

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09191

研究課題名(和文)次世代型テロメスキャンによる肺癌血中循環腫瘍細胞の解析からウイルス治療薬への展開

研究課題名(英文)The analysis of circulating tumor cell measurement of lung cancer by next generation TelomeScan

研究代表者

十合 晋作(TOGO, Shinsaku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80365634

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)：テロメラーゼを発現する細胞を特異的に感染させ蛍光緑色発色させて検出する遺伝子改変分子標的アデノウイルス(テロメスキャン)を用い、末梢血採血中の血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cell; CTC)を超早期肺癌患者Stage0-Iaで58.2%と血清CEA陽性率(11.7%)と比較して圧倒的な高感度での肺がん早期診断に成功した。非小細胞肺癌患者のCTCのほとんどが間葉系-CTCであった。間葉系のCTCは癌幹細胞と関連が強く治療抵抗性で悪性度が高いと考えられ、より鋭敏ながん臨床診断マーカーとなることを報告した。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) have a crucial role in the clinical outcome of cancer patients. The new telomerase-specific replication-selective adenovirus TelomeScan F35 (OBP-1101) can detect EMT-CTC without the detection based on epithelial markers. We measured the CTC from NSCLC patients showed mesenchymal phenotype CTC (EMT-CTC). Peripheral venous blood samples and clinicopathological data were collected from 123 NSCLC patients. The sensitivity of CTC detection was 69.1% and among the EMT-CTC samples, 46% were vimentin positive and 39.0% of non-EMT-CTC samples were EpCAM positive. Patients testing positive for EMT-CTCs at baseline had poor response to chemotherapy and decreased progression-free survival in comparison to those testing negative. TelomeScan F35 is a highly sensitive CTC detection system and will be a useful screening tool for early diagnosis of NSCLC patients. Mesenchymal-phenotype CTCs are crucial indicators of chemotherapeutic efficacy in NSCLC patients.

研究分野：肺癌

キーワード：循環腫瘍細胞 テロメスキャン 上皮間葉転換 非小細胞肺がん 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

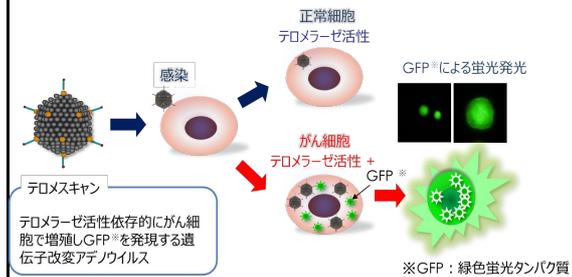
肺がんは、がん死亡要因1位で増加傾向であるが、早期発見による根治的手術症例でも再発率は高く9割は転移再発病巣の合併症により死亡する。採血等でより高感度にCTCの検出が実現化すれば早期診断から再発予測による予防的治療、抗がん剤の奏効/耐性化予測から個別化医療にむけたより効果的な治療法の提供が非侵襲的に評価可能となる。

がん細胞は血液の流れに乗って遠隔臓器に生着して転移を起こす。この血中に浮遊する細胞を血中循環癌細胞(Circulating Tumor Cell; CTC)と呼び、これを捕捉するシステム(CellSearch System; CSS)が米国のveridex社によって開発され、乳がん転移に関する臨床試験が実施された。そして、末梢血液7.5mlあたりEpithelial cell adhesion molecule (EpCAM)陽性のCTCが5つ以上検出される転移性乳がん患者は、予後が悪いことが示された(Cristofanilli M et al., N Engl J Med. 2004)。しかし、本年度の米国腫瘍学会で乳がんの臨床試験 SWOG S0500 に CSS が導入されたが化学療法治療前後における CTC 計数による奏効予測の有用性は否定された。

米国で医療承認(FDA)を得て商品化されている CSS では、CTC を捕捉するために EpCAM 抗体をマーカーとして用いるが、癌の進行に伴う EpCAM の発現の低下や上皮間葉移行(EMT)による EpCAM の陰性な CTC の検出には対応していない。よって、この手法では多くの EpCAM 陰性の CTC の検出限界が示唆されている。(Konigsberg R et al., Acta Oncol. 2011)。CTC の捕捉には、他にも抗原抗体反応、誘電泳動力、サイズ分画、細胞形態識別を利用した手法の開発が行われているが、いずれも検出感度が低いことが課題である。この CSS の弱点を克服するため、我々は CTC の

