

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861251

研究課題名(和文) EMTを起こした肺癌循環腫瘍細胞のマイクロ流体チップシステムを用いた検出法の開発

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

研究代表者

近石 泰弘 (CHIKAISHI, Yasuhiro)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：70609221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：循環腫瘍細胞(CTC)の分離・検出に用いられるCellSearchは上皮マーカーのEpCAMを標的として細胞を捕捉するため、上皮間葉移行(EMT)を起こした腫瘍細胞を検出することは難しい。そこで我々は任意の細胞表面抗原を標的としてCTCを分離検出することが可能な新規マイクロ流体チップシステムについて基礎的性能の評価を行った。

EpCAM陽性細胞のPC-9はEpCAM-chipを用いてCellSearchとほぼ同等の捕捉率が得られたが、EpCAM陰性細胞のMESO-4はCellSearchでは検出できず、Podoplanin-chipで55-70%の捕捉率が得られた。

研究成果の概要(英文)：The “CellSearch” system is widely used to detect circulating tumor cells (CTCs), but tumor cells undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT) may not be captured with the “CellSearch” because an antibody against EpCAM, an antigen expressing on epithelial cells, is used to capture CTCs. Accordingly, we employed a novel microfluidic device (“CTC-chip”) in which any antibody to capture CTCs is easily conjugated, and evaluated the efficiency in capturing CTCs in experimental studies. The “CTC-chip” provided similar efficiency to “CellSearch” in capturing PC-9 cells with EpCAM expression. In capturing MESO-4 cells without EpCAM expression, the “CTC-chip” conjugated with an anti-podoplanin antibody provided a high efficiency (55-70%) whereas MESO-4 cells were not captured with the “CellSearch”.

研究分野：胸部外科学

キーワード：肺癌 循環腫瘍細胞 上皮間葉移行 マイクロ流体チップ

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。1)癌発生の初期から腫瘍細胞が原発巣から遊離し血液中を循環する、2)このような循環腫瘍細胞(CTC)が遠隔臓器に着床し転移が成立する、といった基礎研究結果から、末梢血液中の CTC が早期癌や微小転移の診断法として期待され、米国では自動化検出システムである“CellSearch”を用いた“CTCテスト”が、乳癌・大腸癌・前立腺癌のバイオマーカーとして臨床使用が FDA より認可されている。

・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。だが、我々の施設の田中らは、近年、肺癌においても“CellSearch”システムを用いて検出した CTC の陽性率が、進行度と相関することを示した(Clin Cancer Res 2009、ASCO 2011 等)。

・前述の報告で、肺癌の中でも小細胞癌の CTC 陽性率は 67%と高く、また予後と有意な相関を認めたと、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 検出感度は約 30%と十分ではなかった(遠隔転移が明らかな症例でも CTC 陽性率 50%)。その理由として、以下のように“上皮-間葉転換(EMT)”の影響が示唆されている。

・“CellSearch”は CTC の発現する上皮細胞接着分子(EpCAM)に対して、抗 EpCAM 抗体を用いて CTC を検出する。ただ、上皮由来の癌細胞でも EMT により上皮の性格を消失して間葉系細胞様への変化することが知られており(肺癌での我々の知見：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。

“CTC-chip”は、高感度 CTC を検出するシステムとして米国で開発され(Nature 2007 & NEJM 2008)だが、Chip 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。そこで、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“CTC-chip”を開発(Ohnaga T 他、ISMRC 2011 等)し、基礎実験(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。

ただ、従来の“CTC-chip”は、“chip”表面に抗 EpCAM 抗体を結合させ、血液中を循環する“上皮由来の癌細胞”を捕捉する

(“CellSearch”と同様に、抗 EpCAM 抗体を用いて細胞を捕捉)。我々の“CTC-chip”は、chip に自由に抗体を結合できる汎用化チップであり、前述のような“EMT”を起こした癌細胞の捕捉も可能である。実際、CTC-chip により、様々な癌細胞(癌幹細胞や“EMT”を起こした癌細胞)を単離する研究も進んでいる(Cancer Discovery 2011 等)。

