

令和元年6月14日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19381

研究課題名(和文) 消化管がんにおける末梢循環腫瘍細胞を用いた病態診断法の探索

研究課題名(英文) Search for pathological diagnosis using circulation tumor cells in gastrointestinal cancer

研究代表者

庄司 広和 (Shoji, Hirokazu)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医師

研究者番号：50765568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢循環腫瘍細胞(circulating tumor cells: CTCs)を上皮表面マーカーを利用せず、細胞径によりCTCsを血球から分離する微小経路を用いてCTCsの分離及び、CTCsの微量DNAから次世代シーケンズ(NGS)でゲノム解析を行うための手技を確立した。進行期の消化管がんを含む計20例の末梢血からCTCsの分離が可能であった。増幅したDNAからNGSを行い、CTCsからがん遺伝子のプロファイルの抽出に成功した。さらに、進行大腸がんを対象に抗EGFR抗体の投与を受けた7例の化学療法前および増悪時のCTCs分離を行いがん関連遺伝子の変化のプロファイルの抽出が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTCsから消化管がんの「がんの個性診断法」を実現できれば、最少侵襲で時々刻々変化するがん細胞に対して「適時・最適医療」を提示できるようになると考え、本研究を進めてきた。そして分離したCTCsからの遺伝子変異解析、メタボローム解析が可能であることを証明した。今後は本技術を用いて臨床試験への応用、そしてCTCsの細胞培養が実現できれば、プロテオーム解析や薬剤感受性試験につながり、個々の患者に適した薬剤の提供につながる可能性があり、国内外へのインパクトが非常に高いと考える。また、LFIMAによる診断技術の創出は他の医工学分野の発展にもつながり、新しい医工学の学術領域を創出できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We established a method employing a label-free inertial microfluidics approach (LFIMA) with next-generation sequencing (NGS) for the analysis of genomic alterations in circulating tumor cells (CTCs) isolated from patients with gastrointestinal (GI) cancer. CTCs could be isolated from a total of 20 peripheral blood cases, including advanced gastrointestinal cancer. In addition, we carried out blood-based molecular profiling to identify actionable drug targets, monitor drug resistance, and track tumor dynamics using CTCs and ctDNA from patients with metastatic colorectal cancer (CRC).

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード： circulating tumor cell circulating tumor DNA gastrointestinal cancer 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

近年の化学療法の進歩により消化管がん患者の生存期間は延長してきたが、決して満足できるものではない。がん細胞は治療の介入によりさらに遺伝子異常の蓄積をきたし、様々な特性を獲得する。そのため、今後のさらなる生存期間延長のためには、がんの個性に基づいた治療法の選択、すなわち個別化医療が必須である。個別化医療の遂行のためには、がんの個性を的確に捉え、最適な治療を予測するコンパニオン診断法が必要になる。そのため、継時的・空間的に変化するがん細胞の個性を正確かつ非侵襲的にとらえる技術の創出が求められる。

最近では、血液中に循環する CTCs や循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) の存在が知られており、CTCs や ctDNA を用いたコンパニオン診断法や早期診断法の開発が世界的に着目されている。特に大腸がんにおいては第 III 相試験に付随し ctDNA を用いた検討が行われているが (Taberero J, et al. Lancet Oncol 2015)、消化管がんにおいて CTCs を用いたゲノム解析をはじめとしたオミクス解析の検討はまだ不十分である。さらに、CTCs とがん幹細胞との関連も近年報告されている。すなわち CTCs は幹細胞性、上皮間葉転換、生存促進性、休眠状態に関連した遺伝子の発現増加の可能性があり、化学療法の抵抗性や遠隔転移との関連が示唆される。従って、CTCs の生物学的な特性を理解することにより化学療法の抵抗性の原因等が明らかになる可能性があり、このことは将来の創薬へとつながる可能性がある。

上記背景から、「消化管がんにおける効率的な CTCs 分離を創出することで、CTCs の生物学的特性を理解し、個別化医療の選択に有用な非侵襲的な病態診断法を開発する」ことに着想した。

## 2. 研究の目的

消化管がんの個別化医療の確立を目的に消化管がんの末梢循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells, CTCs) の生物学的特性を理解し、有用な病態診断法を開発する。

