

令和元年6月5日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10524

研究課題名(和文) 胃癌腹腔洗浄液および末梢血中癌細胞の単離と遺伝子解析を用いた補助化学療法薬剤選択

研究課題名(英文) Isolation of circulating tumor cells (CTC) and peritoneal tumor cells (PTC) by cytology-based filtration platform and its application to monitoring therapeutic effect

研究代表者

伊藤 誠二 (ITO, Seiji)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学分野・研究員

研究者番号：50393129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CTC検出デバイスを大幅に改良し、PTCの検出も可能なフィルター型自動分離デバイスを開発した。本デバイスにより捕捉したCTCを、スライドグラスに転写、染色し、光学顕微鏡下でCTCを細胞診として簡便、低コストに検出することが可能となった。本デバイスを用いた小規模な臨床研究(胃癌患11例)の結果、CTCの陽性率は流出路静脈血；28%、末梢血；18%と前者でより多数のCTCを検出した。一方、PTC分離に関しても、本デバイスを用いて腹腔洗浄液中のPTC検出を行い、洗浄細胞診に比べて検出感度が高い傾向を明らかにした。以上、本デバイスのCTC(PTC)の治療感受性評価などへの応用の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でCTCの同定を迅速、低コストに光学顕微鏡下で行うことが可能なデバイスを新たに開発し、市中病院でもCTCの測定をルチン検査として行うことができる可能性が示唆された。デバイスのFilter径を大きくすることにより従来の洗浄細胞診に比べ高感度かつ半定量的なPTCの検出が可能となった。またDVBを用いることにより一定数以上のCTCの回収が可能となりCTCの遺伝子解析の可能性が示唆された。一方、ヒト胃癌のCTCマウスモデルを確立し、T-DM1治療後早期に一過性にCTC数が増加すること、すなわちCTCが動員される可能性を見出した。CTCモニターによる抗がん剤感受性評価の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we newly developed a cytology-based, automated CTC/PTC isolation device for liquid biopsy. This platform consists of three steps; enrichment of CTCs with filter, transfer of CTCs to glass slide and staining with Pap and immunocytochemistry. CTC (PTC) are identified under light microscopy as cytokeratin (CEA)-positive cells with atypical morphology. Some genetic analysis such as FISH is also possible. Pilot clinical study showed that CTC number was higher in drainage vein blood (DVB) than peripheral blood, suggesting that CTCs in DVB are potential source for genetic analysis. Furthermore, using gastric cancer mouse CTC model, we demonstrated transient increase in CTC number early after T-DM1 therapy, suggesting mobilization of CTCs in rapid response to drug therapy. These results indicate that current CTC (PTC) detection platform would be a powerful diagnostic tool for early detection of metastasis and monitoring drug sensitivity in clinical setting.

研究分野：消化器外科学

キーワード：血液中循環がん細胞(CTC) 腹腔洗浄液中がん細胞(PTC) 細胞診 フィルター型デバイス 自動分離装置 薬物治療 Liquid biopsy

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌患者の腹腔洗浄液中や血液中に存在する微量のがん細胞(PTC, CTC)の検出は予後因子や転移の早期診断ツールとして臨床的有用性が認められているが、これまではがん細胞を分離、同定することなく主としてCEAなどの腫瘍マーカーを指標とするRT-PCR法などで検出されていた。近年、Cell SearchなどのCapture 抗体などを用いた分離技術の進歩によりCTCを分離同定することが可能となってきた。しかし、これらの方法は大部分が蛍光染色での暗視野下での同定のため診断の客観性、迅速性に欠け、また高コストなこともあり、実地臨床への応用は殆どなされておらず、一般病院の院内検査として利用できる汎用性の高い方法の開発が待たれていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は一般病院の院内検査として利用できる汎用性の高い方法として金属フィルターを利用してサイズ選択性にCTC/PTCを簡便、低コストに分離・転写し、スライドグラス標本としてCTCを細胞診で同定できるデバイスを改良、開発することである。また本デバイスを用いて薬物療法などに対する治療感受性評価などへの前臨床及び臨床応用の可能性を検討することである。

