

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390335

研究課題名(和文)悪性胸膜中皮腫における末梢血液中バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Blood biomarker in malignant pleural mesothelioma

研究代表者

田中 文啓(TANAKA, Fumihiro)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：10283673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫診断のための非侵襲的なバイオマーカーの開発を行った。その結果、基礎実験においては各種抗体でコーティングしたマイクロスポットで血液中の循環腫瘍細胞(CTC)を捕捉するCTCチップの有用性が示唆された。すなわち、マイクロスポットに中皮腫細胞表面に発現するpodoplaninに対する抗体をコーティングすると、中皮腫細胞株の捕捉効率が劇的に上昇した。また臨床研究においては、既存のCellSearchによるCTCに循環内皮細胞(CEC)と血清可溶性メソテリン分画(SMRP)を組み合わせると中皮腫と非悪性胸膜疾患鑑別における高い感度(79%)と特異度(76%)が得られた。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a highly aggressive tumor associated with asbestos exposure. The present study was conducted to develop useful biomarkers in the diagnosis of MPM. Among a variety of novel biomarkers tested, the most promising biomarker was circulating tumor cell (CTC) evaluated with a novel CTC-chip system, in which tumor cells were captured with micro-spots coated by a variety of antibodies. When an antibody against podoplanin, an antigen expressing on cell surface of MPM cells, was used as coating antibody, the CTC-chip provided a very high sensitivity in detection of MPM cells. Another progress in diagnostic biomarkers achieved in the present study was high sensitivity and specificity (79% and 76%, respectively) in discrimination between MPM and non-malignant pleural diseases with a combination of multiple biomarkers (CTC evaluated with the CellSearch SYSTEM, circulating endothelial cell [CEC], and serum mesothelin-related protein).

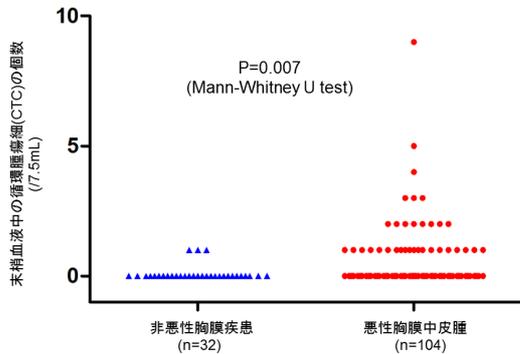
研究分野：呼吸器外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 バイオマーカー 循環腫瘍細胞 循環内皮細胞

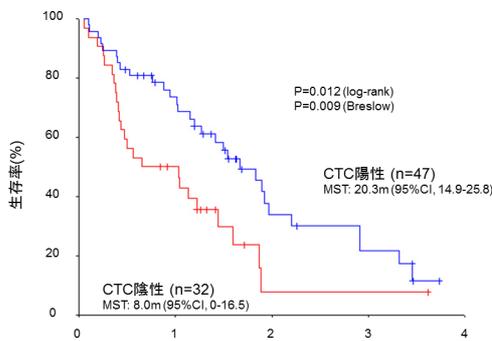
1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性胸膜中皮腫の予後は極めて不良で、我々は、1)従来指摘されてきた局所浸潤に加えて遠隔転移の頻度が高く(長谷川ら、H18-19 科研費基盤研究 B)、2)また臨床的に遠隔転移を認めない時期から末梢血液中に腫瘍細胞(CTC)が検出され有意な予後因子(田中ら、H20-22 科研費基盤研究 B および H18-22 文科省科学技術振興調整費)、3)末梢血液中の循環内皮細胞(CEC)が、中皮腫進展に重要な血管新生の指標となりかつ診断や予後因子として有用(田中ら、同研究)、等を明らかにしてきたが、CTC/CEC を実臨床で用いるには課題も多かった(米国臨床腫瘍学会/ASCO 2011 等)。

