

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19418

研究課題名(和文) 癌幹細胞性を有する循環腫瘍細胞を標的とした個別化医療の開発

研究課題名(英文) Development of personalized therapy targeting circulating tumor cells with cancer stem cell properties

研究代表者

長谷 哲成 (Hase, Tetsunari)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：30621635

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)：肺癌患者から採血を行い、循環腫瘍細胞の分離を行っている。また、遺伝子解析に関しては、whole genome amplificationの技術を用いて、single cellからのEGFR遺伝子変異の検出やMET増幅などの定量を行った。同様にsingle cellからの遺伝子発現解析も行うことが可能であった。また、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測を行うPDL1の発現をsingle cellレベルで確認した。今後上記で得られた研究成果を更に発展させ、肺癌患者の分子標的薬の耐性機序を確認するための新たな臨床試験を立案し、実臨床での有用性を評価する予定としている。

研究成果の概要(英文)：Circulation tumor cells (CTCs) were isolated from patients with lung cancer. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and MET amplification were detected successfully in single CTC using whole genome amplification technology. Also, gene expression analysis and PDL1 expression in single CTC were done successfully. On the basis of these results, we prepared clinical trials for evaluation of molecular mechanisms of resistance to targeted therapies.

研究分野：肺癌

キーワード：循環腫瘍細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在我が国において悪性新生物は全死因の第一位である。中でも肺癌は第一死因であり、肺癌に対するより有効な治療戦略を確立することは急務である。

固形癌における脳転移や骨転移などの遠隔転移は、予後不良因子の一つである。肺癌においては遠隔転移がしばしば認められ、本邦においても診断時にはおよそ3割で遠隔転移を認めると報告されている(院内がん登録2012年集計報告)。外科切除を受けた症例も主に遠隔転移から再発し、最終的には患者の約96%が肺癌の為に死亡すると報告されている(American Cancer Society: Cancer Facts & Figures 200, 1-40, 2000)。遠隔転移の形成には、原発巣から循環血液中に侵入した循環腫瘍細胞(Circulating tumor cells; CTC)の関与が推測されており、その解析は肺癌の転移の解明・新たな治療法の開発につながる事が期待されている。また、近年の分子標的薬の進歩により、治療ターゲットとなる複数の遺伝子変異が見つかっている。肺癌を含めた癌の分子標的治療は患者の遺伝子プロファイルに依存することが予想され、CTCを解析することが可能となれば、遺伝子プロファイルの連続的なモニターが簡単な採血で評価できるようになると考えられている。

多くの単一のCTC(single CTC)は既にアポトーシスを起こしている一方で、CTC clusterといわれる複数のCTCが互いに接着し細胞塊を形成したものはアポトーシスに抵抗性であることが示され、小細胞肺癌ではこのCTC clustersの存在が予後不良因子であることが示されている(Hou et al. Am J Pathol 2011, J Clin Oncol 2012)。これは前者が血液中での接着喪失によるアポトーシス(アノイキス)を起こすのに対し、後者が互いに接触しているためアノイキスに対し抵抗性になったと推測されている。また前述したsphere形成細胞を考えた場合、互いに接

触した細胞塊を形成することから、CTC cluster内に癌幹細胞性を有する細胞が含まれる可能性が考えられる。また、近年の報告ではこのCTC cluster内に血小板や、白血球など血流内に存在する他の血球細胞が共存することが示され(Pantel et al Nat Rev Cancer 2014)、これらの細胞とCTCとの相互作用、転移能への影響も検討すべき課題と考えられる。

本研究では申請者らのこれまでの研究を進展させ、循環腫瘍細胞におけるアノイキス抵抗性や癌幹細胞特異的に発現する遺伝子の探索と、分子機能の解析を目指す。具体的にはsingle CTC、CTC clusterの検出、CTC clusterとsingle CTCの発現解析、CTC clusterとsingle CTCのsphere形成条件での培養、sphere形成された細胞の幹細胞性についての検討、ドライバー癌遺伝子変異モニタリング、並びにsphere形成細胞を用いた薬剤感受性の検討、である。これらの研究により、難治癌である肺癌の新たな治療ターゲットとして癌幹細胞性を有するCTCに発現する遺伝子を見出し、それらを標的とした新たな個別化医療の構築を目指す。

