

平成30年6月19日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10069

研究課題名(和文) 改良テロメスキャンによる血中循環乳がん細胞の単離・機能解析と臨床応用

研究課題名(英文) Isolation and functional analysis of blood circulating breast cancer cells by improved telome scan

研究代表者

清水 秀穂 (Shimizu, Hideo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50424247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CTC解析方法であるCellSearch Systemは、抗体の設定が自由にできず捕捉率は低く臨床応用は困難である。一方本邦で開発されたテロメスキャンは癌で高発現しているテロメラーゼを指標として高効率に癌を捕捉する手法である。本研究では改良を加えたテロメスキャンF35システムが乳がんのCTCを高効率かつ正確に検出することを示すことを目的とした。しかし試験開始直後に外部委託業者によるテロメスキャン解析が無期限中止となったため、代替解析方法を導入した。特定の薬剤を用いる再発乳癌を対象を特化し、治療前後のCTCを測定した。結果は治療前に間葉系CTCの多い患者では治療効果が低かった。

研究成果の概要(英文)：The development of CTCs as a predictive marker for treatment effects on breast cancer remains an enormous task. We investigated CTCs, including epithelial mesenchymal transition status, from metastatic breast cancer patients who had received eribulin-based treatment. Twenty-two patients were enrolled and peripheral blood samples were collected before eribulin treatment. CTCs were then examined using a Microfluidic Chip device. CTCs positive for vimentin and pan-cytokeratin were defined as mesenchymal and epithelial CTCs, respectively. Numbers of total CTCs were significantly increased in patients with progressive disease during treatment. Patients with more total and mesenchymal CTCs at baseline had significantly shorter progression-free survival.

研究分野：乳癌

キーワード：血中循環癌細胞 乳癌

1. 研究開始当初の背景

乳がんは65歳未満の各年代で成人女性の死亡原因の1位であり、いまだに増加傾向にある。また他の臓器のがんと違って術後10年以上経ってから再発を起こす事が稀ではない。従って採血等による簡便な方法で再発転移を予想する、あるいは転移を早期に診断する腫瘍マーカーが必要とされている。

血中循環細胞とその捕捉方法

がん細胞は血液の流れに乗って肝臓などの臓器に生着して転移を起こす。この血中に浮遊する細胞を血中循環癌細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) と呼び、これを捕捉するシステム (CellSearch System; CSS) が米国の veridex 社によって開発された。そして末梢血液 7.5ml あたり Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)陽性の CTC が5つ以上検出される転移性乳がん患者は、予後が悪いことが示されている (Hayes DF et al. *Clin Cancer Res* 2006)。

しかしその検出感度が低いことが大きな課題であり、抗原抗体反応、サイズ分画、細胞形態識別の利用など様々な捕捉方法が検討されている。既に米国で医療承認を得て商品化された CSS は CTC の捕捉に EpCAM 抗体と Cytokeratin (CK) 抗体を用いるが、EpCAM は特定の上皮がん細胞にしか発現しておらず、この手法では EpCAM 陰性の多くの CTC を見逃していることが指摘されている (Konigsberg R et al. *Acta Oncol* 2011)。CSS は CTC の捕捉率が悪いことに加えて捕捉に用いる抗体を変えるのに巨額のコストがかかるなど、問題点が多い。

テロメスキャン法

この CSS の弱点を克服するため、がんを高発現しているテロメラーゼを指標としたテロメスキャン法が開発された (J Clin Invest. 2009)。この方法ではヒトアデノウイルス 5 型ゲノム E1 領域にヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) プロモーターと、翻訳に必要なリボゾームを呼び込む IRES

を組み込んだ。それによりテロメラーゼ活性の高いがん細胞特異的にこのウイルスが感染・増殖し、さらに E3 部位に GFP を組み込むことで感染細胞の検出が容易となった。このテロメスキャン法はがんの検出以外にも、がん細胞に対する分子標的ウイルス製剤開発等、広範な可能性を秘めている。

