

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09028

研究課題名(和文) 新規デバイスによる肺癌患者の血液中循環腫瘍細胞の同定

研究課題名(英文) The new method for detecting circulating tumor cells in lung cancer patients

研究代表者

坂尾 幸則 (sakao, yukinori)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00274605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CTCの分離は我々が開発した金属フィルターを用いた自動分離装置を用いた。本方法ではスライドガラス上に転写して、免疫染色(汎サイトケラチン抗体)し、光学顕微鏡下でCTCを測定した。同定したCTCよりDNAを抽出し、デジタルPCRを用いてEGFR変異の検討を行った。【結果】8例中7例にCTCが同定され、そのうちEGFR変異が検出されたのは3例であった。切除組織からのEGFR検査と結果が一致したのは6例(変異ありでの一致が2例、無しでの一致が4例)、不一致の2例は、組織で変異あり/CTCで変異なしが1例、組織でEx19del/CTCでL858Rが1例であった。臨床現場での応用可能性まで確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本方法は簡易であるばかりでなく、効率の良いliquid biopsyとしての応用の可能性も示された。院内での簡便なCTC検査+liquid biopsyの可能性が広がった。

研究成果の概要(英文)：For the separation of CTC, an automatic separation device using a metal filter developed by us was used. In this method, the cells were transferred onto a slide glass, immunostained (pan-cytokeratin antibody), and CTC was measured under an optical microscope. DNA was extracted from the identified CTC, and EGFR mutation was examined using digital PCR. Results: CTC was identified in 7 of 8 cases, of which EGFR mutations were detected in 3 cases. The results of the EGFR test from the resected tissue were consistent in 6 cases (2 cases with mutation and 4 cases without mutation), and 2 cases with disagreement were mutated in tissue / no mutation in CTC. One case was L858R in Ex19del / CTC in the tissue. We were able to confirm the applicability in clinical practice.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：CTC liquid biopsy 肺癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

患者への侵襲の少ない liquid biopsy の有用性が報告され、その中でも CTC が、癌の治療効果および予後予測バイオマーカーとして注目されている。肺癌においても、CTC が肺癌の診断および治療効果予測に有用であることが報告されている (Clin Cancer Res 2009, J Cardiothoracic Surgery 2013, PLOS one 2012 Jianwei Huang et al, Matthew G. et al. J Clin Oncol 29:1556-63, Yoon SO et al. Lung Cancer. 2011;71:209-16.)。しかし、これらの最も多い報告は CellSearch システムなどを用いたものであった。本法は代表的な上皮細胞特異的マーカーである EpCAM を指標に CTC 数を数えるもので、肺癌例において末梢血での感度が低く、高コストであること、また CTC 数しか計測できず Liquid biopsy として利用できないなど改善すべき点が多かった。最終的に CellSearch システムは普及せず、CTC 検査のデバイスとしては撤退することが決定している。

我々の開発した 3D filter 型 CTC 分離デバイスは小型、操作が簡便でかつ測定コストが低いことが特徴であり、Liquid biopsy としての診断能力が臨床的に実証されれば大きなインパクトとなる。

### 2. 研究の目的

血液中循環癌細胞 (Circulating tumor cell、以下 CTC) は cfDNA などと並んで Liquid biopsy 候補の 1 つとして注目されている。これまでに、EpCAM 抗体標識磁気ビーズなどを用いた CTC の分離、検出デバイスを用いて乳癌や肺癌患者などにおいて 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。しかしながら、従来の EpCAM などのキャプチャー抗体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、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簡便かつ高感度に分離する 3D filter 型 CTC 分離デバイスを開発し CTC の検出とその意義について研究を進めている。肺癌患者でのプレリミナリーな検証結果から今後期待できるデバイスであると考えている。

### 3. 研究の方法

我々は愛知県「知の拠点」P3 プロジェクト (H23-27 年度) の支援を受け、CTC を細胞のサイズ差によって簡便かつ高感度に分離検出する 3D filter 型 CTC 分離デバイスを開発し【末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス (愛知県がんセンター、オプトニクス、財団、名大本多研の 4 者共願) 特願 2013-153717、出願日; H25.7.24 本特許の PCT 出願; PCT/JP2014/069469, 米国特許出願番号 14-407,466 (オプトニクス、愛知県がんセンター)】、臨床検体などを用いて、前臨床ならびに臨床の両面から CTC の検出とその意義について研究を進めてきた。

これまでの予備的実験から (倫理承認番号、第 8 - 26 号; 頭頸部がん、胃がん、大腸がん、卵巣がん、肺がん等に対する新しい個別化医療に関する基礎的検討とその臨床応用に関する研究) 本デバイスは肺がんに対しても CTC を従来法より高感度に検出でき、さらに CTC の動態や転移の早期診断、治療効果判定、さらに Liquid biopsy としてコンパニオン診断など臨床的にも低コストで有用な新しい診断ツールになりうる可能性を明らかにしつつある。従って、肺がんに対しても、感度の高いコンパニオン診断を組み合わせた再発高リスク群や治療高感受性患者の選別にもとづく新しい個別化治療戦略を目指すツールとして期待できる。

