

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09293

研究課題名(和文) 肺癌における新開発マイクロ流路システムを用いた循環腫瘍細胞の検出と臨床応用

研究課題名(英文) Detection of circulating tumor cells with novel microfluidic system in lung cancer

研究代表者

田中 文啓 (Fumhiro, Tanaka)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：10283673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新開発マイクロ流路システム(CTC-chip)によって循環腫瘍細胞(CTC)を効率よく捕捉・検出するための基礎検討を行った。上皮細胞接着因子(EpCAM)の抗体を用いることで、血中に含まれる腫瘍細胞(特に上皮性の表現型をもつ癌細胞)を高感度で捕捉できる系を構築した。捕捉された細胞は、CTC-chip上での免疫蛍光染色にて判定した。血中にはCTCの他にリンパ球も含まれるので、サイトケラチンおよび核染色陽性かつCD45陰性の細胞をCTCと判定した。この検出系を用いて実際の肺癌患者の血液サンプルを解析したところ、CTCが検出された群は、検出されなかった群と比べ有意に予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の転移様式としての血行転移はこれまで多くの状況証拠を基に提唱されていたが、実際に血中から癌細胞を分離・採取することは困難であった。しばらく後に抗原抗体反応を利用して血中を流れる腫瘍細胞(循環腫瘍細胞、CTC)を捕捉する概念が生まれ、様々な固形癌で試行されてきた。しかし、肺癌においては捕捉率が低く、感度や特異度の高いCTCの捕捉系の構築が望まれていた。当科ではマイクロ流路デバイスに上皮細胞接着因子の抗体をコーティングすることで、感度及び特異度の高いCTCの捕捉デバイスを構築することが出来た。これによって、癌患者の予後や治療への耐性獲得を予測することが可能となり、臨床の一助となることができる。

研究成果の概要(英文)：A preliminary study was conducted to efficiently capture and detect circulating tumor cells (CTCs) by a newly developed microfluidic system (CTC-chip). Using an antibody against epithelial cell adhesion factor (EpCAM), we constructed a system that can capture tumor cells (especially cancer cells with epithelial phenotype) in the blood with high sensitivity. Since blood contains lymphocytes as well as CTCs, cytokeratin- and nuclear-stain-positive and CD45-negative cells were identified as CTCs. The captured cells were determined by immunofluorescence staining on the CTC chip. Blood samples from actual lung cancer patients were analyzed using this detection system, and the group with CTCs detected had a significantly poorer prognosis than the group without CTCs detected.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：循環腫瘍細胞 肺癌 マイクロ流路システム

1. 研究開始当初の背景

遠隔転移の検出とその制御は、がんの診断と治療において重要である。特に肺癌では、術前にCT/PET等で遠隔転移が検出されない症例に完全切除が達成されても、術後に高頻度に転移再発を生じる。これは、手術時点で既に、原発巣から遊離し脈管内に侵入した腫瘍細胞が微小転移を形成していたためと推測される。従って、微小転移の指標である血液中の腫瘍細胞(循環腫瘍細胞CTC)の検出は、手術適応の決定や手術補助療法の選択等に重要であると期待される。加えて、循環腫瘍細胞の分子生物学的特徴の解析により、標的薬剤(EGFR阻害剤等)や免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1/PD-L1抗体等)等の薬物療法の適切な選択が可能になると期待される。特に最近では、術後補助療法としてのEGFR阻害剤や抗PD-L1抗体の有用性が報告され、投与症例の適切な選択や効果モニタリングを行うためのバイオマーカーの確立が強く求められている。末梢血液は繰り返し低侵襲で採取可能なことから、治療効果のモニタリングや薬剤耐性検出等における有用性が期待される(Liquid biopsy)。Liquid biopsyは、血液中に存在する腫瘍細胞由来DNA断片(ctDNA)の検出と腫瘍細胞そのもの(循環腫瘍細胞CTC)の検出に大別される。前者はPCR増幅により比較的容易に高感度検出が可能であることから、既にEGFR阻害剤の感受性変異(Del19やL858R)や耐性変異(T790M)の検出に臨床応用されている。ただ、血液中には正常血球細胞由来のDNA断片が多数混在しているため、PD-L1のような正常細胞にも発現するマーカーの評価はctDNAでは困難であり、正常細胞に存在する変異遺伝子(加齢に伴うTP53変異等)の混入も問題である。これに対しCTCは、腫瘍細胞の形態及び定量評価や機能解析(培養系)等の細胞レベルでの解析に加え、腫瘍細胞におけるPD-L1等の定量的発現評価や包括的遺伝子異常解析等の多彩な分子生物学的解析に適応可能であるという多くの利点を有する。しかしながら、無数の正常血球細胞の中に混在する微量の腫瘍細胞の検出は技術的に困難である。現在臨床使用可能なCTC検出システムはCellSearch(但し、米国で大腸・前立腺・乳癌に限定)のみであるが、CellSearchを用いた我々の研究では、CT/PET等で遠隔転移が確認された肺癌症例の約30%でCTCが検出されず(偽陰性)、検出感度不足が示唆された。そこで我々は高感度CTC検出系の開発に取り組み、マクロ流路システム(CTC-chip)を完成させた。この新開発CTC-chipは、CellSearchを超える高感度CTC検出や捕捉したCTCの分子生物学的解析が可能であることがこれまでの基礎研究や予備臨床研究で示され、微小転移の指標として期待されるがその臨床的有用性は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新開発CTC-chipにより捕捉検出された循環腫瘍細胞(CTC)の肺癌臨床における有用性、具体的には 1) CTCが予後予測および治療効果モニタリングに有用か、2) CTCの分子生物学的特徴による治療効果予測(EGFR変異とEGFR阻害剤の効果など)や耐性検出等に有用か、を明らかにすることである。本研究は独自に開発した高感度CTC検出システム(CTC-chip)を用いる点で独創的である。また捕捉したCTCの分子生物学的特徴とその臨床的意義を解析しうる点で、個数評価のみであるCellSearchより応用範囲

