

Ⅲ-2 ヒト癌細胞を用い、白血球凝集および密度勾配遠心を利用したマウス血中循環腫瘍細胞バイオアッセイモデルの確立

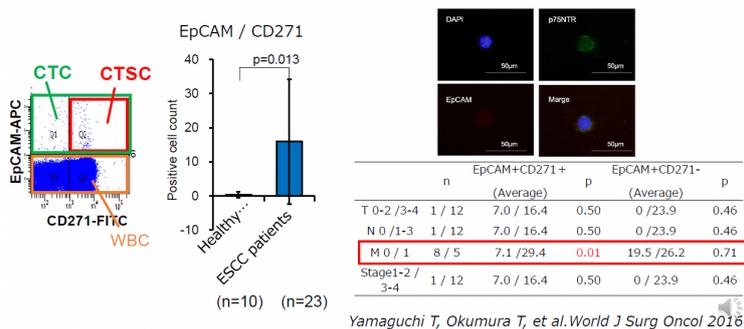
学術研究部医学系 講師 奥村知之

【目的】

近年、様々な癌種において血中循環腫瘍細胞（CTC）が検出されるようになり Liquid Biopsy の一つとして転移予測や治療効果予測などの診断的意義が検討されている。一方、これまでの CTC 研究は上皮細胞マーカーである上皮細胞接着分子 EpCAM の発現を指標に捕捉した細胞数をカウントすることで癌の臨床病期や治療効果、予後との相関を検討したものがほとんどであり、CTC の悪性形質に関わる分子機構や治療標的としての機能解析は進んでいない。

我々はこれまでに低親和性神経成長因子受容体 p75NTR や CD44 の発現に基づいて食道癌および胃癌における腫瘍幹細胞を同定分離し分子機構解析を進めるとともに、EpCAM と p75NTR や CD44 を組み合わせて CTC を検出することでより臨床病理学的特性を反映した CTC を検出できることを報告してきた。本研究では、食道癌、胃癌および膀胱癌細胞を用いて CTC における悪性形質制御機構の解明と新規治療開発への応用を目的として、ヒト癌細胞を用いたマウス CTC バイオアッセイモデルの確立とその臨床応用を目指す。

CD271をマーカーとした食道癌CTCの同定

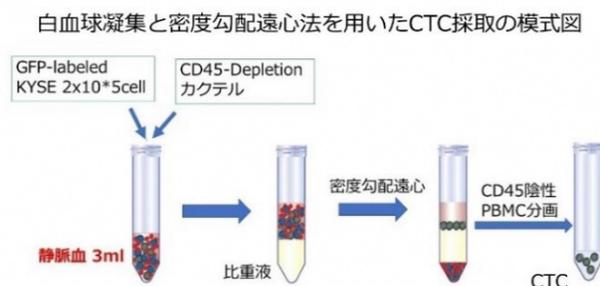


【方法】

① 密度勾配遠心法を用いた CTC 捕捉法の確立

健康人ボランティアから抹消静脈血 5 ml をヘパリン加採血管に採取し、ヒト食道癌細胞株 KYSE、胃癌細胞株 MKN-45、および膀胱癌細胞株 MIAPaCa を 1×10^5 個混和した。

限界希釈による細胞回収率の計測には、KYSE を Green-fluorescent Cytoplasmic Membrane Staining Kit を用いて標識したものを血液に混和した。細胞を混和した血液を白血球抗原 CD45 Depletion カクテルで処理し、密度勾配遠心によって単核球層を採取し、捕捉した細胞を用いて、EpCAM/DAPI 蛍光染色を行い、蛍光画像を取得し CTC の識別を行った。捕捉細胞の画像解析には AI を用いた解析アルゴリズムを応用した。



② ヒト癌細胞株を用いたマウス血行性転移および CTC モデルの作成

イソフルランによる吸入麻酔下に 6 週令ヌードマウスの皮下および胃壁内にマイクロピペットを用いて KYSE、MKN-45、および MIAPaCa-2 を 1×10^5 個注入し、6 週後に深麻酔下に心臓穿刺によって血液 0.5 ml を採取したうえで頸椎脱臼によって安楽死させ、皮下腫瘍、胃および肝臓を摘出し腫瘍形成を確認した。皮下、胃、および肝転移腫瘍においてはヒト特異的上皮細胞膜抗原 EMA の発現を免疫組織染色を用いて検出した。血液は上記①にて確立した密度勾配遠心法を用いて単核球層を採取し、CD45 抗体を用いたネガティブセレクション法を組み合わせることで CTC を捕捉し、EpCAM/p75NTR や CD44/DAPI 蛍光染色を行い、蛍光画像を取得し CTC の識別と画像解析を行った。本研究におけるマウスへの腫瘍細胞移植実験については、計画書を提出し富山大学動物実験委員会の承認を得た。

