある症例は除外する。採血を 10ml 行うことにより全身状態に影響を及ぼす症例を除外する。大阪大学医学部付属病院規定の臨床試験倫理審査委員会の承認のもと患者本人にインフォームドコンセントにより承諾を得た症例とする。

末梢血からの遊離癌細胞の精製

CellSearch システムでは EpCAM 陽性細胞を磁気ビーズ法により回収し、CD45 および CK を用いて検出しているが、本研究においては FACS を利用するものとする。患者からの血液 10ml を用いて血清を回収する。Percoll による赤血球の除去および死細胞、凝固因子の分離を行う。表面抗原マーカーとして EpCAM、CK18、E-cadherin、CD45 抗体を用いて FACS にて展開し、CD45 陰性分画のうち上皮性マーカーを発現している細胞を FACSsort にて分離する。当初は以下の方法を行うこととしていたが、EpCAM 陽性細胞が健常症例にも存在することから、CTC に由来すると考えられる miRNA に注目して解析を行った。

回収された遊離癌細胞の証明

遊離癌細胞の培養

培養増殖した遊離癌細胞の検討

培養増殖した遊離癌細胞を用いた耐性機構の解明

変更後の方法

周術期における血清遊離 miRNA のマイクロアレイ解析

候補 miRNA の validation

臨床病理学的因子との比較解析

4. 研究成果

末梢血遊離癌細胞の精製・培養

末梢血液 10cc を大腸癌症例の術前に採取し、Percoll を用いて細胞のみを精製した。この

細胞に EpCAM-APC、CD44-FITC、CD45-PE、を用いて FACS で解析を行った (図 1)。

CD45 陰性、EpCAM 陽性細胞は 4.0×10^5 個の細胞中 10 個検出された。また、大腸癌幹細胞のマーカーとして知られる CD44 陽性、EpCAM 陽性細胞は 4.0×10^5 個の細胞中 15 個検出された。また、この 2 つの検出細胞は merge しなかった。すなわち CD44 陽性、EpCAM 陽性細胞は CD45 陽性であった。このことから CD44 陽性 EpCAM 陽性細胞は血球系細胞細胞であると考えられ、CTC ではないと考えられた。しかし、健常者からの血液を用いた解析においても EpCAM 陽性 CD45 陰性細胞が検出されたことから、この細胞が癌特異的であるとは示せなかった。

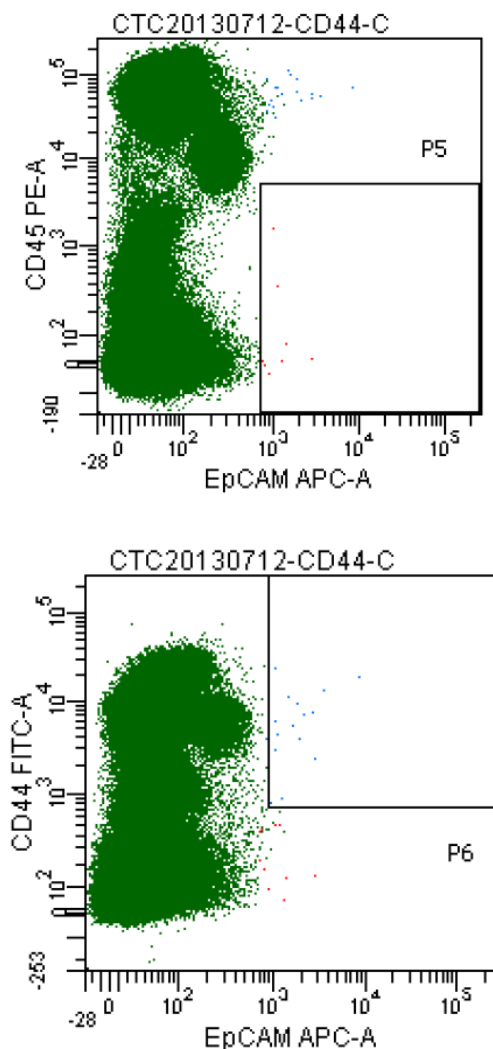


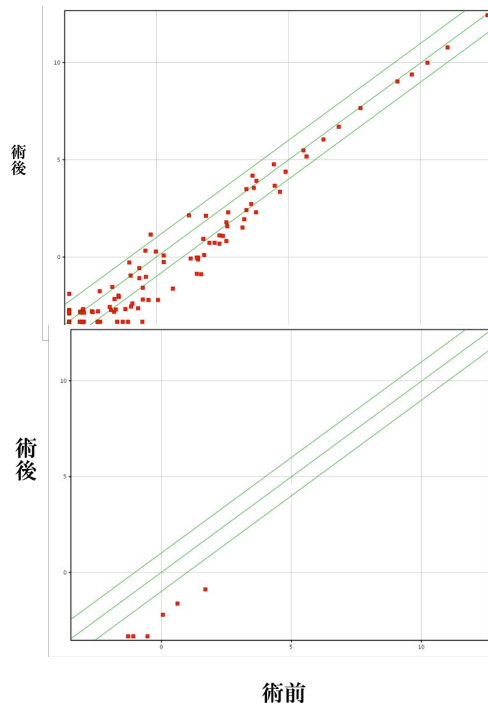
図 1 血液中細胞の CD44, CD45, EpCAM による FACS 解析 (上段: CD45 & EpCAM、下段: CD44 & EpCAM)

血液中 miRNA の解析

そこで、血液中に存在する遊離 miRNA に注目した。遊離 miRNA は CTC からの分泌も十分に考えられる。大腸癌症例 10 例の根治的切除術の術前と、術後約 7 日目に血液を採取し、血漿を分離した。microRNA を抽出しアレイ解析を行った。結果多くの miRNA が術前には高値であったが術後に低下する傾向を認めた。

これらの miRNA のうち有意に、4 倍以上の差を認めた候補 miRNA を 6 種類検出できた (図 2)。

これらの候補 miRNA を validation のため



に 30 例の術前術後血液検体を用いて解析した。その結果、6 個の候補 miRNA のうち 4 個の miRNA が有意に術後に低下することが判明した。

図 2 術前術後の血液中遊離 miRNA のアレイ解析 (上段: アレイ解析結果、下段: 候補 miRNA の検出)

次に健常症例の血液と比較を行った。候補 miRNA 4 個のうち 3 個が大腸癌症例において健常者よりも上昇していることが分かった。

以上のことからこれらの miRNA は疾患特異的マーカーになる可能性が示唆された。さらに症例数を増加させて特異度、感度などを解析する予定である。

また、これらの研究成果は現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

野中亮児、西村潤一、畑泰司、竹政伊知朗、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹。大腸癌における血液中 miR21 のバイオマーカーとしての検討 第 68 回日本大腸肛門病学会学術集会 (東京、2013/11)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村潤一(Nishimura Junichi)
大阪大学医学系研究科・助教
研究者番号：20379209

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：