(2) 循環腫瘍細胞(CTC)は、上皮細胞に発現する EpCAM に対する抗体を結合した磁気ビーズにより腫瘍細胞を捕捉する既存の自動化システム(CellSearch)により検出した(予備実験で中皮腫の約半数で EpCAM 発現陽性(すべて上皮型)を確認)。その結果、胸膜中皮腫患者の約 30%の症例に CTC が陽性で(下図上)、非悪性胸膜疾患との鑑別診断(AUC-ROC=0.63; P=0.04)や中皮腫の予後因子(下図下)としての有用性が示唆された。



非悪性胸膜疾患と悪性胸膜中皮腫における循環腫瘍細胞(CTC)の分布

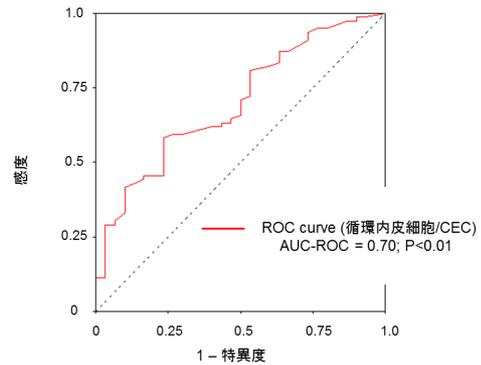


悪性胸膜中皮腫患者における循環腫瘍細胞(CTC)と予後

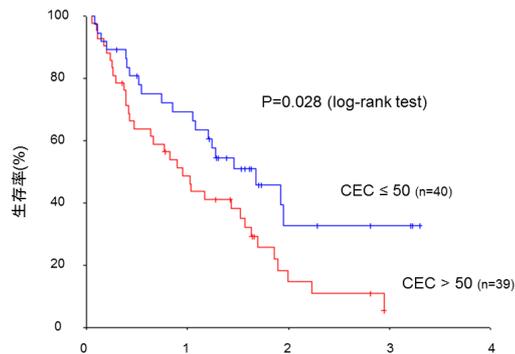
(3) しかしながら CTC 陽性率(感度)は 30%と低く、また EpCAM 発現陰性の非上皮型中皮腫では CTC を検出できなかった。一方、1)より効率的な細胞捕捉が可能な磁気ビーズ、2)

マイクロ流体チップを用いた検出システム(CTC-chip)、が新たに開発された。これらは既存の CellSearch システムより効率的な CTC 捕捉が期待される上、捕捉用の抗体を自由に選択できる汎用性があるために EpCAM を発現していない腫瘍細胞の捕捉も可能である、という利点を有する。

(4) 循環内皮細胞(CEC)も CellSearch により自動分離定量し、CEC が腫瘍の血管新生(腫瘍組織での血管密度/MVD)と有意に相関することをまず確認した。ついで、非悪性胸膜疾患と比較し胸膜中皮腫患者では有意に CEC が高値で両者の鑑別に有用(下図上)であり、また CEC が胸膜中皮腫における有意な予後因子(下図下)であることを明らかにした。



循環内皮細胞(CEC)による悪性胸膜中皮腫と非悪性胸膜疾患の鑑別(ROCカーブ解析)



悪性胸膜中皮腫患者における循環腫瘍細胞(CEC)と予後

(5) しかしながら循環内皮細胞(CEC)は、未熟な前駆細胞や幹細胞から成熟細胞に至る様々な細胞群から構成されており、その異常は心血管疾患等にも認められる非特異的な変化である。そこで胸膜中皮腫に特異的な変化を検索する必要がある。また、研究代表者らの研究室では、腫瘍免疫の基礎的検討から中皮腫患者の血清中に上昇する新たな分子(Gene-X 等)を同定した(Cancer Sci 2009 等)。これらは単独で用いた時の有用性は不十分ではあるが、CTC/CEC 等と組み合わせることにより、末梢血液による非侵襲的バイオマーカーとして実臨床での有用性が期待される。