CTC を考える上でさらに重要なのは、血中に侵入した癌細胞の 99% 以上が数分で細胞死に至り、ごく少数の細胞のみが CTC として遠隔転移に関与すると考えられている点である。テロメスキャン法は生きてがん細胞のみにウイルスが感染するため、生きている CTC のみを選択的に抽出し計測できるという点で従来の CTC 測定法より優れた検出法である。

申請者らはこの新システムの将来性や応用性に着目し、既にテロメスキャン法を用いて肺がん患者からの臨床検体から CTC の捕捉試験を行っている。さらに最近このテロメスキャン法に改良を加えることにより、がん細胞の捕捉率の向上と、一部の血球系細胞による擬陽性の排除を実現し、より高精度な CTC の捕捉が可能となった。

テロメスキャン法を用いる必要性

CSS などのシステムは EpCAM 陽性の血中細胞を CTC と定義しその抗体を捕捉に用いている。しかし上皮由来のがん細胞は上皮間葉移行 (EMT) を起こしながら原発巣より離れ転移能を高めていることがわかっている。EMT を起こしたがん細胞の多くは EpCAM の発現を喪失している可能性が高い。一方でテロメラーゼを指標として捕捉するテロメスキャン法は EMT を起こした EpCAM 陰性の CTC も捕捉可能であり、本研究を遂行する上での大きな強みである。

転移性乳がんについては予後予測因子としての CTC の有効性が示されているが、実際のがん患者から抽出された CTC が転移形成する能力を持っているか否かは未だに示されていない。また遠隔転移巣のがん細胞と CTC が同じ形質を示すか否かも解明されていない。以上のことから CTC の細胞特性すなわち CTC と転移の関係を明らかにすることの学術

的意義は非常に大きい。

2. 研究の目的

本研究では乳がん CTC の新規腫瘍マーカーとしての臨床応用を目的とし、同時に CTC の細胞特性、つまり CTC と転移の関係を解明することで新規治療法の開発への基盤形成までを目的とする。具体的には

1) テロメスキャン F35 がより精度の高い乳がん CTC 検出システムであることを立証する。乳がん患者の血液 7.5ml 中の CTC 数をカウントし、既存の腫瘍マーカーとの関連性、病期、遠隔転移の有無などの臨床情報との関連性について評価する。

2) CTC と転移の関係性（転移性がんの起源が CTC に由来するのか）を解明するために、テロメスキャン F35 により捕捉した細胞を回収・培養し、ヒト免疫不全マウスへの移植により、転移能の評価を実施する。

3) 遠隔転移を伴う乳がん患者より、原発巣、転移巣、CTC を採取してマイクロアレイ解析による遺伝子発現の比較解析、網羅的解析を実施することで、CTC 特異的な転移関連遺伝子を同定する。また CTC 特異的な細胞表面マーカーや高感度に検出される CTC そのものは新規腫瘍マーカーとして臨床応用を検討する。

3. 研究の方法

改良したテロメスキャン F35 を用いて乳がん患者の血液で捕捉率評価試験を実施し、CTC と遠隔転移の有無等の臨床情報との関連について比較検討し腫瘍マーカーとしての有用性を評価する。具体的には

1) 乳がん患者から採取した血液を分析に用いる。特に CTC 数が多いと考えられる遠隔転移・リンパ節 転移を伴う症例を中心に検証を行う。またテロメスキャン F35 法による CTC 検出が十分であるか評価するために、感染させたウイルス由来の GFP シグナルだけでなく、EpCAM、cytokeratin (CK) 等の細胞表面抗原について免疫染色を同時に実施することで、検出法の裏付けを行う。

2) 原発巣（乳房）の病理組織像やリンパ節転移の有無、遠隔転移の有無などの臨床情報や、既存の腫瘍マーカーと CTC 数の関連性について評価する。

3) 術後再発した症例については、手術時の CTC 数との相関や数の変化について評価する。

さらに CTC を回収し、初代培養を行い転移モデルマウスへの移植実験により CTC の細胞特性を評価する。CTC 由来 mRNA を用いたマイクロアレイ解析による CTC 関連遺伝子、転移関連遺伝子を同定し、乳がん腫瘍マーカー、転移マーカーとしての臨床応用の可能性を検討する。さらに捕捉した CTC で薬剤感受性試験を実施し、標準化治療や個別化治療への応用を模索する。