が広く肺癌の診断と治療、特に周術期薬物療法の治療 効果向上、に貢献すると期待される。

3 . 研究の方法

1) CTC-chipによるCTC検出感度とその臨床的意義の解明

- 新開発CTC-chipを用いて末梢血より循環腫瘍細胞(CTC)を分離。細胞質染色(サイトケラチン)及び核染色で腫瘍細胞の確認を行い、CD45染色にて陽性細胞(混入したリンパ球)を除外。CTC個数や検出感度を対照群(CellSearch)と比較検討。
- 循環腫瘍細胞(CTC)の定量的評価は自動画像解析システムによる高速処理が可能か否かを同時に検討。
- CTC個数と臨床病理学的因子・予後との関連を検討し、肺癌におけるCTCの診断能や進行度・予後予測因子等を明らかにする。

2) CTCのEGFR変異等の遺伝子異常の解析とその臨床的意義の解明

- 臨床検体よりCTC-chipで捕捉した腫瘍細胞からDNAを抽出しPCR増幅の後にEGFR変異解析(感受性変異と耐性変異)等の遺伝子異常解析を行い、変異検出能をctDNAと比較検討する。

4 . 研究成果

本研究では肺癌細胞を捕捉するために上皮細胞接着因子(EpCAM)に対する抗体を流路にコーティングし、蛍光標識した細胞株を健常人全血に添加したCTCモデルをサンプルとして捕捉率(捕捉細胞数/流入細胞数)を算出した。PC-9, NCI-H441は細胞表面にEpCAMを強く発現しており捕捉率はそれぞれ99.4%, 88.8%であった。一方、EpCAMの発現が弱いA549の捕捉率は13.4%に留まった。捕捉された細胞の検出は、chip上での免疫蛍光染色にて細胞質染色(サイトケラチン)及びHoechstによる核染色及び混入するリンパ球を除外するためのCD45染色を行い、サイトケラチン陽性で核を内包かつCD45陰性の細胞をCTCと判定した。基礎検討で得られた至適条件にて肺癌患者末梢血でのCTC検出について検討した。肺癌(または疑い)にて産業医科大学病院呼吸器・胸部外科を受診し、文書による研究参加の同意を得た患者を対象とし、末梢血中のCTCの個数をカウントした。CTCが検出された群は、検出されなかった群と比較して予後が悪い傾向を認めた。また、既知の遺伝子変異をもつ患者の血液より同様の方法でCTCを捕捉し、PCRによる変異解析も可能であることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masatoshi Kanayama, Taiji Kuwata, Masataka Mori, Yukiko Nemoto, Natsumasa Nishizawa, Rintaro Oyama, Hiroki Matsumiya, Akihiro Taira, Shinji Shinohara, Masaru Takenaka, Kazue Yoneda, Koji Kuroda, Takashi Ohnaga, Fumihito Tanaka	4. 巻 113
2. 論文標題 Prognostic impact of circulating tumor cells detected with the microfluidic "universal CTCchip" for primary lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1028, 1037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15255. Epub 2022 Jan 28	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中文啓、米田和恵、橋本昌樹、長谷川誠紀
2. 発表標題 呼吸器悪性腫瘍における循環腫瘍細胞の臨床的意義
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金山雅俊、森將鷹、柴田泰治、米田和恵、大永崇、田中文啓
2. 発表標題 "Universal CTC-chip"によるEMTを起こした循環腫瘍細胞の捕捉システム確立に向けた検討
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森將鷹、小山倫太郎、金山雅俊、平良彰浩、黒田耕志、大永崇、田中文啓
2. 発表標題 凍結PBMCを用いたCTC-chipでの循環腫瘍細胞捕捉系の構築
3. 学会等名 第5回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田和恵、大永 崇、田中文啓
2. 発表標題 原発性肺癌におけるポリマーCTCチップとLiquidBiopsyによる循環腫瘍細胞（CTCs）の検出
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山雅俊、森將鷹、柴田泰治、米田和恵、大永崇、田中文啓
2. 発表標題 胸部悪性腫瘍におけるUniversal CTC-Chipを用いた循環腫瘍細胞の捕捉と臨床応用への取り組み
3. 学会等名 第5回CTC臨床応用研究会
4. 発表年 2022年

〔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	米田 和恵 (Yoneda Kazue) (80724806)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師 (34519)	

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
---------	---------