

III. ヒキガエル由来生薬成分による血中循環腫瘍細胞の根絶を目指した新規癌治療法の開発

学術研究部薬学・和漢系 助 教 藤 井 拓 人
学術研究部医学系 講 師 奥 村 知 之

【研究背景および目的】

血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell: CTC) は、腫瘍組織から離脱して血液中へと浸潤し、全身を循環する癌細胞であり、癌の再発や転移の源であると考えられている。さらに CTC は複数の癌細胞で塊 (クラスター) を形成することで、自己複製能と腫瘍組織を構成するさまざまな系統の癌細胞を生み出す能力を併せ持つ癌幹細胞の性質を獲得し、薬物療法や放射線治療に抵抗性を示す。従って、CTC の消失 (根絶) は、癌治療成績の劇的な向上に結びつくと期待されるが、CTC の生物学的特性については不明な点が多く、CTC を標的とした効果的な治療法は開発されていない。

ナトリウムポンプ (Na^+, K^+ -ATPase) はほぼ全ての細胞の原形質膜に存在し、膜電位の維持を担う生命活動に必須の膜輸送タンパク質である。しかし最近我々は、通常神経細胞に高発現する Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform ($\alpha 3\text{NaK}$) が様々な癌細胞の細胞内小胞に異常発現することを明らかにした。また癌細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* 解析により、 $\alpha 3\text{NaK}$ が転移癌細胞の生存に関与することが示唆され、 $\alpha 3\text{NaK}$ が CTC の治療標的となりうる可能性を見出した。

本研究では、(1) 転移 (浮遊) 癌細胞および CTC における $\alpha 3\text{NaK}$ の新規病態生理機能を解明すること、(2) 新規 CTC バイオアッセイモデルを構築すること、(3) ヒキガエル毒腺分泌物由来の生薬である蟾酥 (センソ) から単離・精製した種々の有効成分を用いて、 $\alpha 3\text{NaK}$ を標的とした新規抗癌メカニズムの解明および CTC 抑制に有力な候補生薬成分の探索を行うことを目的としている。強心配糖体による CTC 抑制メカニズムを分子レベルで明らかにすることで、 $\alpha 3\text{NaK}$ を標的とした新規の CTC 制御機構の解明につなげる。さらに、ヒト臨床サンプルを用いた研究を行い、強心配糖体の治療効果や本研究で見出した CTC 制御機構の有用性を検証することで、CTC 根絶を目指した新規治療法開発の研究基盤を構築する。

【本年度の成果の概略】

1. 細胞内ナトリウムポンプを標的とした新規血中循環腫瘍細胞抑制機構の解明 (富山大学 学術研究部薬学・和漢系 薬物生理学：藤井 拓人)

ヒト膵癌細胞株 (MIA PaCa2 および Panc1) において Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform ($\alpha 3\text{NaK}$) が細胞剥離により原形質膜移行することを見出した。これらヒト膵癌細胞株をヌードマ

ウスの背部皮下に移植することでマウス CTC バイオアッセイモデルを作製し、CD45 抗体を用いたネガティブセレクション法を用いて CTC をロスなく高純度で単離する方法を確立した。単離した膵癌由来 CTC において $\alpha 3\text{NaK}$ が原形質膜に発現していることを見出した。さらに、膵癌細胞の剥離時における $\alpha 3\text{NaK}$ の原形質膜移行を抑制し、アポトーシスを誘導する強心配糖体を見出した。

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 (富山大学 学術研究部医学系 消化器・腫瘍・総合外科：奥村 知之)

ヒト癌細胞株を健常人血液に混和したサンプルを用いて、密度勾配遠心法および CD45-Depletion による迅速かつ効率的な CTC 捕捉法を確立した。また、捕捉した CTC の画像解析に AI を使用することで、ヒトと比較して高い分類精度と短時間での解析が実現できる可能性を示した。また、ヒト食道癌、胃癌および膵癌細胞株の移植によって、ヌードマウスでの血行性転移および CTC 捕捉モデルを作成した。さらに、上記にて構築した AI アルゴリズムを用いて患者血液検体から CTC を検出できる可能性を示した。

総括

これまで CTC におけるナトリウムポンプの発現解析は全く行われていない。藤井らは、ヒト膵癌を用いたマウス CTC バイオアッセイモデルより単離した CTC において $\alpha 3\text{NaK}$ が原形質膜に発現することを初めて明らかにした。また膵癌細胞において剥離時の $\alpha 3\text{NaK}$ の原形質膜移行を抑制し、剥離癌細胞にアポトーシスを誘導する強心配糖体を見出した。また、奥村らは、ヒト CTC 単離方法の確立および AI アルゴリズムを用いた新規の CTC 検出技術の構築につながる成果を得た。

これまでの研究により、(1) ヒト癌細胞における $\alpha 3\text{NaK}$ の新規の病態生理機能の解明、(2) ヒキガエル由来強心配糖体による新規の抗腫瘍メカニズムの解明、(3) ヒト癌細胞株を用いた新規のマウスバイオアッセイモデルの構築、(4) マウス血液からの CTC 補足法および AI を用いた新規の CTC 判別技術が確立された。従って、癌患者の血液に含まれる微量の CTC 単離法および解析技術の開発や強心配糖体による $\alpha 3\text{NaK}$ を標的とした新規 CTC 治療法の開発を目指した研究基盤が構築された。

