

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16786

研究課題名(和文) 肺癌におけるEMTを起こした循環腫瘍細胞の臨床的意義と転移メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of clinical significance and metastasis mechanism of circulating tumor cells undergoing EMT in lung cancer

研究代表者

名部 裕介 (NABE, YUSUKE)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：10813264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉移行(EMT)起こした腫瘍細胞に特異的に発現するCell Surface Vimentin (CSV)を結合したマイクロ流体チップ“CTC-chip”(CSV-chip)は間葉系性質の強い腫瘍細胞での捕捉効率が良好であり、EMT-CTCの捕捉が可能なシステムであると考えられた。手術症例での検討では、再発した3症例で術前に従来のEpCAM-chipおよびCSV-chipによりCTCが捕捉され、また、その内2症例については、再発直前のCTC検査ではCSV-chipのみでCTCが捕捉される結果であり、CSV-chipにより転移能の高いCTCの採取が可能であることが期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発巣から放出された腫瘍細胞が血流に乗って他臓器へ到達することにより転移が生じると考えられている。その血液中の腫瘍細胞のことを循環腫瘍細胞(CTC)といい、CTCが存在する症例では今後転移を生じる危険性が高いと考えられる。従来までCTCを検出するターゲットとして、上皮細胞接着分子(EpCAM)が用いられてきたが、血液中にがんが入るためには上皮間葉移行(EMT)を生じ、上皮系性質のEpCAMの発現が下がり、間葉系性質のマーカーの発現が増加すると考えられている。本研究では転移形成に重要な役割を担うEMTを生じたCTCを高感度に捕捉するシステムの構築を図り、その有用性を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：The microfluidic chip "CTC-chip" (CSV-chip), which is combined with Cell Surface Vimentin (CSV) specifically expressed on tumor cells undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT), has well capture efficiency in tumor cells with strong mesenchymal characteristics. This system was considered to be capable of capturing EMT-CTCs. In a study of surgical cases, CTCs were captured by the conventional EpCAM-chip and CSV-chip before surgery in three cases of recurrence, and in two of these cases, CTCs were captured only by the CSV-chip in the CTC examination immediately before recurrence, indicating that the CSV-chip can capture CTCs with high metastatic potential. It is expected that the CSV-chip can be used to collect CTCs with high metastatic potential.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：循環腫瘍細胞 上皮間葉移行 肺癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

“循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells: CTC)”検出法としては、“CellSearch System”を代表として上皮細胞接着因子 (Epithelial Cell Adhesion Molecule: EpCAM) をターゲットにした捕捉が用いられている。

しかし、癌転移ステップの一部として知られている“上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transformation: EMT)”により EpCAM をターゲットにすると検出できない CTC が存在する可能性が指摘されているため、EMT を起こした CTC に特異的に発現しているタンパクをターゲットにした捕捉系が望まれている。

### 2. 研究の目的

(1) EMT を起こした CTC の捕捉を目的とするために間葉系マーカー (抗 Vimentin 抗体 (Cell-Surface Vimentin) や抗 N-cadherin 抗体など) を用いた CTC 検出システムを確立する。

(2) 肺癌患者において、で構築したシステムを用いて定期的に CTC を検出し、捕捉した CTC の個数と臨床経過と照らし合わせることで、転移・再発予測因子・治療効果予測因子となり得るか検討する。

(3) 癌の転移・再発を生じた肺癌患者における上皮系マーカー (抗 EpCAM 抗体) で捕捉された CTC と間葉系マーカー (抗 Vimentin 抗体や抗 N-cadherin 抗体など) で捕捉された CTC の個数やその比率の経過を見ることにより、癌の進展と EMT との関連性を検討する。

(4) 癌の進展に EMT が関与していることが確認できれば、上皮系マーカーで捕捉された CTC と間葉系マーカーで捕捉された CTC、原発病巣から、それぞれ DNA/RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析・比較を行うことにより転移メカニズムの解明に応用する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 基礎実験 (研究開始～半年)

