

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07222

研究課題名(和文) 膵癌循環腫瘍細胞のシングルセル解析による肝転移形成機序の解明

研究課題名(英文) Innovative comprehensive investigation of the novel target molecule based on the mechanisms of liver metastasis in circulating tumor cells of pancreatic cancer.

研究代表者

井口 友宏 (IGUCHI, Tomohiro)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30598959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌から血液中に放出される循環腫瘍細胞は門脈血から肝臓に入り肝静脈血に流れま
す。しかしながら、ほとんどの循環腫瘍細胞は肝転移形成能をもたず肝臓内で排除されるため、門脈血中より肝
静脈血中に肝転移形成能をもつ循環腫瘍細胞が多く分布することが予想されます。
我々は、膵癌患者の門脈血、肝静脈血から採取した数少ない循環腫瘍細胞の特徴を比較し、肝静脈血中に含まれ
る循環腫瘍細胞がより高い肝転移形成能を持っている可能性を示唆しました。またゲノム解析により門脈血と肝
静脈血の循環腫瘍細胞の遺伝子発現量には少なからず差異を認めていることが分かりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝静脈血中に含まれる循環腫瘍細胞に特徴的な遺伝子の変化は肝転移形成能の獲得に

つながる新規のドライバー遺伝子であり、治療標的となりうる可能性が高いと考え

られます。今回の研究で明らかとなりつつある門脈血と肝静脈血の循環腫瘍細胞の遺伝子発現の差異により、膵
癌肝転移機構が解明されれば、循環腫瘍細胞そのものを治療標的とする創薬基盤を創出する可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) of pancreatic cancer travel from portal vein
to hepatic vein through the liver. However, most CTCs have a low metastatic potential and are
spoiled in the liver. We expect that CTCs having a high metastatic potential are more frequently
seen in hepatic vein than portal vein.

We compared the characteristics of a few CTCs obtained from portal vein and hepatic vein in the
patients with pancreatic cancer and suggested that CTCs present in hepatic vein had a higher
metastatic potential. Furthermore, there was not a little gene expression differences between CTCs
of portal vein and hepatic vein by genome analysis.

研究分野：外科系臨床医学

キーワード：膵癌 循環腫瘍細胞 肝転移 RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

膵癌の治療と予後

膵癌は我が国において増加傾向にあり、早期診断、治療法の開発が喫緊の課題である。手術が唯一根治を期待できる治療であるが、再発率は高く、特に肝転移再発は術後早期に起こり、その予後は甚だしく不良である。膵癌転移機構の解明とそれに基づく新たな分子標的治療薬の開発が切望されている。

Circulating Tumor Cell (CTC) CTC は原発巣から血中に遊離した転移カスケードの key component とされ、末梢血 CTC は治療効果判定や予後予測因子として注目されているが、膵癌患者の末梢血に同定される CTC はわずかである。これは原発巣から遊離された CTC は門脈、肝静脈を経て肝臓や肺にトラップされることによる。最近、門脈血中 CTC 数が膵癌術後肝転移再発の予測因子となると報告されたが、ほとんどの CTC は転移形成能がなく排除されるため、門脈血中 CTC の臨床的意義は確率論の域を出ない。肝血流は肝静脈血にドレナージされ、微小な肝転移巣からの CTC は肺の毛細血管を通過するまでは肝静脈から下大静脈血内に留まるため、肝静脈血中に多く分布する CTC が肝転移形成能を有する集団であると考えられる。最近、シングルセルレベルでのトランスクリプトーム解析が可能となり、CTC に関する研究が飛躍的に進んでおり、膵癌転移機構に重要な役割を担うと考えられる CTC の転移形成能獲得の礎となるドライバー遺伝子は何であるか、血液間での CTC の遺伝子発現の表現型の差異は臨床的に意義があるかを明らかにすることは非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

膵癌 CTC のシングルセル解析により肝転移巣形成の機序を明らかにすること、肝転移形成能を有する CTC の存在が微小肝転移のバイオマーカーとなりうるかを検証することで CTC そのものを治療標的とする創薬基盤を創出する。

