

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15833

研究課題名(和文) 口腔がんにおける1細胞末梢循環腫瘍細胞からのオミクス解析技術創出への挑戦

研究課題名(英文) Omic analysis from single cell circulating tumor cells of oral cancer

研究代表者

本田 一文 (Kazufumi, Honda)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10260936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：1細胞CTCのオミクス解析を実施するための技術基盤を開発した。CTCを細胞マーカーで明示し、マクロキャピラリーを用いてCTC細胞質から細胞内液を抽出する基盤技術を確立した。口腔がん・唾液腺がんのCTCやcfDNAを抽出し、次世代シーケンサーで遺伝子変異プロファイルを取得した。口腔がん・頭頸がんのみならず、食道がん、胃がん、大腸がんなどの消化管がんの遺伝子変異プロファイルを取得し、各がん種毎での特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Liquid biopsy has recently gained attention as a real-time monitoring method for patients with cancer. Circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor DNA (ctDNA) released into the bloodstream from both the primary tumor and metastases may reflect current tumor status. Although it is considering that CTCs are consisting the heterogeneous of population, the biological behavior of single cell CTC has not identified yet. To identify behavior of single cell CTC, we developed the omics analysis of single cell CTC.

研究分野：オミクス解析

キーワード：末梢循環腫瘍細胞 1細胞解析 オミクス解析

### 1. 研究開始当初の背景

口腔がんはヒト個性にとってもっとも重要な顎顔面部に発症するため、最小限な侵襲で最大の治療効果を発揮する個別化医療の開発が求められている。最適治療の選択には、時間的・空間的に変化するがん細胞の個性を正確かつ非侵襲的に捉える技術の創出が求められる。血中を循環する CTCs や循環細胞フリー DNA (circulating cell free DNA cfDNA) を利用して、腫瘍細胞の情報を非侵襲的に回収するリキッドバイオプシーが注目を集めている。リキッドバイオプシーは、採血検体を利用するため頻回の検査でも患者に対する負担は少ない。われわれは、口腔がん患者から CTCs や cfDNA を回収し、次世代シーケンス技術 (NGS) を使いゲノム変異を検出する方法の開発をすすめており、CTCs や cfDNA から p53 や p16 の変異を解析できる可能性を示してきた(平成 27 年度挑戦的萌芽研究)。しかしながら、血行性転移を惹起する CTCs はがん治療のコンパニオン診断への利用だけでなく、転移細胞の遺伝子変異背景の多様性、がん幹細胞、がん休眠、後発遠隔転移、化学療法耐性獲得機構などのがん治療を困難にさせる要因に関与することが指摘され始めた。今回の研究では、口腔がん CTCs の遺伝子変異や代謝機構の多様性の検討による口腔がんの転移・再発・薬剤耐性機構の解明を目的に、CTC の 1 細胞 (single cell) からのオミクス解析の技術開発に挑戦する。

### 2. 研究の目的

- ①口腔がん末梢循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell CTC) 1 細胞からゲノム、メタボローム解析を行うための技術基盤を確立する。
- ②口腔がん CTC オミクス情報から口腔がんの転移・再発・薬剤耐性機構を解明する。

### 3. 研究の方法

- ①Microfluidic separation tool (MST)を用いて口腔がん CTCs の回収法を最適化する。口腔がん患者を前向きに登録し NUS が開発した MST プロトコルを 2 回通すこと(ダブルランププロトコル)により、リンパ球や白血球の混入が少ない、できるだけピュアな CTCs を回収する方法を最適化する。
- ②CTCs が発現する表面バイオマーカーを用いて、CTCs を明示する方法を考案する。CTCs またはリンパ球等の正常細胞が細胞膜表面に特異的に発現する表面マーカーを用いて CTCs を明示させ、マイクロキャピラリーで 1 細胞 CTC から DNA や代謝物を抽出する方法を確定する。リンパ球や CTCs を特異的に生細胞のまま染色する表面マーカーを探索する。
- ③1 細胞 CTC の DNA から次世代シーケンス (NGS) 技術でゲノム解析する技術を開発する。

