

令和元年6月19日現在

機関番号：83205

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10617

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍細胞による早期膵臓癌の発見・診断と悪性度解析に関する研究

研究課題名(英文) Study on use of circulating tumor cells for diagnostics and malignancy analysis of pancreatic cancer

研究代表者

大永 崇 (Ohnaga, Takashi)

富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・副主幹研究員

研究者番号：10416133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌の早期発見を目的とし、血中循環腫瘍細胞(CTC)を利用した診断と悪性度解析について研究した。血中からのCTCの選択的捕捉を検討するために、癌細胞表面の抗原に特異的な抗体を導入したマイクロ流体デバイスを利用した。このような抗原としてEpCAM、EGFR、HER2、N-Cadherin、PD-L1について検討した結果、このようなデバイスによりEGFRをターゲットとしてcetuximabで早期膵臓癌のCTCを捕捉できる可能性を示した。さらにデバイスに捕捉された膵臓癌細胞をシングルセルで回収して遺伝子解析を行い、膵臓癌の悪性化に関わるKRAS変異が検出できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期膵臓癌の確定診断・治療においては、現状では必要な膵臓へのアクセスや生検は極めて困難だが、本研究の末梢血を用いたCTC検査による悪性度診断が可能となれば、異常が認められた際には直ちに検査し明確な診断や治療方針決定が可能となる。さらに膵臓の嚢胞や慢性的炎症などが認められるハイリスク患者については、低侵襲なCTC検査は繰り返し実施可能であるため、病状のモニタリングが可能となる。そしてこのような進歩が、膵臓癌による死亡の減少をもたらすことが予想される。また本提案から得られる成果は、胆管癌など他の早期発見が非常に困難な癌に展開可能であり、癌の診断・治療に広く貢献できることが予想される。

研究成果の概要(英文)：We studied use of circulating tumor cells (CTCs) for diagnostics and malignancy analysis of pancreatic cancer (PC). Microfluidic devices having surface functions to capture CTCs by antibody had been developed by the authors and were applied to this study. Since CTCs at an early stage of PC was known to be hard to capture targeting EpCAM that is usually employed for CTC isolation, the surface markers suitable for the capture were explored. We found that EGFR was a good target to capture CTC in PC even at the early stage and cetuximab was a suitable antibody. Then, PC cells captured in the microfluidic device were released and put outside, and were genetically analyzed by ddPCR. We successfully detected KRAS mutation that is known to occur in early PC from a single PC cell.

研究分野：マイクロ流体デバイス

キーワード：血中循環腫瘍細胞 膵臓癌 マイクロ流体デバイス EGFR シングルセル 遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年、血中循環腫瘍細胞 (CTC) は精力的に研究され、癌の診断、治療、研究などにおいて極めて有効に利用できることが示されている。CTC に関して、遺伝子変異やタンパク質発現解析による診断・治療への応用可能性、血中濃度と化学療法効果や予後との相関性、転移と上皮間葉転換や癌幹細胞存在との関係、などが明らかにされている。このような検討は様々な癌種においてなされているが、筆者らは膵臓癌における CTC の利用について注目した。現状では膵臓癌は進行した状態での発見が多く極めて予後不良の癌であり、たとえ原発巣が小さな段階で発見されても転移している事が多く、また切除可能であっても再発が多い。よって膵臓癌の死亡を減らすためには、出来る限り早期での発見が求められるが、現状では病変が認められても手術前にそれを探取して確定診断することは極めて難しい。このように膵臓癌は転移性が高く厄介だが、転移には CTC の存在が不可欠であることを考えると、早期からの CTC の存在が予想され、それを捕捉できれば CTC を利用した早期診断の可能性が考えられる。膵臓癌の CTC 研究はこれまでも比較的蓄積がある。進行した膵臓癌では 50~90% の患者さんから CTC が検出できたとの報告がなされており (K.Tjensvoll et al. *Int.J.Cancer*:134,1(2014))、さらに CTC 濃度測定による化学療法のモニタリングが可能なこと、遺伝子解析により悪性度の判定が可能なことなどが知られている (W.Sheng et al. *Lab Chip*: 14,89(2014))。しかし一方で、早期の膵臓癌では高々 10% 程の患者さんからのみ CTC が検出されている (F.C.Bidard et al. *Annals of Oncology*: 24,2057(2013))。このような早期癌での低検出率については、CTC をその上皮細胞接着分子 (EpCAM) をターゲットとして捕捉する (抗 EpCAM 抗体により抗原抗体反応で捕捉する) ことが大きな原因であるとの指摘があり、上皮間葉転換 (EMT) の関与が考えられている (A.D.Rhim et al. *Cell*: 148,349(2012))。改良した捕捉手法として、EpCAM に加え膵臓の悪性腫瘍で高発現の mucin1 を取り入れた方法で膵臓癌の CTC 捕捉を試みている例があるものの、捕捉性能は EpCAM 単体と変わらない結果が報告されている (F.I.Thege et al. *Lab Chip*: 14,1775(2014))。このように現状では、早期の膵臓癌における CTC 検出は十分ではなく、診断に利用できる状況には至っていない。

