

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462191

研究課題名(和文) 肺癌における循環腫瘍細胞の高感度検出法の確立

研究課題名(英文) Development of a sensitive system for capturing circulating tumor cells in lung cancer.

研究代表者

宗 知子(S0, Tomoko)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：00341529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌における循環腫瘍細胞(CTC)は、標準法とされるCellSearchを用いても十分な検出感度が得られていない。本研究ではこれまで様々な方法による検討を行ったが、CTC-Chipについて詳細な検討を行った。CTC-Chipはポリマー製マイクロ流体システムで、これに任意の捕捉抗体を結合させ標的細胞の捕捉率の検討を行った。細胞株を用いたCellsearchとの比較ではEpCAM陽性のPC-9ではCellsearchと同等の検出率が得られたが、EpCAM陰性のAC-MESO-4はCellsearchでほとんど検出されず、CTC-Chipでは全血に添加した条件において約8割の捕捉率が得られた。

研究成果の概要(英文)：The “CellSearch” is widely used to detect circulating tumor cells (CTCs), but provided only modest sensitivity in capturing CTCs in lung cancer patients. In the current study, we employed a variety of CTC-detection systems including a novel microfluidic device (“CTC-chip”) in which any antibody to capture CTCs is easily conjugated. In experimental studies using tumor cell lines, the “CTC-chip” provided a similar efficiency to the “CellSearch” in capturing PC-9 cells with EpCAM expression. When MESO-4 cells without EpCAM expression were spiked in the blood, approximately 80% of tumor cells were captured with the “CTC-chip”, whereas few tumor cells were captured with the “CellSearch”.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 循環腫瘍細胞

## 1. 研究開始当初の背景

・肺癌は予後不良の疾患であり、その高い死亡率は主に遠隔転移によるものと考えられている。診断時に約 40%の患者で遠隔転移を認めている。多くの肺癌患者では遠隔転移の有無にかかわらず、腫瘍細胞が血液中に循環している可能性があり、それらの CTC を同定、検出することは再発リスクの予測、術後補助化学療法の対象の絞り込み、全身化学療法の効果のモニタリング等に寄与すると考えられる(C.A.Panabières, et al. Clin Cancer Res, 2008)。

・CTC の検出法として、半自動化システムである CellSearch system が多く用いられている(W.J.Allard, et al. Clin Cancer Res, 2004)。乳癌、大腸癌、前立腺癌では既に臨床応用されている。上皮性のマーカーである EpCAM に対する抗体でラベルしたコロイド様磁性粒子を用いて CTC を分離、抗サイトケラチン抗体、抗 CD45 抗体で標識し、抗サイトケラチン陽性、抗 CD45 抗体陰性の細胞を CTC として判定し、定量化する。

・しかし、EpCAM やサイトケラチンが陰性であれば CTC として検出は不可能であり、検出された CTC が微小転移をすべて反映しているとは断定できない。

・同じく磁性粒子で JSR 社の開発した Magnosphere™ MC 粒子は細胞分離用に特化した表面物性を持っている。一次抗体として抗 EpCAM 抗体を固定化した粒子を用いて CTC を検出することが可能である。

・上皮系由来の癌であっても“上皮-間葉系移行(EMT)”により上皮系の性格を消失し、間葉系細胞様に変化することが知られており(H.Uramoto, et al. Anticancer Res, 2010)、EpCAM の発現が消失した細胞は従来の CTC 検出法では捉えられない。Magnosphere™ MC 粒子は EpCAM 以外の調べたい抗体を粒子表面に固定化できるため、EMT を来した EpCAM 陰性の腫瘍細胞も同定することが可能となる。

また、CTC-Chip はポリマー製のマイクロ流路装置で、流路に任意の捕捉抗体(例えば抗 EpCAM 抗体)をコーティングし血液を流すと、血液中の標的細胞(EpCAM 陽性細胞)が捕捉されるという仕組みである。(Ohnaga T, et al. )同様のシステムで高い捕捉効率が示されている(Nature 2007)。

## 2. 研究の目的

循環腫瘍細胞(circulating tumor cells; 以下 CTC)は原発巣や転移巣から遊離し、血中に浮遊するがん細胞を指す。われわれは肺癌患者において CellSearch system を用いて CTC を検出し、遠隔転移の surrogate marker となることを確認したが、その感度と精度は十分ではなかった(F.Tanaka et al. Clin

Cancer Res 2009, Y.Okumura et al. Ann Thorac Surg 2009)。その理由の 1 つに CellSearch system では EpCAM 陽性の CTC しか検出できず、上皮間葉系移行(EMT)を来した細胞は検出されないことがあげられる。

今回われわれは、磁気ビーズ(Magnosphere™ MC 粒子、JSR)と抗 EpCAM 抗体を始めとする二次抗体を組み合わせて CTC を検出し、高感度の検査法の確立を目指す。本法の最大の長所として mouse IgG のサブタイプの抗体であればいずれの抗体も磁気ビーズと結合可能であるため、種々の表面マーカーでの細胞の検出が可能であるという汎用性があげられる。その精度について CellSearch system や現在施行可能な他の検出法と比較検討が可能であり、本法を用いた肺癌患者における CTC の標準的な検査法の構築を目的とする。