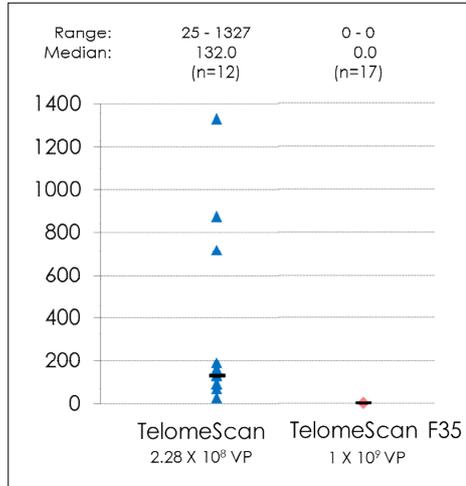
測定に児島らのテロメスキャン法を採用した(J Clin Invest. 2009)。癌細胞はテロメアを維持する分子機構を獲得しておりテロメラーゼの活性により無制限の増殖能を有している。このテロメラーゼを発現する腫瘍細胞を標的とした分指標的ウイルス製剤に GFP を組み込んだアデノウイルスベクターを共感染させると腫瘍細胞選択的にアデノウイルスが増殖する。この測定法により GFP の緑色蛍光発色した生きた CTC のみの計数が可能となり極めて高感度に可能となる(図1)。

図1) テロメスキャンの CTC 検出機序



テロメスキャンは初期遺伝子(E1 遺伝子)のプロモータをテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子(hTERT)プロモータと置換し、テロメラーゼ陽性細胞すなわち癌細胞特異的にウイルス複製を起こす。hTERT 依存的なウイルス複製は、下流に挿入した緑色蛍光蛋白質(GFP)の発現・発光により蛍光検出が可能となる。さらに、テロメスキャン F35 は細胞への感染に寄与するファイバータンパク質を従来型の5型から35型アデノウイルスに置換し感染性を向上させ血球特異的なマイクロRNAの標的配列を組み込むことで血球系細胞の擬陽性の排除を実現し、より高感度/特異度に血液サンプルからCTCを捕捉が可能となった(図2: テロメスキャンF35)。

図2)テロメスキャンF35における擬陽性排除



がん細胞は初期段階からテロメラーゼ活性が高く、その性質を応用したテロメスキャン F35法は、がんの早期検出のみならず癌細胞に対する分子標的ウイルス製剤への応用まで、広範な可能性を秘めている。また、肺癌原発巣では早期段階から EMT マーカーが発現しそのようなタイプの肺癌は早期での根治手術後も再発の生存期間が短いことが報告されている。従来、EpCAM 陽性の血中細胞が“CTC”と定義され、CTCの捕捉にはCSSなどの抗体を用いたシステムが採用されてきた。しかし、血中循環に移動するために EMT を起こし浸潤能が亢進させた多くのがん細胞は、CTC マーカーとして使われている EpCAM や CK の発現を喪失している可能性が高い。テロメスキャン法は細胞表面抗原を認識する抗体ではなく、テロメラーゼを指標として高効率に癌を捕捉する手法のため、EMT を起こした EpCAM 陰性の CTC (EMT-CTC) も捕捉可能である。この利点は本研究を遂行する上で非常に重要なポイントとなる。乳がん患者では抗癌剤の耐性化と再発時に EMT-CTC が増加し EMT を起こした CTC は癌幹細胞と関連が強く治療抵抗性で悪性度が高いと考えられている (Yu M et al., Science, 2013)。よって EMT-CTC を制御することが薬剤耐性や再発を防ぎ生存期間を延長につながることを期待される。我々は EMT-CTC の治療臨床経過上の推移を測定し、

治療奏効/耐性/再発としての鋭敏なバイオマーカーであることを検証していく。高感度 CTC 検出システムである次世代型テロメスキャン F35 の臨床応用及び分子標的ウイルス製剤としての有効性を明らかにすることは肺癌のみならず全ての癌患者の生命予後の改善につながり学術的意義は非常に大きい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代型の血中循環癌細胞 (CTC) 検出システムである F35 テロメスキャン法を用いた非小細胞肺癌での臨床応用である。CTC 検出法は米国 (FDA) で認可された CellSearch System (CSS) が主流で細胞表面抗原を認識する抗体を用いた CTC 検出法だが非小細胞肺癌の検出感度は低く有用性は疑問視されている。一方、本邦で開発されたテロメスキャンは、癌で高発現しているテロメラーゼを認識する遺伝子組み換えアデノウイルスを感染させることで高効率に CTC を捕捉する手法である。本研究ではテロメスキャン F35 システムで CTC を高感度に検出し、非小細胞肺癌の早期診断から個別化医療に向けた革新的な手法であることを立証し、世界初の画期的な臨床応用システムの実現を目指す。