これらの研究を通じて、乳がん由来 CTC の機能解明と腫瘍マーカーとしての臨床応用を目指す。

4. 研究成果

解析方法の変更

サンプリングのための対象患者の選定を終え同意取得を開始したところで、外部委託業者によるテロメスキャン解析が突如無期限中止となった。保存採血からの CTC 解析は行えず、また本研究は CTC 数の測定だけでなく CTC の詳細な解析が重要であるため、代替解析方法を導入することは容易ではなく、その時点ではサンプル採取開始を延期せざるを得なかった。

その後テロメスキャン解析の再開の目処が立たなかったため、本研究の目的に沿った解析が行える別の解析方法を探索し、慎重に選別してサンプル採取及び解析を開始した。

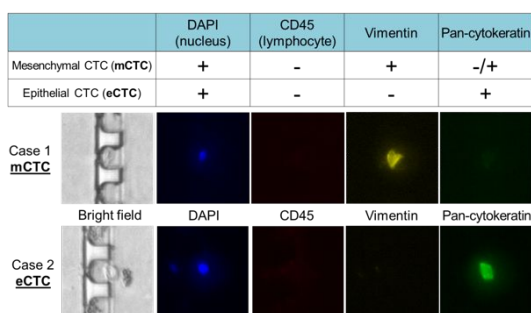
新規に導入した解析方法

本研究は CTC の検出・解析方法自体の研究ではないため、開発中ではなく既に確立された方法を導入する必要があった。また従来の EpCAM による検出では捉えきれない CTC をも捕捉する必要がある。そこで

EMT を示す CTC を捉えられることが示されていた、微小流路デバイス法を採用した (Gogoi P et al. *PLoS ONE* 11 (1): e0147400)。

本法は Microfluidic Device を用い、細胞の大きさと変形能をもとに CTC を血球から分離・濃縮する。また EMT マーカーを含めた蛍光染色により CTC の性質を同時に評価することが可能である。本研究では下図のごとく、vimentin 陽性 CTC を間葉系 CTC (mCTC)、pan-cytokeratin 陽性 CTC を上皮系 CTC (eCTC) と定義した。

本研究における CTC の定義



対象の選別

前述の理由によりサンプリング開始が大幅に遅れたことや予算の規模を鑑み、解析対象を再発乳癌のうち特定の薬剤 (エリブリン) を開始する患者に特化した。治療薬剤としてエリブリンを選んだ理由は、この薬剤の作用機序の1つとして EMT の抑制が知られているからである (Dybdal-Hargreaves NF et al. *Oncotarget* 9, 5545-61, 2018, Yoshida T et al. *Br J Cancer* 110, 1497-505, 2014)。この薬剤に効果を示す患者では、EMT-CTC が抑制されることを予想した。

結果

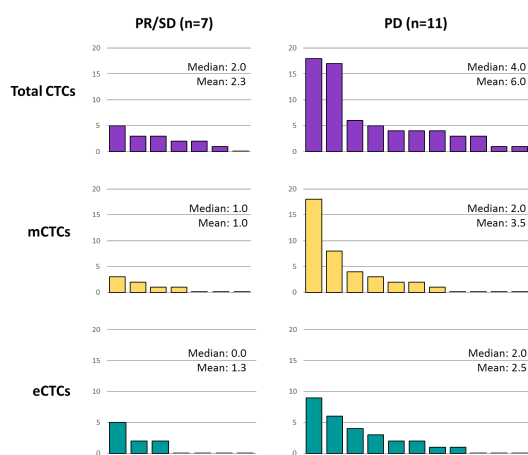
(1) CTC 数とサブタイプ

CTC は対象の 22 人中 21 人で検出された。CTC の中央値は 3.0 (4ml あたり) であった。乳癌のサブタイプ別に解析すると、total CTC 数に差はなかったが、mCTC は triple negative で多い傾向があり、また total CTC を分母とした時の mCTC の率は TN で有意に高かった ($p < 0.05$)。