3. 研究の方法

膵癌肝転移のバイオマーカーとしての肝静脈血中 CTC の有用性の検討

膵癌肝転移症例 (Stage)、膵癌切除症例 (Stage -)を対象とし、術中に採取した肝静脈血、門脈血、末梢血から微小流路デバイス法 (Microfluidic Chip; 日本遺伝子研究所)により CTC を捕捉する。CK(+),Vimentin(-),CD45(-)または、CK(-),Vimentin (+),CD45(-)の CTC 数をカウントし、血液間での比較、肝転移の有無 (術後早期肝再発: 3 か月以内)や臨床病理学的因子との相関を検討する。

肝静脈・門脈血中 CTC のトランスクリプトーム解析

当初、CTC のシングルセル解析を予定していたが、オンチップ・バイオテクノロジーとの共同研究にてフローサイトメトリーを用いた CTC ソーティングを行った結果、CTC の純度が担保できないため、bulk の CTC を用いたトランスクリプトーム解析を行う計画に変更した。

(1) CTC 分離 (MINDEC 法)

当センターで膵癌切除を行う 10 症例を対象とし、術中に採取した肝静脈血、門脈血からマイクロ流路チップ・セルソーター (On-chip Biotechnologies Co. Ltd)を用いて CTC をソーティングする。CD45, CD16, CD19, CD163, CD235a 陰性条件中のゲート内で上皮系マーカーであ

る EpCAM と間葉系マーカーである Vimentin を用いて純度の高い CTC を解析・分取する。

(2) CTC トランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

(1)で分取した cell lysate からライブラリーを作製し、次世代シーケンサ NovaSeq, Illumina を使用し、RNA シークエンシングを行う。

(3) RNA-seq データ解析

網羅的に得られた遺伝子発現やスプライシングバリエント、融合遺伝子の有無において肝静脈血、門脈血間での差異を解析し、肝静脈血中に多く分布する CTC が肝転移形成能を有する集団であるという仮説のもと、肝転移形成能を有する CTC の表現型を明らかにする。

トランスクリプトーム解析結果の臨床的意義(バイオマーカー)、機能解析

多数の膵癌手術症例の末梢血を用いてトランスクリプトーム解析より得られた肝静脈血中に多く分布する CTC に特有な遺伝子発現、スプライシングバリエント、融合遺伝子 (“特有な遺伝子異常”)の有無をデジタル PCR やシーケンサーを用いて検索し、肝転移再発を主評価項目とし膵癌術後の予後や治療効果のバイオマーカーとなりうるかを検証する。また膵癌培養細胞株を用いた当該遺伝子の機能解析を行う。

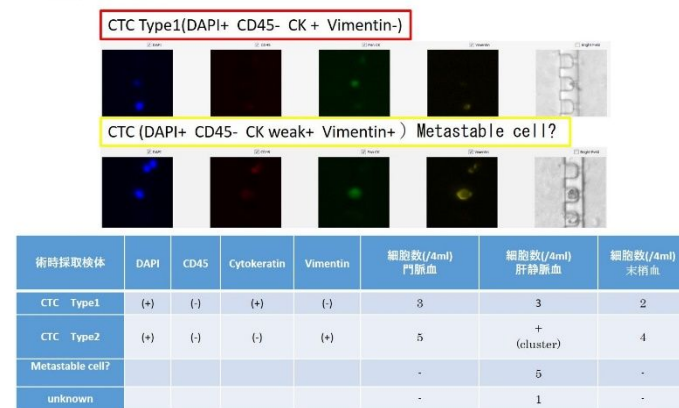
4. 研究成果

膵癌肝転移のバイオマーカーとしての肝静脈血中 CTC の有用性の検討

術前診断で膵癌と診断された 3 例を選定し、肝静脈血、門脈血、末梢血を採取した。2 例は手術時肝転移のない Stage IIB の膵癌、1 例は肝転移を有する Stage IV の膵癌症例であった。微小流路デバイス法により捕捉した CTC 数をカウントした (全血 4ml 中)。Stage IIB の 2 症例の門脈血、肝静脈血中いずれにも上皮系 CTC が存在していた。そのうち 1 症例の肝静脈血中には、門脈血中にはみられない間葉系 CTC や上皮系、間葉系の両極の特性をもつ "metastable cell" を認めた。肝転移を有する

Stage IV 症例では他 2 例と比較して肝静脈血、門脈血中の CTC 数は多く、特に間葉系の CTC が多く存在していた (図 1)。さらに肝静脈血中のみに多くの "metastable cell" を認めており、両血液間には異なる phenotype (転移形成能) をもつ CTC が含まれる可能性を示唆した。当初 10 例を予定してい

