

令和元年9月5日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10487

研究課題名(和文) サイズ分画による乳がん末梢血循環腫瘍細胞の分離及び上皮間葉転換の解析

研究課題名(英文) Analysis of EMT in CTCs isolated by a size-based microfluidic device in breast cancer patients

研究代表者

永井 成勲 (NAGAI, SHIGENORI)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 乳腺腫瘍内科・副部長

研究者番号：20458277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん患者の末梢血循環腫瘍細胞(CTCs)をサイズ分画法で分画することにより、上皮性CTC以外の間葉系CTC及び、SET陽性CTCの検出法を確立した。このサイズ分画法は、CellSearchシステムより高い感度であり、Stage II-IIIの乳がん患者においてもCTCが検出された。更に、微量なCTC分画のmRNA発現解析法を確立し、CTC数とmRNA発現量の併用によって特異性を高めることが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法の開発によって、上皮性CTCだけでなく、間葉系CTC及び、SET陽性CTCなど多様なCTC亜集団を高い感度と特異性で検出できること可能となった。SET陽性CTCの検出は、SET阻害剤を用いた新しい乳がん治療の可能性も示唆している。本研究成果により、乳がん患者の予後予測だけでなく、がん治療の効果予測、さらには、がん転移の機構解明に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：To determine EMT-related CTCs, we used a size-based microfluidic device for early and metastatic breast cancer patients. We found that the size-based device is more effective to detect CTCs than CellSearch System, and can determine not only epithelial-type CTCs, but also mesenchymal-type CTCs and SET-positive CTCs, using antibodies-cocktails. We also succeeded to analyze mRNA expression in CTCs fraction using digital PCR. Our established CTC-detection method will provide new insights for treatment of breast cancer.

研究分野：乳癌 臨床腫瘍学 腫瘍免疫学

キーワード：末梢血循環腫瘍細胞 上皮・間葉転換 乳がん がん転移 サイズ分画法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がんの分子生物学的な解明が大きく進む中で、いまだに転移はがんによる死亡率の90%以上の原因となっている。がんの転移は原発腫瘍から遊離したがん細胞が血管に侵入することにより始まるが、このプロセスにがん細胞の上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) が関与していると考えられている。EMTによって細胞間接着を失ったがん細胞は原発腫瘍から遊離することが可能となり、運動性も高まるため血管に侵入し多臓器へ転移を起こすことができると考えられる。また EMT を起こしたがん細胞は化学療法や放射線療法に抵抗性であることが知られている。このためがん患者の末梢血循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell, CTC) を分離し EMT を検証することは、がん患者の予後と治療効果の予測および治療抵抗性のメカニズムを知るうえで重要である。

(2) 当時、CTC について CellSearch® system を用いた解析結果から、CTC 数が乳がんの予後予測に役立つことが報告されたが、このシステムは上皮細胞接着分子 (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM) 発現細胞を抗体で分離するため、EMT を起こしたがん細胞は検出できない。そのため、全ての CTC を分離し CTC における EMT 状態の解析方法の確立が望まれていた。

## 2. 研究の目的

末梢血循環腫瘍細胞 (CTC) をサイズ分画法によって分離することにより、CTC 数だけでなく、上皮間葉転換 (EMT) 状態の異なる CTC 亜集団の割合等を詳細に解析し、予後予測や治療効果判定に役立つ CTC 解析法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) サイズ分画法 (ClearCell-CX システム) による CTCs の回収

i) インフォームドコンセントを书面で得た後、乳がん患者 18 名、健常者 5 名から血液を採取し、6 ml のサンプル緩衝液に懸濁した後、500 x g 10 分間の遠心で血液中の細胞を回収した。これをサンプル緩衝液 1 ml に懸濁し、CTChip-S (ClearCell system) にアプライし 30 kPa で洗浄し、チップ状に 8 µm 以上の細胞を回収した。

### ii) 抗体を用いた CTCs の検出

CTChip-S 上に回収された細胞を、FITC-抗サイトケラチン 8, 18 抗体 (緑、CK) と PE-抗 CD45 抗体 (赤、CD45)、及び DAPI (青) で染色し、DAPI 陽性、CK 陽性、CD45 陰性の細胞で 10 µm 以上の細胞を CTCs と定義し計数した。

さらに、抗ビメンチン抗体と AF488 抗マウス IgG 抗体を用い、EMT の CTCs を観察した。観察は、All-in-One マルチ顕微鏡で観察、撮影した

### iii) CellSearch System との比較

6 名の乳がん患者血液については、同時に CellSearch System による CTCs の回収率を比較した。CellSearch System による解析は SRL に依頼した。

### (2) 改良サイズ分画法 (ClearCell-FX システム) による CTCs の回収

ClearCell-FX システムは、ClearCell-CX システムの改良型で、7.5 ml の血液からの細胞を解析できる。乳がん患者 10 名、健常者 8 名の血液について解析した。

i) 7.5 ml の血液を溶血した後、500 x g 10 分間の遠心で血液中の細胞を回収した。これを 4 ml の懸濁緩衝液に懸濁し、FX システムにアプライし、10 ml の回収液に回収された細胞を 500 x g 10 分間の遠心で回収した。これを約 100 µl の懸濁液に懸濁して、スライドガラス 2 枚に固定し、免疫染色用とした。

