

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462192

研究課題名(和文) 循環腫瘍細胞を用いた多発肺癌と肺内転移の新たな鑑別システムの開発

研究課題名(英文) Development of a CTC (circulating tumor cell) guided system for discrimination between multiple lung cancer and pulmonary metastases

研究代表者

岩田 輝男 (IWATA, Teruo)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：00435124

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)：多発肺癌(MPL)と肺内転移(PM)の鑑別は重要であるが、臨床病理学的情報やお画像診断情報のみでは両者の鑑別は時に困難である。本研究では、循環腫瘍細胞(CTC)の両者の鑑別における有用性を検討した。多発肺結節を有しMPLまたはPMが疑われる患者を対象に"CellSearch"でCTC検出を試みたが、大部分の患者でCTCが検出されず両者の鑑別には有用ではなかった。そこで新たなCTC検出系としてマイクロ流路システム("CTC-chip")を開発し、基礎実験で高い検出効能が示された。現在は患者血液を用いた検討を行っており、MPLとPMの鑑別能についても検討したい。

研究成果の概要(英文)：Discrimination between multiple lung cancer (MPL) and pulmonary metastases (PM) is clinically important but is sometimes difficult with routine clinic-pathological and imaging modalities. In the current study, we employed circulating tumor cell (CTC) as a marker for the discrimination. We first used "CellSearch" to detect CTCs in patients with multiple lung nodules and with suspicion of MPL or PM, but the CTC-test did not provide any information for the discrimination because CTCs were not detected in most patients. Based on the results, we have tried to develop more sensitive detection system of CTCs, and developed a novel CTC-detection system with microfluidic device ("CTC-chip"). In experimental studies, the "CTC-chip" system provided higher efficiency in capturing tumor cells than "CellSeach". We now evaluate CTCs in the blood sampled from patients, and will evaluate the diagnostic performance of the CTC-test with the "CTC-chip" in discrimination between MPL and PM.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 循環腫瘍細胞 多発肺癌 肺内転移

## 1. 研究開始当初の背景

・原発性肺癌は日本人の悪性腫瘍死因の第1位を占める予後不良の悪性腫瘍である。特に腺癌は近年増加傾向にあり、原発性肺癌の過半数を占める。同一患者に同時性または異時性に複数の肺癌病巣を認める機会が増加しているが、第2癌が第1癌の転移(肺内転移 [pulmonary metastasis, PM])であるのか、原発性肺癌(つまり多発肺癌)であるのかを鑑別することは治療戦略上重要である。両者の組織型が異なる場合には多発肺癌と診断しうるが、同一である場合にはその鑑別は容易ではない。臨床的基準(Martini & Melamedの基準, 1975 Cancer)によって肺内転移(PM)と多発肺癌(multiple primary lung cancer, MPLC)の鑑別が行われてきたが、その妥当性は確立されていない。近年、肺腺癌発生に関与する遺伝子(EGFR 遺伝子、K-ras 遺伝子、EML4-ALK 融合遺伝子、等)が同定され、それぞれの遺伝子変異に個別の治療薬(Gefitinib, Erlotinib, Crizotinib)も開発され既に実臨床で投与されている。

・我々は、多発肺腺癌の遺伝子変異(EGFR 遺伝子、K-ras 遺伝子、EML4-ALK 融合遺伝子)解析から 67.6%の症例が分子生物学的特性から明確に MPLC と PM に鑑別可能であることを明らかにした (Iwata T 他, BJC 2011)。しかし、より精度の高い MPLC と PM の診断方法の確立が期待される。また、遺伝子変異に乏しい扁平上皮肺癌に対しての鑑別に関しては、いまだに臨床的基準のみに頼らなければいけないのが現状である。

