

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390181
 研究課題名（和文）
 癌患者における血中循環癌細胞の特性解析と癌転移動態の分析に関する研究
 研究課題名（英文）
 Research on functional analysis of circulating tumor cells in association with cancer metastasis.
 研究代表者
 戸井 雅和 (TOI MASAKAZU)
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号：10207516

研究成果の概要（和文）：CTC を高感度かつ安定的に検出する方法について検討した。抗 EpCAM 抗体、抗 P-cadherin 抗体を用いることで basal type における CTC 回収率が改善した。原発性乳癌を主対象に術前化学療法を施行した症例で CTC 数の変化、viability と治療効果について検討した。M30 を用いた CTC の viability の評価と術前化学療法の治療効果との関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the way to improve sensitivity and reproducibility of CTC assay. Recovery rate of basal type phenotype was improved with additional staining with anti-EpCAM antibody and anti-P-cadherin antibody. CTC count and viability in patients with breast cancer who received neoadjuvant chemotherapy was also evaluated. Evaluation of CTC viability using M30 may help to evaluate response of neoadjuvant chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：1)腫瘍検査学 2)血中循環癌細胞 3)転移 4)アポトーシス 5)M30 6) EpCAM 7)P-cadherin 8)上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

癌の病態形成において最も重要な因子の一つである転移に関する動態解析の重要度は高い。ヒトの固形癌における転移の評価はこれまで画像診断を中心に行われてきたが、循環血中癌細胞(circulating tumor cell:

CTC)や骨髄微小転移の検索により、転移細胞の細胞特性を解析し、転移の動態を個体レベルで計量的に分析することが可能になった。

CTC の特性は癌の病態によって異なり、原発腫瘍と同様の多様な生物学的特性を持つ場合や原発腫瘍と異なる転移細胞の特性を

持つ場合など様々であることが見いだされてきた。これらの特性については綿密な臨床的検討が必要である。また、原発巣の癌幹細胞と CTC の特性に関する比較、骨髄転移細胞と CTC の間の対比等が重要であると考えられ、種々の癌腫や病態での検討が必要である。

2. 研究の目的

1) CTC 測定法の検討、最適化

CTC の測定は CellSearch System が一般に用いられている。これは免疫磁気法による半自動化された測定法であり、結果の安定性、再現性に優れている。しかしながら免疫磁気法の抗体として抗 EpCAM 抗体を用いているため、EpCAM 発現の弱い腫瘍細胞が検出されないという欠点がある。CTC を高感度かつ安定的に検出する測定系について検討する。

2) CTC の特性解析

CTC の特性解析は転移のメカニズムを探る上でも、精度の高い予後予測や治療効果の評価を行う上でも重要になる。CTC において幹細胞の性質を持っているものや細胞死前段階のものなど、CTC の特性を解析する

3) CTC の計量的分析

原発巣、転移性癌において CTC の計量的分析を行い、転移動態の分析を行う

4) CTC と治療との関連性に関する検討

治療による CTC の減少が治療の予後に及ぼす影響を推測する上で有用である可能性が示唆されている。治療中の CTC の特性変化や態様の変化を解析することにより、治療に関連した転移動態の分析を行う。

3. 研究の方法

1) CTC 測定法の検討、最適化

① CellSearch system の下方検出限界についての検討

健常人からの血液サンプルに 1-10 個程度の培養細胞を加え、CellSearch System によって subtype 別の回収率を評価した。

② 蛍光免疫染色過程における混合抗体(抗サイトケラチン抗体+抗 EpCAM 抗体)の導入

サイトケラチンの発現の低い腫瘍細胞の検出のため、CellSearch System の蛍光免疫染色過程において、混合抗体(抗サイトケラチン抗体+抗 EpCAM 抗体)の導入し、従来の抗サイトケラチン抗体による染色法と回収率を比較検討した。

健常人からの血液サンプルに培養細胞を加えたものを用いて、CellSearch System による回収率を評価した。

③ subtype 別の新たなマーカーの導入

乳癌細胞株では basal phenotype の回収率が低い。Triple negative type で発現が高いとされる P-cadherin に対する抗体を用いて回収率の改善をはかった。