III-1 細胞内ナトリウムポンプを標的とした新規血中循環腫瘍細胞抑制機構の解明

学術研究部薬学・和漢系 助 教 藤 井 拓 人

【研究背景・目的】

植物由来の強心配糖体が血中循環腫瘍細胞 (CTC) の悪性化に関与するクラスター化を阻害することが報告され、ナトリウムポンプ (Na^+, K^+ -ATPase) が、CTC の病態生理機構に関与する可能性が示唆されているが、その分子機構の詳細は不明である。本研究では、強心配糖体を多数含むヒキガエル毒素由来生薬成分による CTC 抑制効果、および抑制機構の分子メカニズムを解明することで、ナトリウムポンプを標的とした新規 CTC 治療薬の開発につながる研究基盤を構築することを目的としている。令和 2 年度の研究において、ほぼすべての細胞の原形質膜に普遍的に存在する Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ -isoform ($\alpha 1\text{NaK}$) とは別に、 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform ($\alpha 3\text{NaK}$) が様々な癌細胞の細胞内小胞に異常に発現していること、癌細胞が剥離する際に $\alpha 3\text{NaK}$ が原形質膜へ移行することで剥離 (転移) 癌細胞の生存に関与することを明らかにし (Fujii, Okumura et al., *iScience*, 2021)、 $\alpha 3\text{NaK}$ が CTC 抑制の標的候補分子である可能性を見出した。令和 3 年度の研究において、細胞内 $\alpha 3\text{NaK}$ に強心配糖体が作用することで癌細胞の GLUT1 のエンドサイトーシスを誘導し、グルコース取り込みおよび解糖系を阻害し増殖抑制を引き起こすという新しい抗癌メカニズムを見出した (Fujii et al., *J. Cell. Physiol.*, 2022)。また、ヒキガエル毒素由来の強心配糖体である bufalin および gamabufotalin が低濃度で癌細胞の膜マイクロドメインに存在する $\alpha 1\text{NaK}$ に作用することで抗癌シグナルの起点となる容積感受性アニオンチャネルの活性化を引き起こすことを見出した。

本年度は、ヒト膵癌細胞を用いたマウス CTC バイオアッセイモデルを作製し、効率的な CTC 補足技術の構築および CTC における $\alpha 3\text{NaK}$ の発現解析を行った。また植物およびヒキガエル由来の強心配糖体において、剥離 (浮遊) 状態の癌細胞に選択的に作用する薬物の探索を行った。

【方法】

① 細胞培養

ヒト膵癌由来 MIAPaCa2 および Panc1 細胞は、Eagle's Minimum Essential Medium、HT-29 細胞は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (和光純薬)、100 units/mL penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin、10% FBS を加えた培地を用いて 37°C、5% CO_2 存在下で培養した。

② 細胞表面ビオチン化およびウェスタンブロット

原形質膜に存在するタンパク質をビオチンラベルした後にトータルライセートを調製した。アビジンビーズとインキュベーションし、原形質膜に存在するタンパク質を抽出した。原形質膜サンプルとトータルライセートを SDS-polyacrylamide gel にアプライし、泳動した。SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む溶液で、室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体として、抗 α 3NaK 抗体もしくは抗 ERp57 抗体を 1:5,000 希釈で使用した (4°C、15 時間)。二次抗体として HRP 標識した抗マウス IgG 抗体および抗ウサギ IgG 抗体を 1:5,000 希釈で使用し、室温で 1 時間インキュベーションした。Western Lightning ECL pro を用いて化学発光させ、LAS-4000 plus system により検出した。

③ 免疫細胞染色

接着状態で染色では、カバーガラス上で培養した細胞を氷冷したメタノールで固定し、0.3% TritonX100 溶液で膜透過処理した。剥離細胞は、Smear gel を用いてスライドガラスに固定した後に、0.3% TritonX100 溶液で膜透過処理を行った。GSDB (17% goat serum、450 mM NaCl、0.3% TritonX-100 含有 20 mM phosphate buffer pH 7.4) を用いて、室温で 1 時間インキュベーションしてブロッキングし、抗 α 3NaK 抗体を 4°C にて 16 時間反応した。洗浄した後、Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体を遮光状態で室温にて 1 時間反応した。DAPI 溶液 (1:1,000) 希釈で室温にて 15 分間反応させた。蛍光を観察するには、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 780) を用いた。

④ マウス CTC モデルの作製

MIAPaCa2 もしくは Panc1 細胞をヌードマウスの背部皮下に 1×10^7 個/300 μ l で 2 か所に移植した。移植後に腫瘍サイズが 2 cm 程度になるまで (約 6~10 週間) 飼育した後に、安楽死させ、心臓から血液 (約 1 ml) を採取した。強心配糖体は腫瘍サイズが 2 cm 程度になった後に 1 週間毎日 2 mg/kg で腹腔内投与を行った (現在進行中)。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。

⑤ CTC の単離および免疫蛍光染色

(1) Opti-prep を用いた単離方法。採取した血液を溶血処理した後に、Opti-prep および PBS に加えて転倒混和した。混和した血液を 1000xg で 30 分間遠心した。上層を採取し、300xg で 10 分間遠心し上清を除いて CTC 画分を抽出した。

(2) EasySep™ Mouse/Human Chimera Isolation Kit を用いた単離方法。血液を溶血処理した後に Ammonium chloride solution と 1:9 で混和し氷上で 15 分間インキュベーションした。300xg で 6 分間遠心し、ペレットを EasySep™ Buffer で洗浄した。サンプルに Rat serum を加え、96 well plate に蒔いた。Isolation cocktail を加え、混和し 10 分間インキュ

ベーションした。サンプルに Rapid spheres を加え混和し、5 分間インキュベーションした。サンプルにメディアウムを加えてピペッティングして混和した。Plate を 10 分間マグネットの上に置き、上清を新たな 96 well Plate に移し再度マグネット上に置き 5 分間インキュベーションした。上清の細胞を CTC 画分として採取した。

上記の方法で単離した CTC 画分を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、0.3%TritonX100 溶液で膜透過処理を行った。GSDB を用いて、室温で 1 時間インキュベーションしてブロッキングし、抗 α 3NaK 抗体および EpCAM-PE で 4°Cにて 16 時間反応させた。洗浄した後、Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体を遮光状態で室温にて 1 時間反応した。DAPI 溶液 (1:1,000)希釈で室温にて 15 分間反応させた。蛍光を観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 780) を用いた。

⑥ カスパーゼ活性の測定

強心配糖体を含んだメディアウムで 48 時間培養した接着 Panc1 細胞および剥離し浮遊させた Panc1 細胞において Caspase-Glo3/7 Reagent (プロメガ) を用いて Caspase 活性を測定しアポトーシスを評価した。

【結果】

① 膵癌細胞における α 3NaK の発現

まずヒト膵癌 MIAPaCa-2 細胞における α 3NaK の局在を検討した。接着状態において、 α 3NaK の蛍光シグナルは、細胞質内において観察された (図 1 A)。MIAPaCa-2 細胞を Trypsin-EDTA で剥離し浮遊させた状態でスライドガラスに Smear gel で固定化し免疫染色を行ったところ、 α 3NaK の蛍光シグナルは原形質膜において観察された (図 1A)。

