

令和元年6月10日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19893

研究課題名(和文)すべての固形がんの存在診断を可能にするがんスクリーニング腫瘍マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of a universal tumor marker to diagnose the whole solid cancers

研究代表者

桑野 博行(Kuwano, Hiroyuki)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90186560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではすべての固形がんを検出可能な Universal Tumor Marker を開発することを目標に T-プラスチン(PLS3)に注目しました。PLS3はすべての固形がんでは発現する、血液中では通常発現しないことが報告されており Universal Tumor Marker の候補として有望であった。本研究により、血清 PLS3 発現を実臨床で頻用されている ELISA 法で測定することが可能であり、その発現が癌患者において健常者よりも高いことを初めて明らかにしたことである。本研究の成果は、現行のシステムよりも効率的ながん検診スクリーニング法として実臨床への展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、これまで PCR で検出されていた血液中 PLS3 発現が実臨床で頻用されている ELISA 法で検出可能であることを明らかにした点が挙げられる。さらに PLS3 発現は健常者と比較して癌患者で有意に発現亢進しており、この知見は本研究の仮説と一致していた。社会実装の視点では PLS3 は既存の腫瘍マーカーを凌駕する新規 Universal Tumor Marker の候補として期待される。

研究成果の概要(英文)：Several tumor markers are used to evaluate the tumor progression and efficacy of anti-cancer drugs in several solid tumors. The purpose of this study was to establish the Universal Tumor Marker to diagnose the whole solid cancers. Therefore, we focused on the T-plastin (PLS3) which has been reported do to be expressed in whole solid tissues and cancers but not in hematopoietic cells and blood. In this study, we clarified that the expression of PLS3 in serum samples from cancer patients was evaluable using the ELISA method which is commonly used in the clinic now. The expression levels in serum of cancer patients was higher than that of healthy volunteers; suggesting the consistency of our PLS3 hypothesis as a candidate of Universal Tumor Marker. The evaluation of PLS3 in serum samples is expected to be a useful cancer screening tool in the clinic.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：PLS3 T-plastin 腫瘍マーカー 血清マーカー 固形がん

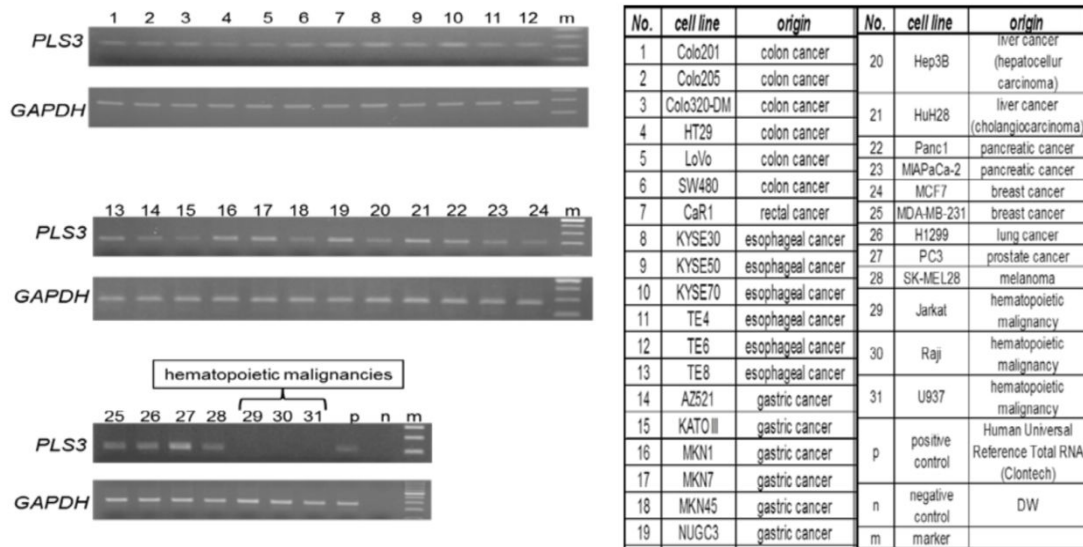
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに癌の種類により様々な腫瘍マーカーが検討されてきた。扁平上皮癌であれば SCC、腺癌であれば CEA, CA19-9、肝臓癌であれば AFP などが一般的であるが、疾患・臓器特異性が高いため腫瘍マーカーを有効に利用するためには組織型の確認が必要である。また検出ができる症例とできない症例が混在することは既存の腫瘍マーカーを癌スクリーニング検査として発展させる上で大きな問題点と言える。

本研究では、われわれがすべての固形がんで発現するにもかかわらず、血液中では通常発現していないことを報告した T-Plastin (PLS3) に注目した (Kuwano and Yokobori et al. Cancer Res 2013) (下図)。

図. PLS3 は血液腫瘍を除く解析したすべての癌細胞株で発現が確認された。



PLS3 の血液中で発現しないという特徴的な発現プロファイルを利用して、血液中の循環癌細胞 (circulating tumor cell; CTC) の検出マーカーとしても有望であった。この血液中に存在せず、すべての固形がん CTC マーカーとしての可能性を報告した PLS3 をより高感度に測定することができれば、固形がん検診スクリーニングに利用可能な Universal Tumor Marker となりうるのではという仮説からこの研究構想に至った。