##### EMT の樹立

当施設において CTC-Chip を使用し、抗 EpCAM 抗体での腫瘍細胞の捕捉が確認されている肺癌細胞株 (PC-9; 腺癌 (Exon19 欠損)) を用いて、トランスフォーミング増殖因子-β (Transforming Growth Factor-β: TGF-β) を添加し、EMT を誘導させる。EMT の誘導を実証するために、TGF-β を添加した肺癌細胞株から RNA を抽出し、Real-Time PCR を用いて EMT に伴う遺伝子の発現の変化 (上皮系マーカーの発現量の低下、間葉系マーカーの発現量の増加) を証明する。

##### CTC-Chip による EMT を起こした CTC の捕捉システムの確立

フローサイトメトリーを用いて EMT を起こした肺癌細胞株における間葉系細胞表面マーカー (Vimentin (Cell-Surface Vimentin) や N-cadherin など) の発現を評価し、EMT を起こした CTC を捕捉する抗体を選別する。選別した抗体を用いて捕捉実験を行うことにより、EMT を起こした CTC の捕捉システムを確立する。

#### (2) 実臨床への応用 (半年～3年目)

##### 肺癌手術患者における CTC の捕捉数と術後経過の比較

肺癌手術予定患者において、1. で確立したシステムを用いて定期的 (術前、術後 1-3 ヶ月毎) に CTC を捕捉し、術後経過と照らし合わせることで、早期再発予測因子となり得るか評価する。また、再発し、化学療法を施行している患者においては CTC の数と治療効果を比較することにより治療効果予測因子となり得るか評価する。

また、従来の上皮系マーカー (抗 EpCAM 抗体) を用いた CTC 検出システムも併用することにより、癌転移を生じた患者において、上皮系マーカーを用いた CTC の捕捉数と間葉系マーカーを用いた CTC の捕捉数や比率の経時的な変化を見ることにより、癌の進展と EMT との関連性を検討する。

研究の対象としては、3年間に上記内容の検討を行うために、比較的術後再発の可能性の高い臨床病期 cN1-2 の手術患者を対象とする。当院では、年間 200 例の原発性肺癌に対して手術を行い、その中で約 30 例の症例が臨床病期 cN1-2 の症例である。

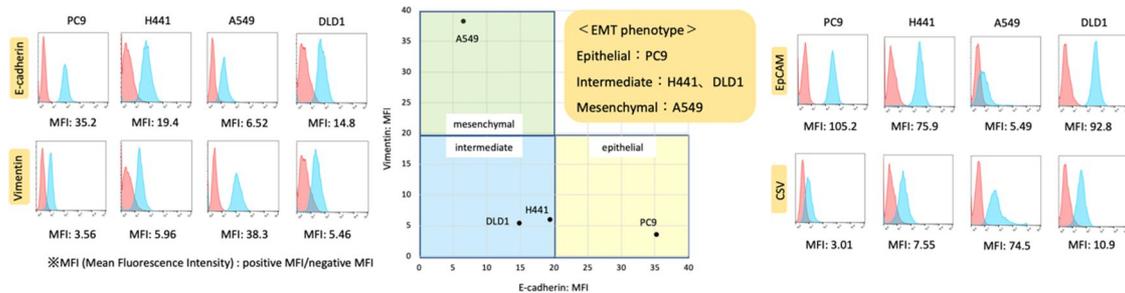
##### 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析、転移メカニズムの解明

2. において癌の転移に EMT が関与しているのであれば、癌の転移を生じた肺癌患者において、上皮系マーカーで捕捉された CTC、間葉系マーカーで捕捉された CTC、手術組織検体からそれぞれ DNA/RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析、遺伝子変異比較を行うことにより転移メカニズムの解明に繋げる。

4. 研究成果  
(1) 基礎実験

EMT の樹立

肺癌細胞株 (PC-9; 腺癌 (EGFR Exon19 欠失)) を用いて、トランスフォーミング増殖因子-β (Transforming Growth Factor-β: TGF-β) を添加し、EMT を誘導させる。EMT の誘導を実証するために、フローサイトメトリーを用いて上皮系マーカー (E-cadherin) および間葉系マーカー (Vimentin) の変化を評価したが、形態的な変化 (円形 紡錘形) は、認められたが、マーカーの変化は期待よりも少なく、EMT の樹立ではなく、下図 (左) のような形で E-cadherin と Vimentin の発現により EMT phenotype で分類した細胞株を使用する方針とした。