2. 研究の目的

(1) 新しいバイオマーカーとしての末梢血液中循環腫瘍細胞 (CTC) や循環内皮細胞 (CEC) の開発と、その他の血清マーカーの組み合わせにより悪性胸膜中皮腫の診断や治療に有用な末梢血液中バイオマーカーの開発を目的とする。

(2) 特に循環腫瘍細胞 (CTC) に関しては、1) 新開発の磁気ビーズを用いた CTC 検出系の有用性、2) 新開発の国産マイクロ流体チップ ("CTC-chip") を用いた CTC 検出系の有用性、3) 中皮腫特異的抗体を結合した系による CTC 検出の可能性、を検討する。

3. 研究の方法

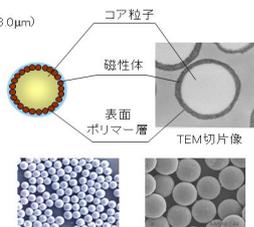
(1) 高感度な循環腫瘍細胞 (CTC) 検出系の開発：新開発磁気ビーズによる CTC 検出

Magnosphere は、JSR 社筑波研究所で開発された優れた工学的特性を有する磁気ビーズ (下図) で、抗 EpCAM 抗体を結合させた本ビーズは上皮由来癌細胞株を用いた基礎実験で高い捕捉回収率 (>70%) が確認されている。

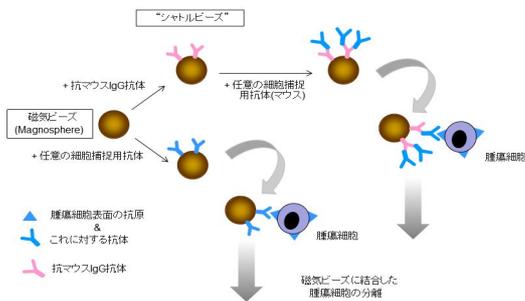
■ ポリマーコア粒子、磁性体、表面ポリマー層の三層構造

- 粒子径 - 磁気応答性 - 表面物性を独立にコントロール可能
- コア粒子により粒子径の選択が可能 (1.5µm, 3.0µm)
- 磁性体層の厚みで磁気応答性を調節可能 (超常磁性体使用)
- 表面ポリマー層の選択で親水性 - 疎水性のバランスをコントロール

■ 表面の官能基種 (COOH, Tosyl) と密度がコントロール可能



Magnosphere は、腫瘍細胞を捕捉する抗体 (例: 抗 EpCAM 抗体) を直接工学的に結合することも、抗マウス IgG 抗体を結合することによりユーザーが任意の捕捉抗体を自由に選択することができる "シャトルビーズ" として細胞捕捉に用いることもできる (下図)



抗 EpCAM 抗体を直接結合した磁気ビーズ (Magnosphere) を用い、EpCAM 発現陽性が確認されている中皮腫細胞株による捕捉効率を検討する。特に、ビーズに Mesothelin や Podoplanin 等、中皮腫細胞表面に特徴的に発

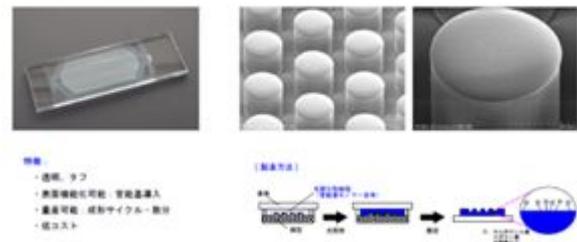
現している抗原に対する抗体を結合し中皮腫細胞株の捕捉効率を検討し、既存の CellSearch システムとの比較も行う。

(2) 高感度な循環腫瘍細胞 (CTC) 検出系の開発: "CTC-chip" による CTC 検出

"CTC-chip" は、米国で開発された高感度 CTC 検出システム (Nature 2007 & NEJM 2008) であるが、チップの信頼性や耐久性の問題などから未だ臨床応用されていない。研究分担者の大永ら富山県工業技術センターグループは、先行する米国のチップの欠点を克服した国産の "CTC-chip" を開発した (H22-24 科研費基盤 (C)、5 件の特許取得済)。

