

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15266

研究課題名（和文）末梢血循環腫瘍細胞を用いた小細胞肺癌の治療効果予測と新規治療法への発展

研究課題名（英文）Evaluating drug efficacy and developing novel therapy using circulating tumor cells from small cell lung cancer patients

研究代表者

天野 陽介（Amano, Yosuke）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：50749330

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小細胞肺癌は治療の進歩に乏しい予後不良の疾患である。手術適応になりがたい本疾患の治療開発には腫瘍細胞の確保が重要であり、本研究は小細胞肺癌患者に多いとされる末梢血循環腫瘍細胞（CTC）の抽出・培養を確立し、あわせてCTCを用いた薬剤感受性の評価および新規治療法の開発を目的とした。STEMCELL Technologies社のRosetteSepを用いて小細胞肺癌患者からCTCを抽出・培養を試みた。長期培養可能なCTCにおいて、小細胞肺癌の治療標的として同定した遺伝子Xに対する抗体薬物複合体の有効性を示した。本研究でCTCを用いた治療評価の有効性を示すことができ、さらなる症例の集積が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢血循環腫瘍細胞（CTC）は検出される数と予後との相関や、直接核酸を抽出し遺伝子解析をおこなう報告が多いが、培養が困難であることが多く、CTCを培養し、治療効果の推定に用いた報告は少ない。腫瘍の遺伝子解析を行って、治療標的を想定しても、解析に用いた生きた細胞があつて初めて想定された標的治療の有効性を示すことが出来ると考え、抽出培養技術を整備することは意義があると考えた。また、このCTCを用いて治療薬の開発にもつながりうることを示したことで、CTCが前臨床研究と臨床研究を結びひとつのツールになる可能性があるという点で重要と考えた。

研究成果の概要（英文）：Small cell lung cancer (SCLC) is one of lethal malignancies without major progress in treatment strategy. Obtaining viable tumor cells is required for evaluating drug sensitivity and therefore important for developing novel treatment to this high-grade malignancy to which surgery is usually not applicable. To attain the purpose, we focused on circulating tumor cells (CTCs) and aimed to extract and culture CTCs. CTCs were collected using RosetteSep (STEMCELL Technologies Inc.) from peripheral blood in SCLC patients. Using CTCs that could be cultured for a long time, we showed the anti-tumor activity of antibody-drug conjugate (ADC) to protein X that we identified as one of molecular targets for SCLC treatment. In this study, we proved the usefulness of CTCs for evaluating drug efficacy and developing novel therapy. Further research for CTCs as a tool for developing novel treatment is warranted.

研究分野：肺癌の治療

キーワード：末梢血循環腫瘍細胞 小細胞肺癌 抗体薬物複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 小細胞肺癌は予後不良な疾患であるが、非小細胞肺癌とことなり、現状において治療法の進歩も乏しい。非小細胞肺癌で見られる分子標的治療薬の良好な治療標的は網羅的遺伝子解析においても見つかっておらず、免疫チェックポイント阻害剤についても2019年に殺細胞性抗癌剤との併用効果が一部見られたものの、上乘せ効果はごくわずかであり、画期的な新規治療薬開発には至っていない。治療開発が遅れている一因として、通常手術適応にならないために小細胞肺癌細胞・組織の確保が困難であることに考えた。

2) 一方で小細胞肺癌には、末梢血中に循環する腫瘍細胞 (circulating tumor cells: CTCs) が多いとされる。CTC を直接抽出し、細胞数のカウントや直接遺伝子の解析を行うことで、治療効果の判定・予後予測や、遺伝子異常の検出をおこなう報告はすでに見られているが、CTC を分離・培養したり、培養した CTC を用いた治療薬の感受性評価を行ったりする報告に乏しい。

2. 研究の目的

上記背景をもとに、

- 1) CTC を抽出、培養する方法の確立、
- 2) CTC を培養することができた場合に、CTC を用いた治療薬の開発と CTC を用いた有効性の評価、

を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 小細胞肺癌患者から採血と、CTC の抽出・分離・培養

