

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08432

研究課題名(和文) 消化管がんの末梢循環腫瘍細胞を用いた精密医療

研究課題名(英文) Precision medicine using circulating tumor cells of gastrointestinal cancer

研究代表者

庄司 広和 (Shoji, Hirokazu)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：50765568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃がん、三次治療でのニボルマブ治療開始前に計11例の末梢血から末梢循環腫瘍細胞(CTCs)の分離が可能であった。増幅したDNAから次世代シーケンサーを行い、CTCsからがん遺伝子、がん促成遺伝子変異のプロファイルの抽出に成功した。同一患者から得られた手術検体(FFPE)とliquid biopsy検体であるCTCsやctDNAの遺伝子変異プロファイルが異なっていた。そのため、CTCsとctDNAの両方のプロファイルを併用することで、それぞれの単独のアッセイと比べて遺伝子変異検出が改善すると考えられた。FFPEとCTCsのTMBは一致しておらず、CTCsのTMBはFFPEより低い傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTCsから消化管がんの「がんの個性診断法」を実現できれば、患者に対して最少侵襲で時々刻々変化するがん細胞に対して「適時・最適医療」を提示できるようになると考え、本研究を進めてきた。本研究の結果、進行胃がんCTCsからの遺伝子変異解析、TMB解析が可能であることを証明した。今後は本技術を用いて検討症例数を増やし、そして臨床試験への応用、CTCsの細胞培養が実現できれば、プロテオーム解析や薬剤感受性試験につながり、個々の患者に適した薬剤の提供につながる可能性があり、国内外へのインパクトが非常に高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) could be isolated from peripheral blood of a total of 11 patients with advanced gastric cancer, prior to the start of nivolumab in the third line of therapy. Next-generation sequencing was performed from the amplified DNA, and oncogenes and cancer-promoting gene mutation profiles were successfully extracted from CTCs. The gene mutation profiles of CTCs and ctDNA from surgical specimens (FFPE) and liquid biopsy specimens obtained from the same patient were different. Therefore, the combined use of both CTCs and ctDNA profiles was expected to improve gene mutation detection compared to each assay alone; the TMBs of FFPE and CTCs were not consistent, and the TMB of CTCs tended to be lower than that of FFPE.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：末梢循環腫瘍細胞 胃癌 tumor mutation burden nivolumab

1. 研究開始当初の背景

化学療法の進歩により切除不能な消化管がん患者の生存期間は延長してきたが、決して満足できるものではない。がん細胞は治療の介入によりさらに遺伝子異常の蓄積をきたし、様々な特性を獲得する。そのため、今後のさらなる生存期間延長のためには、がんの個性に基づいた治療法の選択、すなわち個別化医療が必須である。個別化医療の遂行のためには、がんの個性を的確に捉え、最適な治療を予測するコンパニオン診断法が必要になる。そのため、継時的・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とらえる技術の創出が求められる。

最近では、血液中に循環する CTCs や循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) の存在が知られており、CTCs や ctDNA を用いたリキッドバイオプシー技術が世界的に着目されている。特に大腸がんにおいては ctDNA が、術後再発のモニタリング、早期大腸がんの予後予測、切除不能・進行再発大腸がんの予後予測、そして化学療法のモニタリングとして研究が進められており、さらに第Ⅲ相試験に付随し ctDNA を用いた検討が行われているが (Tabernero J, et al. Lancet Oncol 2015)、消化管がんにおいて CTCs を用いたゲノム解析をはじめとしたオミクス解析の検討はまだ不十分である。さらに、CTCs とがん幹細胞との関連も近年報告されている。すなわち CTCs は幹細胞性、上皮間葉転換、生存促進性、休眠状態に関連した遺伝子の発現増加の可能性があり、化学療法の抵抗性や遠隔転移との関連が示唆される。従って、CTCs の生物学的な特性を理解することにより化学療法の抵抗性の原因等が明らかになる可能性があり、このことは将来の創薬へとつながる可能性がある。