## 2. 研究の目的

固形癌の遠隔転移における循環腫瘍細胞の役割が注目されている。本研究は難治癌である肺癌の新たな治療戦略確立を目的とし、まず、血液中から循環腫瘍細胞(CTC)を分離し、細胞塊を形成しているCTC(CTC cluster)と単一のCTC(single CTC)を捕捉する。これらの発現解析を通して、CTC clusterにおけるアノイキス抵抗性に関わる分子を同定する。癌幹細胞を選択するとされる成長因子を添加した無血清培地での足場非依存性培養を行い、細胞塊(sphere)形成能を検討する。これらからCTC中で癌幹細胞性を有する細胞を見出し、癌幹細胞性を克服するための新たな

な標的を同定し、ドライバー癌遺伝子の連続的モニタリングと併せて革新的な個別化医療の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

CTC cluster の検出を行う。捕捉された CTCのうち、CTC cluster と single CTC を用いて RT-PCR を行い、特に癌幹細胞やアノキス抵抗性に関わるとされる遺伝子の発現を検討する。癌幹細胞を濃縮するとされる sphere 形成条件と低酸素を組み合わせることで、CTC の培養が可能かどうか検討する。CTC 培養による sphere 形成細胞の癌幹細胞性について検討する。CTC を用いて、そのドライバー癌遺伝子変異プロファイルを連続的に解析する。これらの検討を踏まえて、sphere 形成細胞における薬剤感受性を検討する。

### 4. 研究成果

当院倫理委員会承認と患者同意の元、肺癌患者から採血を行い、循環腫瘍細胞の分離を行っている。また、遺伝子解析に関しては、ガラスキャピラリーを用いた 1 細胞捕捉を行い、これを対象とした whole genome amplification の技術を用いて、single cell からの EGFR 遺伝子変異の検出(図 1)や MET 増幅(図 2)などの定量を行った。

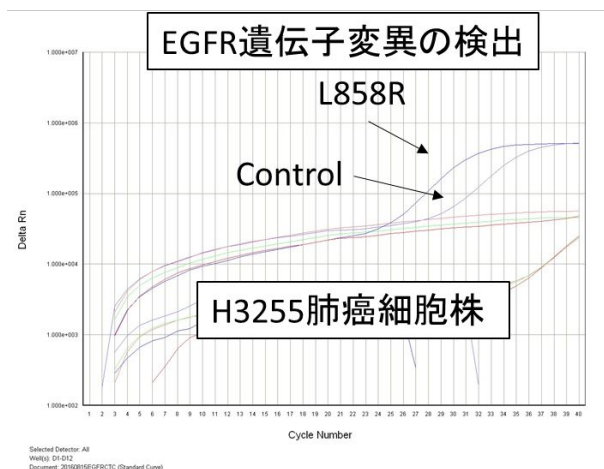


図 1 1 細胞からの EGFR 遺伝子増幅の検出

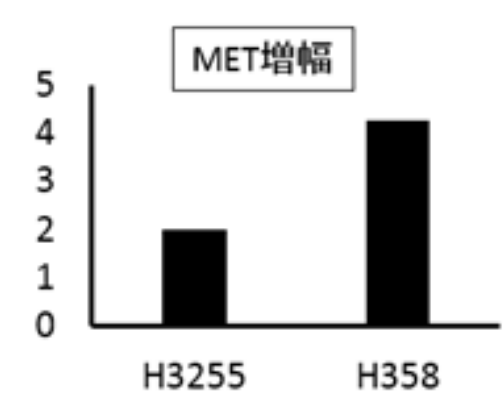


図 2 1 細胞からの MET 遺伝子増幅の検出

同様に single cell からの RNA ベースの発現解析も行うことが可能であった。また、近年注目を浴びている免疫チェックポイント阻害薬の効果予測を行うとされている PDL1 の発現を HCC827 を陽性コントロール、MCF-7 を陰性コントロールとして免疫染色を確認し、それぞれ single cell レベルで確認することができたため、今後臨床応用を考え、患者検体にて応用していく。