CellSearch System の蛍光免疫染色過程において、混合抗体(抗サイトケラチン抗体+抗 P-cadherin 抗体)の導入を行い、従来の抗サイトケラチン抗体による染色法と回収率を比較検討した。

健常人からの血液サンプルに培養細胞を加えたものを用いて、CellSearch System による回収率を評価した。

④ EMT 誘導を抑制することによる EpCAM 蛋白発現変化の検討

CTC に対して EpCAM 蛋白の発現増加をはかることによる測定感度改善を試みた。乳癌細胞株に対して EMT 誘導に重要とされる ZEB1 を siRNA を用いて抑制し、EpCAM 蛋白発現の変化を検討した。

EpCAM 蛋白発現は flowcytometry にて評価した。

2) CTC の特性解析

CTC の特性解析では CTC の viability に着目し、判定評価にアポトーシスマーカーである M30 抗体を加えた新たな CTC 測定システムの構築を図った。

3) CTC の計量的分析

乳癌、胃癌、肺癌を対象に CTC を測定し臨床病期と CTC 陽性率などについて検討した。

4) CTC と治療との関連性に関する検討

治療修飾を受けた CTC の特性解析を目的として、術前化学療法を施行した症例で治療時の CTC 数の変化、CTC におけるアポトーシスの状況を観察し、組織学的抗腫瘍効果との関連性を検討した。

術前化学療法を受けた手術可能な原発性乳癌患者を対象に治療前と化学療法施行 24 時間後、3 週間後の CTC 数および viability を測定した。viability の評価には、判定評価にアポトーシスマーカーである M30 抗体を加えた新たな CTC 測定システムを用いた。

また化学療法の臨床学的治療効果を画像診断で、組織学的効果を手術摘出標本で評価した。

4. 研究成果

1) CTC 測定法の検討、最適化

① CellSearch system の下方検出限界についての検討

SK-BR-3 (HER2) が 77.8-100% と良好な回収率であったのに対し、MDA-MB-468 (basal) では 0-76.9% であった(図 1)。

また、MDA-MB-468 (basal) では特に加え

た細胞が少数の場合に回収率が低い傾向があった。

(図 1) CellSearch System の下方検出限界

細胞株 (subtype)	回収細胞数/加えた細胞数	回収率
SK-BR-3 (HER2)	1/1	100%
	3/3	100%
	7/9	77.80%
MDA-MB-468 (basal)	0/1	0%
	2/5	40%
	12/18	66.7%
	30/39	76.9%
MDA-MB-231 (postEMT)	3/3	100%
	2/5	40%
	9/11	81.8%
	31/40	77.5%

② 蛍光免疫染色過程における混合抗体(抗サイトケラチン抗体+抗 EpCAM 抗体)の導入

従来法(抗サイトケラチン抗体)を用いた場合の回収率は MDA-MB-231(postEMT)で 9.0%、MDA-MB-468(basal)で 43.6%、HCC1937 (basal)で 23.6%であった。

これに対し混合抗体(抗サイトケラチン抗体+抗 EpCAM 抗体)を用いた場合の回収率は、MDA-MB-231(postEMT)で 16.7%、MDA-MB-468(basal)で 60.3%、HCC1937 (basal)で 61.6%であった。

basal type での回収率改善が認められた(図 2)。

(図 2) 抗 EpCAM 抗体による回収率変化

	細胞株 (subtype)	回収細胞数/加えた細胞数			平均回収率 (%)
		1回目	2回目	3回目	
CellSearch System	MDA-MB-231 (post EMT)	20/100	2/100	5/100	9.0
EpCAM追加		18/100	17/100	15/100	16.7
CellSearch System	MDA-MB468 (basal)	57/100	32/100	40/100	43.0
EpCAM追加		63/100	63/100	55/100	60.3
CellSearch System	HCC1937 (basal)	26/100	22/100	23/100	23.6
EpCAM追加		63/100	57/100	65/100	61.6

③ subtype 別の新たなマーカーの導入

従来法(抗サイトケラチン抗体)を用いた場合の回収率は、MDA-MB-468(basal)で 51%、HCC1937 (basal)で 40.3%であった。

これに対し 新たな抗体(抗サイトケラチン抗体+抗 P-Cadherin 抗体)を用いた

場合の回収率は、MDA-MB-468(basal)で 59.0%、HCC1937 (basal)で 72.6%であった。

basal type での回収率改善が認められた(図 3)