近年の免疫チェックポイント阻害剤開発の目覚ましい発展に伴い、効能・奏功性の評価系の構築が重要性を増している。特に胃がん領域において抗 PD-1 抗体である Nivolumab は、切除不能進行・再発胃がんにおける 3 次化学療法以降において延命効果が第Ⅲ相比較試験によって証明された唯一の薬剤である。しかし、他がん種における免疫チェックポイント阻害剤と同様に、奏効率は 10% 程度に留まっており、依然として約半数の患者では、無増悪生存曲線が Best Supportive Care と重なるなど、治療効果が認められていない。一方、肺がんでは、抗 PD-1 抗体薬である Pembrolizumab の有効性が PD-L1 高発現症例で確認されるなど、免疫チェックポイント阻害剤においても個別化医療の重要性が認識されているが、ESMO2017 で報告されたように胃がんにおいては PD-L1 発現は biomarker として不十分であり、依然として biomarker が確立されていないのが現状である (Boku N, et al. Annals of Oncology, Volume 28, Issue suppl_5, 1 September 2017)。

昨今、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果と遺伝子変異量 (tumor mutation burden, TMB rate) と相関することが示唆されてきている。進行肺がんにおいては TMB high の場合、無増悪生存期間が通常の化学療法と比べて有意に長かったことが報告されている (CheckMate 227 試験, Hellmann MD, et al. N Engl J Med. 2018.)。TMB の計測には手術検体からの次世代シーケンズ解析が一般的であるが、Nivolumab の胃がんへの適応は「がん化学療法後に増悪した治療切除不能な進行・再発の胃がん」であり、手術検体がない症例において TMB の検討を行うことが困難な場合が考えられる。リキッドバイオプシー検体を用いたゲノム解析 (CTCs や ctDNA) を用いて TMB を含めた個性と薬剤奏効性との相関を明らかにできれば、免疫チェックポイント阻害療法に対する非侵襲的精密医療バイオマーカーを確立できる可能性が高いと考えられる。

さらに、継時的・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とらえるためには、上記の遺伝子異常の解析に加えて、臨床における化学療法開始前に治療薬の奏功性について生物学的に検証できるアッセイ系の構築が必要である。前臨床の段階で治療の有効性の検索が可能になれば、個別化医療に向けた大事な一歩になり得る。CTCs を用いた Patient-derived xenograft (PDX) やスフェロイド形成によるがん三次元培養などを検討し、培養系の樹立を目指す必要がある。

上記背景から、「消化管がんにおける効率的な CTCs 分離を創出することで、CTCs の生物学的特性を理解し、個別化医療の選択に有用な非侵襲的な病態診断法を開発する」ことに着想した。

2. 研究の目的

消化管がんの個別化医療の確立を目的に消化管がんの末梢循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells, CTCs) の生物学的特性を理解し、有用な病態診断法を開発する。

【研究目標】

(1) 胃がん CTCs を用いたゲノム解析をはじめとしたオミクス解析技術を創出し、免疫チェックポイント阻害剤に対する精密医療を確立する。

(2) 消化管がん CTCs を用いた細胞培養技術を創出する。

3. 研究の方法

➤ **microfluidic separation tool を用いた消化管がんからの CTCs 捕捉法の最適化**

末梢血から CTCs を捕捉する方法としては上皮表面マーカーを用いて集めて、リンパ球等から分離する方法が注目されている。しかしながら抗体による捕捉法は、CTCs が上皮マーカーを発現していることが前提となるため、血行性転移の第一段階である上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) を起こした場合は、上皮マーカーによる CTCs のセレクションが困難な場合がある。

NUS (シンガポール国立大学) は、本問題を解決するため上皮表面マーカーを利用せず細胞径により CTCs を血球から分離する微小流路 (microfluidic separation tool) を用いた分離法の開発に成功した (Hou HW, et al. Sci Rep. 2013) (CTChip-spiral)。我々は、NUS と 2013 年から共同研究を開始し、NUS が開発した CTChip-spiral のプロトタイプを用いて、CTCs の分離に取り組んでいる。本研究では、上皮系表面マーカーを利用せず microfluidics separation tool を用いて消化管がん CTC を効率よく捕捉する方法を確立し、採取された CTCs から次世代シーケンスによるゲノム変異解析等のオミクス解析を行うための技術開発に挑戦する。本方法を用いると、リンパ球・白血球・赤血球・血小板 (血液細胞成分) は外側のセルに分離され、それより大きい CTCs 細胞は内側にセルに濃縮される。濃縮された CTCs を回収して、微量検体から次世代シーケンスによるゲノム解析を行う。この際、上皮表面マーカーを用いた分離を行っていないため、EMT をおこした CTCs についても捕捉が理論上可能になる。事実、同一患者の血液検体で、上皮表面マーカーによる捕捉法と CTChip-spiral による分離法を比較してみたが、血液中のサイトケラチン陽性細胞を分離する能力は、CTChip-spiral の方が 10 倍以上優れていた。CTChip-spiral によって捕捉された CTCs から DNA を分離し、whole genome amplification により微量 DNA を増幅後、次世代シーケンサー (NGS) でゲノム解析を行う予定である。本法は CTCs を簡単に回収できるため、その後の培養も理論的には可能である。