本研究は、これまで存在しなかった 1 種類だけですべての固形がんを診断可能な画期的かつ挑戦的な Universal Tumor Marker 開発につながる重要な基礎研究と考えている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、すべての固形がんを検出可能な Universal Tumor Marker を開発することである。そのために PLS3 に注目し、さまざまな原発臓器からの固形腫瘍における血液中の癌の存在診断に PLS3 を利用した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 高感度 PCR 法を利用した血中 PLS3 検出

健常者、食道癌切除症例の血清より total RNA を抽出し高感度の digital PCR 法を用いて PLS3 発現を評価した。

#### 2) CTC チップを用いた循環癌細胞中の PLS3 発現評価

進行肺がんの診断にて免疫チェックポイント阻害剤ニボルマブの治療を受けた症例の治療前血液検体より CTC チップを用いて CTC を濃縮し、その検体から total RNA を抽出し PLS3 発現を評価した。

抗がん剤治療中の神経芽腫患者の血液検体から CTC チップを用いて CTC を捕捉した。その CTC が固形組織 (神経芽腫組織) 由来であることを検証するために PLS3 発現を蛍光免疫染色法で評価した。

#### 3) 実臨床で使用されている ELISA 法による血清 PLS3 検出とその意義

進行肺癌患者の血清を用いて PLS3 発現を ELISA 法で評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 高感度 PCR 法を利用した血中 PLS3 検出

健常者、食道癌切除症例の血清より total RNA を抽出し高感度の digital PCR 法を用いて PLS3 発現を測定したが、癌患者由来検体での検出感度が低かったことから検体採取法、保存方法のさらなる検討が必要と考えられた。

##### 2) CTC チップを用いた循環癌細胞中の PLS3 発現評価

進行肺がんの診断にて免疫チェックポイント阻害剤ニボルマブの治療を受けた症例の治療前血液検体より CTC チップを用いて CTC を濃縮し、その検体から total RNA を抽出し PLS3 発現を評価した。

15 症例の CTC を濃縮し、その検体を用いて real time RT-PCR 法で PLS3 発現を評価したが、PLS3 発現が陽性であった症例は 15 症例中わずか 1 症例であり、本手法による癌検出の臨床応用は困難と考えられた。一方、既存の腫瘍マーカーである CEA 発現を濃縮 CTC 検体で評価した結果、ニボルマブ感受性と有意に関連したことからその成果を発表した(Kuwano et al., *Oncology Letters* 2018 Mar;15(3):3061-3067)。

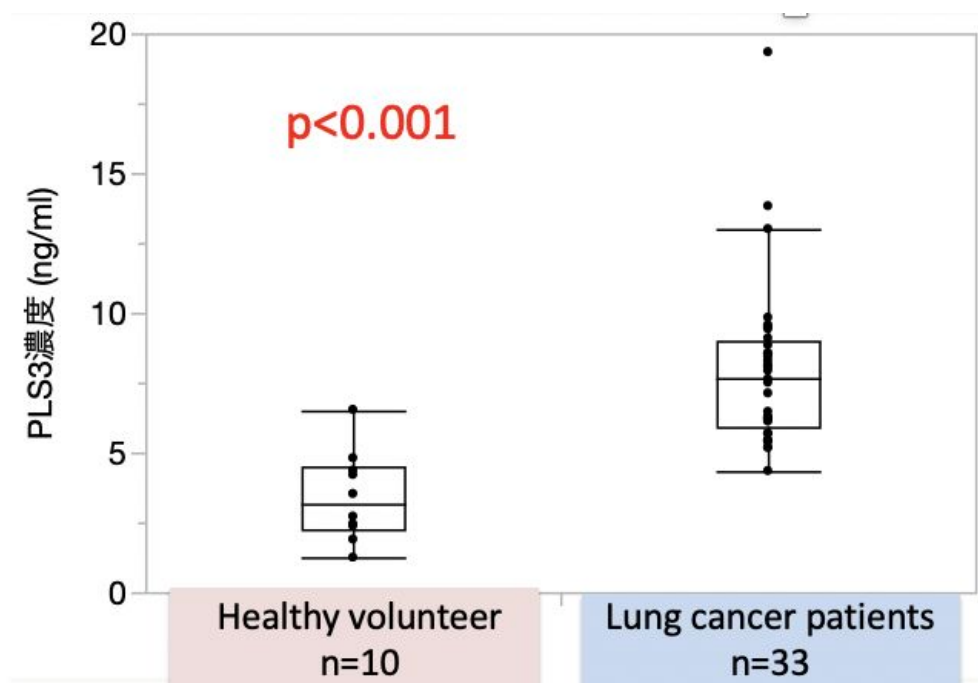
抗がん剤治療中の神経芽腫患者の血液検体から CTC チップを用いて CTC を捕捉した。その CTC が固形組織 (神経芽腫組織) 由来であることを検証するために PLS3 発現を蛍光免疫染色法で評価した。

