

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15916

研究課題名（和文）血中循環腫瘍細胞を用いた大腸癌遠隔転移を規定する遺伝子群の同定

研究課題名（英文）Identification of gene sets related with metastasis by detecting circulating tumor cells

研究代表者

石橋 嶺 (Ishibashi, Rei)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50843299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：オンコパネルを用いた遺伝子解析に基づく薬剤決定に見られるように、癌の診療は癌細胞内の遺伝子変異・発現情報に基づく診療に急速にシフトしつつある。したがって、今後、簡便に、頻回に、癌細胞の遺伝子情報を取得する方法が必須となると考えられる。血中循環腫瘍細胞（circulating tumor cell）の捕捉はその手法のひとつであるが、本研究ではCTCの捕捉だけでなく、その遺伝子解析研究を進め大腸癌遠隔転移惹起と相関する遺伝子変異・発現遺伝子セットを同定し、機能解析を加えて大腸癌遠隔転移責任分子を同定するとともに、CTCの捕捉と遺伝子解析の臨床的有用性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト大腸癌患者で捕捉される循環腫瘍細胞の遺伝子発現状況の解析と、その後の臨床情報とを統合して解析を行うことで、遠隔転移に真に関わる分子を同定できることを証明しえた。さらに、その機能解析を実験的に行って生物学的な機能解明に貢献し、CTCの捕捉と遺伝子解析の有用性について、検体・基礎的手法・統合解析・臨床情報といったものが高度に組み合わせられて初めてできた研究であり、それだけでもオリジナリティーが高く、CTC研究分野・Personalized medicine の促進にもブレークスルーをもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：As seen in drug decisions based on genetic analysis using oncopanels, cancer treatment is rapidly shifting to treatment based on information on gene mutations and expression within cancer cells. Therefore, it is thought that a method for easily and frequently acquiring genetic information of cancer cells will be essential in the future. One of the methods is to capture circulating tumor cells, but in this study, we will not only capture CTCs, but also conduct genetic analysis research to identify gene mutations and expressed gene sets that correlate with the induction of distant metastasis in colorectal cancer. We identified the molecules responsible for colorectal cancer distant metastasis through functional analysis, and demonstrated the clinical utility of CTC capture and genetic analysis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：循環腫瘍細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Microsatellite instability の有無による免疫チェックポイント阻害剤の適応決定に代表されるように、癌は遺伝子変異状況によって治療法選択をする時代になりつつある。このことを鑑みると、癌の診断・治療・経過観察において、癌細胞の遺伝子情報を、必要時に非侵襲的に頻回に得ることは、ますます重要になると思われる。そのような情報取得を実現する手法として、癌由来の遺伝子や細胞を体液中から得る“Liquid Biopsy”が期待されている。血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) は、末梢血中を流れる癌細胞で、軽微な侵襲で繰り返し採取可能なことから、Liquid Biopsy のひとつとして、臨床応用の期待が大きい。しかし、入手可能な CTC 解析装置として現在唯一 FDA の承認を得ている“CellSearch”は今までのところほとんど普及していない。その最大の理由は、本機器自体が高額で、ランニングコストもかかるうえ、特定の上皮マーカーを持つ癌細胞にしか適用できず、採取した細胞の遺伝子解析もできず、要するに利用価値が無いためと思われた。そこで、ほん研究では、癌の特異的表面マーカーに対する抗体による CTC 捕捉原理を応用し、癌細胞特異的抗体を結合させたマイクロ流体デバイス「樹脂 CTC チップ」(富産業技術研究センターで開発)の運用を工夫し、数年前から臨床検体を用いた検討を行っている。このデバイスは、簡便に安価に CTC 解析ができるため極めて有用性が高い。