図1 55歳, M pStage IV

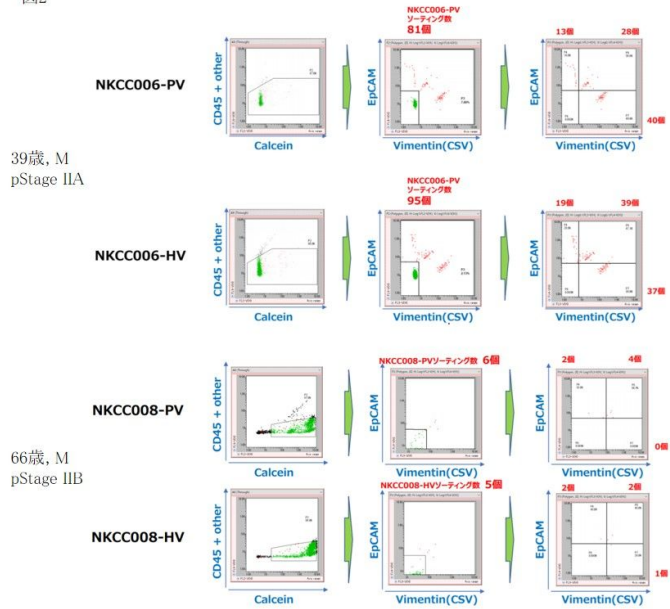


たが、肝転移を有する症例で門脈血 CTC とは phenotype が異なる CTC が肝静脈血中に含まれていることが明らかとなり、3 例のみの解析で終了とし、トランスクリプトーム解析に移った。

肝静脈血中 CTC のトランスクリプトーム解析

異なる phenotype をもつ CTC のゲノム変化を網羅的、統合的に解析するべく、オンチップ・バイオテクノロジーとの共同研究にてフローサイトメトリーを用いた CTC ソーティングを行い、条件設定後に RNA を抽出した (図 2)。具体的には健常人末梢血および PC9 細胞株を使用し、CD45,CD16,CD19,CD163,CD235a 陰性条件で EpCAM と Vimentin を用いて純度高く CTC が採取できるようゲート設定を行った。また同条件で採取した血球細胞の RNA-QC を行い、RIN 8.5 であり、解析に足ることを確認した (Agilent BioAnalyzer RNA60000 Pico)。

図2



RNA-seq データ解析

3 症例において RNA シークエンシングをおこない網羅的な解析を開始した。Variance が高い top 10000 の遺伝子をもとに各症例、血液間でクラスタリング解析を行った (図 3)。症例間の遺伝子発現量の差異が大きい分、肝静脈血 CTC と門脈血 CTC の遺伝子発現量の差異については、現在のところ明確なものには至っていない。しかしながら、個々の症例における肝静脈血 CTC と門脈血中 CTC の遺伝子発現量には少なからず差異を認めているため、GSEA 解析や pathway 解析を行い、肝転移形成に関連する遺伝子群を抽出すべく鋭意解析中である。

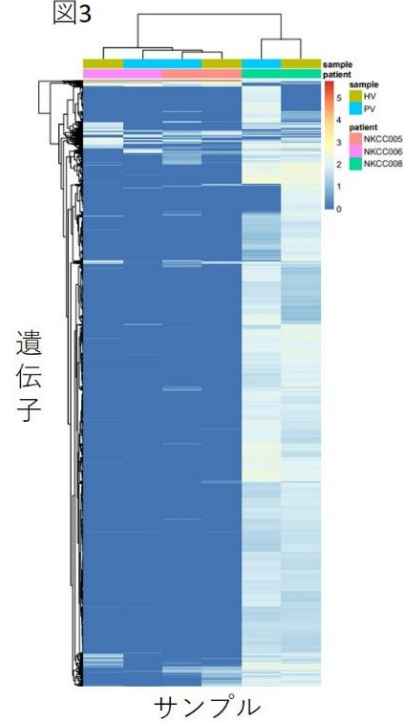
<引用文献>

Pantel K et al. Nat Rev Cancer 2004;4:448-56.

Catenacci et al. Gastroenterology 2015;149:1794-1803.

Jiao LR et al. J Clin Oncol 2009;27:6160-5.

図3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉町 圭史 (SUGIMACHI Keishi) (90452763)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・肝胆膵外科医長 (87102)	
研究分担者	古川 正幸 (FURUKAWA Masayuki) (70601912)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・副院長 (87102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関