また、MIAPaCa-2 細胞および Panc1 細胞において、原形質膜のタンパク質をビオチンラベルし、原形質膜における α 3NaK の発現レベルを検討した。トータルライセートおよび原形質膜サンプルにおいて抗 α 3NaK 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、どちらの細胞株においても、剥離細胞で原形質膜の α 3NaK の発現レベルが上昇した。従って、大腸癌や胃癌細胞と同様 (Fujii et al., *iScience*, 2021) に、膵癌細胞においても α 3NaK は、細胞剥離により細胞質内から原形質膜へと移行することが示唆された。

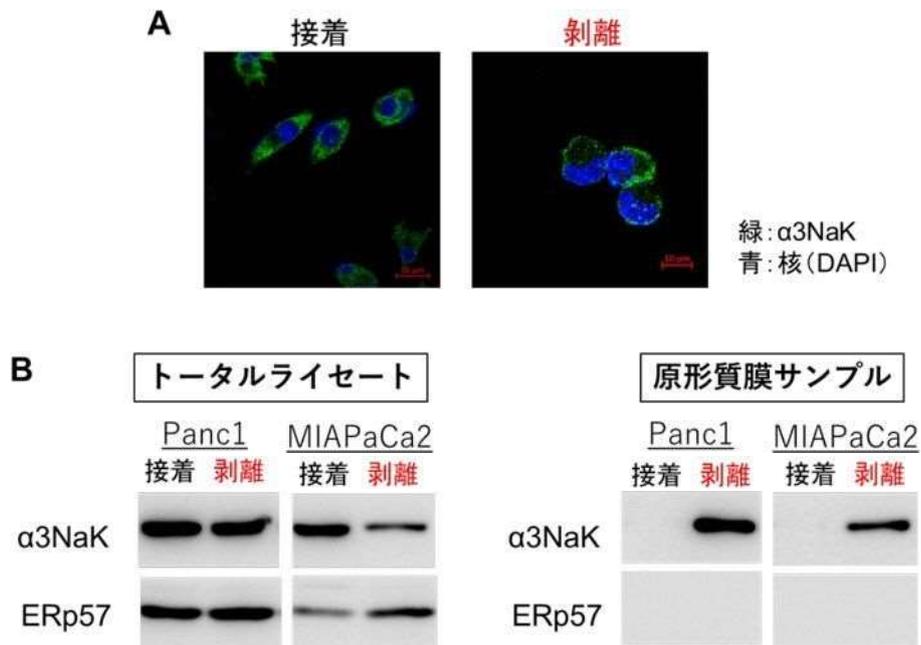


図 1. ヒト膵癌細胞における α 3NaK の発現

② マウス CTC における α 3NaK の発現

ヌードマウスの背部の皮下に MIAPaCa2 細胞を移植し、腫瘍サイズが約 2 cm になった際に安楽死させ心臓から血液を採取した。採取した血液をまず Opti-prep を用いた密度勾配遠心により分離し CTC を単離する方法を試みた。種々の条件検討を行ったが、遠心分離法では、マウスの血球由来成分のコンタミネーションが見られることや CTC のロスが大きいことから CTC の定量化への応用が難しいことが示唆された。

次に、EasySep を用いたネガティブセレクション法により CTC の単離を試みた。この方法では CD45 抗体を用いてマウスの造血系細胞を除去することができる。また磁器を用いた分離を行うことから、遠心分離法に比べて CTC のロスが抑えられることがわかった。マウス背部への腫瘍生着率、CTC 採取率、遠隔転移率、腫瘍最大径を図 2A に示した。単離した CTC において免疫蛍光染色を行ったところ、MIAPaCa2 細胞のマーカーである EpCAM 陽性細胞において α 3NaK 蛍光シグナルは原形質膜に観察された。従って、CTC において α 3NaK は原形質膜に移行していることが明らかとなった (図 2B)。一方、マウスの血液を採取し、溶血した後に遠心分離し得られた造血系細胞において抗 α 3NaK 抗体を用いた免疫染色を行ったが、マウス由来細胞では α 3NaK の有意な蛍光シグナルは検出されなかった (図 2C)。

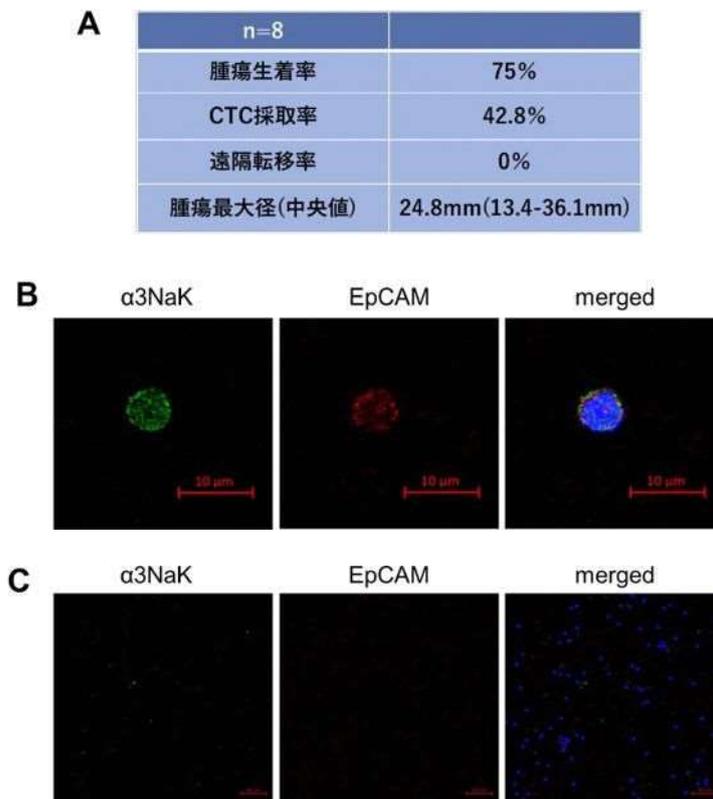


図 2. CTC における $\alpha 3NaK$ の発現

③ 膀胱癌細胞の剥離に伴う $\alpha 3NaK$ の膜移行やアポトーシスに対する強心配糖体の効果

これまで大腸癌細胞や胃癌細胞において、 $\alpha 3NaK$ の発現を siRNA により減少させることで、剥離時のアポトーシスが促進することを報告した (Fujii et al., *iScience*, 2021)。そこで、植物およびヒキガエル由来の各種強心配糖体が、剥離時の $\alpha 3NaK$ の原形質膜移行やアポトーシスを抑制するかについて検討した。その結果、細胞剥離による $\alpha 3NaK$ の原形質膜移行を抑制し (図 3 A)、剥離時の癌細胞においてより強力にアポトーシスを引き起こす (図 3 B) 強心配糖体 A を見出した (論文投稿前のため非公表)。