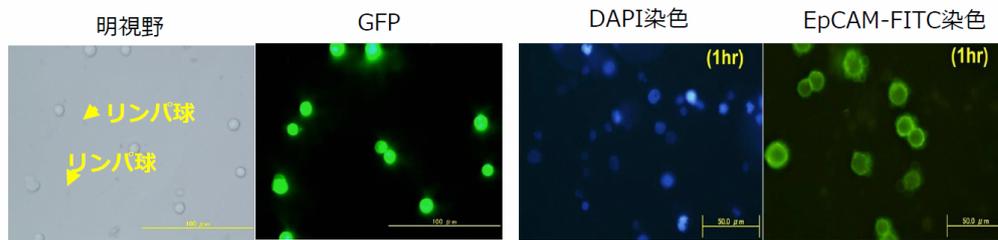
【結果】

① 密度勾配遠心法を用いた CTC 捕捉

健康人血液に KYSE および GFP 標識 KYSE 1×10^5 個を混和し、密度勾配遠心および CD45 depletion によって単核球層を採取し、GFP および EpCAM-FITC 検出によって混和した KYSE の回収を確認した。さらに限界希釈法を用いて混和細胞数を調整したところ、100 細胞混和にて平均 33.3% (n=3) の回収率で回収できることを確認した。

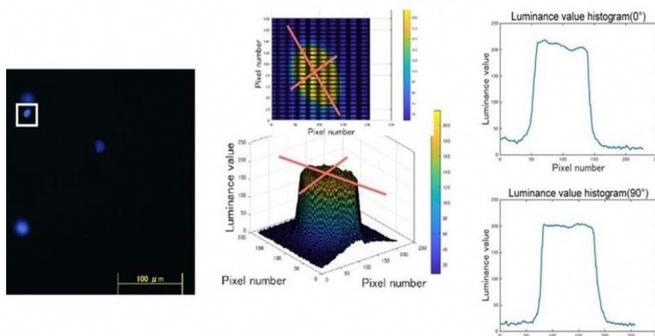
血液に混和したGFP標識-KYSE140の回収

血液に混和したKYSE140の回収



回収した KYSE を用いた多重蛍光染色では、EpCAM-APC、p75NTR-FITC および DAPI 染色を行い、蛍光顕微鏡画像を検討したところ、CD45 陰性/EpCAM 陽性/p75NTR 陽性細胞、CD45 陰性/EpCAM 陽性/p75NTR 陰性細胞、CD45 陰性/EpCAM 陰性/p75NTR 陽性細胞、CD45 陰性/EpCAM 陰性/p75NTR 陰性細胞、CD45 陽性/EpCAM 陰性/p75NTR 陽性細胞、CD45 陽性/EpCAM 陰性/p75NTR 陰性細胞に分別できる可能性が示された。取得した CD45-PE、EpCAM-APC、p75NTR-FITC および DAPI 染色画像を AI を用いた高精度解析システムを用いた解析に進め、サンプル量、露光時間、背景処理など画像取得条件の検討を行い、撮影条件の最適化に必要なパラメーターに関する知見を蓄積し安定した画像取得が可能となった。