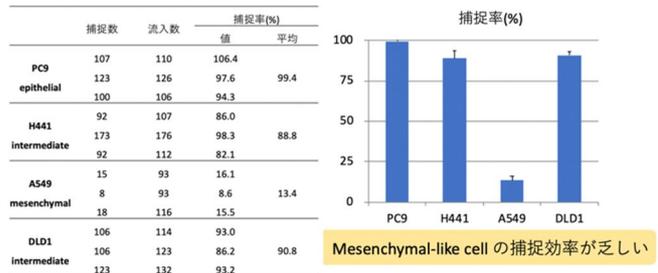


CTC-Chip による EMT を起こした CTC の捕捉システムの確立

間葉系細胞表面マーカーとして N-cadherin も候補に挙げたが、血球細胞への発現を認めたため、Cell-surface Vimentin (CSV) を捕捉ターゲットに選定した。上記細胞株での EpCAM および CSV の発現を評価すると上図 (右) のような形になった。

EpCAM-Chip (血液)

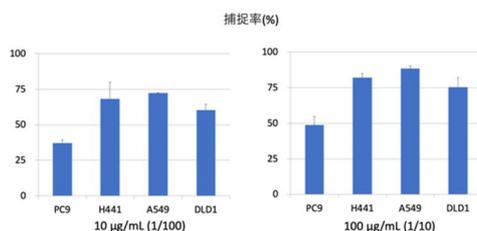
従来までの EpCAM をターゲットにした捕捉データでは右図のような形であり、間葉系性質の強い細胞株では捕捉率が不良な結果であった。



そのため、CSV をターゲットにした捕捉実験を行なうと (下図左) PBS ベースでは抗体濃度による差はあるものの、EpCAM-chip では捕捉率の不良であった A549 にて高い捕捉効率を示した。血液ベースでも同様の検討を行うと、捕捉率の低下はあるものの、間葉系性質の強い細胞株において捕捉率の高い結果であり、CSV-chip は EMT-CTC の捕捉に有用なことが示唆された (下図右)。

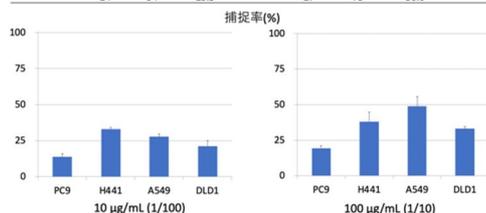
CSV-Chip (PBS)

抗CSV抗体濃度	10 µg/mL (1/100)				100 µg/mL (1/10)			
	捕捉率(%)		捕捉率(%)		捕捉率(%)		捕捉率(%)	
	捕捉数	流入数	値	平均	捕捉数	流入数	値	平均
PC9 epithelial	35	89	39.3	37.1	58	106	54.7	48.7
	44	126	34.9		42	101	42.6	
H441 intermediate	40	50	80.0	68.2	95	120	79.2	82.1
	58	103	56.3		104	120	85.0	
A549 mesenchymal	50	69	72.5	72.4	84	93	90.3	88.4
	70	97	72.2		102	118	86.4	
DLD1 intermediate	53	94	56.3	60.4	92	112	82.1	75.5
	108	168	64.3		62	90	68.9	



CSV-Chip (血液)

	10 µg/mL (1/100)				100 µg/mL (1/10)			
	捕捉率(%)		捕捉率(%)		捕捉率(%)		捕捉率(%)	
	捕捉数	流入数	値	平均	捕捉数	流入数	値	平均
PC9 epithelial	14	150	9.3	13.7	44	197	22.3	19.5
	19	110	17.4		20	103	19.4	
	19	132	14.3		20	120	16.7	
H441 intermediate	32	91	35.2	33.0	26	91	28.6	38.2
	51	157	32.5		57	163	35.0	
	56	179	31.3		56	110	50.9	
A549 mesenchymal	24	76	31.6	27.7	62	102	60.8	46.8
	18	72	25.0		26	71	36.6	
	24	91	26.4		45	92	48.9	
DLD1 intermediate	12	88	13.6	21.2	24	75	32.0	33.0
	28	114	24.6		36	116	31.0	
	24	94	25.5		27	75	36.0	