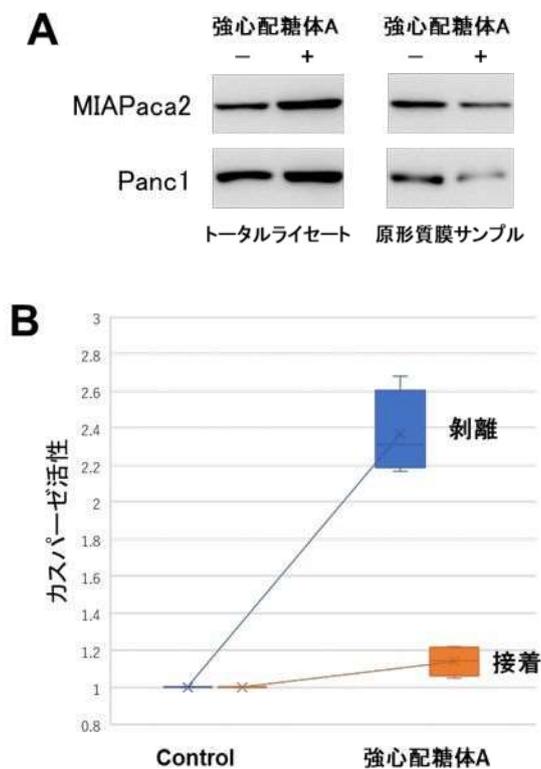


図 3. Panc1 細胞の $\alpha 3\text{NaK}$ の原形質膜移行およびカスパーゼ活性に対する強心配糖体 A の効果. (n=4)

④ マウス CTC に対する強心配糖体の効果

現在、ヒト膵癌細胞を背部に皮下移植した CTC モデルに強心配糖体 A を腹腔内投与し CTC に対する抑制効果を検討している。予備的解析として強心配糖体 A をマウス 10 匹に対して投与し、安全性試験を行った。強心配糖体 A を 2 mg/kg で一週間毎日腹腔内投与を行ったが、投与による有意な体重変化は見られず、その他有害事象を疑う所見は観察されなかった (図 4)。今後、EpCAM を用いた CTC の定量を行い、強心配糖体 A が血中の CTC 数を減少させるかについて詳細に検討を行う予定である。

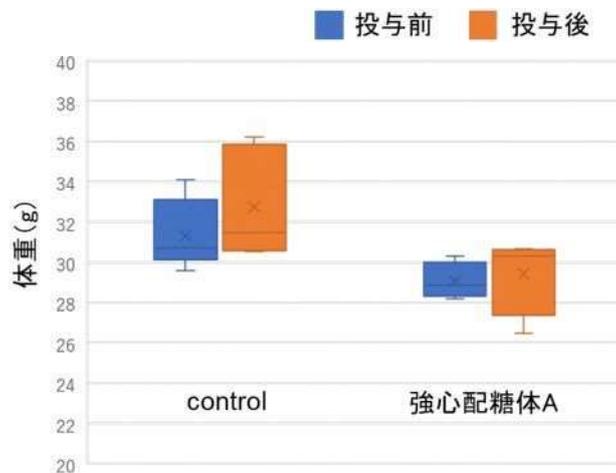


図 4. 強心配糖体 A の投与によるマウスの体重変化 (n=10)

【まとめと今後の展望】

本年度の研究により、ヒト膵癌細胞を用いたマウス CTC バイオアッセイモデルの構築を行い、CTC をロスなく高純度で単離する方法を確立した。また CTC において $\alpha 3\text{NaK}$ が原形質膜に発現することを明らかにした。さらに、膵癌細胞の剥離時における $\alpha 3\text{NaK}$ の原形質膜移行を抑制し、アポトーシスを誘導する強心配糖体 A を見出した。マウス CTC バイオアッセイモデルを用いた強心配糖体 A の CTC 抑制効果については現在進行中である。本研究により、ナトリウムポンプが関与する新規 CTC 制御機構の解明および新規 CTC 治療法の開発につながる研究基盤が構築できた。今後は、癌患者血液検体から単離した CTC における $\alpha 3\text{NaK}$ の発現解析などヒト CTC を対象とした研究を遂行する予定である。

【発表論文】

Fujii T, Katoh M, Ootsubo M, Nguyen OTT, Iguchi M, Shimizu T, Tabuchi Y, Shimizu Y, Takeshima H, Sakai H. Cardiac glycosides stimulate endocytosis of GLUT1 via intracellular Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform in human cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 237:2980-91, 2022.

【学会発表】

藤井拓人, 加藤瑞希, 清水貴浩, 田渕圭章, 清水康晴, 竹島浩, 酒井秀紀. 強心配糖体は細胞内 Na^+, K^+ -ATPase を標的としてヒトがん細胞における GLUT1 依存性のグルコース取り込みおよび解糖系を抑制する. 第 96 回日本薬理学会年会. 2022 年 11 月 30 日-12 月 3 日.

藤井 拓人, 沼田 佳久, 奥村 知之, 藤井 努, 酒井 秀紀. 強心配糖体を用いた CTC 制御機構の解明. 第 6 回 CTC 臨床応用研究会. 2023 年 3 月 4 日.

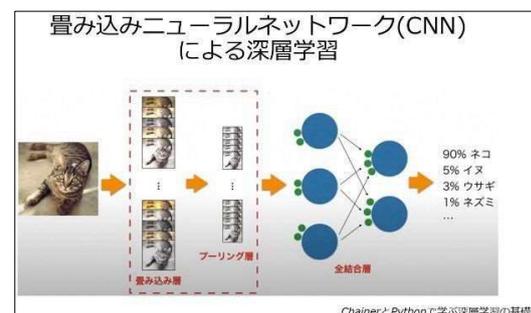
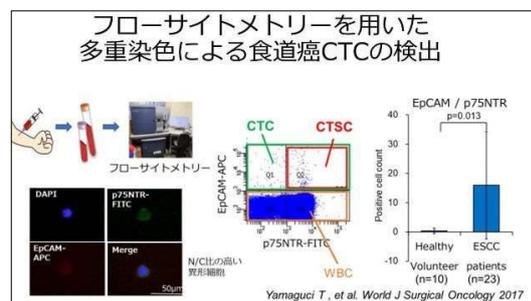
III-2 ヒト癌細胞を用い、白血球凝集および密度勾配遠心を利用したマウス血中循環腫瘍細胞バイオアッセイモデルの確立