3. 研究の方法

テロメスキャン F35 法による CTC 測定は共同研究施設としてオンコリス社に血液サンプルを送り委託測定で進める。研究代表者の十合を中心としてオンコリス社とともに取り出した CTC サンプルから血球系マーカー CD45 の陰性の確認と同時に癌幹細胞 (CD44, CD133)、間葉系 (Vimentin)、上皮系マーカー (EpCAM) の抗体を用い EMT や癌幹細胞マーカーの細胞免疫染色を行い EMT-CTC や循環腫瘍幹細胞の存在を確認する。患者データベースより臨床情報とフェノタイプ別の CTC の測定値との相関を検討し再発、薬剤奏効/耐性、予後予測などの臨床的バイオマーカーとしての有用性を検討する。研究代表者は既にヒト非小細胞肺癌患者の測定結果

(n=50)からテロメスキャン F35 は早期段階から CTC の検出が高感度に可能であることを実証し臨床検体の測定は実稼働の段階である。また、テロメスキャン F35 法による CTC 検出が十分であるか評価するために、感染させたウイルス由来の GFP シグナルだけでなく、EpCAM、Cytokeratin (CK)等の細胞表面抗原について免疫染色を同時に実施することで、検出法の裏付けを行った。実際、非小細胞肺がんと同定された CTC のほとんどは EpCAM 陰性の EMT-CTC でありこの事実が CSS 法での検出限界とテロメスキャン F35 法の有利な点であることを確認した。同時に健常人血液サンプルにおいて全例 CTC が陰性であり特異度 100%を達成し、非小細胞肺癌の早期発見にも信頼性の高い測定方法であることを確認した。

- (1) 主に手術前の早期肺がん患者より採取した血液を試験に使用する。我々は既に Stage Ia 期の早期肺がんの術前検体より約 3 割に EMT-CTC を同定している。術前 CTC 陽性症例で術後再発が速いか検討を行う。術後転移・再発した症例については、転移・再発時の CTC 数変化について評価する。
- (2) 化学療法が選択される進行期肺がん患者 50 症例を目標に、化学療法直前、投与後 1 コース後に採血して CTC 数を測定する。実際の抗癌剤の奏効と CTC の経時変化の解析から抗癌剤の奏効予測、再発/耐性予測が可能か検討を行う。また、CTC に発現する関連遺伝子や分子標的薬の奏効に関連する Drivers Mutation (EGFR 遺伝子変異、EML4-ALK 融合遺伝子など)の解析を行う。
- (3) 病理組織像(組織学的悪性度、浸潤度)と相関するか、リンパ節転移、遠隔転移、Stage 分類、予後などの臨床情報と CTC 数の関連性について評価する。

4. 研究成果

非小細胞肺がんと同定された CTC のほとんどは EpCAM 陰性の EMT-CTC(図 5-C)であり、この事実は CSS 法での検出限界とテロメスキャン

F35 の有利な点であることを示し、非小細胞肺がんの早期発見における信頼性の高い測定方法であることを立証した。昨年度の以下の研究成果として、テロメスキャン F35 を用いた 120 症例の肺がん患者の CTC 解析から臨床バイオマーカーとしての有望性の検証を行い、