しかしながら「血中に流れ出す腫瘍細胞すべてが生物学的に重要な意味を持っているか」は、まだ明確ではない。例えば最近の重要な報告として、腸上皮の幹細胞でもあり大腸癌の癌幹細胞とも考えられる Lgr5 陽性細胞こそが遠隔転移巣を作り出し、逆に Lgr5 陰性細胞は転移巣を作らず、ひとたび例えば肝転移巣ができたとしても Lgr5 陽性細胞を genetic に消去すると転移巣も消失することがマウスの実験で報告されている (Nature 2017;676)。つまり、流血中に出た癌細胞すべてが生物学的に病態に関わるのではなく、特定の遺伝子発現を持つ癌細胞の有無が、例えばその後の転移形成に重要と考えられ、CTC の個数だけではなく、CTC 内の遺伝子発現状況の把握が重要であることが示唆される。そのような背景の中で、「ヒト大腸癌での遠隔転移に関わる遺伝子や遺伝子変異は何か」という問いを、CTC を用いてヒトサンプルで解明することは、「患者さんの予後規定因子の同定」という意味でも、「生物学的に転移をきたすドライバー分子の同定」という意味でも大きな意義があり、癌診療に革新をもたらすことができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、「a) ヒト大腸癌症例を対象として CTC を回収し、b) 遺伝子増幅と次世代シーケンスを使って網羅的な遺伝子解析をした上で臨床情報との相関を解析し、c) 大腸癌の遠隔転移に関わる遺伝子発現状況あるいは遺伝子変異の同定を試みる」ことが目的である。この検討によって、大腸癌の遠隔転移に関わる遺伝子あるいは遺伝子セットが同定できれば、転移抑制の分子標的として新たな研究に展開できる有用な基礎的知見が得られる。

多くの他の研究が癌原発巣や癌転移巣の遺伝子解析を行っているのに対して、本研究は血中を流れる癌細胞を捕捉してその遺伝子解析を加えることで「今まさに転移に関わる可能性のある癌細胞」を用いた研究が進められる。これは、患者さんを前にした CTC 捕捉と回収・遺伝子発現解析の経験が一体とならないとできないことであり、さらに臨床情報との相関解析を行うことで活きた情報での統合解析が可能となる。つまり、検体・基礎的手法・統合解析・臨床情報といったものが高度に組み合わせられて初めてできる研究でありそういう観点からも独自性が高いものと考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) これまでの論文研究でも使用してきた癌の特異的表面マーカーに対する抗体による CTC 捕捉原理を応用した簡便なマイクロ流体デバイス「樹脂 CTC チップ」を用いてヒト大腸癌患者の血清から CTC を捕捉する。その後の遺伝子解析を円滑にすすめるために、CTC チップに供する前に CD45 磁気ビーズを用いて白血球をあらかじめ除去する。

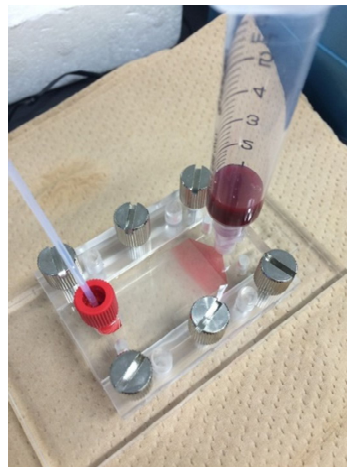
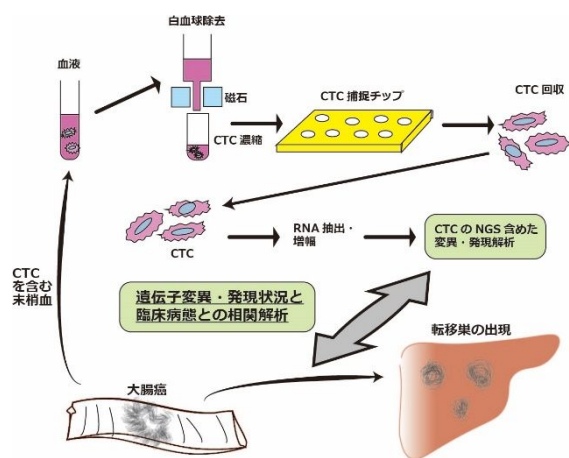
(2) 一連の操作で回収された CTC をもとに RNA シーケンスを行い、臨床病態、特に遠隔転移の出現との関連性を検討する。その結果、血行性転移に関わる可能性の高い遺伝子セット、あるいは Lgr5 のような単一遺伝子、あるいは遺伝子変異を抽出し検討する。これらの検討によって、大腸癌の遠隔転移に関わる遺伝子の発現を同定し、予後の改善に寄与出来ないかをめざす。