1 細胞 CTC から抽出された微量 DNA を whole genome amplification (WGA) で増幅し、NGS でゲノムシーケンスする方法を確定する。

④1 細胞 CTC の細胞成分からメタボローム解析する技術を確定する。

1 細胞 CTC から抽出された細胞成分から高分解能質量分析装置を用いて CTC 代謝物(メタボライト)を一斉分析する解析技術を開発する。

### 4. 研究成果

1 細胞 CTC のオミクス解析を実施するための技術基盤を開発した。CTC を細胞マーカーで明示し、マイクロキャピラリーを用いて CTC 細胞質から細胞内液を抽出する基盤技術を確定した。理化学研究所と共同研究で、CTC から抽出した細胞内代謝産物をメタボロミクス解析を実施した。口腔がん・唾液腺がんの CTCs や cfDNA を抽出し、次世代シーケンサーで遺伝子変異プロファイルを取得した。口腔がん・頭頸がんのみならず、食道がん、胃がん、大腸がんなどの消化管がんの遺伝子変異プロファイルを取得し、各がん種毎での特徴を明らかにした。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Kakuya T, Mori T, Yoshimoto S, Watabe Y, Miura N, Shoji H, Onidani K, Shibahara T, Honda K\*.

Prognostic significance of gene amplification of ACTN4 in stage I and II oral tongue cancer.

*Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Apr 3.

pii: S0901-5027(17)31345-0. doi:

10.1016/j.ijom.2017.03.001.

[学会発表] (計 6 件)

1. Kaoru Onidani, Seiichi Yoshimoto, Nami Miura, Hirokazu Shoji, Ken Kato, Takahiko Shibahara, **Kazufumi Honda**,  
Next-generation sequencing of circulating tumor cells isolated from peripheral blood of patients with head and neck or gastrointestinal cancer, ESMO Asia2017 (国際学会) 2017.

2. 鬼谷 薫、吉本世一、三浦奈美、庄司 広和、加藤 健、柴原孝彦、**本田一文** 次世代シーケンサーによる血中循環腫瘍細胞(CTCs)の遺伝子変異プロファイリング 第 37 回日本分子腫瘍マーカー研究会 2017 年

3. Kaoru Onidani, Seiichi Yoshimoto, Nami Miura, Hirokazu Shoji, Ken Kato, Takahiko Shibahara, **Kazufumi Honda**  
Next-generation sequencing of circulating tumor cells isolated from peripheral blood of patients with head and neck or gastrointestinal cancer.

2017 年度生命科学系学会合同年次大会

2017 年

4. 鬼谷 薫、柴原孝彦、本田一文 次世代シーケンサーによる血中循環腫瘍細胞(CTCs)の遺伝子プロファイリング 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会

2017 年

5. Kaoru Onidani, Takanori Kakuya, Nami Miura, Hirokazu Shoji, Takahiko Shibahara, **Kazufumi Honda** Prognostic significance of gene amplification of ACTN4 in stage I and II oral tongue cancer 第 76 回日本癌学会 2017

6. **Honda K.**

Clinical application of plasma biomarkers for early detection of pancreatic cancer identified from proteomic profile.

***The 8<sup>th</sup> Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) Congress, 2016 September, Sun Moon Lake Taiwan. Invited speaker.***

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本田 一文 (HONDA, Kazufumi)

国立研究開発法人国立がん研究センター  
一・研究所・ユニット長

研究者番号：10260936

### (2) 研究分担者

森 泰昌 (MORI, Taisuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター  
一・中央病院・医員

研究者番号：00296708

### (3) 研究分担者

吉本 世一 (YOSHIMOTO, Seiichi)

国立研究開発法人国立がん研究センター  
一・中央病院・科長

研究者番号：00462242