- (1) 全病期の非小細胞肺がんの約 70%で CTC 検出が可能であった。その内約 46%が CSS 法で検出不可能な間葉系の表現型を持つ EMT-CTC であり、CTC 陽性 85 人中 57 人の 67%が EMT-CTC 陽性であった。早期でも EMT-CTC は約 40%、Non-EMT-CTC と比較してより高率に同定された。
- (2) 早期肺がん(Stage 0-IA)では血清腫瘍マーカーの CEA(CEA 5.0 を陽性:12%)により CTC(CTCs 1 個/7.5ml を陽性:58%)の感度が圧倒的に高く、検診などのがん早期発見のスクリーニングにおける有用性が示唆された。
- (3) 化学療法前の EMT-CTC 陽性症例では、有意に治療奏効率の低下と無増悪期間(PFS)の低下が認められ EMT-CTC は治療奏効予測及び予後のより鋭敏なマーカーとなることが示唆されている。
- (4) CD133 陽性となる循環腫瘍がん幹細胞の特性を持つ EMT-CTC の存在も認められた。
- (5) ALK 阻害剤が有効な肺がんの Driver 変異である EML4-ALK 遺伝子変異陽性患者の CTC から FISH 法により EML4-ALK 遺伝子変異を検出し評価可能であることを発見した。ALK 阻害剤投与患者における非侵襲的な液体生検でテロメスキャン F35 による ALK 遺伝子変異 FISH 陽性 CTC のモニタリングが可能で、将来的に ALK 阻害剤の奏効/耐性予測評価が期待されることを確認した。

以上の結果より、テロメスキャン F35 の非

小細胞肺がんの EMT-CTC の高感度測定は早期から可能であり、さらに鋭敏な抗がん剤感受性/組織学的浸潤度予測の有用な臨床マーカーとなることを証明した。また、テロメスキャン F35 による CTC 測定は、がん検診やドックのスクリーニングにおけるがん早期発見に有用な簡易測定検査法となることが期待された。本研究成果は、Oncotarget に 2017 年報告した。本結果より全ての固形がん腫を対象として特許出願中であり論文報告後に特許承認へ進む(特願 2014-099955: 細胞の検出方法)。

また、テロメスキャン F35 は CTC にアデノウイルス(OBP-1101)が感染後増殖することにより 72 時間以内に細胞死に至ることを確認した。治療奏効率の向上、耐性化阻止、再発阻止に極めて有効な CTC の標的治療候補薬としてもテロメスキャン F35 は有効と考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Sensitive detection of viable circulating tumor cells using a novel conditionally telomerase-selective replicating adenovirus in non-small cell lung cancer patients. Togo S, Katagiri N, Namba Y, Tulafu M, Nagahama K, Kadoya K, Takamochi K, Oh S, Suzuki K, Sakurai F, Mizuguchi H, Urata Y, Takahashi K. Oncotarget. 2017 May 23;8(21):34884-34895. doi: 10.18632/oncotarget.16818.

Efficient detection of human circulating tumor cells without significant production of false-positive cells by a novel conditionally replicating adenovirus. Sakurai F, Narii N, Tomita K, Togo S, Takahashi K, Machitani M, Tachibana M, Ouchi M, Katagiri N, Urata Y, Fujiwara T, Mizuguchi H. Mol Ther Methods Clin

Dev. 2016 Mar 2;3:16001. doi: 10.1038/mtm.2016.1. eCollection 2016.

〔学会発表〕(計 3 件)

Shinsaku Togo. High Sensitive Detection of Circulating Tumor Cells Including EMT-CTCs in NSCLC Patients by TelomeScan F35 Tri-Conference 2015 十合晋作。非小細胞肺癌患者における循環腫瘍細胞のテロメスキャン F35 による高感度検出 第 73 回日本癌学会学術総会 2014

十合晋作。TelomeScan F35 による非小細胞肺癌の循環腫瘍細胞の高感度測定法 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2014

〔図書〕(計 2 件)

十合晋作、片桐伸悦、浦田泰生、高橋和久。肺がんバイオマーカーとしての循環腫瘍細胞解析の展望。一般社団法人呼吸研究 呼吸34巻12号 Page1152-1158 (2015)

十合晋作、高橋和久。肺がんバイオマーカー 循環腫瘍細胞の現状とテロメスキャンF35法を用いた高感度検出法。科学評論社 呼吸器内科26巻6号 Page462-468(2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

発明の名称：細胞の検出法 (申請)

出願番号：PCT/JP2015/064124号

出願日：2015年12月5日

出願人：順天堂大学/オンコリスバイオフィーマ社

発明者：十合晋作、高橋和久、浦田泰生

国内外の別：国内

取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

日刊工業新聞の紙面掲載

6．研究組織

(1)研究代表者

十合 晋作(TOGO, Shinsaku)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：80365634

(2)研究分担者

小見山博光(KOMIYAMA, Hiromitsu)
順天堂大学・医学部・講師
研究者番号：30348982

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

難波由紀子(NAMBA, Yukiiko)
順天堂大学・医学部・助教

ミニワントラフ(MINIWAN, Torafu)
順天堂大学・医学部・研究員