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 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、胃癌および膵癌細胞を用いて 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。また、これまでの CTC 研究における課題として、フローサイトメトリーやセルソーターなどは高価な大型捕捉装置であること、悪性度/幹細胞形質によって細胞表面マーカーの発現が不均一であること、CTC の多様性検出には複数のマーカーを要しスライドの観察に多大な時間を要すること、などの問題点が挙げられる。本研究においては簡便かつ短時間で施行可能な CTC 検出方法の開発を目指して人工知能 AI の一つである畳み込みニューラルネットワークを用いた画像処理アルゴリズムの構築をあわせて行う。



【方法】

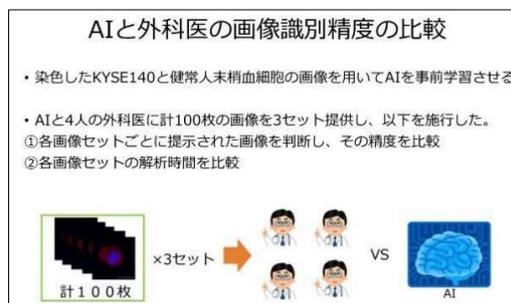
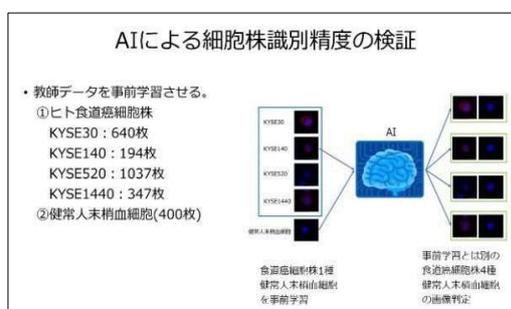
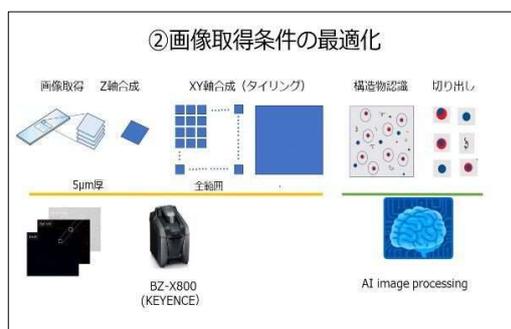
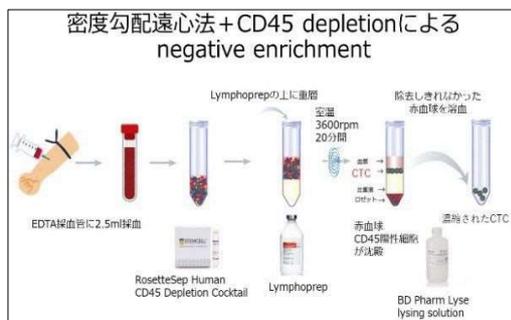
① ヒト癌細胞株を用いた CTC 捕捉法および AI を用いた画像識別アルゴリズムの確立

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、および膵癌細胞株 MIPaCa 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。

AI による癌細胞と単核球層 (PBMC) の画像認識精度の検証には、DAPI および EpCAM で染色した KYSE シリーズ (KYSE30 : 640 枚、KYSE140 : 194 枚、KYSE520 : 1037 枚、KYSE1440 : 347 枚) および PBMC(400 枚)の画像を用いて、1 組ずつ学習させた。

次に答えを隠した KYSE と PBMC の画像を提示し、AI が示された各細胞画像が KYSE か PBMC かを判定させた。

続いて従来の研究者による画像認識精度と AI による画像認識精度を比較する目的で、DAPI および EpCAM で染色した KYSE140 と PBMC の画像を教師画像として AI に事前学習を行った。その後、AI と 4 人の研究者に答えを隠した合計 100 枚の画像セットを 3 セット提供し、示された各細胞画像が KYSE140 か PBMC かの判定を行った。



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

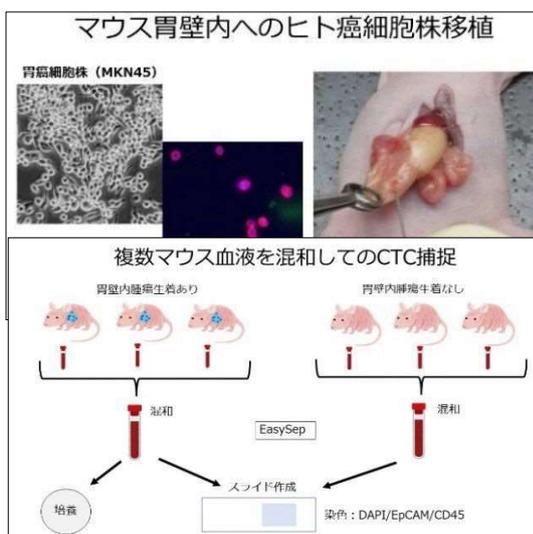
イソフルランによる吸入麻酔下に 6 週令ヌードマウスの胃壁内にマイクロピペットを用いて KYSE および MKN-45、皮下に MIAPaCa-2 を 1×10^5 個注入し 6-10 週後に深麻酔下に心臓穿刺によって血液 0.5-1ml を採取したうえで頸椎脱臼によって安楽死させ、皮下腫瘍、胃および肝臓を摘出し腫瘍形成を確認した。皮下、胃、および肝転移腫瘍においてはヒト特異的上皮細胞膜抗原 EMA の発現を免疫組織染色を用いて検出した。

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 CTC を捕捉し、EpCAM/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。

さらに、マウスから回収した CTC (ヒト癌細胞株) の分子生物学的解析を目指して継続培養を試みた。その際はマウス 1 匹あたりから回収する CTC 数が少ないことを考慮し、2-3 匹のマウスから採取した血液を混和したうえで CTC を捕捉した。