我々の研究室では、現在、富山県工業技術センターグループの大永らと共同で、国産の CTC-chip(安価で大量生産が可能)を用いて肺癌、悪性胸膜中皮腫などの循環腫瘍細胞の検出の開発を行っている。その中で、抗 EpCAM 抗体を用いて、肺癌の腫瘍細胞を捕捉する基礎実験に成功した。さらに、抗 EpCAM 抗体以外の抗体を用いて(抗 Mesothelin 抗体や抗 Podoplanin 抗体など)、悪性胸膜中皮腫の腫瘍細胞を捕捉する基礎実験に成功し、どのような抗体も利用できる、universal な CTC 検出システムであることを証明できた。

2. 研究の目的

循環血液中腫瘍細胞(CTC)の検出で、“CellSearch”は、米国において乳癌・大腸癌・前立腺癌での臨床使用が認可されている。肺癌では我々が世界に先駆けて予後の検討を行ったが、検出感度については十分とは言えなかった(Tanaka F 他、Clin Cancer Res 2009 等)。その理由として、“上皮-間葉系移行(EMT)”の影響が示唆されている。

マイクロ流体チップ(“CTC-chip”)は、CTC のより高感度な検出が可能なシステムとして米国で開発された(Nature 2007 等)が未だ実用化されていない。我々と共同研究を行っている大永らは国産の“CTC-chip”を開発した(Ohnaga T 他、ISMRC 2011、日本癌学会 2011)。“CTC-chip”を用いて、EMT の影響を克服し、より高感度かつ信頼性の高い CTC 検出システムに改良することを目的とする。

3. 研究の方法

1) EMT を起こした腫瘍細胞の“CTC-chip”による検出法の検討

・肺癌細胞株に EMT を起こさせ抗 EpCAM 抗体以外の抗体で“CTC-chip”への捕捉を行う。

・従来の“CellSearch”と CTC の検出感度を比較検討する。

我々が行っている“CTC-chip”を用いた基礎実験において、抗 EpCAM 抗体を使用して、

捕捉されることが確認されている肺癌細胞株(B901L)を、TGF などの増殖因子を用いて意図的に EMT を起こさせる。

EMT を起こさせた段階で、再度抗 EpCAM 抗体を使用して、捕捉率が下がることを確認(本来であれば、EMT が起これば、抗 EpCAM 抗体の反応は悪くなるはずである)。

抗 EpCAM 抗体以外の抗体(EMT を起こした癌細胞を認識する抗 N-Cadherin 抗体等)を用いて EMT を起こした、肺癌細胞株が捕捉可能かを検証する。

肺癌細胞株に対して、抗 EpCAM 以外の抗体で“CTC-chip”を用いて CTC を検出した場合と“CellSearch”を用いた場合とで、検出感度を比較する。

2) “CTC-chip”により捕捉された腫瘍細胞の分子生物学的特性の解析

・捕捉された CTC からの DNA/RNA 抽出や、遺伝子変異/発現異常解析が可能か否かを検討

・EMT を起こさせる前後で癌細胞に生物学的特性の違いがあるかを比較検討

EGFR 変異が既知の当科樹立肺癌細胞株(B901L[Exon19 欠損]、G603L[exon21/L858R]等、Uramoto H 他、Anticancer Res 2007)、その細胞懸濁液や血液による希釈液を“CTC-chip”に流して CTC を捕捉する。捕捉された CTC から DNA を抽出し、1) EGFR 変異解析が可能か否か、2) EGFR 変異が当該細胞株の変異に一致するか否か、を検討する。

肺癌細胞株に EMT を起こさせ、抗 EpCAM 抗体以外の抗体で捕捉された CTC から DNA を抽出し、上記の 1)、2)が可能か否かを検討。さらに EMT を起こさせる前の DNA と比較し、生物学的特性の違いがあるかを比較検討する。