### 【研究目標】

- I. 消化管がんの効率的な CTCs の採取法を開発する。
- II. 消化管がん CTCs を用いたゲノム解析をはじめとしたオミクス解析技術を創出する。
- III. 消化管がん CTCs を用いた細胞培養技術を開発する。

## 3. 研究の方法

### ➤ microfluidic separation tool を用いた消化管がんからの CTCs 捕捉法の最適化

末梢血から CTC を捕捉する方法としては上皮表面マーカーを用いて集めて、リンパ球等から分離する方法が注目されている。しかしながら抗体による捕捉法は、CTCs が上皮マーカーを発現していることが前提となるため、血行性転移の第一段階である上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) を起こした場合は、上皮マーカーによる CTCs のセレクションが困難な場合がある。

NUS (シンガポール国立大学) は、本問題を解決するため上皮表面マーカーを利用せず細胞径により CTCs を血球から分離する微小流路 (microfluidic separation tool) を用いた分離法の開発に成功した (Hou HW, et al. Sci Rep. 2013) (CTChip-spiral)。我々は、NUS と 2013 年から共同研究を開始し、NUS が開発した CTChip-spiral のプロトタイプを用いて、CTCs の分離に取り組んでいる。本研究では、上皮系表面マーカーを利用せず microfluidics separation tool を用いて消化管がん CTC を効率よく捕捉する方法を確立し、採取された CTCs から次世代シーケンスによるゲノム変異解析等のオミクス解析を行うための技術開発に挑戦する。本方法を用いると、リンパ球・白血球・赤血球・血小板 (血液細胞成分) は外側のセルに分離され、それより大きい CTCs 細胞は内側にセルに濃縮される。濃縮された CTCs を回収して、微量検体から次世代シーケンスによるゲノム解析を行う。この際、上皮表面マーカーを用いた分離を行っていないため、EMT をおこした CTCs についても捕捉が理論上可能になる。事実、同一患者の血液検体で、上皮表面マーカーによる捕捉法と CTChip-spiral による分離法を比較してみたが、血液中のサイトケラチン陽性細胞を分離する能力は、CTChip-spiral の方が 10 倍以上優れていた。CTChip-spiral によって捕捉された CTCs から DNA を分離し、whole genome amplification により微量 DNA を増幅後、次世代シーケンサー (NGS) でゲノム解析を行う予定である。本法は CTCs を簡便に回収できるため、その後の培養も理論的には可能である。

NUS が開発した microfluidic separation tool を用いて、血球細胞成分の混入ができるだけ少なく消化管がんの CTCs を濃縮する方法を最適化する。

### ➤ CTCs が含まれた微量検体から遺伝子変異解析等のオミクス解析を確立する。

濃縮された CTCs の微量検体から DNA を抽出し、次世代シーケンサーでゲノム変異解析を行うために必要な量まで増幅する whole genome amplification 技術を確立する。また増幅された DNA から次世代シーケンスを行うためのプロトコルを確立する。当研究室では得られた微量 CTCs からマイクロマニピュレーターを用いた single cell 分離の技術があり、single cell を用いたメタオミクス解析を行うための方法を最適化する。

### ➤ CTCs が含まれた微量検体から培養技術を確立する。

濃縮された CTCs の微量検体から、CTCs を培養するための基礎技術を検討しプロテオーム解析をはじめとするオミクス解析、および薬剤感受性試験への道筋をつける。具体的に上皮成長因子や繊維芽細胞増殖因子の添加 (Min Yu, et al. Science 2014) や、CTCs の機能の保持をめざしスフェロイド培養等を試みる予定である。