### 3. 研究の方法

我々はこれまでに金属フィルターで細胞のサイズにより濃縮分離したCTCを蛍光で検出する血中循環がん細胞(CTC)の検出デバイスを独自に開発してきた[1]。しかしながら、この方法では暗視野での蛍光観察のため薬物療法などにより変性したCTCの形態評価が十分にできず、正確な治療効果判定が困難であった。この問題点を克服するため、デバイスのシステムの抜本的な改良を行った。主な改良点は以下の3点である。1)3Dフィルター型分離デバイスで捕捉したCTCをスライドグラスに転写、パパニコロウ染色、免疫染色を施し、光学顕微鏡下にCTCを細胞診として病院内で測定できるようにすること、2)4検体からCTCを一度に自動分離できる簡便、低コストなCTC分離装置を開発すること。3)腹腔洗浄液中微小がん細胞(PTC)に関しては分離デバイス中の3DフィルターのporeサイズをCTC用の8  $\mu\text{m}$ から10  $\mu\text{m}$ に変更することにより、中皮細胞のコンタミを減らし、PTCの高感度な検出を可能とすること。

これらの点を改良した分離デバイスを用いてCTC(PTC)の評価のためのパイロット臨床試験を行った。流出路静脈血(DV)及び末梢血(PB)CTCの評価では11例の胃癌患者検体を用い、PTCの評価では5例の胃癌(一部大腸癌患者)の腹腔洗浄液を用いた。ちなみにこれらの患者からは倫理審査委員会を通した同意書を得ている。

### 4. 研究成果

今回開発した改良3Dフィルター型自動CTC分離装置の概観を以下に示す(図1)。(B)は3D型ニッケルフィルター(pore size:8  $\mu\text{m}$ )とそれを装着したアクリル樹脂製の使い捨て型のCTC分離デバイスで、(A)はこの分離デバイスを用いて一度に4検体の血液サンプルを自動的に濃縮分離するシステムである。定圧型回路を採用しているため、流速を早くしてもずり応力が小さく、細胞形態が良好に保たれるという特性を有している。(C)は分離デバイスで濃縮したCTCを転写したスライドグラス標本を示している。このスライドグラス標本を用いることにより一般病院の病理検査室内でもPapanicolaou(Pap)染色とサイトケラチン等の免疫染色を行い、原理的には病理医あるいは細胞検査士が院内でCTCを評価することが可能である。

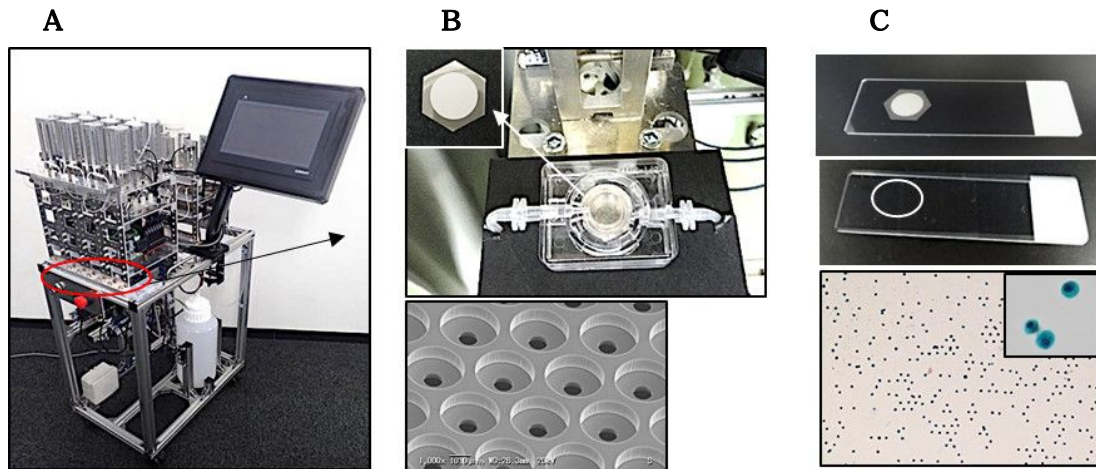


図1 3Dフィルターデバイスを用いた自動CTC分離システムとCTC細胞診

腹腔洗浄液中がん細胞(PTC)分離装置システムも基本的に上記装置と同一だが、コンタミする中皮細胞を減らすために上記3D型ニッケルフィルターのpore sizeをCTC用の $8\mu\text{m}$ から $10\sim 12\mu\text{m}$ に変更し課題を克服した。

この自動CTC分離システムを用いて小規模な臨床研究(胃癌患者11例)を実施した。代表的なCTCの細胞像を以下に示す(図2)。血液サンプルのCTC陽性率は流出路静脈血(DVB); 28%、末梢血(PB); 18%とDVBでより高頻度でかつ多数のCTC(DVB;  $1\sim 123/5\text{ml}$ , PB;  $1\sim 26/5\text{ml}$ )を検出した[2]。

