

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

## 助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 : 780,000	円
研究代表者 : 奥村知之	所属 : 学術研究部医学系 (消化器・腫瘍・総合外科)	職位 : 講師
研究題目 : マイクロ流体チップを用いた末梢血循環癌細胞の捕捉とゲノム医療への応用		

## 研究概要

患者体液を用いた Liquid Biopsy における標的の一つである末梢血液循環腫瘍細胞 (CTC) は、血液中を流れる癌細胞であり転移責任細胞を含むと同時に原発巣の病理学的特性に関わる幅広い情報を有している。本研究においては、低侵襲・低コストかつ精度が高く一般病院検査室での普及が可能な癌モニタリング技術を提供しゲノム医療および個別化医療を推進することを目指し、CTC を高感度・高純度で捕捉し、解析試料を採取する一連のシステムを開発する。

特に近年は上皮-間葉転換 (EMT) を起こし上皮細胞マーカーEpCAM 発現が低下した CTC や癌幹細胞マーカーを発現した CTC がより有意に臨床病理と相関するとの報告がみられ、申請者らも食道癌や胃癌において癌幹細胞マーカーp75NTR と EpCAM を組み合わせた CTC 検出の有用性を報告している。

本研究では、食道扁平上皮癌培養細胞 (KYSE) を混入したヒト抹消血液から①シリコン型マイクロ流体チップおよび密度勾配遠心法を用いて CTC を捕捉し、②p75NTR と EpCAM を組み合わせた多重染色を行い、③捕捉細胞の回収と画像解析によって EMT-CTC および MET-CTC など CTC 内の細胞フラクションを同定するシステムを確立する。さらに確立したシステムを用いた臨床研究立ち上げを目指す。

## 成果要約

## ① シリコン型マイクロ流体チップおよび密度勾配遠心法を用いた CTC 捕捉

健康人ボランティアから抹消静脈血を採取し、KYSE30 および KYSE140 を 1000 細胞/ml 混和したのち EpCAM 付着マイクロ流体チップにアプライして捕捉細胞を確認した。同様に癌細胞混和血液を白血球抗原 CD45 Depletion カクテルで処理したうえで密度勾配遠心を行い単核球層を採取した。単核球層内には単球およびリンパ球とともに N/C 比が高く大型の細胞を多数確認した。さらに回収した細胞を培養条件に播種したところフラスコへの付着・増殖および継代によって KYSE を生細胞として回収できることを示した。

## ② 捕捉細胞を用いた多重染色

上記①にて捕捉した細胞を用いて、CD45-PE、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。これまでに KYSE を用いた癌幹細胞 (CSC) 分離に関する当科からの報告 (Int J Oncology 2017、Int Surgery 2018) と比較すると、上記細胞フラクションはそれぞれ MET-CSC、non-CSC、EMT-CSC、non-CSC、リンパ球、単球に相当する可能性が考えられた。

## ③ 捕捉細胞の画像解析

画像解析システムの確立に向け、KYSE30、KYSE140、白血球、正常食道細胞を用いて CD45-PE、EpCAM-APC、p75NTR-FITC および DAPI 染色を行い蛍光顕微鏡画像を取得したところ、各細胞における輝度値分布の違いが確認でき、高い精度で細胞フラクションを識別するアルゴリズムを確立できる可能性が考えられた。現在、上記②にて染色した捕捉細胞の画像解析を進めている。

これまでに得た上記①-③の結果から、抹消血液中の単核球層から CTC およびその細胞フラクションを画像解析によって判別するシステムを構築できる可能性が示された。今後は多重染色画像で識別されたフラクションをセルソーターを用いて分離しその細胞生物学的特性を検証するとともに、機械学習による画像識別率の改善を進め、患者血液を用いたパイロット研究につなげたい。

<p>研究成果 発表状況</p>	<p><b>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</b>  第5回CTC臨床応用研究会  テーマ：「CTC研究の軌跡とこれから」  開催日：2020年3月14日（土）  会場：金沢大学病院CPDセンター（金沢大学附属病院外来診療棟4階）  演題6：「消化器癌幹細胞とCTC」  演者：奥村 知之（富山大学大学院医学薬学研究部 消化器・腫瘍・総合外科）  座長：大塚 基之（東京大学 消化器内科）</p>		
<p>経費の 執行状況</p>	<p style="text-align: center;">区 分</p> <p><b>【物品費】</b>  液体窒素  CD45-PE human100tests  SlowFafe (R)DiamondAntifadeMountant  with DAPI2ML  トナーカートリッジ  その他</p> <p><b>【旅費】</b>  旅費</p> <p><b>【謝金】</b></p> <p><b>【その他】</b></p> <p style="text-align: right;">合計</p>	<p style="text-align: center;">執行額（円）</p> <p>5,400  45,540  8,712  34,061  217,667</p> <p>305,840</p> <p>162,780</p> <p>780,000 円</p>	<p style="text-align: center;">備 考</p> <p>学会・研究会費用 等</p> <p>成果発信等</p>