● 研究成果: 開発品、チップシステム

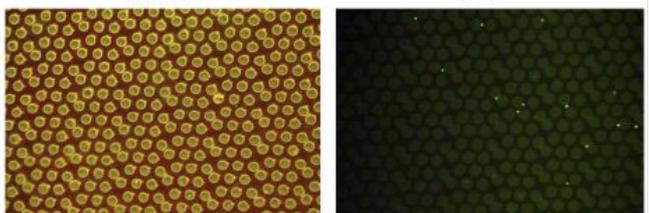
【開発した超常磁性マイクロチップ】



新開発 "CTC-chip" による中皮腫細胞の CTC 検出を検討する。まず抗 EpCAM 抗体結合のチップ (作成済) を用いて、EpCAM 陽性細胞株の捕捉、患者胸水中腫瘍細胞捕捉、末梢血液中 CTC の検出、を検討する。更に、新たに抗 Mesothelin 抗体等中皮腫特異的抗体結合チップを作成し、同様に細胞株を用いた検討から開始する。尚、このチップに抗 EpCAM 抗体を結合させると食道癌細胞株の高効率な捕捉が可能であることは既に確認 (下図 [蛍光標識された腫瘍細胞がチップに捕捉されている]、ISMRC2011 等) しており、抗体を変更することにより様々な細胞捕捉に応用可能である。

【明視野像】

【蛍光像】



(3) 新規バイオマーカーの臨床的有用性の検討:

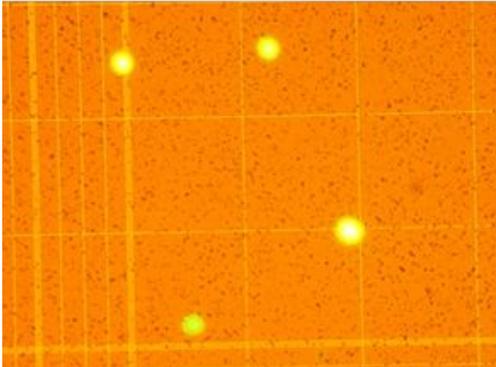
上記の新開発の CTC 検出システムによる CTC の悪性胸膜中皮腫にける診断や予後予測因子としての有用性の検討を行う。更に、CTC と CEC や他の血清マーカー (SMRP 等) との組み合わせ位にり、より臨床的有用性の向上が図れるかを検討する。

4. 研究成果

(1) 新規 CTC 検出系の開発：磁気ビーズ

新しい磁気ビーズを用いた循環腫瘍細胞(CTC)検出系の構築を肺癌細胞株を用いて行った。抗 EpCAM 抗体を結合した磁気ビーズで肺癌細胞株の捕捉を試みたところ、PBS に懸濁した細胞株からの腫瘍細胞捕捉率は 80% 以上と比較的良好であった。

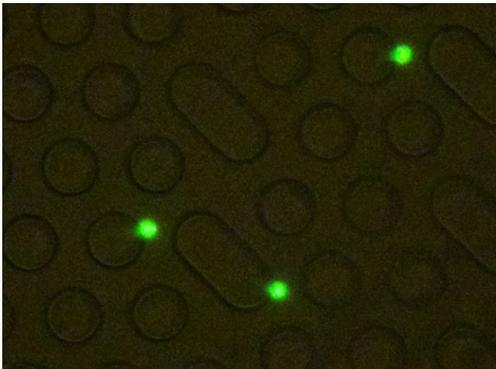
この結果に基づいて、新開発の磁気ビーズに中皮腫細胞表面に発現する Podoplanin に対する抗体を結合させて、中皮腫細胞株の捕捉を試みたところ捕捉可能であることが確認された(下図)。



しかしながら細胞株を血液に浮遊させた場合には腫瘍細胞株の捕捉率は 20%未滿と不良であった。更に、数例の中皮腫患者より得た血液を用いて CTC 捕捉・検出実験を行ったところ、CTC の捕捉は困難であった。これは捕捉効率が十分ではないことと、ビーズの存在のために腫瘍細胞の形態的確認が困難であること等が原因と推測された。