## 3. 研究の方法

肺癌における磁気ビーズ(Magnosphere™ MC 粒子)を用いた循環腫瘍細胞(CTC)の標準的検査法の確立と、臨床応用を目的に以下の研究を行う。

1) CTC の検出感度の検討、CellSearch system、RosetteSep、CTC chip との比較

肺癌細胞株(EpCAM 陽性:PC-9 他)を CFSE で蛍光標識し、各方法での捕捉効率を確認する。

2) Magnosphere™ MC 粒子で分離した腫瘍細胞の分子生物学的解析

3) 抗 EpCAM 抗体以外の抗体を固定化した Magnosphere™ MC 粒子による腫瘍細胞の分離

・抗 EpCAM 抗体を固定化した Magnosphere™ MC 粒子は JSR より供与されている。Magnosphere™ MC 粒子による CTC の捕捉実験は研究代表者ら産業医科大学が担当する。抗 EpCAM 抗体以外の抗体を固定化した粒子の作成は研究協力者である JSR 株式会社筑波研究所 片寄 聡氏が担当する。

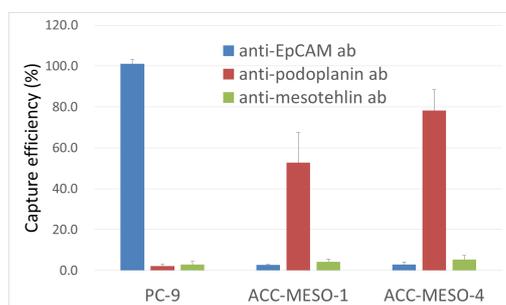
## 4. 研究成果

磁気ビーズ(Magnosphere™ MC)と抗 EpCAM 抗体を用いた細胞捕捉感度の検討において、健康人血液に添加した EpCAM 陽性ヒト肺癌細胞株(PC-9)の捕捉効率を求めたところ 48-81%であった。また、Magnosphere™ MC 粒子は粒子径が大きく、磁性粒子が凝集した状態では捕捉した細胞の観察が困難であった。

一方、抗 EpCAM 抗体をコーティングした

CTC-Chip の検討において、リン酸緩衝液 (PBS) と血液にそれぞれ PC-9 を添加した場合の捕捉率 (捕捉細胞数/流入細胞数) は、101.1% (PBS) 88.0% (血液) と高い捕捉効率が得られた。肺癌細胞株で PC-9 より EpCAM 発現が低い A549 において捕捉率は 16.5% (PBS) であり、表面抗原の発現に応じた捕捉効率が得られた。

また、EpCAM 以外の抗原として中皮腫細胞に対する mesothelin, podoplanin を標的にした検討も行った。中皮腫細胞株 ACC-MESO-1, ACC-MESO-4 を用いた捕捉率の検討では抗 mesothelin 抗体を用いた場合 (4.3%、5.4% : PBS) 抗 podoplanin 抗体では (52.7%、78.3% : PBS) (12.7%、38.4% : 血液) であった。



Cellsearch による細胞捕捉実験では、EpCAM 陽性の PC-9 ではほぼ 100% の捕捉効率が得られた。

更に捕捉された細胞の性質を複数のマーカーの免疫蛍光染色にて行った。血液より分離・捕捉した腫瘍細胞は CTC-Chip 上で cytokeratin + Alexa Fluor 594, CD45 + Alexa Fluor 488, Hoechst の多重染色により白血球でない核を持つ上皮性細胞であることの確認を行った。同様の方法で臨床検体についても CellSearch と同時に測定を行い、測定数を比較した。今後臨床背景との関連について解析を進めたい。