NUS が開発した microfluidic separation tool を用いて、血球細胞成分の混入ができるだけ少なく消化管がんの CTCs を濃縮する方法を最適化する。

➤ **CTCs が含まれた微量検体から遺伝子変異解析等のオミクス解析を確立する。**

濃縮された CTCs の微量検体から DNA を抽出し、次世代シーケンサーでゲノム変異解析を行うために必要な量まで増幅する whole genome amplification を行う。また増幅された DNA から次世代シーケンスを行う。

➤ **CTCs が含まれた微量検体から培養技術を確立する。**

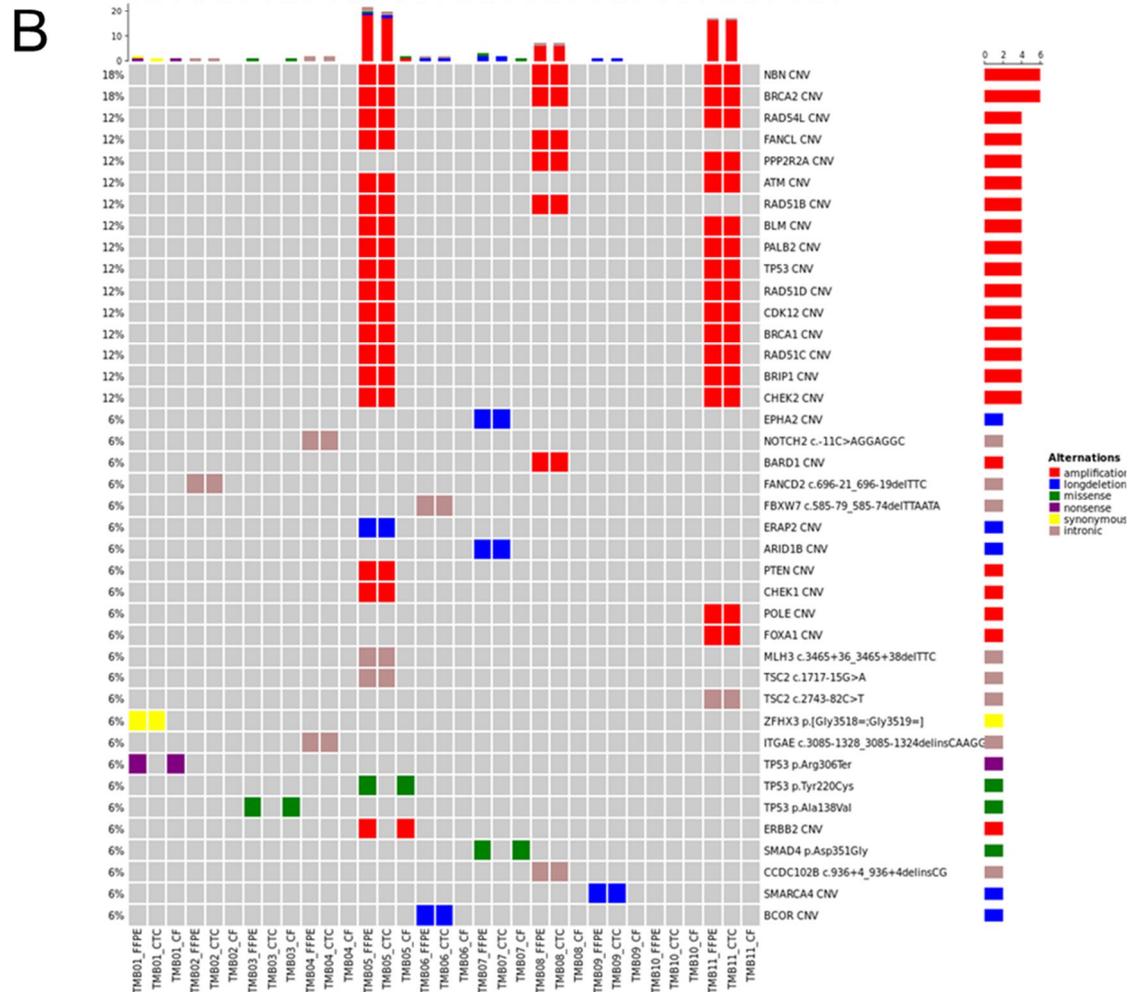
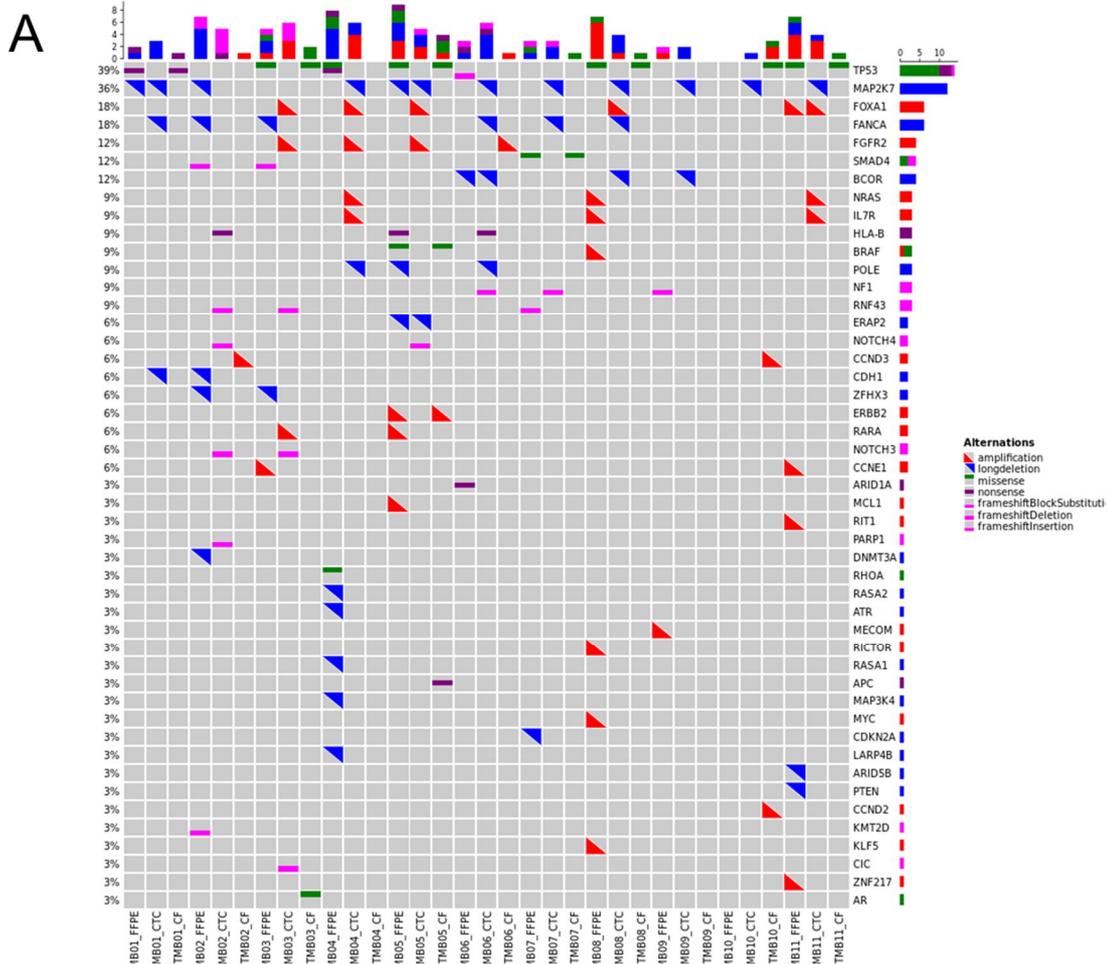
濃縮された CTCs の微量検体から、CTCs を培養するための基礎技術を検討しプロテオーム解析をはじめとするオミクス解析、および薬剤感受性試験への道筋をつける。具体的に上皮成長因子や繊維芽細胞増殖因子の添加 (Min Yu, et al. Science 2014) や、CTCs の機能の保持をめざしスフェロイド培養等を試みる予定である。

4. 研究成果

私たちは CTCs から遺伝子変異を確認する効率の良い解析方法の確立に挑戦し、上皮表面マーカーを利用せず、細胞径により CTCs を血球から分離する微小経路を用いて消化管がんの CTCs の分離及び、CTCs の微量 DNA は一旦増幅を行った後から次世代シーケンス (NGS) でゲノム解析を行うための手技を確立した。