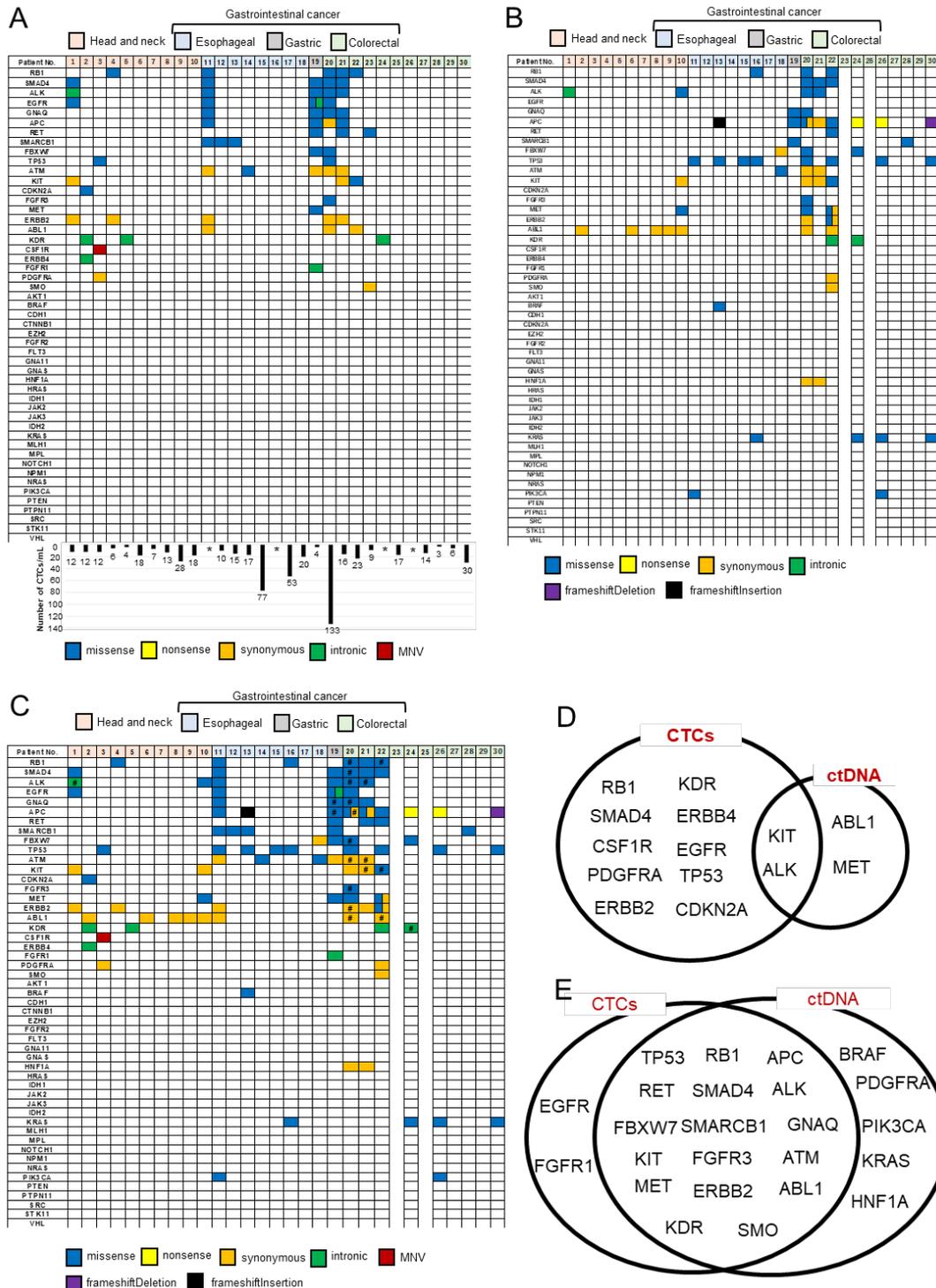
#### 4. 研究成果

私たちは CTCs から遺伝子変異を確認する効率の良い解析方法の確立に挑戦し、上皮表面マーカーを利用せず、細胞径により CTCs を血球から分離する微小経路を用いて消化管がんの CTCs の分離及び、CTCs の微量 DNA は一旦増幅を行った後から次世代シーケンス (NGS) でゲノム解析を行うための手技を確立した。

進行期の食道がん、胃がん、大腸がんを含む計 20 例の末梢血から CTCs の分離が可能であった。Whole genome amplification により増幅した DNA から NGS を行い、CTCs からがん遺伝子、がん促成遺伝子変異のプロファイルの抽出に成功した。(図 1 A, B)