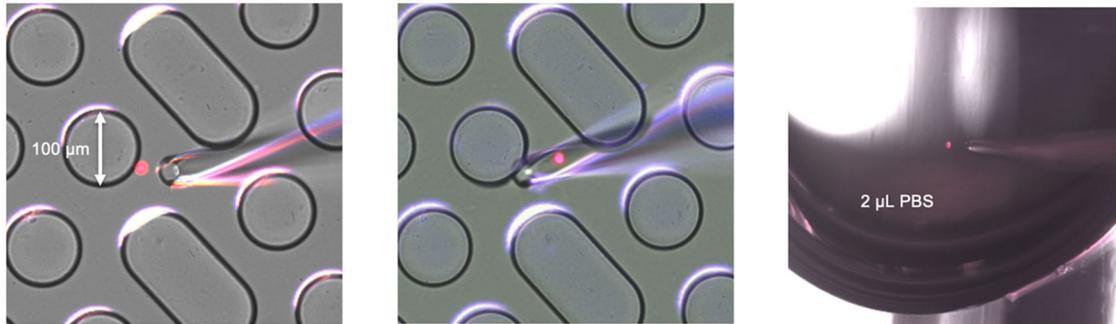
(2) 実臨床への応用 (半年~3年目)

### 肺癌手術患者における CTC の捕捉数と術後経過の比較

上記システムを用いて、手術症例 15 例において EpCAM-chip および CSV-chip による CTC の捕捉を行った。また、その症例において定期的な捕捉を行うことにより CSV-chip の有用性を検討したが、そのうち再発した症例が 3 例であり、その全ての症例で術前に EpCAM-chip および CSV-chip により CTC が捕捉された。また、その内、2 症例については、再発直前の CTC 検査では CSV-chip のみに CTC が捕捉される結果であり、CSV-chip によりより転移能の高い CTC の採取が可能であることが期待される結果であった。症例数、経過観察期間がやや短く、今後検討していく必要があると考える。

### 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析、転移メカニズムの解明

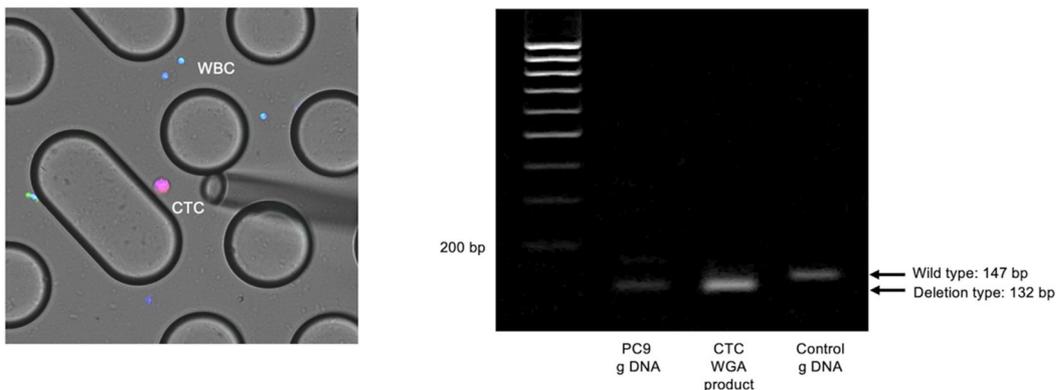
まずは、捕捉した CTC-chip からの細胞の回収、PCR ベースでの遺伝子変異解析が行えるか検討をした。



上図のように、捕捉した腫瘍細胞をマイクロマニピュレーターで分離し、PCR tube への回収を行うことができた。さらに捕捉した腫瘍細胞から DNA を抽出し、既存の遺伝子変異 (PC-9: EGFR exon19 欠失) を PCR で検出することを証明した。

その上で、臨床症例において、手術時に EGFR exon19 欠失が確認できている症例において CTC を採取し、同様の解析を行うと CTC からも遺伝子変異検出が可能であった。

本研究では、上記のように PCR ベースでの遺伝子検出までの検討となったが、今後、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子検出の検討に進む予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金山雅俊、森將鷹、栗田泰治、米田和恵、大永崇、田中文啓
2. 発表標題 "Universal CTC-chip"によるEMTを起こした循環腫瘍細胞の捕捉システム確立に向けた検討
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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