## 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 11 件)

- Shimabukuro I1, Yatera K, Noguchi S, Kawanami Y, Iwanami T, Nishida C, Yamasaki K, Kawanami T, Ishimoto H, So T, Uramoto H, Yoshii C, Tanaka F, Mukae H. Primary Pulmonary Angiosarcoma Presenting with Hemoptysis and Ground-Glass Opacity: A Case Report and Literature Review. *Tohoku J Exp Med*.2015;237(4):273-8 査読有
- 平良 彰浩, 永田 好香, 山田 壮亮, 宗 知子, 浦本 秀隆, 田中 文啓. 乳腺腫瘍との鑑別を要した神経鞘腫の 1 例. *臨床外科* 2015;70(10):1274-1278 査読有
- Hanagiri T, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Shimokawa H, Nakagawa M, Uramoto H, So T, Tanaka F. Primary Adenoid Cystic Carcinoma of the Peripheral Lungs. *J UOEH*. 2015 Jun 1;37(2):121-5. 査読有
- 岩田 輝男, 竹中 賢, 岡 壮一, 宗 知子, 浦本 秀隆, 田中 文啓. 右上葉肺癌と炎症性中葉支狭窄への上中葉管状切除術の一例. *日本呼吸器外科学会雑誌* 2015;29(4): 491-494 査読有
- 下川 秀彦, 宗 知子, 浦本 秀隆, 田中 文啓. 膠原病合併肺癌手術に関する検討. *日本呼吸器外科学会雑誌* 2015;29(1): 2-5 査読有
- Chikaishi Y, Uramoto H, Oka S, Nagata S, Shimokawa H, So T, Yamada S, Hanagiri T, Mukae H, Tanaka F. Discrepancy between the Clinical Image and Pathological Findings of Non-Small Cell Lung Cancer Harboring an Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutation That Was Surgically Resected after Gefitinib Treatment. *Case Rep Oncol*. 2014 Feb 20;7(1):126-31. 査読有
- Shinohara S, Hanagiri T, Takenaka M, Chikaishi Y, Oka S, Shimokawa H, Nakagawa M, Uramoto H, So T, Aoki T, Tanaka F. Evaluation of undiagnosed solitary lung nodules according to the probability of malignancy in the American College of Chest Physicians (ACCP) evidence-based clinical practice guidelines. *Radiol Oncol* 2014 Jan 22;48(1):50-5. 査読有
- Hanagiri T, Shigematsu Y, Shinohara S, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Nagata Y, Iwata T, Uramoto H, So T, Tanaka F. Clinical significance of the frequency of regulatory T cells in regional lymph node lymphocytes as a prognostic factor for non-small-cell lung cancer. *Indian J Surg*. 2014 Oct;76(5):354-8. 査読有
- 文達 陽順, 野口 真吾, 矢寺 和博, 篠原 周一, 岡 壮一, 山崎 啓, 西田 千夏, 川波 敏則, 川波 由紀子, 石本 裕士, 宗 知子, 吉松 隆, 浦本 秀隆, 田中 文啓, 迎 寛. 心筋転移を認め、癌性心膜炎による症状の管理が困難であった肺腺癌の 1 例. *産業医科大学雑誌* 2014;36(3): 199-203 査読有

10. 下川 秀彦, 松本 崇秀, 浦本 秀隆, 宗知子, 花桐 武志, 田中 文啓. 右肺上葉切除後、左残存肺に完全無気肺を呈した異時性多発肺癌に対し残存肺全摘(completion pneumonectomy)を施行した 1 例. 日本呼吸器外科学会雑誌 2014;28(4): 466-470 査読有
  11. 門司 祥子, 岩田 輝男, 宗 知子, 浦本 秀隆, 花桐 武志, 田中 文啓. 肋骨原発軟骨肉腫の 1 切除例 適切な切除縁の設定に関する検討. 日本呼吸器外科学会雑誌 2013;27(7):817-821 査読有
- [学会発表](計 5 件)
1. 宗 知子. 高齢者肺癌の外科治療戦略パート 2 安全性と有効性を評価するために必要なこと. 第 32 回日本呼吸器外科学会. サポートホール高松、かがわ国際会議場、JR ホテルクレメント高松 (香川県・高松市) 2015.5.14-15
  2. 宗 知子, 岩浪 崇嗣, 篠原 周一, 水口 ゆう子, 金山 雅俊, 平良 彰浩, 竹中 賢, 近石 泰弘, 岡 壮一, 平井 文子, 永田 好香, 下川 秀彦, 浦本 秀隆, 田中 文啓. 胸壁浸潤肺癌の 1 切除例. 第 31 回日本呼吸器外科学会総会. ホテル日航東京 (東京都・港区) 2014.5.29-30
  3. 宗 知子, 門司 祥子, 岡 壮一, 水口 ゆう子, 篠原 周一, 金山 雅俊, 平良 彰浩, 竹中 賢, 近石 泰弘, 平井 文子, 岩浪 崇嗣, 永田 好香, 下川 秀彦, 浦本 秀隆, 田中 文啓. 気胸手術時に発見され, 二期的に切除した肺癌の 1 例. 第 31 回日本呼吸器外科学会総会. ホテル日航東京 (東京都・港区) 2014.5.29-30
  4. 宗 知子, 竹中 賢, 名部 裕介, 平良 彰浩, 松本 崇秀, 門司 祥子, 岡 壮一, 近石 泰弘, 永田 好香, 中川 誠, 下川 秀彦, 浦本 秀隆, 花桐 武志, 田中 文啓. 人工透析患者に対する肺癌手術について. 第 30 回 日本呼吸器外科学会総会. 名古屋国際会議場. (愛知県・名古屋市) 2013.5.9-10
  5. 宗 知子, 竹中 賢, 名部 裕介, 平良 彰浩, 松本 崇秀, 門司 祥子, 岡 壮一, 近石 泰弘, 永田 好香, 中川 誠, 下川 秀彦, 浦本 秀隆, 花桐 武志, 田中 文啓. 冠動脈疾患症例に対する肺癌治療の周術期管理. 第 30 回日本呼吸器外科学会総会. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市) 2013.5.9-10

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宗 知子 (SO Tomoko)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00341529

### (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

近石 泰弘 (CHIKAISHI Yasuhiro)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 25861251

米田 和恵 (YONEDA Kazue)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80724806

### (3) 研究協力者

片寄 聡 (KATAYORI Satoshi)  
JSR ライフサイエンス株式会社  
研究開発部