(2) CTC と治療効果

画像による治療効果判定は 18 人で可能であった。Partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD) はそれぞれ 17%, 22%, 61% にみられた。対象を PR/SD と PD の 2 群に分けて比較すると、total CTC と mCTC は PD 群で多く認められた (それぞれ 2.3 vs 6.0 および 1.0 vs 3.5) もの、統計学的に有意な差ではなかった。

各 CTC と治療効果の関係



(3) 治療中の CTC の変化

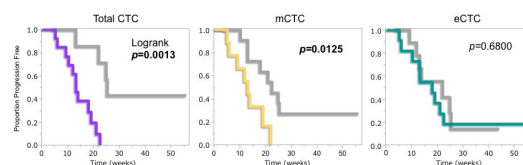
治療中に 2 回目の CTC 評価を行えた患者は 13 人で、PD 群では有意に total CTC が増加していた ($p = 0.0060$)。mCTC も似た傾向を示した ($p = 0.073$)。一方で PR/SD 群では CTC の種類によらず、一定の傾向はみられなかった。

さらに mCTC と eCTC の比率の変化に注目した。しかしそれらの比率と治療効果の間に統計学的な関連性は認めなかった。

(4) CTC と無病増悪期間 (PFS) の関係

PFS は 20 人の患者で評価された。PFS 中央値は 14.6 ヶ月であり、3 人は治療継続中であつた。PFS の Kaplan-Meier カーブを CTC のタイプ別に描くと、total CTC が多かった患者では PFS が有意に短かった (下図) ($p = 0.0013$)。

各 CTC と PFS の関係



その傾向は mCTC についても同様であった(p=0.013)。一方で eCTC による違いは認めなかった。PFS に差のあった前 2 者を比較すると、total CTC のほうが mCTC より PFS の差が顕著であった。

(5) 長期 PFS の予測因子

最後に、我々は長期 PFS(6 ヶ月以上と定義)と臨床病理学的因子や CTC との関連を調査した。Fisher's exact test では、total CTCs (3 未満), mCTCs (2 未満) そして術後無再発期間(60 ヶ月以上)が長期 PFS と有意に関連していた。その後これらの因子にういてロジスティックモデルによる多変量解析を行ったところ、total CTC と無再発期間が長期 PFS の独立した予測因子であった(p=0.020)。

以上より、mCTC および eCTC の両者を評価することでエリブリンの効果を予測できることが示唆された。現在まで多くの臨床試験において CTC は EpCAM によって評価されてきているが、今回の我々のデータから、今後より正確な予後・治療効果予測をするためには mCTC の評価も導入していく必要があると考えられた。

以上のデータについて、現在投稿中である。

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 1 件)

1. 乳癌における上皮間葉転換 -治療標的としての臨床応用の可能性
猪狩史江、堀本義哉、吉田悠子、徳田恵美、清水秀穂、田辺真彦、齊藤光江
乳癌の臨床 30(3): 229-236, 2015

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Circulating tumour cell analysis to predict efficacy of Eribulin for metastatic breast cancer patients.

Y Horimoto, E Tokuda, F Murakami, K Nakai, H Shimizu, M Saito.

The 4th International Consensus

Conference for Advanced Breast Cancer.
(2018 年 3 月、リスボン)

2. Circulating tumour cell analysis to predict efficacy of Eribulin for patients with metastatic breast cancer.

Y Horimoto.

Anticancer Treatment Japan (2018 年 5 月、東京)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水秀穂 (SHIMIZU, Hideo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 50424247

(2) 研究分担者

堀本義哉 (HORIMOTO, Yoshiya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 40424246

十合晋作 (TOGO, Shinsaku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 80365634

小見山博光 (KOMIYAMA,)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 30348982