進行期の胃がん、三次治療でのニボルマブ治療開始前に計 11 例の末梢血から CTCs の分離が可能であった。Whole genome amplification により増幅した DNA から NGS を行い、CTCs からがん遺伝子、がん促成遺伝子変異のプロファイルの抽出に成功した。(図 1 A, B)

同一患者から得られた手術検体 (FFPE) と liquid biopsy 検体である CTCs や ctDNA の遺伝子変異プロファイルが異なっていた。そのため、CTCs と ctDNA の両方のプロファイルを併用することで、それぞれの単独のアッセイと比べて遺伝子変異検出が改善すると考えられた。また、3 症例において、amplification は FFPE と CTCs でプロファイルが同一であった。



次に、各症例のFFPEとCTCsのTMBと生存期間の検討を行った。7例で検討が可能であっ

た。(Table 1) FFPE と CTCs の TMB は一致しておらず、CTCs の TMB は FFPE より低い傾向を認めた。症例 TMB01 では FFPE、CTCs とともに TMB が高い傾向があり、全生存期間(Overall survival) も長い傾向があった。

Table 1

Cases	TMB (mutations per megabase)		Survival (months)	
	FFPE	CTCs	Progression-free survival	Overall survival
TMB01	11.33	4.72	1.88	12.93
TMB04	11.34	0.94	4.70	6.35
TMB06	13.23	2.84	0.13	0.95
TMB07	8.52	2.83	4.77	5.03
TMB08	5.68	1.89	0.46	2.43
TMB10	6.68	2.83	0.95	2.93
TMB11	40.43	0.94	2.07	12.40

CTCs を培養するための基礎技術については、引き続き検討が必要である。

CTCs から消化管がんの「がんの個性診断法」を実現できれば、患者に対して最少侵襲で時々刻々変化するがん細胞に対して「適時・最適医療」を提示できるようになると考え、本研究を進めてきた。本研究の結果、進行胃がん CTCs からの遺伝子変異解析、TMB 解析が可能であることを証明した。今後は本技術を用いて検討症例数を増やし、そして臨床試験への応用、CTCs の細胞培養が実現できれば、プロテオーム解析や薬剤感受性試験につながり、個々の患者に適した薬剤の提供につながる可能性があり、国内外へのインパクトが非常に高いと考える。また、Microfluidic separation tool による診断技術の創出は他の医工学分野の発展にもつながり、新しい医工学の学術領域を創出できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Takamizawa S, Shoji H, Hirano H, Izutsu K, Yamamoto S, Iwasa S, Honma Y, Okita N, Takashima A, Kato K, Boku N.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Panitumumab-Associated Drug-Induced Immune Thrombocytopenia in a Patient with Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Rep Oncol.	6. 最初と最後の頁 85-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000512821.	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 Fukahori M, Kato K, Taniguchi H, Ohtomo R, Takahashi N, Shoji H, Iwasa S, Honma Y, Takashima A, Hamaguchi T, Yamada Y, Shimada Y, Ito Y, Itami J, Hokamura N, Igaki H, Tachimori Y, Miwa K, Torimura T, Boku N.	4. 巻 14(2)
2. 論文標題 Relationship between cervical esophageal squamous cell carcinoma and human papilloma virus infection and gene mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2020.2205.	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 -
1. 著者名 Tamura N, Honma Y, Sekine S, Tsukamoto S, Hirano H, Okita N, Shoji H, Iwasa S, Takashima A, Kato K, Boku N.	4. 巻 2020(11)
2. 論文標題 Case report: potential treatment of metastatic ampicrine carcinoma of the rectum with FOLFOXIRI chemotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oxf Med Case Reports.	6. 最初と最後の頁 omaa097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/omcr/omaa097.	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 -
1. 著者名 Narita Y, Shoji H, Kawai S, Mizukami T, Nakamura M, Moriwaki T, Yamanaka T, Sunakawa Y, Kawakami H, Nishina T, Misumi T, Muro K.	4. 巻 17(8)
2. 論文標題 REVIVE study: a prospective observational study in chemotherapy after nivolumab therapy for advanced gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Future Oncol.	6. 最初と最後の頁 869-875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2217/fon-2020-0621.	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 Kobayashi S, Takahashi S, Takahashi N, Masuishi T, Shoji H, Shinozaki E, Yamaguchi T, Kojima M, Gotohda N, Nomura S, Yoshino T, Taniguchi H.	4. 巻 27(9)
2. 論文標題 Survival Outcomes of Resected BRAF V600E Mutant Colorectal Liver Metastases: A Multicenter Retrospective Cohort Study in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 3307-3315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08817-8.	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 -