CTC を分離、抽出する方法は複数開発されているが、その中で CTC そのものへの傷害が少なく、特別な設備を要さない方法として、STEMCELL Technologies 社の RosetteSep CTC Enrichment Cocktail Containing Anti-CD36 を用いた、negative selection 法がある。具体的には、抗赤血球抗体と不要な細胞に対する抗体の複合体 (TAC) を用いて、末梢血より、白血球などの不要な細胞を赤血球と結合させて沈殿・除去することで、CTC を抽出する。

東京大学医学部倫理委員会で「小細胞肺癌患者の末梢血循環腫瘍細胞の培養方法の確立および、末梢血循環腫瘍細胞を用いた新規治療法の開発」(G10154)として承認を得て、未治療および再発時の小細胞肺癌患者より血液検体を取得し、上記 RosetteSep を用いて CTC を抽出を行った。

得られた CTC を増殖因子等を添加した非血清培地を用いて培養を行い、条件検討を行った。

- 2) CTC を用いた治療検討

CTC の増殖が得られたら、薬剤の感受性試験等を検討した。今回は、本研究室で行っているある遺伝子 X に対する抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate: ADC) の効果を検討した。

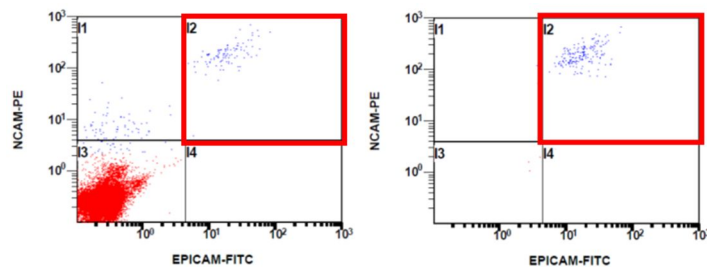


図1: 健常者血液にSHP77添加(左)後RosetteSep施行(右)

4. 研究成果

- 1) 小細胞肺癌細胞株を用いた抽出能の検討

先駆けて、健常者血液に小細胞肺癌細胞株 SHP77 を希釈系列で添加し、RosetteSep を用いて分離を試みた (図1)。健常者血液 2ml に SHP77 を 200 個添加した場合でも抽出でき、培養 2 週間後にコロニーを形成することが確認できた。また、フローサイトメトリーで、抽出した細胞集団は EpCAM+ NCAM+ として検出できた。

- 2) 患者検体からの CTC 抽出・培養

倫理委員会の承認を得て、東京大学医学部附属病院呼吸器内科に入院した進展型小細胞肺癌患者から血液約 10ml を採取して、試薬のプロトコールに沿って、RosetteSep による分離を試みた。

症例は 2020 年 1 月時点で 20 例で施行した。しかし今回の検討においては、実際の症例では、安定して培養が得られたのは報告書作成時点では 2 例にとどまった。

想定される原因としては、予想より CTC の数が少なく、安定して培養が得られた例でフローサイトメトリーを施行し、細胞数を推定できたものでも 360cells/ml (末梢血 5ml 中 1800cells) にとどまった。細胞株と異なり、

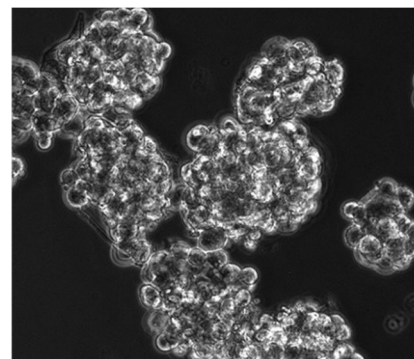


図2: 患者末梢血から樹立したCTC株

CTCの増殖能が低く、脆弱性が強かった、等が考えられた。

については腫瘍細胞が少ないと、RosetteSep 施行後に白血球などの不要細胞が多くみられ、その影響もあり、細胞の生存が得られにくいことが推定された。 については、不要細胞の存在も影響している可能性があるが、分離時点では顕微鏡で腫瘍細胞の確認が可能であるが、細胞増殖が一向に得られない例を多く経験した。一方で、増殖が得られた例においては、半年以上生存が確認された(図2)。