## 2. 研究の目的

これまでに筆者らは、上記同様に癌細胞表面のマーカーをターゲットとし、自らが開発した“マイクロ流体デバイス”ポリマーCTCチップ”を用いた CTC 捕捉について検討してきた (T.Ohnaga et al. *Biomed Microdevices*: 15,611(2013))。このデバイスの捕捉原理では、多数の微細なマイクロポスト (高さ、直径とも 100  $\mu$ m のポストが 30,000 個程度) の間にサンプル (全血など) を流し、マイクロポスト表面に固定した抗体が癌細胞の表面マーカーに結合することで、選択的に細胞を捕捉する。また素材の特長からデバイスの表面への抗体固定が容易なので、適切な抗体を選定することにより、様々な癌細胞表面マーカーをターゲットとした捕捉を実施できる。これまでに EpCAM、podoplanin に対する抗体使用し、国内数カ所の大学病院と共同して捕捉試験を実施し、乳癌、大腸癌、食道癌、肺癌、悪性胸膜中皮腫、前立腺癌の臨床検体で CTC が捕捉できることを明らかにした。

本研究ではポリマーCTCチップを使用し、早期膵臓癌の捕捉に適する表面マーカーを見いだすことを目的に検討する。さらに捕捉した細胞について遺伝子解析を実施し、膵臓癌の悪性化に関わる遺伝子変異をシングルセルレベルで検出できるようにすることを目指し検討する。

## 3. 研究の方法

早期膵臓癌の捕捉に適する表面マーカーについて調査を行い、EGFR、HER2、N-Cadherin、PD-L1 を検討対象とした。EGFR と HER2 は、膵臓癌が高発現するマーカーとして報告があるため (*Invest New Drugs* 31,558 (2013)) 対象とした。N-Cadherin と PD-L1 は、EMT により高発現するマーカーとして知られており対象とした。

これらのマーカーを捕捉できる抗体を見出す検討を、各マーカーの発現が高い次の細胞を使用して行った: EGFR / KYSE220、HER2 / SKBR3、N-Cadherin / HeLa、PD-L1 / MDA-MB-231。捕捉テストは、これらのマーカーに対する各抗体を CTC チップに固定し、そこに細胞懸濁液 (PBS) を流すことで行った。さらに EGFR については、膵臓癌細胞株 BxPC3、MIAPaCa2 を使用し、細胞捕捉効率を EpCAM と比較した。

遺伝子解析については、チップに捕捉した MIAPaCa2 の細胞を剥がして外に流出させたのち、マイクロマニピュレータで個々に回収して ddPCR にて変異の検出を試みた。変異は、膵臓癌の悪性化において最初に関わると考えられている KRAS について注目した。

## 4. 研究成果

EGFR、HER2、PD-L1 をターゲットとして捕捉した際の捕捉率 (チップに捕捉された細胞数 / チップに流入した細胞数) を Fig.1 に示す。EGFR、HER2 については、ここで使用した抗体 (図中括弧内に表示) によりよく捕捉できる一方、N-Cadherin、PD-L1 ではこれらの抗体で十分に捕捉できないことが分かった (N-Cadherin については、捕捉を撮影したビデオからほとんど捕捉されないことが分かったため、捕捉率は未計測)。