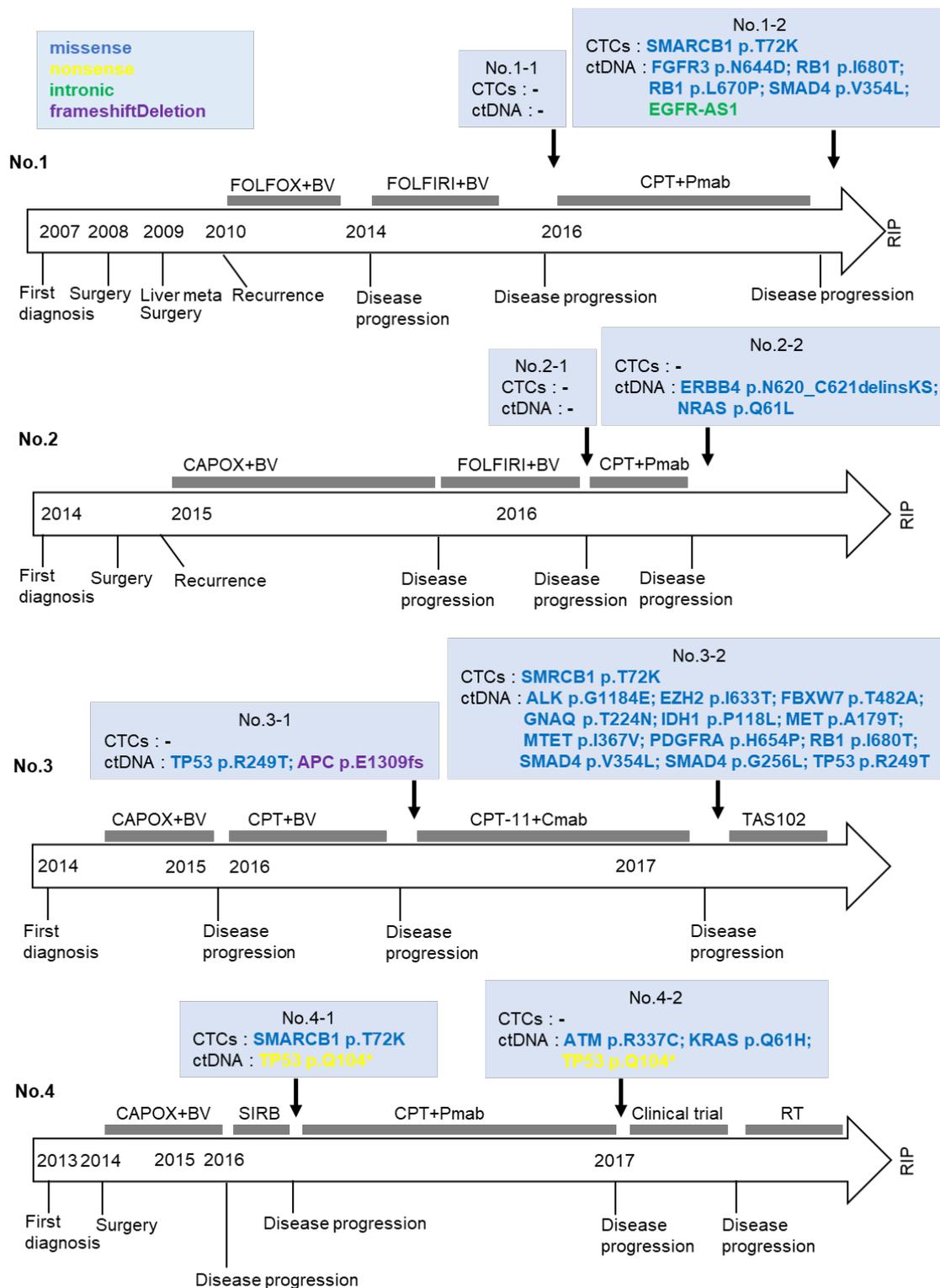
また、同一患者から得られた CTCs と ctDNA の遺伝子変異プロファイルが異なっており、CTCs と ctDNA の両方のプロファイルを併用することで、それぞれの単独のアッセイと比べて遺伝子変異検出が改善すると考えられた。(図 1 C, D, E)