新規に開発された CTC チップを用いて循環神経芽腫細胞を捕捉し、その細胞は PLS3 を発現することが確認できた。

##### 3) 実臨床で使用されている ELISA 法による血清 PLS3 検出とその意義

進行肺癌患者の血清を用いて PLS3 発現を ELISA 法で評価した。

肺癌患者 (n=33) の血清をもちいて PLS3 発現を ELISA 法で評価した結果、健常者と比較して有意に高発現であり、血清 PLS3 発現評価ががんマーカーとして有望であることが示唆された (下図) (論文準備中)。さらに食道癌、胃癌など臓器横断的に PLS3 の ELISA 法による癌の存在診断が可能かを現在検証中である。



#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

High expression of carcinoembryonic antigen and telomerase reverse transcriptase in circulating tumor cells is associated with poor clinical response to the immune checkpoint

inhibitor nivolumab. (査読有り)

Bao H, Bai T, Takata K, Yokobori T, Ohnaga T, Hisada T, Maeno T, Bao P, Yoshida T, Kumakura Y, Honjo H, Sakai M, Sohda M, Fukuchi M, Altan B, Handa T, Ide M, Miyazaki T, Ogata K, Oyama T, Shimizu K, Mogi A, Asao T, Shirabe K, Kuwano H, Kaira K.  
Oncol Lett. 2018 Mar;15(3):3061-3067.

Genetic and Immunohistochemical Studies Investigating the Histogenesis of Neuroendocrine and Carcinomatous Components of Combined Neuroendocrine Carcinoma. (査読有り)

Iijima M, Yokobori T, Mogi A, Shimizu K, Yajima T, Kosaka T, Ohtaki Y, Obayashi K, Nakazawa S, Gombodorj N, Tsukagoshi M, Shirabe K, Kuwano H.  
Ann Surg Oncol. 2019 Mar 28.

Carboxypeptidase A4 accumulation is associated with an aggressive phenotype and poor prognosis in triple-negative breast cancer. (査読有り)

Handa T, Katayama A, Yokobori T, Yamane A, Fujii T, Obayashi S, Kurozumi S, Kawabata-Iwakawa R, Gombodorj N, Nishiyama M, Asao T, Shirabe K, Kuwano H, Oyama T.  
Int J Oncol. 2019 Mar;54(3):833-844.

High stromal transforming growth factor  $\alpha$ -induced expression is a novel marker of progression and poor prognosis in gastric cancer. (査読有り)

Suzuki M, Yokobori T, Gombodorj N, Yashiro M, Turtoi A, Handa T, Ogata K, Oyama T, Shirabe K, Kuwano H.  
J Surg Oncol. 2018 Nov;118(6):966-974.

Elucidation of the Anatomical Mechanism of Nodal Skip Metastasis in Superficial Thoracic Esophageal Squamous Cell Carcinoma. (査読有り)

Kumakura Y, Yokobori T, Yoshida T, Hara K, Sakai M, Sohda M, Miyazaki T, Yokoo H, Handa T, Oyama T, Yorifuji H, Kuwano H.  
Ann Surg Oncol. 2018 May;25(5):1221-1228.

High STMN1 Expression Is Associated with Tumor Differentiation and Metastasis in Clinical Patients with Pancreatic Cancer. (査読有り)

Suzuki K, Watanabe A, Araki K, Yokobori T, Harimoto N, Gantumur D, Hagiwara K, Yamanaka T, Ishii N, Tsukagoshi M, Igarashi T, Kubo N, Gombodorj N, Nishiyama M, Hosouchi Y, Kuwano H, Shirabe K.  
Anticancer Res. 2018 Feb;38(2):939-944.

Plastin3 is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in gastric cancer. (査読有り)

Kurashige J, Yokobori T, Mima K, Sawada G, Takahashi Y, Ueo H, Takano Y, Matsumura T, Uchi R, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Mori M, Baba H, Mimori K.  
Oncol Lett. 2019 Feb;17(2):2393-2399.

〔学会発表〕(計1件)

発表者：横堀武彦、大竹紗弥香、鈴木信、浅尾高行、桑野博行  
新型 CTC チップを用いた神経芽腫の循環腫瘍細胞検出キットの開発  
第115回日本外科学会定期学術集会 名古屋 平成26年度若手外科医のための臨床研究助成

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：茂木 晃  
ローマ字氏名：Akira Mogi  
所属研究機関名：群馬大学  
部局名：大学院医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：10323362

研究分担者氏名：藤井 孝明  
ローマ字氏名：Takaaki Fujii  
所属研究機関名：群馬大学  
部局名：大学院医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：40507331

研究分担者氏名：横堀 武彦  
ローマ字氏名：Takehiko Yokobori  
所属研究機関名：群馬大学  
部局名：未来先端研究機構  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：60420098

研究分担者氏名：宮崎 達也  
ローマ字氏名：Tatsuya Miyazaki  
所属研究機関名：群馬大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：70372349

研究分担者氏名：原 圭吾  
ローマ字氏名：Keigo Hara  
所属研究機関名：群馬大学  
部局名：大学院医学系研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：60826270

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。