・肺癌の治療成績が不良である原因として早期発見や微小転移検出の困難さがあげられる。1)癌発生の初期から腫瘍細胞が原発巣から遊離し血液中を循環する、2)このような循環腫瘍細胞が遠隔臓器に着床し転移が成立する、といった基礎研究結果から、末梢血液中の循環腫瘍細胞(CTC)が早期癌や微小転移の診断法として期待され、米国では自動化検出システムである“CellSearch”を用いた“CTCテスト”が、乳癌・大腸癌・前立腺癌のバイオマーカーとして臨床使用がFDAより認可されている。肺癌においてPMでは、MPLCと比しCTCは多いことが予想される。また、CTCの遺伝子変異の有無及び変異部位に関しては原発巣の特性を反映していることが予想される。CTCの検出はmicrofluidic deviceを用いることによってstageIVの肺癌症例の92%から行うことが可能であり、しかもその遺伝子変異のみならず、2nd mutation(耐性遺伝子変異)の検出まで可能であることが報告されている (NEJM, 2008)。

1)原発性肺癌の30%で末梢血液中に循環腫瘍細胞(CTC)が検出され、かつ肺癌の進行度とCTC陽性率が相関(下図左)

2)肺癌の中でも小細胞癌のCTC陽性率は67%と高く、また予後と有意な相関(下図右)を示したCTC $\geq$ 8個)

・また、現在の“CTC-chip”は、“chip”表面に抗EpCAM抗体を結合させ、血液中を循環する“上皮由来の癌細胞”を捕捉する(“CellSearch”も同様に、抗EpCAM抗体を用いて細胞を捕捉)。しかしながら、上皮由来の癌細胞でも“上皮-間葉系移行(EMT)”により上皮の性格を消失して間葉系細胞様へ変化することが知られており(肺癌での我々の知見:Uramoto H 他, Anticancer Res 2010, Lung Cancer 2011, Br J Cancer 2011 等)、このような癌細胞は上皮細胞マーカーであるEpCAM発現の消失によって、従来のCTC検出システムでは捕捉できない。我々の“CTC-chip”は、chipに自由に抗体を結合できる汎用化チップであり、このような“EMT”を起こした癌細胞の捕捉も可能である。

## 2. 研究の目的

・多発肺癌と肺内転移の鑑別は臨床的病理学的基準が用いられているが正確性に欠ける。我々は、分子生物学的基準を適用することで精度が向上することを報告した (Iwata T 他, Front Biosci 2011)

・また、“CellSearch”で検出した循環血液中腫瘍細胞(CTC)は米国で乳癌/大腸癌/前立腺癌での臨床使用が認可されている。これまでの研究で我々は、肺癌でのその臨床的有用性をはじめて示した(Tanaka F 他, Clin Cancer Res 2009 等)。

・補足したCTCからDNAを抽出し、その遺伝子変異を検索し原発巣のgenotypeと高い相関が得られたことが報告されている (NEJM 2008)

・多発肺癌症例は高齢化と画像診断の進歩、及び肺癌術後の予後延長に伴い著しく増加してきており、肺内転移との鑑別に苦慮することが多く、従来の方法にCTCとそのgenotype解析を加える事で、新しい診断方法に改良することを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) “CTC-chip”による循環血液中の肺癌細胞検出感度の検討と改良

・肺癌細胞株や肺癌患者血液を用いてCTC検出感度を“CellSearch”と比較検討

・“chip”改良による、CTC検出感度や再現性向上を試みる

2) “CTC-chip”により捕捉された腫瘍細胞の分子生物学的特性の解析

・捕捉されたCTCからのDNA/RNA抽出や、遺伝子変異/発現異常解析が可能か否かを検討

・原発巣での癌細胞の生物学的特性との比較検討

・抗EpCAM抗体以外の抗体を用いた腫瘍細胞捕捉(“CTC-chipの汎用化”)の可能性の検討

3) 肺癌患者における staging 別での循環腫瘍細胞数の検討、特にPM1 (T3), PM2 (T4), PM3

(M1a, stageIV) 症例における腫瘍細胞数の検討から、新たな診断基準の提案を行う。

#### 4. 研究成果

多発肺癌と肺内転移の鑑別において現在の臨床病理学的鑑別法では正確性が十分でない。本研究では新たな鑑別マーカーとして末梢血液中の循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) に着目して検討を行った。

(1) 多発肺癌もしくは肺癌の肺内転移が疑われ手術を施行する症例 30 例をを前向きに登録し、末梢血中の CTC を CellSearch System により測定した。解析の結果、両者の鑑別に十分な有用性は認められなかった。CellSearch は CTC 分離・検出の標準的なシステムであるが、微小転移を高感度に検出する能力は不十分であった。