次に捕捉率が低い PD-L1 については、Fig.2 に示すマーカーの変換による捕捉を試みた。すなわち細胞上の PD-L1 に予め抗 PD-L1 抗体を結合させ、チップ上に固定した抗 IgG 抗体で捕

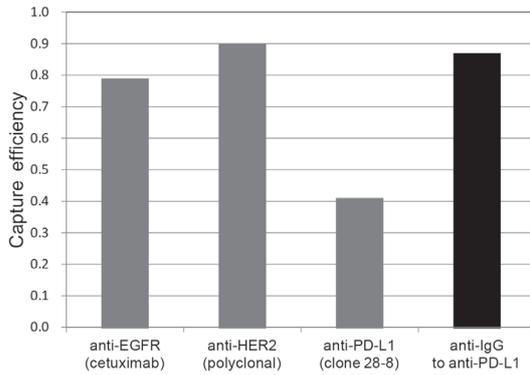


Fig.1 各マーカーで捕捉するための抗体選定

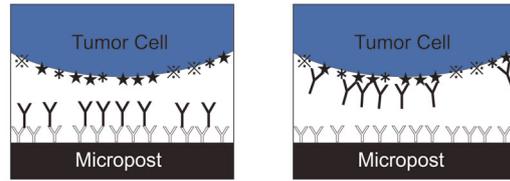
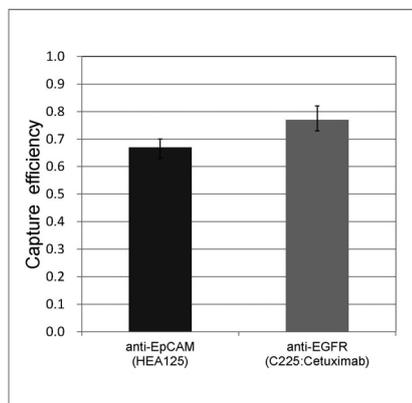
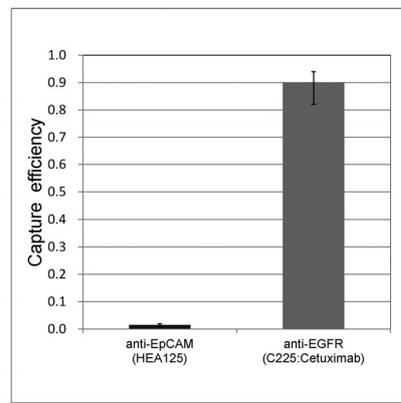


Fig.2 マーカー変換による捕捉方法



(a)BxPC3



(b)MIAPaCa2

Fig.3 EGFRによる膵臓癌細胞株の捕捉

捉した。その結果、捕捉率は87%に向上した。本方法は、サンプル前処理として捕捉抗体を結合させる手間が増えるが、他の抗体にも広く使用できるので、適当な捕捉抗体が見つからない場合などに有効に使用できる。

このようにEGFRをターゲットとする捕捉ではcetuximabが効率よく細胞を捕捉することが分かったので、次にそれを用いて膵臓癌細胞株のBxPC3、MIAPaCa2について捕捉試験し、従来の抗EpCAM抗体(clone HEA125)との比較を行った(Fig.3)。BxPC3ではEpCAM、EGFRの何れをターゲットとしても、比較的良い捕捉率が得られた。一方、MIAPaCa2では、EpCAMではほとんど細胞が捕捉されなかったのに対し、EGFRでは高い捕捉率となった。またEpCAMとEGFRの比較では、何れの細胞においてもEGFRをターゲットとした方が高い捕捉率となった。以上の結果から、膵臓癌のCTC捕捉においてはEGFRが良い捕捉ターゲットとなることが分かった。本検討に使用したMIAPaCa2は、膵臓癌細胞株の中では比較的EGFR発現が低いので、本検討で使用した条件により広く膵臓癌細胞を捕捉できることが期待される。またEGFRは、他の癌でEMTにより発現が上昇するとの報告があるので、早期膵臓癌のCTCを効率よく捕捉する点でも期待できる。