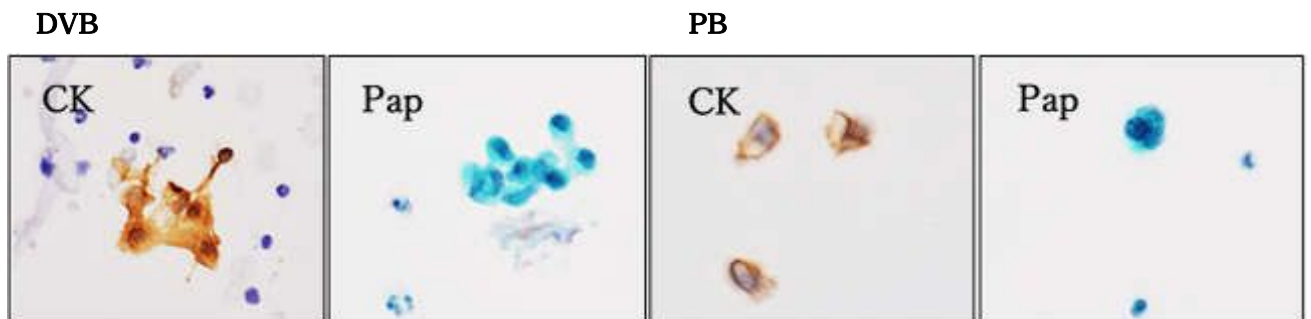


図2 胃癌患者の流出路静脈血中(DVB)及び末梢血中(PB) CTCのサイトケラチン(CK)染色像とPapanicolaou染色像

一方、腹腔洗浄液中がん細胞(PTC)分離に関しても、本自動分離デバイス(フィルタはpore size;  $10\sim 12\mu\text{m}$ を使用)を用いて胃がん(一部大腸癌)患者5名のPTC検出を行った。代表的なPTCの細胞像を以下に示す(図3)。従来の腹腔洗浄細胞診に比べて検出感度が高い傾向を認めた。また検体中の全PTCが1枚の標本の一定の面積の円形領域に限定されるため、顕微鏡による検出が簡便で、かつ半定量的な検出が可能であった。

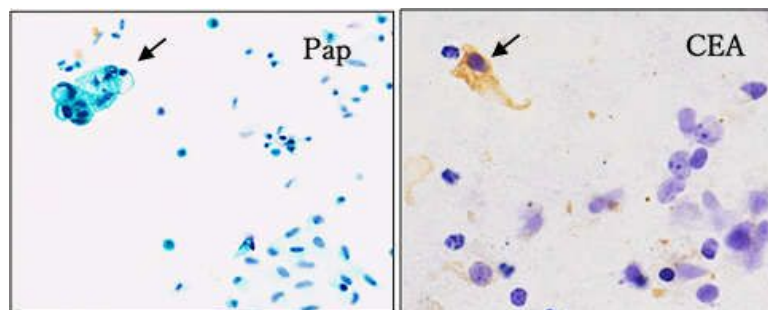


図3 胃癌患者の腹腔洗浄液中PTCのPapanicolaou染色像とCEA染色像。矢印はCEA陽性のがん細胞。周囲に反応性中皮細胞の細胞集塊が認められる。

本研究ではデバイスの開発改良に時間がかかり、臨床検体を用いた臨床研究はごく小規模なものにとどまった。そのため当初予定していた臨床検体を用いたCTCによる薬物治療の効果の評価は検討できなかった。しかしながら、別途研究していたHER2陽性胃癌のCTCマウスモデルを用いた前臨床研究において、予備的検討ながら、Trastuzumab-DM1 (T-DM-1)などの分子標的薬治療前後の血中CTCの動態を検討したところ、治療後早期に一過性にCTC数が増加する傾向があることを見出した。薬剤の原発腫瘍に対する治療効果を反映して、変性壊死に陥った原発巣から血液中にCTCが動員された結果である可能性が示唆された。このことは本デバイスを用いたCTC(PTC)の経時的なモニタリングにより原発巣の薬剤感受性や治療反応性などを評価できる可能性を示唆するものと考えられる。

## 引用文献

- [1] Yusa A, Toneri M, Masuda T, Yamamoto S, Okochi M, Ito S, Kondo N, Iwata K, Ichinosawa Y, Kinuta S, Honda H, Arai F, Nakanishi H. Development of a New Rapid Isolation Device for circulating Tumor Cells (CTCs) Using 3D Ilidium Filter and Its Application for Genetic Analysis. PLoS One.2014; 11;9(2):e88821.
- [2] Tsutsuyama M, Nakanishi H, Yoshimura M, Oshiro T, Kinoshita T, Komori K, Shimizu Y, Ichinosawa Y, Kinuta S, Wajima K, Sakakibara Y, Yatabe Y, Ito S, Koder Y. Detection of circulating tumor cells in drainage venous blood from colorectal cancer patients using a new filtration and cytology-based automated platform. 2019 (published on line at 27 Feb), PLOS ONE. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212221>