(2) 新規 CTC 検出系の開発：CTC-chip

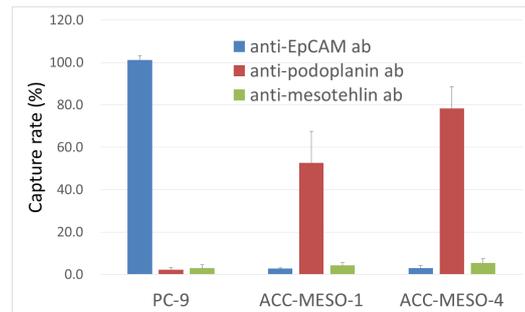
新開発の CTC-chip に抗 EpCAM 抗体を結合させて各種肺癌細胞株の捕捉実験を行ったところ、EpCAM 高発現の PC-9 では高効率(95%以上)の細胞捕捉が可能であった(下図)。



一方で EpCAM 発現の低い肺癌細胞株 A549 では EpCAM 抗体結合 CTC-chip では捕捉効率が低下(50%以下)し、EpCAM 発現が無~低い中皮腫細胞株(ACC-MESO-1/-4)では殆ど chip に捕捉されなかった。

そこで CTC-chip に中皮腫細胞表面に発

現する Podoplanin や Mesothelin に対する抗体を結合させて捕捉実験を行ったところ、特に抗 Podoplanin 抗体により中皮腫細胞の捕捉効率が 10 倍以上に向上した(捕捉率 50-80%、下図)。つまり新開発の CTC-chip は任意の抗体を結合させて多くの腫瘍細胞株を捕捉可能な、つまり EpCAM に依存しない CTC 検出系であることが明らかとなった。



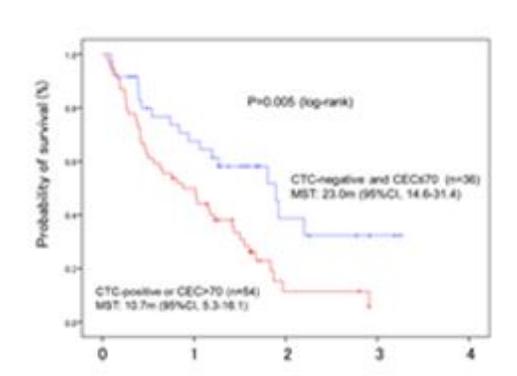
(3) CTC を含む各種バイオマーカーと組み合わせによる有用性の検討

従来のシステム(CellSearch)による CTC/CEC および血清中可溶性メソテリン(SMRP)による胸膜中皮腫の診断能は以下の通りで、現在保険適応されている SMRP は特異度は高いものの感度は十分ではなかった。

	CTC	CEC	SMRP
AUC-ROC	0.619	0.725	0.703
P-value	0.039	<0.001	0.009
Cut-off	1cell/7.5mL	70cells/4.0mL	2nmol/L
Sensitivity	28%	44%	33%
Specificity	95%	91%	91%

そこでこれら3つのバイオマーカーを組み合わせるとその診断能を検討(CTC、CEC、SMRPのいずれかが陽性)すると診断能の改善が認められた(感度 79%; 特異度 76%)

また、CTC と CEC を組み合わせると有意な予後因子となった(CTCまたはCEC陽性群は有意に予後不良、下図)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Iwanami T, Uramoto H, Nakagawa M, Shimokawa H, Yamada S, Kohno K, Tanaka F. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition-associated markers in malignant pleural mesothelioma. *Oncology*, 査読有、86巻、2014、109-116

Hashimoto M, Tanaka F, Yoneda K, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, Kondo N, Tsubota N, Tsujimura T, Tabata C, Nakano T, Hasegawa S. Significant increase in circulating tumour cells in pulmonary venous blood during surgical manipulation in patients with primary lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 査読有、16巻、2014、775-783