3) 肺癌患者の血液を用いて“CTC-chip”による検出法の検討

・抗 EpCAM 抗体のみを使用した場合と、抗 EpCAM 抗体以外の抗体を併用した場合とで捕捉率に変化が出るかを判定する。

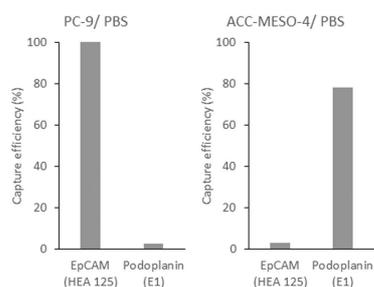
肺癌患者の血液を用いて、抗 EpCAM 抗体のみを使用した場合と、抗 EpCAM 抗体以外の抗体を併用した場合とで CTC の捕捉率に変化が出るかを判定する。

4. 研究成果

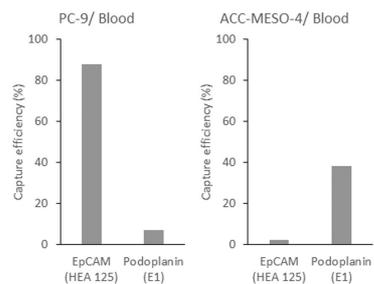
新規マイクロ流体チップシステムについて EpCAM も含め任意の細胞表面抗原を標的として細胞を分離検出する条件の基礎的検討を行った。

EpCAM 陽性細胞(PC-9:肺癌細胞株)と陰性細胞(ACC-MESO-4:胸膜中皮腫細胞株)を CFSE により蛍光標識し、リン酸緩衝液(PBS)または健常人血液に添加した場合の細胞捕捉効率(捕捉細胞数/流入細胞数)を確認した。

・PC-9の抗 EpCAM 抗体(HEA125)による平均捕捉率は 101.1%、抗 Podoplanin 抗体(E1)では 2.3%であった。一方 ACC-MESO-4 は抗 EpCAM 抗体ではほとんど捕捉されず(3.0%)、抗 Podoplanin 抗体で 78.3%捕捉された。



・同様に血液に添加した場合の検討では PBS の場合に比べ捕捉率は、PC-9 で 88.0%、ACC-MESO-4 では 38.4%であった。



・細胞捕捉感度の検定において、PC-9 では 1mL あたり 10 個の細胞でもほぼ 100%捕捉可能、MES04 は 50-100%であった。

・CellSearch との性能比較では、EpCAM 陽性の PC-9 に対して抗 EpCAM 抗体結合 chip で CellSearch とほぼ同等の検出率が得られた。これに対して EpCAM 陰性の ACC-MESO-4 は CellSearch ではほとんど検出されず、抗 Podoplanin 抗体結合 chip にて 55-70%の検出率が得られた。

・“CTC-chip”により捕捉された腫瘍細胞の遺伝子変異解析の検討では、CTC-chip に捕捉された PC-9 を蛋白分解酵素で溶解後に回収、DNA を抽出して遺伝子変異解析を行った。

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。

・肺癌患者の血液を用いた検討では、血液 1 mL を抗 EpCAM 抗体結合 chip に流し、捕捉された細胞を chip 上でサイトケラチン-Alexa Fluor 594、CD45-Alexa Fluor 488、Hoechst で蛍光染色し、サイトケラチン陽性、CD45 陰性、Hoechst がサイトケラチン領域に含まれるものを CTC としてカウントした。肺癌患者のべ 19 例について検討を行い、1mL の血液あたり 0-94 個の CTC が検出された。

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 11 件)