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。



③ 患者血液を用いた CTC 分離

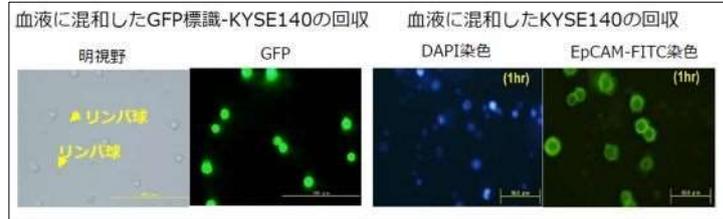
2022 年 1 月から 2022 年 10 月の間に食道扁平上皮癌に対して富山大学附属病院で治療を受けた患者 10 名と健常人ボランティア 5 名から末梢血 (2.5mL) を採取した。血液サンプルは EDTA 採血管に採取し、3 時間以内に処理した。血液は上記①にて確立した密度勾配遠心法を用いて単核球層を採取し、CD45 抗体を用いたネガティブセレクション法を組み合わせ PBMC を捕捉し、EpCAM/DAPI 蛍光染色を行い、蛍光画像を取得し CTC の識別と画像解析を行った。

本研究のプロトコルは富山大学医学部附属病院の倫理審査委員会により承認され (R2021042)、すべての参加者から書面でのインフォームドコンセントを得た。

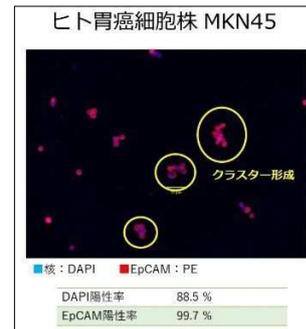
【結果】

① ヒト癌細胞株を用いた CTC 捕捉法および AI を用いた画像識別アルゴリズムの確立

健康人血液に KYSE および GFP 標識 KYSE を混和し、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。

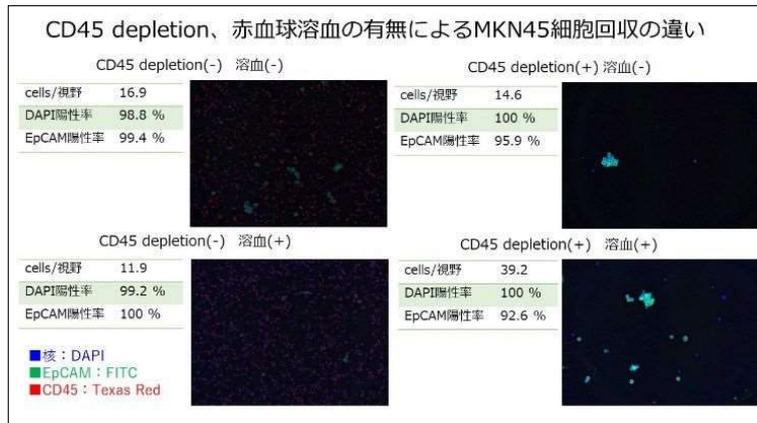


限界希釈法を用いて混和細胞数を調整したところ、100 細胞混和にて平均 33.3% (n=3) の回収率で回収できることを確認した。

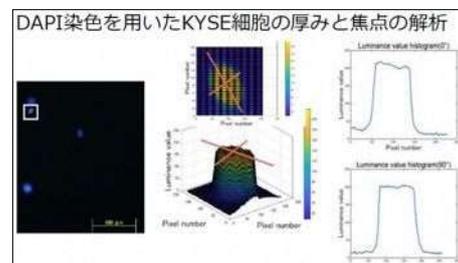


また健康人血液に胃癌細胞株 MKN45 を混和し、密度勾配遠心法によって単核球層を分離したのち CD45 depletion および赤血球溶血の有無によって回収細胞の EpCAM/DAPI 標識の違いを検討したところ、赤血球溶血無しで CD45 depletion を行う方法が最適であることを確認した。

続いて取得した 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



適化を行い安定した画像取得が可能となった。

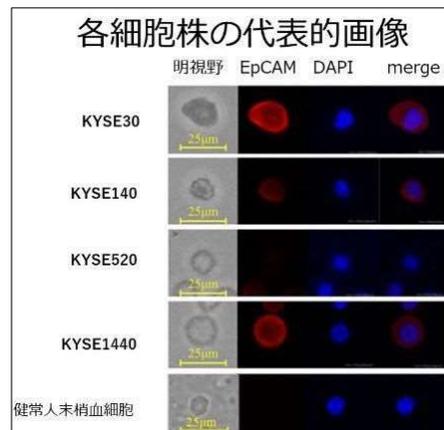


さらに AI による癌細胞と PBMC の画像認識精度を検証するため、KYSE シリーズと PBMC の画像を教師データとして事前学習を行い、答えを隠した各細胞画像が KYSE か PBMC かを判定させた。4 種類の KYSE シリーズ (KYSE30、KYSE140、KYSE520、KYSE1440) の代表画像は細胞サイズ、形態、EpCAM 発現、核染色において異型性を示した。特に EpCAM の発現は、KYSE520 では EpCAM の発現は認められなかったが、KYSE30、KYSE140 および KYSE1440 では強く発現していた。一方、PBMC は、EpCAM の発現を認めず、細胞、核ともに小型であった。

AIはトレーニングを行った細胞と同じ細胞株とPBMCの識別は良好な結果であり、それぞれKYSE30では99.9%、KYSE140では99.8%、KYSE520では99.8%、KYSE1440では100%の精度で識別することができた。また、トレーニングで使用した細胞株とは異なる細胞株を使用した識別においても、トレーニングに用いた細胞株と識別に用いた細胞株の組み合わせにかかわらず、PBMCとKYSEを識別する特異度は99.6%以上であった。一方、感度は20.4%~100%であり、トレーニングに用いた細胞株と識別用の細胞株の組み合わせに依存していた。

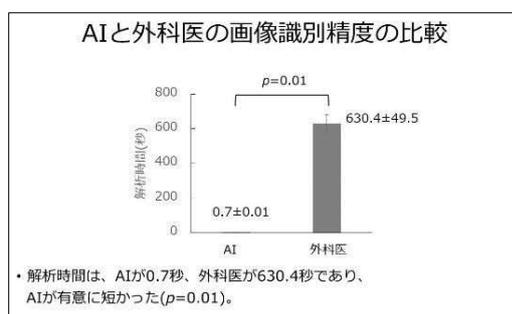
続いて、これまで一般的に行われてきた研究者による画像認識精度とAIによる画像認識精度を比較する目的で、KYSE140およびPBMCを事前学習したAIと4人の研究者に、EpCAMおよびDAPI染色した細胞100個（KYSE140 50個、PBMC 50個）画像3セットを提示した。3セット100枚の画像を評価した結果、AIは感度・特異度ともに100%でKYSE140とPBMCsを完全に区別した。一方で、ヒト研究者は感度86%、特異度97.5%で区別した。AIとヒトの平均画像認識精度は100%および91.8%と有意差を認めた（ $p=0.01$ ）。また、画像100枚の分類に要した平均時間は、AIが 0.7 ± 0.01 秒、ヒトが 630.4 ± 49.5 秒と統計学的有意差を認めた（ $p=0.01$ ）。