Yoneda K, Tanaka F, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, Tsubota N, Sato A, Tsujimura T, Kuribayashi K, Fukuoka K, Tabata C, Nakano T, Hasegawa S. Circulating tumor cells (CTCs) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Ann Surg Oncol*, 査読有、21巻、2014、S472-480

Shimokawa M, Hasegawa S, Fukuoka K, Okada M, Yokoi K, Tanaka F, Yamanaka T, Daimon T, Nakano T. A feasibility study of induction pemetrexed plus cisplatin followed by pleurectomy/decortication aimed at macroscopic complete resection for malignant pleural mesothelioma. *Jpn J Clin Oncol*, 査読有、43巻、2013、575-578

Hashimoto M, Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Takuwa T, Matsumoto S, Kuroda A, Noda M, Tomita N, Hasegawa S. Circulating tumor cells as a potential biomarker in selecting patients for pulmonary metastasectomy from colorectal cancer: report of a case. *Case Rep Oncol*, 5巻、査読有、2012、542-545

Yoneda K, Tanaka F, Kondo N, Orui H, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, Tsubota N, Sato A, Tsujimura T, Kuribayashi K, Fukuoka, Nakano T, Hasegawa S. Tumor cells in the pulmonary vein, Ann Circulating endothelial cell (CEC) as a diagnostic and prognostic marker in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Ann Surg Oncol*, 査読有、19巻、2012、4229-4237

Naito T, Tanaka F 15名中2番目, Yoneda K 15名中4番目, Hasegawa S 15名中14番目, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 査読有、7巻、2012、512-519

Hanagiri T, Shinohara S, Takenaka M, Shigematsu Y, Yasuda M, Shimokawa H, Nagata Y, Nakagawa M, Uramoto H, So T, Tanaka F. Effects of hyaluronic acid and CD44 interaction on the proliferation and invasiveness of malignant pleural mesothelioma. *Tumor Biol*, 査読有、33巻、2012、2135-2141

Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Morinaga T, Fukuoka K, Yamada S, Murakami A, Kondo N, Matsumoto S, Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S, Hashimoto-Tamaoki T, Nakano T. Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci*, 査読有、103巻、2012、868-874

[学会発表](計4件)

Yoneda K, Tanaka F, So T, Ohnaga T, et al. Capture of EpCAM-negative circulating tumor cells (CTCs) with a "Universal CTC-chip". Blood tests in malignant pleural mesothelioma (MPM). Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (AACR), 2015年4月19日、フィラデルフィア市(米国)

Yoneda K, Tanaka F, Hasegawa S, et al. Blood tests in malignant pleural mesothelioma (MPM). Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2014年5月31日、シカゴ市(米国)

Chikaishi Y, So T, Yoneda K, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F, et al. Comparison of CellSearch with polymeric microfluidic devices for CTC isolation using EpCAM-negative tumor cell lines of malignant pleural mesothelioma. Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (AACR), 2014年4月8日、サンディエゴ市(米国)

Chikaishi Y, So T, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F, et al. Development of detecting systems for circulating tumor cells in malignant pleural mesothelioma patients. Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (AACR), 2013年4月10日、ワシントンDC市(米国)

〔図書〕(計2件)

長谷川誠紀、医薬ジャーナル社、胸膜全書、2013、334-341

田中文啓、医薬ジャーナル社、胸膜全書、2013、342-351

〔その他〕

ホームページ情報：下記に掲載

http://www.uoeh-hospital.jp/hospital/introduction/sec_fac/006.html

または

http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/2geka/intro_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 文啓 (TANAKA Fumihiro)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：10283673

(2) 研究分担者

浦本 秀隆 (URAMOTO Hidetaka)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90389445

宗 知子 (SO Tomoko)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：00331529

米田 和恵 (YONEDA Kazue)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：80724806

長谷川 誠紀 (HASEGAWA Seiki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10252438

大永 崇 (ONAGA Takashi)

富山工業技術センター中央研究所・主幹研究員

研究者番号：10416133