## 4. 研究成果

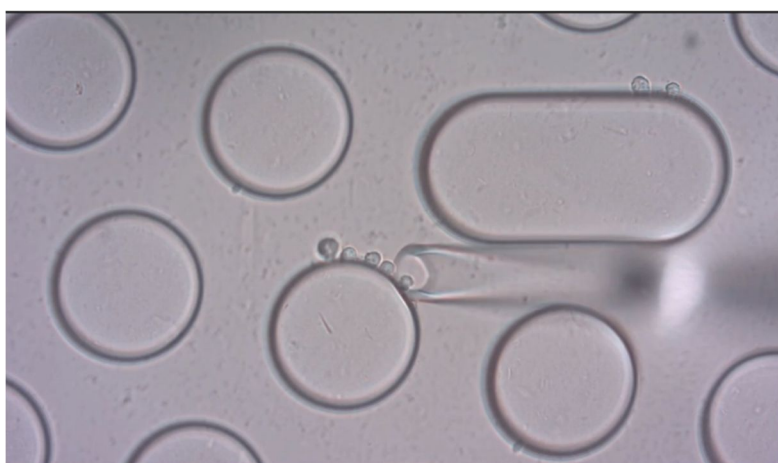
(1) CTC チップによる CTC の捕捉とそこからの細胞回収

抗 EpCAM 抗体を貼り付けた樹脂チップを用いて、血中の CTC を回収する方式を適用した。CTC に血液をアプライする前に、CD45 抗体で白血球を除去し、そのうえで CTC チップ上にアプライし

た(下図 左と右)

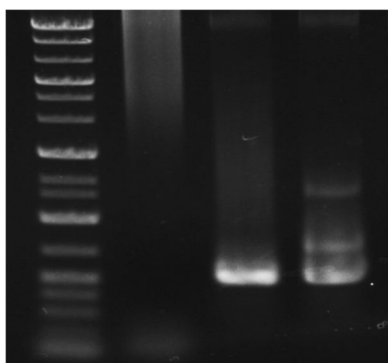


ここで、CTC チップ上で捕捉された CTC をマイクロマニピュレーターで吸引回収する形をとった(下図)。



チップに捕捉した細胞のマイクロマニピュレーターによる回収(富山県産業技術研究開発センター大永先生提供)

ここから回収した single cell をもとに DNA を回収し、kRas 変異を検出するために、その部位の周辺 500bp 程度を PCR で増幅できるか、検討した。



その結果、左図の真ん中のレーンのように、PCR で増幅できることが確認できた(左レーンは negative control、右レーンは positive ontrol)