また、癌幹細胞性を有する細胞の分離として、申請者らが以前より検討している成長因子を添加した無血清培地での足場非依存性培養で癌幹細胞の選択的な培養を行い、癌幹細胞性を有する細胞塊の形成を行った。従来の足場非依存性培養による方法では、CTC からの培養の成功確率が低かったため、新たな細胞培養ディッシュを用いることや、低酸素状態での培養など、複数の異なる培養法を試みている。

今後上記で得られた研究成果を更に発展させ、循環腫瘍細胞中から分子標的薬の耐性機序を解析するとともに、耐性に寄与すると考えられる癌幹細胞性を克服するための新たな標的を同定し、新たな個別化医療の確立を目指す。また、この解析を行うために、肺癌患者の分子標的薬の耐性機序を確認するための新たな臨床試験を立案し、既に倫理委員会で承認が得られている。2017 年度より研究を開始し、臨床検体を収集する予定である。

## 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3件)

1. Identification of proteasomal catalytic subunit PSMA6 as a therapeutic target for lung cancer. Kakumu T, Sato M, Goto D, Kato T, Yogo N, Hase T, Morise M, Fukui T, Yokoi K, Sekido Y, Girard L, Minna JD, Byers LA, Heymach JV, Coombes KR, Kondo M, Hasegawa Y, Cancer Sci. 2017 Apr;108(4):732-743.

2. Factors Affecting the Diagnostic Yield of Transbronchial Biopsy Using Endobronchial Ultrasonography with a Guide Sheath in Peripheral Lung Cancer. Okachi S, Imai N, Imaizumi K, Iwano S, Ando M, Hase T, Aso H, Morise M, Wakahara K, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y, Intern Med. 2016;55(13):1705-12.

3. Can we predict the development of serious adverse events (SAEs) and early treatment termination in elderly non-small cell lung cancer (NSCLC) patients receiving platinum-based chemotherapy? Kato T, Morise M, Ando M, Kojima E, Ogasawara T, Suzuki R, Shindoh J, Matsumoto M, Sugino Y, Ogawa M, Nozaki Y, Hase T, Kondo M, Saito H, Hasegawa Y. J Cancer Res Clin Oncol. 2016 Jul;142(7):1629-40.

[学会発表](計4件)

1. 胸水細胞溶解液中の肺癌関連タンパク検出デバイスの開発, 口頭, 石川 広弥, 笠間 敏博, 與語 直之, 長谷 哲成, 近藤 征史,

加地 範匡, 長谷川 好規, 馬場 嘉信, 日本化学会第97春季年会, 2017/3/17, 慶應義塾大学 日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

2. 血中循環がん細胞の単一細胞分離デバイスの開発, 口頭, 久保山 大貴, 小野島 大介, 龍腰 健太郎, 木原 直人, ショウ 龍, 小口 亮平, 小高 秀文, 湯川 博, 田中 宏昌, 長谷 哲成, 石川 健治, 堀勝, 馬場 嘉信, 日本化学会第97春季年会, 2017/3/17, 慶應義塾大学 日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

3. 肺がん患者に対するシスプラチン併用化学療法に関する, short hydration 法の安全性評価, ポスター, 與語直之, 長谷哲成, 後藤大輝, 宮沢亜矢子, 加藤俊夫, 森瀬昌宏, 佐藤光夫, 近藤征史, 荒木理沙, 市川和哉, 宮崎雅之, 長谷川好規, 第57回日本肺癌学会学術集会, 2016/12/19, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

4. Cytochrome c oxidase subunit 5a (COX5A) is identified as a potential therapeutic target for lung cancer with high therapeutic index through a pooled shRNA screen. Toshio Kato, Mitsuo Sato, Masashi Kondo, Tomohiko Kakumu, Naoyuki Yogo, Tetsunari Hase, Masahiro Morise, Yoshionori Hasegawa, John D. Minna and Luc Girard. AACR 107th Annual Meeting 2016; April 16-20, 2016; New Orleans, (USA)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

長谷 哲成 (HASE, Tetsunari)  
名古屋大学・医学部附属病院

### ・病院助教

研究者番号: 30621635

### (2)研究分担者

なし