(2) マイクロ流体システムを用いた検出系の検討を中心に行った。このシステムは樹脂で作成した微小流路に任意の捕捉抗体をコーティングして血液 (全血) を流し、目的の細胞を流路上で捕捉・検出する。本研究では捕捉抗体として CellSearch と同様に上皮細胞接着因子 (Epithelial Cell Adhesion Molecule: EpCAM) を用いた。

Cellsearch との比較では同等程度の捕捉能力が認められた。分離した細胞は更にサイトケラチンと CD45、Hoechst で染色し、血液中の「上皮性」細胞をカウントする方法で、臨床検体についても測定を行った。この方法によれば捕捉した細胞の追加染色や、細胞を回収してその生物学的特性を調べることが可能であり、単に細胞数のカウントのみの CellSearch より拡張解析ができる点で優れている。

今後の研究で転移関連因子との関連や、CTC と各病巣における遺伝子学的差異の解析を進めたい。

#### 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 4 件)

1. 岩田輝男, 竹中 賢, 岡 壮一, 宗知子, 浦本秀隆, 田中文啓. 右上葉肺癌と炎症性中葉支狭窄への上中葉管状切除術の一例. 日呼外会誌 2015; 29(4): 491-4. 査読有
2. Hidetaka Uramoto, Ryoichi Nakanishi, Akihiko Uchiyama, Masaaki Inoue, Masakazu Sugaya, Teruo Iwata, Noriyuki Ebi, Takeshi Hanagiri1, Fumihiro Tanaka. A phase II trial of adjuvant chemotherapy with tri-weekly carboplatin plus docetaxel in patients with completely resected

non-small cell lung cancer. World J Respirol 2014; 4(1): 00-00 ISSN 2218-6255(online) 査読有

3. 門司祥子, 岩田輝男, 宗 知子, 浦本秀隆, 花桐武志, 田中文啓. 肋骨原発軟骨肉腫の1切除例 -適切な切除縁の設定に関する検討-. 日呼外会誌 2013; 27(7):817-21. 査読有
4. 岩田輝男, 桑田泰治, 岩浪崇嗣, 浦本秀隆, 田中文啓. Gefitinib 隔日投与 6 症例の検討. 肺癌. 2013; 53: 25-8. 査読有

[学会発表](計 15 件)

1. 岩田輝男, 門司祥子, 田中文啓. 肺癌が疑われた孤立性肺類上皮血管内皮腫の 1 切除例. 第 56 回日本肺癌学会九州支部学術集会北九州国際会議場 (福岡県・北九州市) 2016. 2/26
2. 門司祥子, 近石泰弘, 桑田泰治, 今西直子, 黒田 耕志, 岩田輝男, 田中文啓. c-StageIV と診断されかねなかった p-StageIA 肺癌の 1 切除例. 第 56 回日本肺癌学会九州支部学術集会 北九州国際会議場 (福岡県・北九州市) 2016. 2/27
3. 鈴木 雄, 田浦裕輔, 岩田輝男, 西田千夏, 城戸貴志, 迎 寛. 肺癌精査中にみつかった肺門部重複癌の一例. 第 56 回日本肺癌学会九州支部学術集会北九州国際会議場 (福岡県・北九州市) 2016. 2/27
4. Yoneda K, Chikaishi Y, Kawashima E, So T, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F: Capture of EpCAM-negative circulating tumor cells (CTCs) with a "Universal CTC-Chip". American Association for Cancer Research. Philadelphia 2015 AACR Annual Meeting 2015, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania(USA). 2015 .4.18-22
5. 岩田輝男, 田中文啓. 肺癌が疑われた孤立性肺毛細血管種の 1 切除例 - Solitary capillary hemangioma of the lung - 第 32 回日本呼吸器外科学会総会 サポートホール高松・かがわ国際会議場・JR ホテルクレメント高松 (香川県・高松市) 2015. 5/14
6. 岩田輝男, 田中文啓. 巨大 pleural solitary fibrous tumor の 1 切除例. 第 56 回日本肺癌学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2015. 11/27
7. Chikaishi Y, So T, Oka S, Takenaka M, Hirai A, Iwanami T, Yoneda K, Shimokawa H, Nagata Y, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F: Comparison of Cell Search with polymeric microfluidic devices for CTC isolation using EpCAM-negative tumor cell

lines of malignant pleural mesothelioma. American Association for Cancer Research. San Diego(USA). 2014.4.5-9