次に回収したMIAPaCa2のシングルセルについて遺伝子解析を実施した。精製したDNA、RNAからの増幅が可能であり(Fig.4はDNAのKRAS codon12付近のPCR結果)、それらをddPCRによりKRAS変異について解析した(Fig.5)。シングルセル由来の何れのサンプル(cDNA:逆転写産物、gDNA:ゲノムDNA、a-gDNA:増幅DNA)でもMutant probeからのみシグナルが観測され、MIAPaCa2のKRAS変異が正しく同定できた。このように本研究において、回収CTCの遺伝子解析に関する基礎技術の確立に目途を得たので、今後さらに確認を進めエクソーム解析等にもトライする。

【謝辞】シングルセルの遺伝子解析を実施していただきました、東京大学消化器内科 大塚基之先生に深く感謝申し上げます。

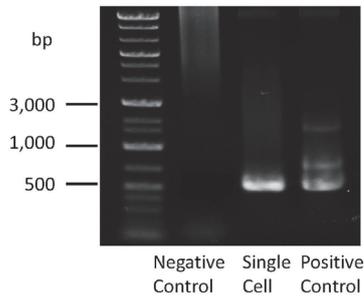


Fig.4 *KRAS* codon12 付近の PCR 結果

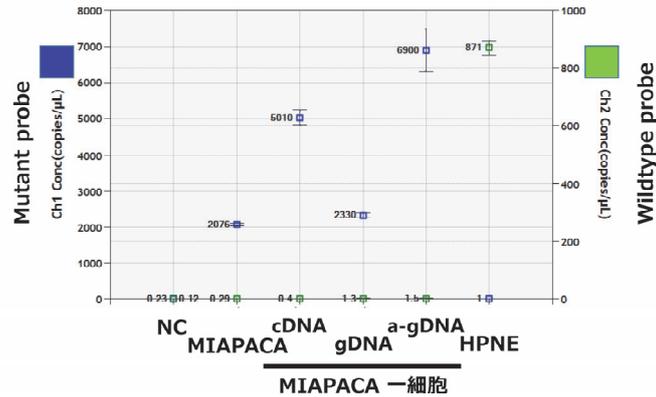


Fig.5 ddPCR 解析結果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Yasuhiro Chikaishi, Kazue Yoneda, Takashi Ohnaga and Fumihiro Tanaka EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a ‘universal CTC-chip’ ONCOLOGY REPORTS 37, 77 (2016)  
DOI: 10.3892/or.2016.5235
- ② Takashi Ohnaga, Yoshinori Takei, Takuya Nagata and Yutaka Shimada Highly efficient capture of cancer cells expressing EGFR by microfluidic methods based on antigen-antibody association Scientific Reports 8, 12005 (2018)  
doi.org/10.1038/s41598-018-30511-9

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 大永崇、新規 CTC 捕捉デバイス；ポリマーCTC チップおよびその基本性能と臨床応用、第 1 回 Liquid Biopsy 研究会、2017
- ② 大永崇、新規 CTC 捕捉システム；ポリマーCTC チップシステムの開発、第 2 回 CTC 臨床応用研究会、2017
- ③ 武井義則、大永崇、清水一治、嶋田裕、低 EpCAM 発現血中がん細胞及び がんクラスターの捕捉、第 2 回 CTC 臨床応用研究会、2017
- ④ 大永崇、注目する細胞マーカーによる CTC の直接捕捉、第 2 回 Liquid Biopsy 研究会、2018
- ⑤ 大永崇、CTC 解析装置、何が足りない？、第 3 回 CTC 臨床応用研究会、2018
- ⑥ 大永崇、CTC チップからのシングルセル回収、第 4 回 CTC 臨床応用研究会、2019

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 大永崇 他、シーエムシー出版、リキッドバイオプシー—体液中腫瘍マーカーの検出・解析技術—、2017、288

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：嶋田裕

ローマ字氏名：Yutaka Shimada

所属研究機関名：京都大学

部局名：薬学研究科

職名：客員教授  
研究者番号（8桁）：30216072

研究分担者氏名：塚田一博  
ローマ字氏名：Kazuhiro Tsukada  
所属研究機関名：富山大学  
部局名：大学院医学薬学研究部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：90171967

研究分担者氏名：藤井努  
ローマ字氏名：Tsutomu Fujii  
所属研究機関名：富山大学  
部局名：大学院医学薬学研究部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：60566967

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大塚基之  
ローマ字氏名：Motoyuki Otsuka

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。