

主論文の要旨

**Acute phase dynamics of circulating tumor cells
after paclitaxel and doxorubicin chemotherapy in
breast cancer mouse models**

〔 乳癌マウスモデルにおけるパクリタキセル及び
ドキソルビシン投与後早期の血液循環腫瘍細胞の動態 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 移植・内分泌外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

安立 弥生

【緒言】

近年、乳癌でも新規治療薬の開発などにより死亡率は低下してきたが、再発乳癌は依然として死因として高い割合を占めている。その中でも、ホルモン受容体陰性、HER2 陰性のトリプルネガティブ (TN) 乳癌は、進行性で予後不良な乳癌である。パクリタキセルとドキシソルビシンは TN 乳癌に対する標準治療薬であるが、その悪性度ゆえ、治療効果なく新規再発転移巣の出現を認める症例も少なくない。原発巣と再発転移巣とではホルモン受容体と HER2 の発現の不一致が認められることがあり、治療方針決定のため再発転移巣の再生検が推奨されているが、侵襲性が高いため困難な例が少なくない。近年、血液循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell : CTC) はリキッドバイオプシーの 1 つとして注目されている。EpCAM 抗体などを用いた CTC の検出デバイスを用いた臨床研究により、乳癌患者において CTC の数が予後予測因子や化学療法の効果予測因子になることが報告されている。しかし、従来の上皮細胞マーカーを用いた分離システムでは CTC を見逃しやすく、また高コストであり、いまだ一般臨床に普及するには至っていない。我々は CTC を細胞のサイズ差によって高感度かつ簡便に分離する新規フィルター型 CTC 分離デバイスを開発してきた。今回、これにさらに改良を加え明視野で CTC の細胞学的な検索が可能となるデバイスを作成した。CTC により治療効果の早期予測と診断が可能かを検討するために、本デバイスおよび乳癌マウス CTC モデルを用いて化学療法後、特に治療後早期の CTC の体内動態について検討した。

【対象及び方法】

マウス CTC モデルは皮下接種後自然肺転移をきたす TN 乳癌細胞株(MDA-MB231)を用いて作成した。移植後 2 カ月以上経過したマウス CTC モデルにパクリタキセル (24、48mg/kg) あるいはドキシソルビシン (12、24mg/kg) を腹腔内投与し、同一マウスで治療前後に麻酔下で心採血した血液 (0.25ml) を用いて CTC を比較検討した。心採血した血液は PBS で希釈後、フィルター型 CTC 分離デバイス (Fig. 1a) を用いてフィルター上に CTC を分離し、10%ホルマリンで固定後、フィルターを取り外し、スライドグラス上に置き、遠心により CTC をスライドグラス上に転写した。この CTC 標本にパパニコロウ染色または免疫染色を施し、CTC を同定した。*In vitro* における細胞増殖、アポトーシス、細胞周期解析は培養細胞にパクリタキセルまたはドキシソルビシンを添加し、2 日後に細胞を回収し、血球計算版、フローサイトメトリー (FCM) 等を用いて常法に従った。

【結果】

マウス CTC モデルでは、移植 2 カ月以上経過すると肺転移を認め (Fig.1b)、それに伴い、CTC 数は肺転移を有しない早期群に比べて有意な増加が認められた (Fig.1c)。次に、MDA-MB231 に対するパクリタキセルの治療効果を *in vitro* で検討した。MDA-MB231 細胞はパクリタキセル添加により増殖が抑制されるが (Fig. 2a)、パパニコロウ

ウ染色により核膜の消失と染色体の凝集が認められ、増殖阻害が主として細胞周期のM(分裂)期停止に起因することが示唆された (Fig. 2b)。FCM解析でも、パクリタキセルによるアポトーシスはごく軽度であり、細胞周期のG2/M期細胞が著増していた (Fig. 2c)。

以上の知見を踏まえ、上記マウス CTC モデルを用いてパクリタキセル治療前後の CTC の継時変化を詳しく検討した。CTC 数はパクリタキセル治療後早期 (3~10 日後) に治療前と比較し有意に増加し、治療 14~20 日後には減少していた (Fig. 4a, b)。これら治療後早期に一過性に増加した CTC はパパニコロウ染色により M 期 (前期、中期) 停止した細胞と非 M 期停止細胞の両者を含んでいた。原発巣の組織学的検討により、原発巣において M 期停止細胞が著増していることから (Fig. 3b, c)、M 期停止した CTC は原発巣で M 期停止した癌細胞が正常癌細胞とともに血液中に動員されたものと考えられた (Fig. 3d)。