3) CTC を用いた ADC の治療効果

本研究室において、小細胞肺癌の治療として ADC の研究を行っている。具体的には、Cancer Cell Line Encyclopedia にある小細胞肺癌細胞株の遺伝子発現を解析し、正常肺より高発現となっている膜タンパクのひとつとして遺伝子 X を同定し、ADC の治療標的と考えた。遺伝子 X は小細胞肺癌細胞株 SHP77 でも高発現しており、膜タンパク X 抗体と殺細胞性抗癌剤を結合させた 2 次抗体を加えることで細胞死に導くことを示した。

この遺伝子 X は増殖が得られた CTC の細胞株においても HEK293 等の非癌細胞株と比べて高発現であり、膜タンパク X に対する抗体と 2 次抗体薬物複合体を加えることで細胞死を誘導することが出来た(図3)。

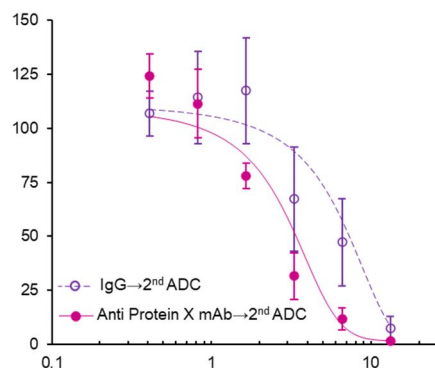


図3: 遺伝子Xに対するADCのCTCへの効果

以上からは、CTCのさらなる抽出・培養能力の向上、症例集積が必要であるが、CTCを用いることで、薬剤の治療感受性の検討を行うことが可能であることが示された。

本研究を進展させることで、遺伝子変異・発現プロファイルなどをもとに、個別に治療標的を検討し、CTCで想定した治療薬の感受性を確認するなどの、より根拠を持った個別化医療につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ando Takahiro, Kage Hidenori, Matsumoto Yoko, Zokumasu Koichi, Yotsumoto Takuma, Maemura Keita, Amano Yosuke, Watanabe Kousuke, Nakajima Jun, Nagase Takahide, Takai Daiya	4. 巻 111
2. 論文標題 Integrin 11 in non-small cell lung cancer is associated with tumor progression and postoperative recurrence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 200 ~ 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14257	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 Watanabe Kousuke, Yasumoto Atsushi, Amano Yosuke, Kage Hidenori, Goto Yasushi, Yatomi Yutaka, Takai Daiya, Nagase Takahide	4. 巻 13
2. 論文標題 Mean platelet volume and lymphocyte-to-monocyte ratio are associated with shorter progression-free survival in EGFR-mutant lung adenocarcinoma treated by EGFR tyrosine kinase inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0203625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0203625	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 Maemura Keita, Watanabe Kousuke, Ando Takahiro, Hiyama Noriko, Sakatani Toshio, Amano Yosuke, Kage Hidenori, Nakajima Jun, Yatomi Yutaka, Nagase Takahide, Takai Daiya	4. 巻 109
2. 論文標題 Altered editing level of microRNAs is a potential biomarker in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3326 ~ 3335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13742	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takuma Yotsumoto, Keita Maemura, Yosuke Amano, Youko Matsumoto, Kouichi Zokumasu, Takahiro Ando, Kousuke Watanabe, Hidenori Kage, Kazuhiro Kakimi, Jun Nakajima, Daiya Takai
2. 発表標題 Novel potential targets of antibody-drug conjugates for small cell lung carcinoma
3. 学会等名 Sixth AACR-IASLC International Joint Conference: Lung Cancer Translational Science from the Bench to the Clinic（国際学会）
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----