これらの結果からCTC画像解析にAIを使用することで、ヒトと比較して高い分類精度と短時間での解析が実現できる可能性が示された。



AIによる細胞株識別精度の検証

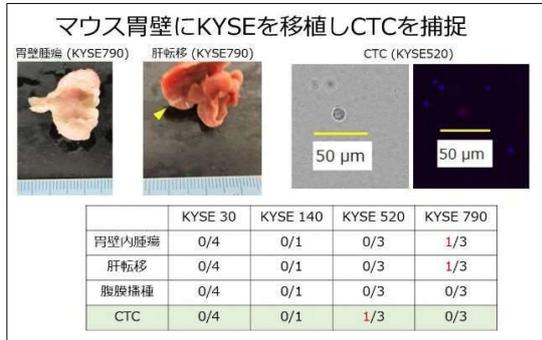
事前学習	評価	精度	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
KYSE30	KYSE30	99.9	99.8	100	100	99.8
	KYSE140	69.9	39.8	100	100	62.4
	KYSE520	80.7	61.4	100	100	72.2
	KYSE1440	99.9	99.8	100	100	99.8
KYSE140	KYSE30	96.0	92.4	99.6	99.6	92.9
	KYSE140	99.8	100	99.6	99.6	100
	KYSE520	60.0	20.4	99.6	98.1	55.6
	KYSE1440	98.8	98.0	99.6	99.6	98.0
KYSE520	KYSE30	99.8	100	99.6	99.6	100
	KYSE140	70.6	41.6	99.6	99.0	63.0
	KYSE520	99.8	100	99.6	99.6	100
	KYSE1440	99.8	100	99.6	99.6	100
KYSE1440	KYSE30	99.9	99.8	100	100	99.8
	KYSE140	83.3	66.6	100	100	75.0
	KYSE520	82.9	65.8	100	100	74.5
	KYSE1440	100	100	100	100	100



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

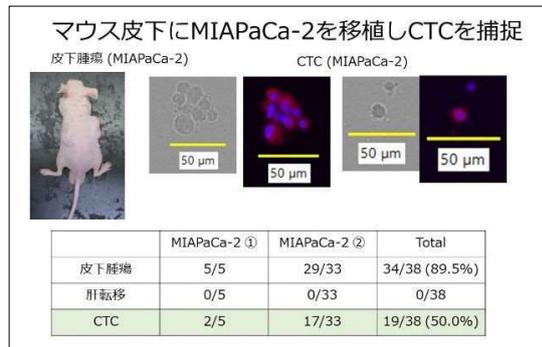
A. マウス胃壁に KYSE を移植

合計 11 匹のヌードマウスの前胃（重層扁平上皮）に食道扁平上皮癌細胞株 KYSE 30、140、520、790 を移植し 6 週後に検索したところ、胃壁内腫瘍形成、肝転移形成、CTC 検出ともに 1/11(9.1%)と頻度が少なかった。

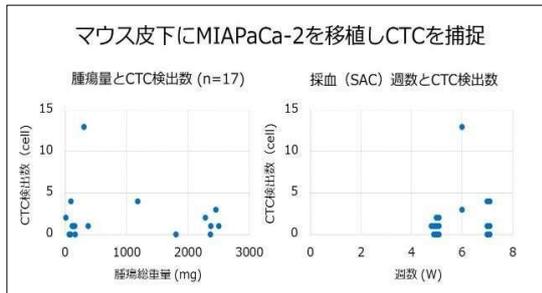


B. マウス皮下に MIA PaCa-2 を移植

マウス背部皮下に膵癌細胞株 MIA PaCa-2 を移植し 5-8 週目に検索したところ、34/38 匹 (89.5%) で皮下腫瘍を形成し、19/34 匹 (55.9%) から CTC を検出した。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、複数の細胞クラスターを形成していた。Sacrifice の週数や腫瘍量と CTC の検出個数に相関はみられなかった。



マウス 10 匹から得た血液を混和して CTC を分離し培養を試みたが細胞の増殖やコロニー形成は得られなかった。

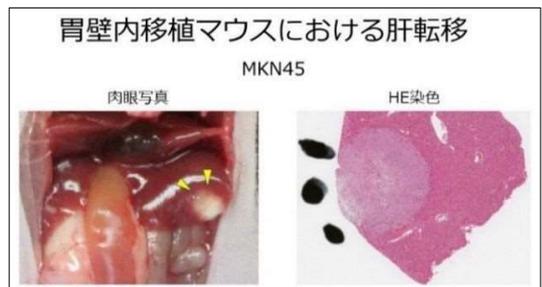


C. マウス胃壁に MKN45 を移植

胃壁内にヒト胃癌細胞株 (MKN45) を 1×10^5 個移植し、6 週間後に sacrifice し、胃、肝を摘出、心臓穿刺により血液を回収し CTC を捕捉した。

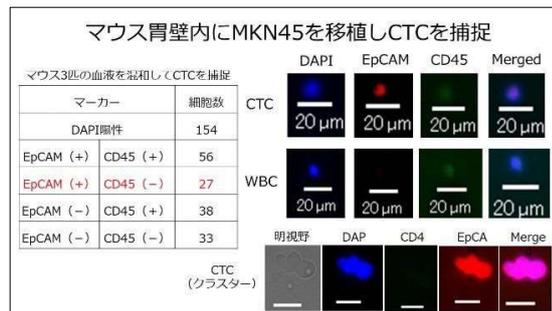


合計 25 匹のマウスを用いて施行したところ、16 匹 (64.0%) で胃壁内腫瘍形成を認め、8 匹 (32%) で肝転移を認めた。胃壁内腫瘍および肝転移についてはヒト特異的 EMA の発現によって移植したヒト癌細胞由来であることを確認した。