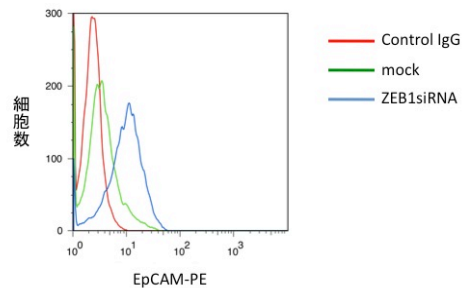
(図 3) 抗 P-cadherin 抗体による回収率変化

	細胞株 (subtype)	回収細胞数/加えた細胞数	回収率 (%)
CellSearch System	MDA-MB-468 (basal)	153/300	51.0
P-cadherin追加		177/300	59.0
CellSearch System	HCC1937 (basal)	121/300	40.3
EpCAM追加		218/300	72.6

④ CTC に対して EpCAM 蛋白の発現増加をはかり、測定感度を改善することを試みた。

乳癌細胞株、MDA-MB-231(post EMT)に対して ZEB1siRNA の transfection によって EMT を抑制すると、EpCAM 発現が増加することが示唆された(図 4)。

(図 4) ZEB1siRNA による EMT 抑制と EpCAM 発現の変化(flowcytometry)



実際の臨床検体に対して EMT を抑制し EpCAM 発現を増加させるためにはさらなる検討が必要である。

2) CTC の特性解析

CTC の特性解析では CTC の viability に着目した。CellSearch System の染色過程では、CTC の positive selection のために抗サイトケラチン抗体、白血球の negative selection のために抗 CD45 抗体が用いられる。

これらに加え、染色過程にアポトーシスマーカーである M30 抗体を用いることで CTC におけるアポトーシスの状況の観察が可能となった。

CellSearch System によって検出される従来の CTC はさらに M30 の染色性によって viable CTC (M30 陰性 CTC) と apoptotic CTC (M30 陽性 CTC) に分類される。CTC のアポト

ーシスという特性解析を併せ持った新しい CTC 測定法により、治療効果と CTC のアポトーシスの関連性の解析などが可能となった。

3) CTC の計量的分析

乳癌に対しては CTC の計量的分析とともに、特に治療効果と CTC のアポトーシスの関連性について解析した。

胃癌に対しては、進行胃癌患者に対して、CTC 測定を施行した。臨床的に遠隔転移のある IV 期では高率に検出される傾向であった。

4) CTC と治療との関連性に関する検討

術前化学療法を受けた手術可能な原発性乳癌患者 75 例を対象とし、治療前および治療経過中の CTC 数、CTC の viability を評価し、治療との関連性を検討した。

①患者背景と治療前の CTC 陽性率 (cut off 1 個) には明らかな相関を認めなかった (図 5)。

(図 5) 患者背景と CTC 陽性率

	n	CTC 陽性 (n,%)	CTC 陰性 (n)	P 値
合計	75	23(31%)	52	
年齢	-50	40	12(30%)	0.89
	51-	35	11(31%)	
T	1	19	7(37%)	0.27
	2	40	13(33%)	
	3	12	1(8%)	
	4	4	2(50%)	
N	0	34	12(35%)	0.43
	1,2,3	41	11(27%)	
ER	+	41	14(34%)	0.47
	-	34	9(26%)	
PR	+	29	10(34%)	0.57
	-	46	13(28%)	
HER2	+	23	7(30%)	0.98
	-	52	16(31%)	
Pheno type	Luminal	30	9(30%)	0.99
	Luminal +HER2	12	4(33%)	
	HER2	11	3(27%)	
	TN	22	7(32%)	
grade	1	1	0(0%)	0.80
	2	34	10(32%)	
	3	37	10(28%)	
Ki67	<30	20	6(30%)	0.81
	≥30	37	10(27%)	
	N/A	18		