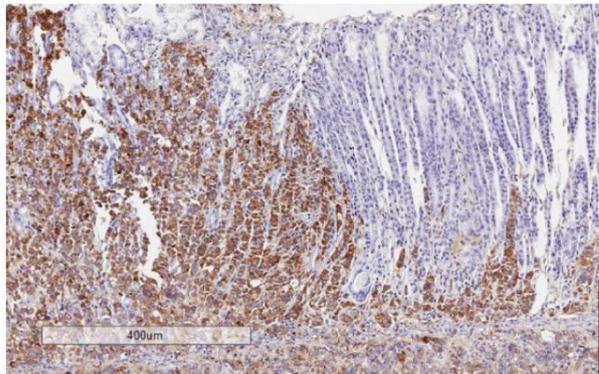
DAPI染色を用いたKYSE細胞の厚みと焦点の解析



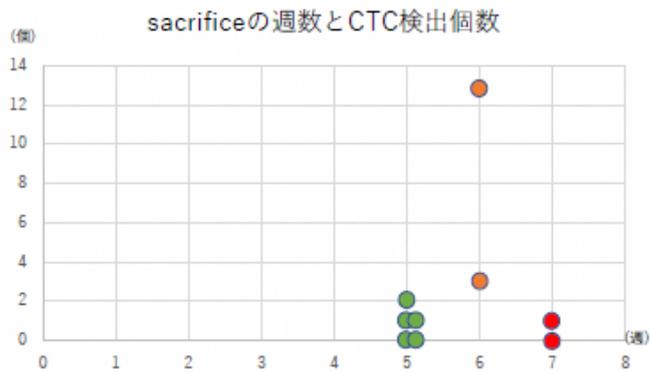
② ヒト癌細胞を用いたマウス血行性転移および CTC モデルの作成

KYSE、MKN-45、および MIAPaCa-2 を皮下および胃壁内に移植し、胃壁、皮下および肝での腫瘍形成を認め、ヒト特異的 EMA の発現によって移植したヒト癌細胞由来であることを確認した。

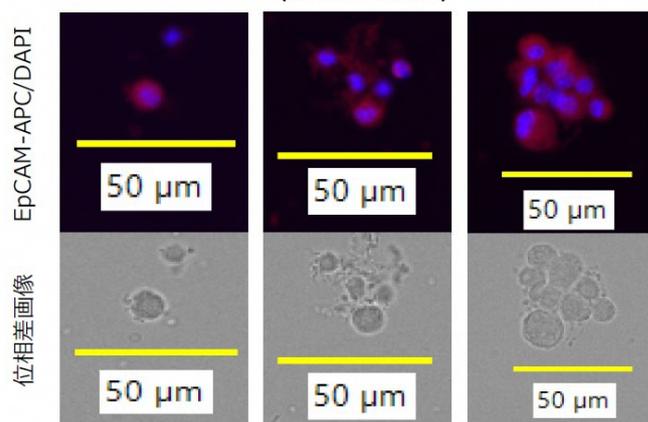
胃壁へのヒト癌細胞株移植による腫瘍形成
(ヒト特異的EMA染色)



さらに、KYSE、MKN-45、および MIA PaCa-2 を移植したマウスともに、採取した血液 1 ml から CTC を 1 個~20 個捕捉することができた。これらの細胞は核染色にて N/C 比の高い単核細胞であり、EpCAM 陽性であり、複数の細胞クラスターを形成していた。



マウスCTCモデルから回収したヒト癌細胞株
(MIA PaCa-2)



【まとめ】

- ① 密度勾配遠心法および CD45 depletion 法の組合せによる CTC 捕捉法を確立し、細胞表面マーカーに対する蛍光染色を用いた画像取得と AI による解析に向けた撮影条件の最適化を進めた。
- ② ヒト食道癌、胃癌および膵癌細胞株の移植によって、ヌードマウスでの CTC モデルを作成することができた。

【今後の展望】

今後、ヒト癌細胞株を移植する部位や細胞数、検出時期を検討することで、再現性の高い安定したモデルを作成するとともに、CTC をターゲットとした薬剤投与下で CTC を採取し、分子生物学的解析を進める予定である。

また、取得した CTC 画像の効率的、高精度な解析に向けて、AI を用いた判別アルゴリズムの確立を進める予定である。さらに、確立した CTC 捕捉法を応用し、癌患者の血液から CTC を単離する新規方法の構築についても検討を行う。

【学会発表】

奥村知之、寺林賢司、明石堯久、福田卓真、馬場逸人、渡辺徹、三輪武史、平野勝久、渋谷和人、北條荘三、松井恒志、吉岡伊作、藤井 努

「AI を利用した微分干渉画像に基づく CTC 検出システムの開発」
第 121 回日本外科学会定期学術集会 2021 年 4 月 8 日-10 日 千葉

山崎豪孔、奥村知之、福田卓真、明石堯久、藤井努

「ヒト癌細胞株を用いたマウス血中循環腫瘍細胞バイオアッセイモデルの作成」
第 54 回制癌剤適応研究会(演題採択) 2022 年 2 月 18 日 富山