






学位論文審査結果要旨

氏 名	近石 泰弘				
論文審査委員	主査 所属	生体適応系	生体機構部門	岩井 佳子	
	副査 所属	生体情報系	生殖生理情報部門	蜂須賀 徹	
	副査 所属	障害機構系	災害外科部門	平田 敬治	
		系	部門		
		系	部門		

論文題目

EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip'

「ユニバーサル CTC-chip」を用いた上皮細胞接着分子に依存しない循環腫瘍細胞の捕捉

学位論文審査結果要旨

<目的>がん患者の体内では微量の腫瘍細胞が血液中を循環していることが知られている。これらの腫瘍細胞は循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell ; CTC) とよばれ、がんの予後や化学療法の治療効果の指標として注目されている。現在、CTC の検出法として用いられている CellSearch システムは、抗 EpCAM(epithelial cell adhesion molecule)抗体結合磁気ビーズにより極微量の CTC を捕捉、検出するが、EpCAM を発現しない CTC の検出は困難である。そこで、本研究では、レジンを用いた独自の universal CTC-Chip (u CTC-chip) を開発し、抗 EpCAM 抗体以外の細胞表面分子に対する抗体を用いることで、より汎用性の高い CTC 捕捉システムを構築した。

<方法>抗 EpCAM 抗体および抗 Podoplanin 抗体を coating した 2 種類の u CTC-chip を作成し、非小細胞肺癌細胞株 PC-9(EpCAM 陽性、Podoplanin 陰性)と悪性胸膜中皮腫細胞株 ACC-MESO4 (EpCAM 陰性、Podoplanin 陽性) の捕捉率を比較した。サンプルは、3ml の 5%BSA-PBS (PBS モデル)、または健康人末梢血 (血液モデル) に腫瘍細胞の濃度が 500 個/ml となるように調整した。PBS モデルは 1.5ml/h、血液モデルは 1.0ml/h の流速にて u CTC-chip に流入し、捕捉率を算出した。

<結果>PBS モデルでは、抗 EpCAM 抗体を用いた u CTC-chip では PC-9 の捕捉率が 101.1%、ACC-MESO4 が 3.0%、抗 Podoplanin 抗体を用いた u CTC-chip では PC-9 の捕捉率が 2.3%、ACC-MESO4 が 78.3%であった。血液モデルでは、抗 EpCAM 抗体を用いた u CTC-chip では PC-9 の捕捉率が 88.0%、ACC-MESO4 が 2.2%、抗 Podoplanin 抗体を用いた u CTC-chip では PC-9 の捕捉率が 6.9%、ACC-MESO4 の捕捉率が 38.4%であった。

<考察>抗 EpCAM 抗体を用いた u CTC-chip では、EpCAM を発現しない腫瘍細胞株 ACC-MESO4 の捕捉率が低かったが、抗 Podoplanin 抗体に変えることで捕捉率が大幅に上昇した。

本研究は、EpCAM の発現に依存しない CTC 検出システムを独自に開発したもので、EpCAM を発現しない他のがんへの臨床応用も期待されることから、本学の学位論文として適格であると判断した。

氏 名	近石 泰弘
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip'	
「ユニバーサル CTC-chip」を用いた上皮細胞接着分子に依存しない循環腫瘍細胞の捕捉	
論文要旨	
<p>【目的】 循環腫瘍細胞 (CTC: circulating tumor cells) は腫瘍の原発巣から離脱し、血液中を循環する腫瘍細胞であり、CellSearch system は臨床応用されている唯一の CTC 検出システムである。だが、このシステムは上皮接着分子 (EpCAM: epithelial cell adhesion molecule) に依存したシステムであり、EpCAM を発現していない CTC の検出は困難である。高感度の CTC 検出システムとして、CTC-chip と呼ばれるマイクロ流体デバイスが報告されているが、我々はレジンを用いた独自の CTC-chip (ユニバーサル CTC-chip: u CTC-chip) を開発し、それにより EpCAM 以外の抗体を使用し、より高感度の CTC 捕捉システムを構築することを目的とした。</p>	
<p>【方法】 細胞株は PC-9 と ACC-MES04 を使い、抗体は抗 EpCAM 抗体、抗 Podoplanin 抗体を用いた。抗 EpCAM 抗体をコーティングした u CTC-chip と抗 podoplanin 抗体をコーティングした u CTC-chip を準備した。サンプルモデルとして、5%BSA を含んだ PBS (PBS モデル) 3ml と健常人の末梢血 (血液モデル) 3ml に PC-9 と ACC-MES04 をそれぞれ 500 個/ml の濃度となるようにスパイクした。PBS モデルは 1.5ml/h、血液モデルは 1.0ml/h の流量で u CTC-chip に流入し、各々の捕捉率を算定した。</p>	
<p>【結果】 免疫染色、flow cytometry にて PC-9 は EpCAM が強発現、podoplanin 低発現、ACC-MES04 は podoplanin が強発現で EpCAM が低発現であった。PBS モデルの捕捉率は抗 EpCAM 抗体をコーティングした u CTC-chip では、PC-9 において 101.1% であったのに対して ACC-MES04 では 3.0% であった。対称に抗 podoplanin 抗体をコーティングした u CTC-chip では、ACC-MES04 の捕捉率が上昇し (78.3%)、PC-9 においては 2.3% と低値であった。血液モデルにおいては、ACC-MES04 では抗 EpCAM 抗体をコーティングした時はわずか 2.2% しか捕捉出来なかったが、抗 podoplanin 抗体をコーティングした時は 38.4% の捕捉率が得られた。また、PC-9 では抗 EpCAM 抗体と抗 podoplanin 抗体がそれぞれ 88.0% と 6.9% であった。</p>	
<p>【考察】 今回初めて、u CTC-chip を用いて EpCAM の発現しない腫瘍細胞を効果的に捕捉出来た。このシステムはもともと上皮系ではなかったり、上皮間葉転換を起こしたりした EpCAM の発現のない腫瘍細胞を捕捉することが期待できるシステムである。また、今回、EpCAM の発現の低い腫瘍細胞として ACC-ME0S4 という、悪性胸膜中皮腫 (MPM) の細胞株を用いた。MPM のような上皮由来以外の腫瘍の CTC でも適切な抗体を選択して使用し、u CTC-chip を使用すれば、CTC を高感度に検出できるかもしれない。今回は podoplanin という、MPM に発現することがある表面抗原をターゲットにして、MPM の細胞株の捕捉に成功した。</p>	
<p>【結論】 u CTC-chip を用いて抗 EpCAM 抗体をコーティングした時、PC-9 の高い捕捉率が得られ、抗 podoplanin 抗体をコーティングした時、ACC-MES04 の捕捉ができた。u CTC-chip は CTC の捕捉率を向上させる可能性があり、さらに個別化治療に結びつけられる可能性がある</p>	