1. Shinohara S, Hanagiri T, Taira A, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Uramoto H, So T, Yamada S, Tanaka F. Immunohistochemical Expression and Serum Levels of CD44 as Prognostic Indicators in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology*.2016 May 26;90(6):344-355. 査読有
2. Chikaishi Y, Uramoto H, Koyanagi Y, Yamada S, Yano S, Tanaka F. TMPRSS4 Expression as a Marker of Recurrence in Patients with Lung Cancer. *Anticancer Res*.2016 Jan;36(1):121-7 査読有
3. Shinohara S, Kuroda K, Shimokawa H, Kuwata T, Takenaka M, Chikaishi Y, Oka S, Hirai A, Imanishi N, Uramoto H, Tanaka F. Pleural dissemination of a mixed ground-glass opacity nodule treated as a nontuberculous mycobacterial infection for 6 years without growing remarkably. *J Thorac dis*. 2015 Sep;7(9):E370-3. 査読有
4. Shinohara S, 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. doi: 10.7888/juoe.37.121. 査読有
5. Kuwata T, Shinohara S, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Hirai A, Kuroda K, So T, Tanaka F. The impact of covering the bulla with an absorbable polyglycolic acid (PGA) sheet during pneumothorax surgery. *Gen Thorac cardiovasc* 2015 Apr 10. [Epub ahead of print] 査読有
6. 岡 壮一, 松宮 弘喜, 篠原 周一, 桑田 泰治, 竹中 賢, 近石 泰弘, 平井 文子, 田嶋 裕子, 今西 直子, 永田 好香, 黒田

耕志, 浦本 秀隆, 田中 文啓. 肺癌手術における心嚢内血管処理の経験. *産業医科大学雑誌* 2015;37(3): 191-194 査読有

7. 篠原 伸二, 花桐 武志, 竹中 賢, 岡 壮一, 近石 泰弘, 下川 秀彦, 中川 誠, 浦本 秀隆, 宗 知子, 田中 文啓. 末梢肺に発生した原発性肺腺様嚢胞癌の 1 例 (Primary Adenoid Cystic Carcinoma of the Peripheral Lungs) *産業医科大学雑誌* 2015;37(2): 121-125 査読有
8. 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
9. 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
10. 浦本 秀隆, 近石 泰弘, 永田 好香, 下川 秀彦, 田中 文啓. 臨床と研究 内視鏡手術トレーニングシミュレータを使用した学生教育. *胸部外科*.2014;37(12): 1047-1050 査読有
11. 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. *Lung Cancer*. 2013 Sep;81(3):475-9. 査読有

[学会発表](計 14 件)

1. 近石 泰弘. 肺癌術後脳転移に対して erlotinib+bevacizumab 併用療法が著効した 2 例. 第 56 回日本肺癌学会九州支部学術集会・第 39 回日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会. 北九州国際会議場(福岡県・北九州市). 2016.2.26-27
2. 近石 泰弘. Bevacizumab 投与後に手術を行った非小細胞肺癌の検討. 第 56 回日本肺癌学会九州支部学術集会・第 39 回日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会. 北九州国際会議場(福岡県・北九州市) 2016.2.26-27