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Yoshida K, Koder Y, Kochi M, Ichikawa W, Kakeji Y, Sano T, Nagao N, Takahashi M, Takagane A, Watanabe T, Kaji M, Okitsu H, Nomura T, Matsui T, Yoshikawa T, Matsuyama J, Yamada M, Ito S. Addition of Docetaxel to Oral Fluoropyrimidine Improves Efficacy in Patients With Stage III Gastric Cancer: Interim Analysis of JACCRO GC-07, a Randomized Controlled Trial. Journal of Clinical Oncology.査読有、2019、DOI: 10.1200/JCO.18.01138
2. Iizuka A, Kanda M, Ito S, Mochizuki Y, Teramoto H, Ishigure Kiyoshi, Murai T, Asada T, Ishiyama A, Matsushita H, Tanaka C, Kobayashi Da, Fujiwara M, Murotani K, Koder Yasuhiro. Proposal of a Scoring Scale to Estimate Risk of the Discontinuation of S-1 Adjuvant Monotherapy in Patients with Stage II to III Gastric Cancer: A Multi-Institutional Dataset Analysis. World Journal of Surgery. 査読有、2019、DOI: 10.1007/s00268-019-04942-y
3. Tsutsuyama M, Nakanishi H, Yoshimura M, Oshiro T, Kinoshita T, Komori K, Shimizu Y, Ichinosawa Y, Kinuta S, Wajima K, Sakakibara Y, Yatabe Y, Ito S, Koder Y. Detection of circulating tumor cells in drainage venous blood from colorectal cancer patients using a new filtration and cytology-based automated platform. PLOS ONE、査読有、14巻2019、DOI: 10.1371/journal.pone.0212221

4. Nakagawa N, Kanda M, Ito S, Mochizuki Y, Teramoto H, Ishigure K, Murai T, Asada T, Ishiyama A, Matsushita H, Tanaka C, Kobayashi D, Fujiwara M, Murotani K, Kodera Y. Pathological tumor infiltrative pattern and sites of initial recurrence in stage II/III gastric cancer: Propensity score matching analysis of a multi-institutional dataset. Cancer Medicine. 査読有、7巻2018、6020-6029、DOI:V10.1002/cam4.1868
5. Ito S, Ohashi Y, Sasako M. Survival after recurrence in patients with gastric cancer who receive S-1 adjuvant chemotherapy: exploratory analysis of the ACTS-GC trial. BMC Cancer. 査読有、18巻2018、DOI: 10.1186/s12885-018-4341-6
6. Ito S, Sano T, Mizusawa J, Takahari D, Katayama H, Katai H, Kawashima Y. A phase II study of preoperative chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 followed by gastrectomy with D2 plus para-aortic lymph node dissection for gastric cancer with extensive lymph node metastasis: JCOG1002. Gastric Cancer. 査読有、20巻2017、322-331、DOI:10.1007/s10120-016-0619-z.

〔学会発表〕(計3件)

1. 中西 速夫, 筒山 将之, 服部 正也, 黒田 浩, 谷田部 恭, 伊藤 誠二、3D フィルタ型 CTC 分離デバイスを用いた CTC 細胞診の試みと大腸、肺、乳がん血中循環癌細胞(CTC)に関する臨床的検討、第77回日本癌学会学術総会、2018年
2. 中西 速夫, 伊藤 誠二, 伊藤 友一, 坂尾 幸則, 黒田 浩, 岩田 広治, 服部 正也, 安立 弥生, 筒山 将之, 谷田部 恭、フィルタ型分離デバイスを用いた CTC 細胞診断法の開発とその前臨床並びに臨床応用、第76回日本癌学会学術総会、2017年
3. Nakanishi H, Ikehara Y, Ito S、Novel therapeutic approach with PAM for peritoneal micrometastasis of gastric Cancer、第89回日本胃癌学会総会、2017年

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：細胞のスライドガラス標本作製方法

発明者：中西速夫、伊藤誠二(愛知県がんセンター)

絹田精鎮、市ノ瀬義行(株)オプトニクス精密)

権利者：(株)オプトニクス精密、愛知県

種類：特許

番号：第6464340号

取得年：2019年

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 友一

ローマ字氏名：(ITO, yuichi)

研究協力者氏名：中西 速夫

ローマ字氏名：(NAKANISHI, hayao)