図 1



進行大腸がんを対象に抗 EGFR 抗体の投与を受けた 7 例の化学療法前および増悪時の CTCs 分離を行いがん関連遺伝子の変化のプロファイルの抽出が可能であった。(図 2) 増悪時に、CTCs と ctDNA で異なる遺伝子プロファイルが確認された。

図 2



また、進行胃がん、大腸がんの 6 例から CTCs を分離後、マイクロマニピュレーターとマイクロキャピラリーで 1 細胞 CTC を採取、凍結し、質量分析を実施した。メタボロミクス解析から取得した膨大なデータのプロファイル取得が可能であった。

CTCs を培養するための基礎技術については、引き続き検討が必要である。

CTCs から消化管がんの「がんの個性診断法」を実現できれば、患者に対して最少侵襲で時々刻々

変化するがん細胞に対して「適時・最適医療」を提示できるようになると考え、本研究を進めてきた。本研究の結果、CTCs からの遺伝子変異解析、メタボローム解析が可能であることを証明した。今後は本技術を用いて臨床試験への応用、そして CTCs の細胞培養が実現できれば、プロテオーム解析や薬剤感受性試験につながり、個々の患者に適した薬剤の提供につながる可能性があり、国内外へのインパクトが非常に高いと考える。また、Microfluidic separation tool による診断技術の創出は他の医工学分野の発展にもつながり、新しい医工学の学術領域を創出できる可能性がある。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Onidani K, Shoji H, Kakizaki T, Yoshimoto S, Okaya S, Miura N, Sekikawa S, Furuta K, Lim CT, Shibahara T, Boku N, Kato K, Honda K. Monitoring of cancer patients via next-generation sequencing of patient-derived circulating tumor cells and tumor DNA. *Cancer Sci*. 2019 Jun 6. doi: 10.1111/cas.14092. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Abouleila Y, Onidani K, Ali A, Shoji H, Kawai T, Lim CT, Kumar V, Okaya S, Kato K, Hiyama E, Yanagida T, Masujima T, Shimizu Y, Honda K. Live single cell mass spectrometry reveals cancer-specific metabolic profiles of circulating tumor cells. *Cancer Sci*. 2019 Feb;110(2):697-706. doi: 10.1111/cas.13915. 査読あり

### 〔学会発表〕(計 4 件)

1. 鬼谷薫、庄司広和、吉本世一、三浦奈美、柴原孝彦、加藤健、本田一文  
次世代シーケンサーによる血中循環腫瘍細胞(CTCs)および血中腫瘍循環 DNA(ctDNA)のリアルタイムモニタリング  
日本分子腫瘍マーカー研究会 2018 年
2. Onidani K, Yoshimoto S, Miura N, Shoji H, Kato K, Shibahara T, Honda K.  
Next-generation sequencing of circulating tumor cells isolated from peripheral blood of patients with head and neck or gastrointestinal cancer.  
European Society for Medical Oncology 2017 Congress Asia 2017 (国際学会) 2017 年
3. 鬼谷薫、吉本世一、三浦奈美、庄司広和、加藤 健、柴原孝彦、本田一文  
次世代シーケンサーによる血中循環腫瘍細胞(CTCs)の遺伝子変異プロファイリング  
日本分子腫瘍マーカー研究会 2017 年
4. Shoji H, Kato K, Yoshimoto S, Kakizaki F, Furuta K, Onidani K, Miura N, Honda K.  
Next-generation sequencing of circulating tumor cells isolated from peripheral blood of patients with head and neck or gastrointestinal cancer.  
European Society for Medical Oncology 2016 Congress 2016 (国際学会) 2016 年

### 〔図書〕(計 2 件)

1. 庄司広和、本田一文  
頭頸部がん、消化管がんの circulating tumor cells (CTC) の同定とその臨床応用  
早期発見・予防に向けた次世代がん検査技術の最前線 99-106, 2019  
シーエムシー出版
2. 庄司広和、鬼谷薫、吉本世一、本田一文、加藤健  
Circulating tumor cells (CTC) の同定とその臨床応用  
腫瘍内科 19(4), 422-427, 2017-04  
科学評論社

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：本田一文  
ローマ字氏名：Kazufumi Honda

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。