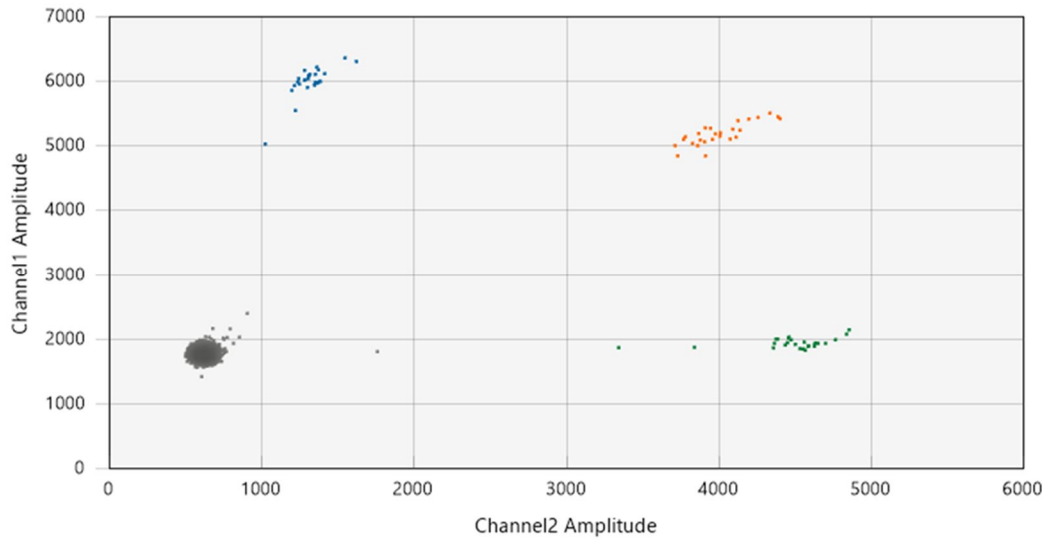
## (2) 遠隔転移を来す臨床検体を用いた検討

上記の細胞株の検討で proof of concept は得られたため、次に実際の大腸癌患者さんの血液を用いて CTC の捕捉を試みた。



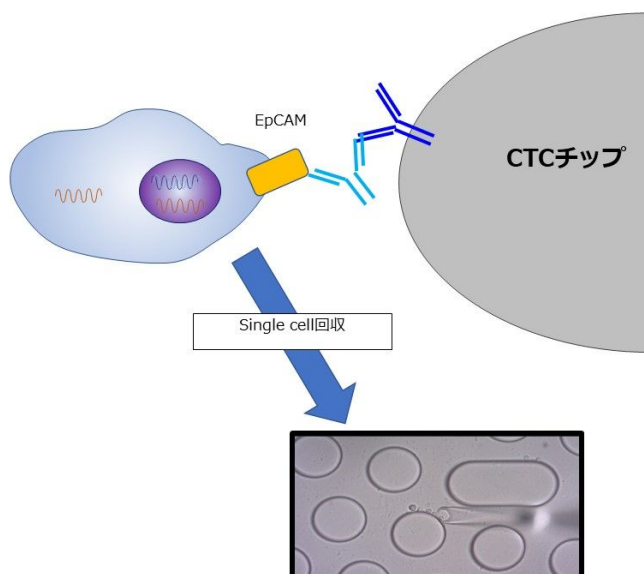
左図のような遠隔転移を呈する大腸がん患者の血液を用いて CTC を捕捉した。

補足した CTC を用いて、droplet digital PCR 法によって、Kras 変異が検出できるかどうか検討した。その結果、下図の左上の droplet のように 変異 kRas を予測通り検出することができた。



これらの結果から、下記のように本 CTC チップを用いることで、実際の臨床検体から CTC を効率的に捕捉し、かつ、そこから細胞を回収して遺伝子解析ができるという proof of concept を達成した。

これにより、さらに網羅的な遺伝子解析を加えることで、遠隔転移を来す遺伝子変異について絞り込みが出来る可能性がひらかれた。



本研究の結果は、樹脂に貼付する抗体を任意に変更することで、任意の血中の癌細胞を捕捉し、かつ、その遺伝子変異を検出することが出来ることを示すものになる。

この方法を用いることで癌だけでなく良性疾患の特異的な血中の細胞を検出することも可能になる。このように、本研究結果は悪性疾患だけでなく良性疾患の特異的な血中細胞

の単離やその遺伝子解析への応用を広げるものと考えられ、今後の発展にさらに期待がもてるものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Seimiya Takahiro, Suzuki Tatsunori, Iwata Takuma, Kishikawa Takahiro, Sekiba Kazuma, Shibata Chikako, Ishigaki Kazunaga, Fujiwara Hiroaki, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Sato Tatsuya, Nakai Yousuke, Ishibashi Rei, Moriyama Masaru, Nakagawa Ryo, Ijichi Hideaki, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Combination of serum human satellite RNA and miR-21-5p levels as a biomarker for pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106021 ~ 106021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106021	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 Inokuma Akiyuki, Takahara Naminatsu, Ishibashi Rei, Hakuta Ryunosuke, Ishigaki Kazunaga, Saito Kei, Saito Tomotaka, Hamada Tsuyoshi, Mizuno Suguru, Yagioka Hiroshi, Takahashi Sho, Kogure Hirofumi, Sasaki Takashi, Hirano Kenji, Ito Yukiko, Isayama Hiroyuki, Nakai Yousuke, Koike Kazuhiko, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Comparison of novel large bore and conventional bore covered self expandable metal stents for malignant gastric outlet obstruction: Multicenter, retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 111 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.14418	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 Suzuki Tatsunori, Kishikawa Takahiro, Sato Tatsuyuki, Takeda Norihiko, Sugiura Yuki, Seimiya Takahiro, Sekiba Kazuma, Ohno Motoko, Iwata Takuma, Ishibashi Rei, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Mutant KRAS drives metabolic reprogramming and autophagic flux in premalignant pancreatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 505 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-021-00326-4	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 Suzuki T, Kishikawa T, Sato T, Takeda N, Sugiura Y, Seimiya T, Sekiba K, Ohno M, Iwata T, Ishibashi R, Otsuka M, Koike K	4. 巻 -
2. 論文標題 Mutant KRAS drives metabolic reprogramming and autophagic flux in premalignant pancreatic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther.	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) 10.1038/s41417-021-00326-4	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0件

〔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
---------	---------