3. Yoneda K, Chikaishi Y, Kawashima E, So T, Uramono H, Ohnaga T, Tanaka F. Capture of EpCAM-negative circulating tumor cells(CTCs) with a "Universal CTC-Chip". American Association for Cancer research. Philadelphia 2015 AACR Annual Meeting 2015, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania(USA).2015.4.18-22.
 4. 近石 泰弘.当科において肺癌術後に乳び胸を合併した症例の検討. 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
 5. 浦本 秀隆, 竹中 賢, 岡 壮一, 近石 泰弘, 平井 文子, 岩浪 崇嗣, 永田 好香, 下川 秀彦, 宗 知子, 花桐 武志, 田中 文啓 SY-3-4 ドライバー癌遺伝子変異耐性に関する分子機構と外科医の役割(SY-3 シンポジウム(3)肺癌の個別化医療時代における外科医の役割, 第 114 回日本外科学会定期学術集会)国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府・京都市) 2014.4.3-5
 6. Chikaishi Y, So T, Takenaka M, Oka S, Hirai A, Iwanami T, Shimokawa H, Yoneda, K, Nagata Y, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F. Comparison of CellSearch with polymeric microfluidic devices for CTC isolation using EpCAM-negative tumor cell lines of malignant pleural mesothelioma. AACR Annual Meeting 2014. San Diego, California,(USA).2014.4.5-9.
 7. 平井 文子, 金山 雅俊, 篠原 周一, 平良 彰浩, 竹中 賢, 岡 壮一, 近石 泰弘, 岩浪 崇嗣, 米田 和恵, 永田 好香, 下川 秀彦, 宗 知子, 浦本 秀隆, 田中 文啓. VW2-4 Endobronchial metastasis を呈した肝細胞癌に対して double plasty を施行した 1 例(ビデオワークショップ, 第 37 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会)国立京都国際会館. (京都府・京都市) 2014.4.14-15
 8. 近石 泰弘, 金山 雅俊, 篠原 周一, 平良 彰浩, 竹中 賢, 新居 和人, 岡 壮一, 平井 文子, 岩浪 崇嗣, 永田 好香, 米田 和恵, 下川 秀彦, 浦本 秀隆, 宗 知子, 田中 文啓. 臍胸に対して開窓術を行った症例の検討 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
 9. 近石 泰弘, 平良 彰浩, 名部 裕介, 松本 崇秀, 門司 祥子, 竹中 賢, 岡 壮一, 下川 秀彦, 中川 誠, 永田 好香, 岩田 輝男, 浦本 秀隆, 宗 知子, 花桐 武志, 田中 文啓. 縦隔鏡にて EGFR の感受性変異を認めた非小細胞肺癌の一例. 第 53 回日本肺癌学会九州支部学術集会、第 36 回日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会. 沖縄市町村自治会館 (沖縄県・那覇市) 2013.2.22
 10. 小山 倫浩, 浦本 秀隆, 竹中 賢, 近石 泰弘, 中川 誠, 永田 好香, 下川 秀彦, 岩田 輝男, 宗 知子, 花桐 武志, 宗 哲哉, 宮田 剛彰, 吉松 隆, 大崎 敏弘, 中西 良一, 兼田 博, 本田 志延, 田中 文啓. PS-025-2 肺腺癌による癌幹細胞マーカー・アルデヒドアルデヒド脱水素酵素 1-の臨床病理学的検討(PS ポスターセッション, 第 113 回日本外科学会定期学術集会)福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市) 2013.4.11-13
 11. Chikaishi Y, So T, Oka S, Takenaka M, Nakagawa M, Shimokawa H, Iwata T, Nagata Y, Uramoto H, Hanagiri T, Ohnaga T, Tanaka F. Development of detecting systems for circulating tumor cells in malignant pleural mesothelioma patients. AACR Annual Meeting 2013. Washington, DC,(USA).2013.4.6-10
 12. 近石 泰弘・竹中 賢・岡 壮一・山崎 政治・中川 誠・永田 好香・下川 秀彦・岩田 輝男・市来 嘉伸・浦本 秀隆・宗 知子・花桐 武志・吉田 泰憲・田中 文啓. 低肺機能の左肺癌症例に対して左肺下葉管状切除+肺動脈形成を施行した一例. 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
 13. 竹中 賢, 松本 崇秀, 岡 壮一, 近石 泰弘, 岩田 輝男, 下川 秀彦, 中川 誠, 浦本 秀隆, 宗 知子, 花桐 武志, 田中 文啓. 胸膜に多発発生した Calcifying Fibrous Tumor の 1 切除例(第 36 回日本呼吸器内視鏡学会九州支部会)大宮ソニックシティ・パレスホテル大宮 (埼玉県・大宮市) 2013.6.20-21
 14. 近石 泰弘, 宗 知子, 米田 和恵, 浦本 秀隆, 田中 文啓, 花桐 武志, 大永 崇. 新しいマイクロ流体デバイスを用いた循環腫瘍細胞の検出法の開発 BioJapan 2013 World Business Forum パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)2013.10.9-11
6. 研究組織
- (1)研究代表者
近石 泰弘 (CHIKAISHI Yasuhiro)
 産業医科大学・医学部・助教
 研究者番号：2 5 8 6 1 2 5 1