

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(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592108

研究課題名(和文) マイクロ流体チップシステムによる肺癌での循環腫瘍細胞の高感度検出法の開発

研究課題名(英文) Development of high sensitivity detection method of CTCs in lung cancer using microfluidic chip system

研究代表者

岡 壮一(OKA, Soichi)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：20596655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の治療成績は不良であり、その最大の原因は高頻度にかかる遠隔転移である。循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell：CTC)は、微小転移の潜在的マーカーとして有用であるが、現在臨床使用のための唯一の機器であるCellSearchは感度が不十分である。そこで、我々は新たに国産のマイクロ流体チップシステムを開発し、CTC検出感度の向上を目指し、基本的性能を確認した。新開発CTCチップは、これまで標的としてきたEpCAMだけでなく、他の細胞表面抗原に対しても良好な捕捉能を示した。分離した細胞の遺伝子解析も可能であった。

研究成果の概要(英文)：Prognosis of primary lung cancer patients is not satisfactory, which is mostly caused by frequent development of distant metastasis. Although Circulating Tumor Cell (CTC) is useful for a surrogate marker of distant micro-metastasis, the CellSearch which is the only machine for CTC detection for clinical use, is insufficient sensitivity. Therefore, we developed a new microfluidic chip system of domestic, to improve sensitivity, and evaluated its basic performance. Newly developed CTC-chip not only EpCAM that have been targeted up to now showed good capture ability for other cell surface antigens. In addition, it was possible genetic analysis of the captured cells.

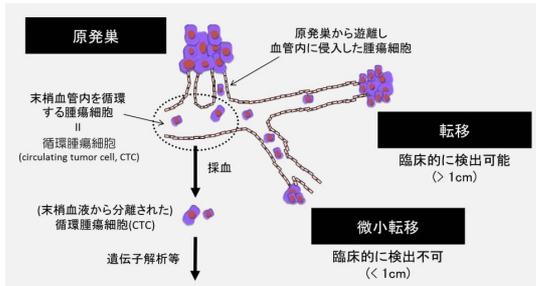
研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 バイオマーカー 循環腫瘍細胞

1. 研究開始当初の背景

肺癌の治療成績が不良である要因として早期発見や微小転移検出の困難さが挙げられる。

循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell : CTC)は、腫瘍の原発巣から遊離し血液中を循環する腫瘍細胞であり、臨床的に転移が認められる以前から血液中に存在することが知られており、早期癌や微小転移の診断マーカーとして期待される。(下図)



“CellSearch”は米国で唯一臨床使用が認可(転移性乳癌・前立腺癌・大腸癌において)されているCTC検出システムで、上皮細胞接着因子(Epithelial Cell Adhesion Molecule: EpCAM)に対する抗体を結合した磁気ビーズを用い、上皮由来の腫瘍細胞を血液から分離する。

原発性肺癌におけるCTCの臨床的意義については従来ほとんど報告がなかったが、我々はこれまで、“CellSearch”により検出されたCTCについて以下の事項を明らかにした。

- ・原発性肺癌の約30%でCTC陽性(末梢血7.5mLあたり1個以上のCTCが検出)であり、転移がある症例では無い例に比べてCTCが高く、遠隔転移の予測に有用である(Clin Cancer Res. 2009)。
- ・小細胞癌において末梢血液7.5mLあたり2個以上のCTCが検出された割合は約67%と高く、CTC高値(8個以上)で有意に予後不良であった(J Thorac Oncol. 2012)。

しかしながら、原発性肺癌の80%以上を占める非小細胞肺癌については、“CellSearch”によるCTC検出感度は十分ではなく(臨床的に遠隔転移が明らかな症例でもCTC陽性率50%)、より高感度なCTC検出システムの開発が求められる。

“CTC-chip”は、米国で開発されたCTC捕捉・検出のためのマイクロ流体チップシステムである(Nature 2007)。これはCellSearchと同様にEpCAMを標的とした分離法であるが、EpCAMに対する抗体をコーティングした

無数のマイクロポストの間に血液を流すことにより効率よく腫瘍細胞を捕捉できるとされる。しかし、Chipの信頼性や耐久性などの問題から未だ臨床応用されていない。

これらの問題に対し、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“CTC-chip”の欠点を克服する国産の新開発“CTC-chip”を開発(Biomed Microdevices 2013等)、消化器癌細胞株を用いたCTC捕捉実験等で良好な成績を確認し、肺癌での臨床的有用性が期待される。

更に、我々の肺癌における知見では、上皮由来の癌細胞でも“上皮-間葉系移行(EMT)”により上皮の性格を消失して間葉系細胞様へ変化することが確認されている(Uramoto H 他、Anticancer Res 2010、Lung Cancer 2011、Br J Cancer 2011等)。このような癌細胞は上皮細胞マーカーであるEpCAM発現の消失によって、従来のCTC検出システムでは捕捉できない可能性があるが、新開発“CTC-chip”は、チップに自由に抗体を結合できる汎用化チップであり、抗EpCAM抗体以外の抗体をチップにコーティングすることにより、“EMT”を起こした癌細胞の捕捉も可能である。