8. 岩田輝男, 田中 明, 宗 知子, 浦本秀隆, 田中文啓. 全周性難治性気管狭窄に対し気管管状切除術を施行した1例. 第31回日本呼吸器外科学会 ホテル日航東京(東京都・港区) 2014.5/29-30
9. 岩田輝男, 吉本裕紀, 田中 明, 金山雅俊, 岩浪崇嗣, 宗 知子, 浦本秀隆, 田中文啓. 大血管及び上縦隔浸潤右肺尖部腫瘍をTMA併用胸骨正中切開にて切除し得た1例. 第31回日本呼吸器外科学会総会 ホテル日航東京(東京都・港区) 2014.5/29-30
10. Hidetaka Uramoto, Ryoichi Nakanishi, Akihiko Uchiyama, Masaaki Inoue, Masakazu Sugaya, Teruo Iwata, Noriyuki Ebi, Takeshi Hanagiri, Fumihiro Tanaka. A phase II trial of adjuvant chemotherapy with tri-weekly carboplatin plus docetaxel in patients with completely resected non-small cell lung cancer. The 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology. 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター(福岡県・福岡市) 2014.7/17-19
11. Chikaishi Y, So T, Oka S, Takenaka M, Nakagawa M, Shimokawa H, Iwata T, Nagata Y, Uramoto H, Hanagiri T, Ohnaga T, Tanaka F: Development of detecting systems for circulating tumor cells in malignant pleural mesothelioma patients. American Association for Cancer Research. Washington(USA) 2013.4.6-10
12. 岩田輝男, 松本崇秀, 名部祐介, 門司祥子, 平良彰浩, 竹中 賢, 近石泰弘, 岡 壮一, 永田好香, 下川秀彦, 中川誠, 浦本秀隆, 宗 知子, 花桐武志, 田中文啓. 左膿胸及び左荒蕪肺に対し一期的に左下葉切除と広背筋による膿胸腔充填を施行した1例. 第30回呼吸器外科学会 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) video 2013.5/9-10
13. 岩田輝男, 松本崇秀, 名部祐介, 門司祥子, 平良彰浩, 竹中 賢, 近石泰弘, 岡 壮一, 永田好香, 下川秀彦, 中川誠, 浦本秀隆, 宗 知子, 花桐武志, 田中文啓. 放射線治療後の超高齢心不全腎不全合併肺癌に肺動脈形成術施行し切除し得た1例. 第30回呼吸器外科学会 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) video 2013.5/9-10
14. 岩田輝男, 松本崇秀, 名部祐介, 門司祥子, 平良彰浩, 竹中 賢, 近石泰弘, 岡 壮一, 永田好香, 下川秀彦, 中川

誠, 浦本秀隆, 宗 知子, 花桐武志, 田中文啓. 右上葉肺癌気管支浸潤と炎症性気道狭窄に対して右上中葉管状切除術を施行した1例. 第30回呼吸器外科学会 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) video 2013.5/9-10

15. 岩田輝男, 竹中 賢, 近石泰弘, 岡 壮一, 平井文子, 岩浪崇嗣, 永田好香, 下川秀彦, 宗 知子, 浦本秀隆, 花桐武志, 田中文啓. 難治性気管狭窄に対し気管管状切除術を施行した1例. 第30回福岡胸部外科疾患研究会 都久会館(福岡県・福岡市) 2013.6/29

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩田 輝男 (IWATA, Teruo)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号: 00435124

### (2) 研究分担者

米田 和恵 (YONEDA, Kazue)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80724806

浦本 秀隆 (URAMOTO, Hidetaka)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90389445

田中 文啓 (TANAKA, Fumihiro)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10283673