1. 著者名 Aoki M, Shoji H, Kashiro A, Takeuchi K, Shimizu Y, Honda K.	4. 巻 12(5)
2. 論文標題 Prospects for Comprehensive Analyses of Circulating Tumor Cells in Tumor Biology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel).	6. 最初と最後の頁 1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12051135.	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 Aoki M, Shoji H, Kashiro A, Takeuchi K, Shimizu Y, Honda K.	4. 巻 12(5)
2. 論文標題 Prospects for Comprehensive Analyses of Circulating Tumor Cells in Tumor Biology.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 pii: E1135.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12051135.	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 Nagata Y, Kato K, Miyamoto T, Hirano H, Shoji H, Iwasa S, Honma Y, Takashima A, Hamaguchi T, Matsushita H, Nagashima K, Saruta M, Boku N.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Safety and efficacy of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy (CART) in gastrointestinal cancer patients with massive ascites treated with systemic chemotherapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Support Care Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00520-020-05401-4.	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 -

1. 著者名 Nakatani Y, Kato K, Shoji H, Iwasa S, Honma Y, Takashima A, Ushijima T, Ito Y, Itami J, Boku N.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Comparison of involved field radiotherapy and elective nodal irradiation in combination with concurrent chemotherapy for T1bN0M0 esophageal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01652-7.	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 -

1. 著者名 Kudo-Saito C, Miyamoto T, Imazeki H, Shoji H, Aoki K, Boku N.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 IL33 Is a Key Driver of Treatment Resistance of Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-2235.	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Abe Y, Hirano H, Shoji H, Tada A, Isoyama J, Kakudo A, Gunji D, Honda K, Boku N, Adachi J, Tomonaga T.	4. 巻 10(5)
2. 論文標題 Comprehensive characterization of the phosphoproteome of gastric cancer from endoscopic biopsy specimens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theranostics	6. 最初と最後の頁 2115-2129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/thno.37623. eCollection 2020.	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 Masuda K, Shoji H, Nagashima K, Yamamoto S, Ishikawa M, Imazeki H, Aoki M, Miyamoto T, Hirano H, Honma Y, Iwasa S, Okita N, Takashima A, Kato K, Boku N.	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Correlation between immune-related adverse events and prognosis in patients with gastric cancer treated with nivolumab.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-6150-y.	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 Aoki M, Shoji H, Nagashima K, Imazeki H, Miyamoto T, Hirano H, Honma Y, Iwasa S, Okita N, Takashima A, Kato K, Higuchi K, Boku N.	4. 巻 4(3)
2. 論文標題 Hyperprogressive disease during nivolumab or irinotecan treatment in patients with advanced gastric cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ESMO Open	6. 最初と最後の頁 e000488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/esmoopen-2019-000488. eCollection 2019.	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 Onidani K, Shoji H, Kakizaki T, Yoshimoto S, Okaya S, Miura N, Sekikawa S, Furuta K, Lim CT, Shibahara T, Boku N, Kato K, Honda K.	4. 巻 110(8)
2. 論文標題 Monitoring of cancer patients via next-generation sequencing of patient-derived circulating tumor cells and tumor DNA.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2590-2599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14092.	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shoji H, Adachi J, Hirano H, Honda K, Mizuguchi K, Tomonaga T, Boku N
2. 発表標題 Search of biomarkers and creation of innovative methods required for precision medicine for gastric cancer
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 庄司広和
2. 発表標題 血液検体を用いたリキッドバイオプシーの有用性
3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会 第30回日本口腔内科学会 第13回日本口腔検査学会 合同学術大会. (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Shoji, Y. Abe, H. Hirano, J. Adachi, M. Aoki, K. Honda, N. Boku, T. Tomonaga
2. 発表標題 Comprehensive phosphoproteomics using gastric cancer biopsy specimens.
3. 学会等名 13th International Gastric Cancer Congress 2019 (IGCC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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	本田 一文 (Honda Kazufumi) (10260936)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・部門長 (82606)	

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
---------	---------