同様の検討をドキシソルビシンでも行った。MDA-MB231 に対するドキシソルビシンの治療効果を *in vitro* で検討したところ、MDA-MB231 のドキシソルビシン投与による増殖抑制は主として核凝縮と M30 陽性に特徴づけられるアポトーシスによるものであった (Fig5a, b)。このアポトーシス亢進は Annexin V を用いた FCM 解析でも確認された (Fig. 5c, d)。次にマウス CTC モデルでのドキシソルビシン治療前後の CTC 変化を検討すると、パクリタキセル治療と同様に、ドキシソルビシン治療 3~10 日後に CTC 数の有意な増加が認められた (Fig. 6d)。パパニコロウ染色では、増加した CTC にはアポトーシス細胞と非アポトーシス細胞の両者が認められ、原発巣の検索ではアポトーシス細胞の増加が認められた (Fig6. a, b, c)。

【考察】

CTC は通常、腫瘍マーカー抗体を用いた多重免疫蛍光染色を用いて暗視野で同定される。しかし、この方法では化学療法によりアポトーシスや細胞周期の M 期停止などに陥った変性 CTC の評価が十分ではないこと、また CTC を含めた検体中の背景細胞の情報が全く得られないことなど形態学的、細胞学的検索に課題がある。これら CTC の同定、診断上の課題を改善するため、本研究では CTC 分離デバイス上での蛍光観察を止めて、CTC をフィルターデバイスからスライドグラスに転写し、スライドグラス上で従来のパパニコロウ染色や免疫染色を施工し、スライドグラス標本(明視野下)で細胞診として CTC を評価できるように改良を行なった。この新規デバイスを用いて、マウス CTC モデルにおける化学療法後早期の CTC 動態についてモニタリングを行なった。その結果、予想に反し、CTC 数はパクリタキセル治療後早期に一過性に増加することを見出した。増加した CTC は M 期停止細胞と非 M 期停止細胞を含むことが分かり、その割合は、化学療法後の原発巣で見られる M 期停止細胞と非 M 期停止細胞の割合と類似していた。同様に、ドキシソルビシン投与後でも、化学療法後早期の CTC 数増加が認められ、これらの増加 CTC は原発巣の腫瘍細胞構成と類似したアポトーシス CTC と非アポトーシス CTC を含んでいた。以上のことより、化学療法後

早期に出現する CTC は、原発巣の化学療法に対する反応性をよく反映している可能性が示唆された。

化学療法後の CTC 数の変化については従来いくつかの報告があるが、減少するとする報告が殆どであった。しかし、近年、肺癌患者において放射線治療後に、また、口腔癌患者においては化学療法後に CTC 数が増加したとする報告がなされている。しかし、前臨床モデルを用いて、化学療法後早期の CTC 数増加について詳細に検討した研究はなく、本研究が初めてと思われる。化学療法後早期の CTC 数増加のメカニズムについては、不明な点が多いが、化学療法による細胞間結合と脈管の破壊による腫瘍細胞の脈管内への受動的、能動的侵入が一因と推測される。本研究で臨床的に重要であると思われる点は、パクリタキセル治療またはドキソルビシン治療後に増加した CTC には形態学的に正常に近い非 M 期停止細胞や非アポトーシス細胞が含まれている点である。これらの CTC は増殖性を有する生存細胞である可能性が高く、遠隔臓器への転移を促すリスク要因となる可能性も考えられる。

【結論】

CTC のモニタリングの結果、化学療法後早期に CTC の動態に著明な変化が認められることが明らかとなった。化学療法後の変性細胞と生存細胞からなる不均一な CTC 群の出現は、原発巣の組織学的な治療効果を反映しているものと推測される。このことより、細胞診を基盤とする新規 CTC 同定デバイスを用いた化学療法後早期の経時的な CTC (数と形態) のモニタリングは、臨床現場において薬物療法の効果を早期に予測するリキッドバイオプシーとして有用な診断ツールとなり得る可能性がある。