



Title	Simple Detection and Culture of Circulating Tumor Cells from Colorectal Cancer Patients Using Poly(2-Methoxyethyl Acrylate)-Coated Plates
Author(s)	野村, 雅俊
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/98621
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	野村 雅俊
論文題名 Title	Simple Detection and Culture of Circulating Tumor Cells from Colorectal Cancer Patients Using Poly(2-Methoxyethyl Acrylate)-Coated Plates (Poly (2-Methoxyethyl Acrylate)コーティングプレートを使用した大腸癌患者からの簡易的な血中循環癌細胞の検出および培養法)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目 的(Purpose)〕</p> <p>近年がんの診断・治療においてliquid biopsyが注目されており、生検や手術が困難な症例に対してcirculating tumor DNAを調べることで適切な治療をtimelyに行えるようになってきている。Circulating tumor cell (CTC)は大腸癌において血中には少数しか認めないものの、検出・培養ができればin vitro/vivoにおいて生物学的解析が可能となりうる。今回我々は新しい方法でCTCの濃縮・培養法を確立することを目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>これまでに我々は小孔に単核球を誘電泳動にて誘導し免疫染色を行った後に回収する手法で研究を行ったが、このシステムではCTCを生きたまま捕捉できないためにOncoQuick tubeを用いた濃度勾配遠心分離および合成ポリマーであるpoly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)とフィブロネクチン(FN)を用いた濃縮行程に続いてstem cell培養液で培養を行った。OncoQuickは50ml遠心管と多孔質バリア・分離液で構成され最大30mlまでの血液を直接濃縮でき、ある程度、赤血球と白血球を除くことができる。PMEAは人工心肺装置のコーティングとしても使用されFDAにも認可されている合成ポリマーである。血球を接着させない上に癌接着を促進することも報告されている。大腸癌細胞株を使用しPMEAおよびFNをコーティングした培養プレートへの癌細胞の接着率を検討した。HCT116, SW480ではノンコーティングと比較し差は認めなかったもののHT29では有意に接着率の向上を認めた(P=0.03)。続いて健康者の血液にCell Trackerでラベリングし、正確にカウントした大腸癌細胞株をspikeし、OncoQuickで濃縮後に1日PMEAおよびFNでコーティングしたチャンバースライド上に細胞を接着させ、翌日に抗EpCAM抗体を用いて免疫染色を行い、陽性細胞数をカウントした。染色方法はDAB染色で行い、細胞のlossを減らすためにone step法にて行った。PMEAコーティングのための溶媒としてメタノールを使用していたために内因性POD阻害には過酸化水素水をメタノールではなくアジ化ナトリウムに溶かし使用した。HT29, DLD-1を用いてspike試験を施行しそれぞれ76.1, 77.3%の結果であった。続いて臨床サンプルを用いて検討を行った。2018年1月から2022年9月までの41人の大腸癌患者(StageIV:38例, StageIII:2例, StageII:1例、このうち化学療法もしくは放射線治療を受けた症例は11例)から10mlの末梢血を採取し大腸癌細胞株を使用した際と同様の手法で免疫染色を行った。なお途中から濃縮した一部を免疫染色に使用し残りを培養する方針とした。培養についてはPMEAコーティングスライドからTrypLE Expressを使用し細胞を剥がした後に matrigel上でstem cell培養液を用いて培養を行った。免疫染色によるCTC検出率は41例中18例(43.9%)であった。症例の中には肉眼的に癌と判断する細胞を認めるものの、抗EpCAM抗体では染色しない細胞を認めたり、大きなClusterを形成する癌細胞も認めた。培養は33例に試みたがサイズアップしてspheroid様の形態をとるものを18例(54.5%)確認した。免疫染色でのCTC検出、もしくはサイズアップした癌細胞が検出された症例は23例に認め、検出率と臨床病理学的因子を比較検討したところ、化学療法もしくは放射線治療を未施行の症例で有意に検出率が高かった(P=0.02)。免疫染色で算出したCTC個数が0-10個であった症例が35症例(85.4%)と多数を占めたが、1-10個の症例においても12例中11例で培養可能であった。</p> <p>〔総 括(Conclusion)〕</p> <p>本研究により、特殊なデバイスを使わずに安価で、簡便な濃縮行程を用いたCTCの捕獲と培養法を確立した。OncoQuickのみでは、相当数の血球が残存し、少数のCTCの培養の妨げとなるが、PMEAコート併用することで、CTCの培養に好適な環境が得られる。更に、肝細胞癌や膵癌患者に対しても同様の検討を行いCTCの検出に成功していることから、本法は様々な癌種においても応用可能である。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		野村 雅俊	
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 江口 英利	署 名
	副 査	大阪大学教授 竹原 敏郎	署 名
	副 査	大阪大学教授 新谷 康	署 名

論文審査の結果の要旨

誘導電気泳動を用いて大腸癌のcirculating tumor cells (CTC)を回収し、single cell 遺伝子変異解析を行った結果、同じ患者由来のCTCでも遺伝子変異の状況に多様性があることが分かった。更に、密度勾配遠心分離後に合成ポリマーであるpoly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)を塗布したチャンバースライドを使用することで少数のCTCでも培養可能となることが分かった。PMEAは人工血管の血球付着防止に使用されており、正常血球のスライドへの付着を防止できる。大腸癌患者の末梢血10mlを採取し、EpCAM抗体による免疫染色と形態的診断によるCTC検出率は41例中18例(44%)であり、培養は33例中18例(54.5%)でspheroid 様の構造物を確認した。本法では、これまで困難とされていた少数のCTCの培養を可能としたことで、多くの症例のCTCの性質解明に繋がることが期待できることから学位の授与に値すると考えられる。