2-5 匹のマウス血液を混和して CTC 捕捉した 9 グループのうち 5 グループの血液から CTC を捕捉した。捕捉した細胞を

用いて DAPI/EpCAM/CD45 蛍光染色したところ、DAPI 陽性細胞（有核細胞）は EpCAM 陽性/CD45 陽性、EpCAM 陽性/CD45 陰性、EpCAM 陰性/CD45 陽性、EpCAM 陰性/CD45 陰性の 4 つ分画に分けられたが、EpCAM 陽性/CD45 陰性細胞を CTC としてカウントした。

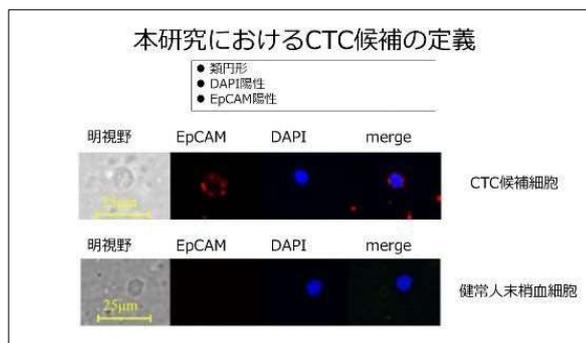


捕捉した CTC 数は血液 1ml あたり 20-308 細胞であった。全マウス 25 匹のなかでは、最小 5 匹 (20.0%)、最大 11 匹 (44.0%) で CTC を捕捉した。胃壁内腫瘍形成を認めたマウス 16 匹のうち最小 5 匹 (31.3%)、最大 11 匹 (68.8%) で CTC を捕捉した。

③ 患者血液を用いた CTC 分離

患者は男性 5 名、女性 5 名、年齢中央値は 71.9 (54-79) 歳であった。臨床病期は I 期: 2 例、III 期: 8 例であった。臨床病理学的特徴および検出された EpCAM 陽性/DAPI 陽性細胞の数を Table にまとめた。陰性対照群として年齢中央値 35.3 (30-39) 歳の健常者ボランティア 5 名を用いた。

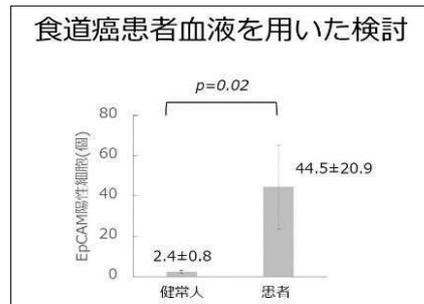
患者から検出された EpCAM 陽性/DAPI 陽性細胞の代表画像では、細胞核は DAPI で染色され、細胞表面に EpCAM 発現を認め、上皮由来の単核細胞であることがわかる。一方、健常者ボランティアから検出された PBMC は、サイズが小さく、円形の核を示し、EpCAM 陰性であり、リンパ球と考えられた。



EpCAM 陽性/DAPI 陽性細胞は、患者群と陰性対照群の両方で検出されたが、患者群の検出数は平均 44.5 ± 20.9 個であり、陰性対照群の平均 2.4 ± 0.8 個に比べて有意に多かった ($p=0.02$)。

食道癌患者血液を用いた検討

患者	年齢(歳)	性別	T	N	M	stage	採血前の化学療法歴	EpCAM陽性細胞(個)
患者1	69	F	3	1	0	III	no	23
患者2	54	M	3	1	0	III	yes	60
患者3	73	M	1b	0	0	I	no	1
患者4	71	F	4a	2	0	III	no	8
患者5	79	M	3	1	0	III	no	221
患者6	78	F	3	2	0	III	no	3
患者7	69	M	1b	0	0	I	yes	41
患者8	73	F	3	1	0	III	yes	18
患者9	70	M	3	1	0	III	yes	64
患者10	73	F	3	1	0	III	yes	6



これらの結果から細胞株を用いて構築した CTC 捕捉法および AI アルゴリズムを用いて患者血液検体から CTC を検出できる可能性が示された。

【まとめ】

ヒト癌細胞株を健常人血液に混和したサンプルを用いて、密度勾配遠心法および CD45-Depletion による迅速かつ効率的な CTC 捕捉法を確立した。また、捕捉した CTC の画像解析に AI を使用することで、ヒトと比較して高い分類精度と短時間での解析が実現できる可能性を示した。

また、ヒト食道癌、胃癌および膵癌細胞株の移植によって、ヌードマウスでの血行性転移および CTC 捕捉モデルを作成した。

さらに、上記にて構築した AI アルゴリズムを用いて患者血液検体から CTC を検出できる可能性を示した。

【今後の展望】

マウス CTC モデルに関して、MKN45Luc とルシフェラーゼアッセイの組み合わせによる体内腫瘍の検出や、細胞移植時にマトリゲルを使用するなど、さらに再現性の高い安定したモデルを作成するとともに、CTC のクラスタリング検出法を確立したい。そのうえで 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、AI を用いた画像判別アルゴリズムの自動化を進める予定である。

癌患者血液を用いた CTC 捕捉について症例蓄積を進めて臨床病理学的因子や化学療法感受性、予後との関連を検討する。また、捕捉した CTC における分子生物学的解析を進めたい。さらに臨床病理学的因子や予後を解として、AI を用いた画像判別アルゴリズムの確立につなげたい。

【論文発表】

Takahisa Akashi, Tomoyuki Okumura, Kenji Tarabayashi, Yuki Yoshino, Haruyoshi Tanaka, Takeyoshi Yamazaki, Yoshihisa Numata, Takuma Fukuda, Takahiro Manabe, Hayato Baba, Takeshi Miwa, Toru Watanabe, Katsuhisa Hirano, Takamichi Igarashi, Shinichi Sekine, Isaya Hashimoto, Kazuto Shibuya, Shozo Hojo, Isaku Yoshioka, Koshi Matsui, Akane Yamada, Tohru Sasaki, Tsutomu Fujii.

The use of artificial intelligence algorithm in detection of circulating tumor cells in esophageal cancer patients.

Oncology Letters (投稿中)

【学会発表】

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 77 回日本消化器外科学会総会
2022 年 7 月 20 日 横浜

山崎豪孔、奥村知之、福田卓真、明石堯久、佐伯しおり、藤井努
「ヒト膵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 60 回 日本癌治療学会学術集会
2022 年 10 月 20 日 神戸

真鍋 高宏、奥村知之、山崎豪孔、明石堯久、藤井努
「消化器癌における CTC の AI 解析」
第 6 回 CTC 臨床応用研究会 2023 年 3 月 4 日 Web 開催