【対象】肺癌手術患者

- 1) 採血: 動脈血/静脈血/肺動脈/肺静脈 (肺動脈・肺静脈は開胸のみ)
- 2) 時期: 加刀前 (術前) 1 週間以内および術後の外来受診日 (静脈血)
- 3) 量、種類: EDTA-2Na 入り採血管 (ベノジェクト II 5ml) 2 本。測定、保管は愛知県がんセンター 遺伝子病理診断部 3.4. 付随の後方視的検討: 最終登録終了後 5 年の観察を行う。

### 4. 研究成果

27 例の肺がん患者検体 (肺静脈血: PV、肺動脈血: PA および末梢血: PB) を用いて CTC の臨床的意義の検討を行った。その結果、PV、PA は PB に比べて有意に CTC 数が多く、しかもクラスター CTC が多いことから遺伝子解析に有用であることが判明した。また血管侵襲は PA、PV ともに起こることも判明した。

【CTC の遺伝子解析の検討】

第 1 に培養肺癌細胞を用いてサイトケラチン免疫染色による CTC 算定後にスライドグラスから DNA 抽出を行うための発色法について検討した。その結果、2 次抗体の標識として POX から ALP に変更することにより、活性酸素による DNA 分解を防ぎ、高効率な DNA 抽出が可能となった。この DNA を用いて Droplet デジタル PCR 法による遺伝子変異解析法を確立した。次に肺静脈血 (PV) を用いて CTC の EGFR 変異について解析を行った。肺静脈血 PV から CTC が検出できた 8 例を対象とし、7 例に CTC が同定され、そのうち EGFR 変異が検出されたのは 3 例であった。肺切除組織からの EGFR 検査と結果が一致したのは 6 例 (変異ありでの一致が 2 例、無しでの一致が 4 例)、不一致は 2 例であった。検討した症例の CTC 数は 1~195 個で、CTC 数 10 個以上

の症例で変異の検出が可能であった。このことから肺静脈血 PV は遺伝子解析の可能な新たなリキッドバイオプシー検体となり得るものと考えられた。

今回、改良型 CTC 自動分離・転写装置を用いて肺癌で CTC の検討を行なったが、大腸癌、胃癌、乳癌など他臓器の癌で報告されているように、肺癌においてもリキッドバイオプシーの本命である末梢血の CTC 数が少ないことが判明した。この CTC の希少性が末梢血 CTC のバイオマーカーとしての意義や遺伝子検査への応用性を乏しいものになっている最大の理由である。今回の2年間の研究では基礎実験及び臨床パイロット試験を含めた CTC の光学顕微鏡的検出と遺伝子解析という2つの機能を同時に解析できるシステムの確立に重点を置いたため、臨床例の検討数が30例以下と少なかった。今後は本研究成果を基盤として、さらに数年をかけ臨床実証研究を重点的に行い(症例登録目標 150 例) 肺癌症例での臨床病期・予後と CTC 数の関係や CTC を用いた遺伝子解析(EGFR/ALK 他)の有用性の検証、切除標本との比較など臨床的な解析を重点的に検討を進めてゆく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito A, Nakanishi H, Yoshimura M, Ito S, Sakao Y, Kodera Y, Yatabe Y, Kaneda N.	4. 巻 39
2. 論文標題 Dynamics of circulating tumor cells early after targeting therapy to human EGFR-mutated lung cancers and HER2 gene-amplified gastric cancers in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4811-4720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Dejima Hitoshi, Nakanishi Hayao, Kuroda Hiroaki, Yoshimura Mayumi, Sakakura Noriaki, Ueda Nanae, Ohta Yuko, Tanaka Rie, Mori Sayomi, Yoshida Tatsuya, Hida Toyoaki, Sawabata Noriyoshi, Yatabe Yasushi, Sakao Yukinori	4. 巻 125
2. 論文標題 Detection of abundant megakaryocytes in pulmonary artery blood in lung cancer patients using a microfluidic platform	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 128 ~ 135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2018.09.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 H. Nakanishi, H. Kuroda, H. Iwata, Y. Yatabe, S. Ito, Y. Sakao
2. 発表標題 Clinical study on CTC for GI tract, lung and breast cancer patients using a new cytology-based automated platform 「新規血中循環癌細胞(CTC) 自動細胞診標本作成装置の開発と消化器癌、肺癌、乳癌CTCの臨床的検討」
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西速夫、吉村真弓、筒山将之、岩田広治、坂尾幸則、松下和博
2. 発表標題 血中循環がん細胞(CTC)を光学顕微鏡で検出できるCTC完全自動分離・染色システムの開発と臨床応用
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西 速夫、筒山 将之、服部 正也、黒田 浩、谷田部 恭、伊藤 誠二、 坂尾 幸則、岩田広治
2. 発表標題 3Dフィルタ型CTC分離デバイスを用いたCTC細胞診の試みと大腸、肺、乳がん血中循環癌細胞(CTC)に関する臨床的検討
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西 速夫、伊藤 誠二、伊藤 友一、坂尾 幸則、黒田 浩、岩田広治、服部 正也、安立 弥生、筒山 将之、谷田部 恭
2. 発表標題 フィルター型分離デバイスを用いたCTC 細胞診断法の開発とその前臨床並びに臨床応用
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中西 速夫  (Nakanishi Hayao)  (20207830)	愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学分野・研究員   (83901)	
研究 分担者	谷田部 恭  (Yasushi Yatabe)  (90280809)	愛知県がんセンター(研究所)・個別化医療TR分野・分野長   (83901)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------