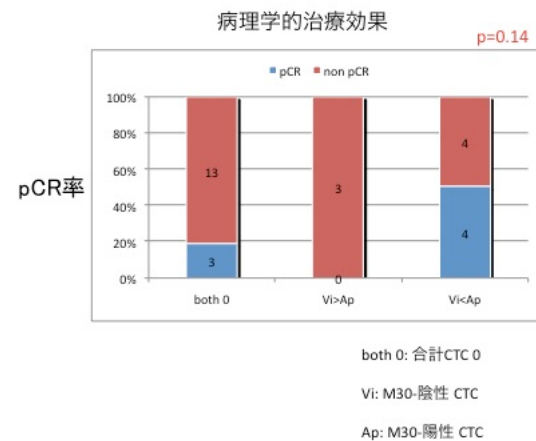
②組織学的治療効果 (pCR 率) と治療前の CTC 陽性率をとの関連を CTC の viability とあわせて検討すると、治療前に M30 陰性 CTC を認めた症例では pCR 率は 0% であった。統計学的な有意差は認めなかった (図 6)。

(図 6) 治療前 CTC と pCR

	CTC 数	合計人数	pCR (人数,%)	non pCR (人数)	P value*
治療前 (n=72)	≥1	22	3(14%)	19	0.25
	0	50	13(26%)	37	
M30 陰性 CTC	≥1	9	0(0%)	9	0.087
	0	63	16(25%)	47	
M30 陽性 CTC	≥1	14	3(21%)	11	0.94
	0	58	13(22%)	45	

③化学療法 3 週間後に CTC 数、viability の測定が可能であった 27 例を解析について病理学的治療効果との関連を検討した。治療 3 週間後の pCR 率は、合計 CTC 陰性患者で 18.8% (3/13)、合計 CTC 陽性症例のうち viability の評価で M30 陰性 CTC > M30 陽性 CTC の症例で 0% (0/3)、M30 陰性 CTC < M30 陽性 CTC の症例で 50% (4/8) であった。統計学的な有意差は認めなかったが、CTC のアポトーシスと治療効果との関連が示唆された (図 7)。

(図 7) 化学療法 3 週間後の CTC viability と pCR 率



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1) Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer. Nakamura S, Yagata H, Ohno S, Yamaguchi H, Iwata H, Tsunoda N, Ito Y, Tokudome N, Toi M, Kuroi K, Suzuki E. Breast Cancer. 2010 Jul;17(3):199-204. Epub 2009 Aug 1. (査読有)
DOI: 10.1007/s12282-009-0139-3

[学会発表] (計 5 件)

1) Noriyoshi Fujisawa, Sunao Tanaka, Takayuki Ueno, Masakazu Toi, Evaluation of CTC viability with M30: Early

predictive factor for response of neoadjuvant chemotherapy. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, 2011/9/21, Osaka

- 2) Masakazu Toi, Clinical significance of minimal residual cancer in the treatment of breast cancer, 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, 2011/9/21, Osaka
- 3) 藤澤憲良, 上野貴之, 竹内 恵, 辻 和香子, 山城大泰, 石黒 洋, 杉江知治, 戸井雅和, 乳癌症例の CTC(循環血液中腫瘍細胞)数の検討, 18回日本乳癌学会 学術総会, 2010/6/25, 札幌
- 4) Takayuki Ueno, Tomoharu Sugie, Hiroyasu Yamashiro, Megumi Takeuchi, Wakako Tsuji, Hiroshi Ishiguro, Sunao Tanaka, Masakazu Toi, Circulating tumor cells in primary breast cancer, Organizaion for Oncology and Translational Research, 2010/02/26-27, Kyoto
- 5) Takayuki Ueno, Sunao Tanaka, Masakazu Toi, Circulating tumor cells in primary breast cancer, American Society for Cell Biology, 2009/12/06, San Diego

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸井雅和 (TOI MASAKAZU)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：10207516

(2) 研究分担者

石黒 洋 (ISHIGURO HIROSHI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：20422925

大野真司 (OHNO SHINJI)
独立行政法人国立病院機構 (九州がんセン
タ一臨床研究部) 乳腺科
研究者番号：50203881

上野 貴之 (UENO TAKAYUKI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：40452362

辻 和香子 (TSUJI WAKAKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：00531816

岡部 寛 (OKABE HIROSHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：10335250