2. 研究の目的

肺癌における新開発“CTC-chip”の有用性と更なる改良を目指し、以下を明らかにする。

(1) 新開発“CTC-chip”による循環血液中の肺癌細胞検出感度の検討と改良

肺癌細胞株を用いた捕捉実験や肺癌患者より採取した血液を用い、検出感度を明らかにする。

“chip”の改良による、捕捉検出感度の向上が可能か否か、を明らかにする。

(2) 抗EpCAM抗体以外の抗体を“chip”に結合し、従来システムで捕捉できなかったCTC捕捉の可能性を明らかにする。

(3) “CTC-chip”で捕捉した腫瘍細胞の分子生物学的解析の可能性を検討

捕捉されたCTCから遺伝子を抽出し、遺伝子変異や発現異常解析が可能か否か、またその信頼性を明らかにする。

3. 研究の方法

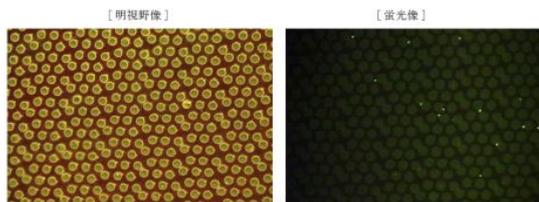
(1) 新開発 “CTC-chip” の基本的性能を確認

抗 EpCAM 抗体結合のチップを用いて以下の項目について検討

EpCAM 陽性細胞株の捕捉
肺癌患者の胸水中腫瘍細胞捕捉
末梢血液中 CTC の検出

(2) 抗 EpCAM 抗体以外の抗体を用いた腫瘍細胞捕捉 (“CTC-chip の汎用化”) の可能性の検討

EMT を起こした CTC の検出の検討の前段階として、中皮腫の細胞株の CTC-chip での捕捉を検討する。新たに抗 Podoplanin 抗体、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。



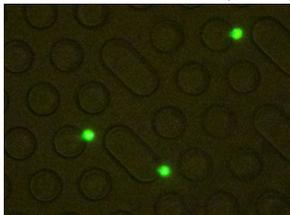
(3) “CTC-chip” により捕捉された腫瘍細胞の遺伝子変異解析。

EGFR 変異(exon19 における 15 塩基欠失)がある PC-9 を抗 EpCAM 抗体コーティング CTC-chip で捕捉後、細胞を Proteinase K で溶解して回収した細胞から DNA を抽出し、EGFR 変異を検出できるかを検証する。

4. 研究成果

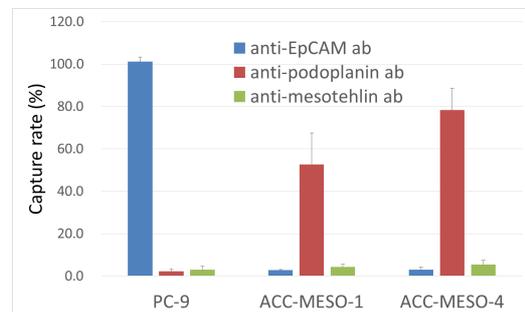
(1) ”CTC-chip” による循環血液中の肺癌細胞検出感度の検討と改良

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 では高い効率(95%以上)の細胞捕捉が可能であった(下図)。



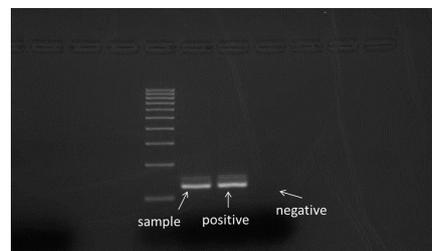
一方で EpCAM 発現の低い肺癌細胞株 A549 では EpCAM 抗体結合 CTC-chip では捕捉効率が低下(50%以下)し、EpCAM 発現が無～低い中皮腫細胞株 (ACC-MESO-1/-4)では殆ど chip に捕捉されなかった。

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。



(2) “CTC-chip” により捕捉された腫瘍細胞の遺伝子変異解析

CTC-chip に捕捉された PC-9 を Proteinase K で溶解後に回収、DNA を抽出して遺伝子変異解析を行ったところ、同様の変異を認めた。CTC-chip に捕捉後の細胞も遺伝子解析が可能であった。



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6件)

1. Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Tanaka F. Epidermal growth factor receptor-GEP100-Arf6 axis affects the prognosis of lung adenocarcinoma. *Oncology*, 査読有、86 巻、2014、263-270
2. 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
3. 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
4. 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
5. Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Iwanami T, Tanaka F. The expression of CD146 predicts a poor overall survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Reserch*, 査読有、32 巻、2012、861-864
6. Oka S, Uramoto H, Chikaishi Y, Tanaka F. The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Reserch*, 査読有、31 巻、2011、4277-4282

[学会発表](計4件)

1. 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)

2. 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)
3. 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)
4. 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)

[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

岡 壮一 (OKA, Soichi)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：20596655

(2)研究分担者

田中 文啓 (TANAKA, Fumihiro)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283673

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

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