### ii) 免疫染色による解析

スライドガラスに固定した細胞を、上皮細胞検出抗体カクテル (抗パンサイトケラチン抗体、抗サイトケラチン 9, 19 抗体、抗 EpCAM 抗体) 間葉系細胞検出抗体 (抗ビメンチン抗体) 乳腺上皮細胞検出抗体 (抗 GCDFP15 抗体) 及び、抗 SET 抗体と DAPI で染色した。

### (3) デジタル PCR による遺伝子発現解析

ClearCell-FX で回収した細胞の 3 ml 分から RNA を回収し cDNA した後、SET 及び CD45 遺伝子の発現をデジタル PCR (ThermoFisher Scientific) で測定した。

(4) 倫理的配慮

本研究は埼玉県立がんセンター倫理審査委員会承認された研究計画のもとに行った。

4. 研究成果

(1) CellSearch System との回収率の比較

i) ClearCell CX との比較

4名のStage IVと2名のStage IIIの乳がん患者で比較した。ClearCellCXはStage IVでは4名中3名(75%)、Stage IIIは2名(100%)の検出率であったが、CellSearch Systemでは、Stage IVで50%、Stage IIIでは0%であった。明らかに、サイズ分画法が、EpCAM抗体を用いた方法に比べ、検出率が高いことが分かった。

ii) ClearCell FX との比較

ClearCell FXはCXを改良した装置であるため、5名のStage IV患者で100%の検出率でCTCsを検出したが、CellSearch Systemでは、0%であった。

この結果は、サイズ分画法のCTCs回収率は、抗体による回収法に比べ高いことを証明した。

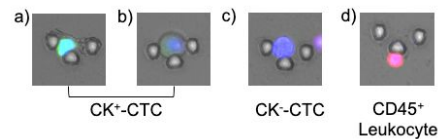


図1. CK陽性CTCとCK陰性CTCの染色像

(2) EMT 亜集団 CTCs の検出

i) ClearCell CXによるサイトケラチン陽性、及び、陰性CTCsの検出

6名のStage II-IIIと12名のStage IVの乳がん患者で、サイトケラチン陽性の上皮性CTCs数の中央値は、28/2 mlと57/2 mlであり、転移性のがん患者で有意に多いCTCsを検出した。さらに、健常者では1/2 mlであった。この際、サイズが10 μmより有意に大きく、サイトケラチン陰性、CD45陰性、DAPI陽性の細胞を観察した(図1)。このサイトケラチン陰性CTCsが、間葉系CTCsと考えられるので、その数を比較した。Stage II-IIIの患者では中央値が1.5/2 mlと健常者の1/2 mlと同等であったのに対し、Stage IVの患者では、8.5/2 mlのCTCsが回収された。Stage IVの患者では、ビメンチン陽性CTCsの観察されたので、サイズ分画法は、明らかにEMT亜集団CTCsを計測することができることが示された。しかし、この手法は、CTChip-S上で免疫染色を行うため、観察できるフェノタイプが限られていた。そこで、CTCsを回収できるClearCell FXによる回収法に切り替えた。

ii) 上皮性マーカー抗体カクテル、ビメンチンとGCDFP15抗体カクテル、及びSET抗体によるCTCs亜集団の検出

ClearCell FXで回収したCTCsは3種の亜集団に分けて検出を行った。上皮性マーカーカクテルを用いて検出すると検出率70%で中央値2/3 mlの上皮性CTCsが検出された。この際、8名の健常者では、0/3 mlであり、検出率だけでなく、特異性も改善された。次に同じ患者のCTCsについてビメンチンとGCDFP15陽性の間葉系CTCsを比較したビメンチンはEMTを誘導した乳がん細胞だけでなく線維芽細胞などでも発現しているため、乳がんのマーカーとして用いられるGCDFP15も陽性の細胞のみを間葉系CTCsとした。間葉系CTCsの検出率は60%であり、その中央値は7/3 mlであった。健常者では、0/3 mlであった。さらに、SETは脱リン酸化酵素PP2Aの阻害タンパク質であり、乳がん組織で正常の乳腺組織に比べ高発現しているため、CTCsの新しいマーカーと考え検討した。健常者で3/3 mlのSET陽性細胞が検出されたので、カットオフ値を5とした。その結果、SET抗体による検出率は70%と上皮性CTCsの検出率と同等であり、その中央値は8.5/3 mlであった。上皮性マーカーカクテルやビメンチン・GCDFP15抗体で検出されなかった患者においてSET陽性CTCが検出されたので、SETは上皮性CTCsや間葉系CTCsとは異なるCTCsの亜集団を検出していると考えられる。さらに、乳がんのサブタイプで比較するとトリプルネガティブ乳がんでの検出率が上皮性マーカーカクテルより高く(図2)、今後、SETによって検出されるCTCsの性質と転移性との関連などを明らかにする必要があると考える。

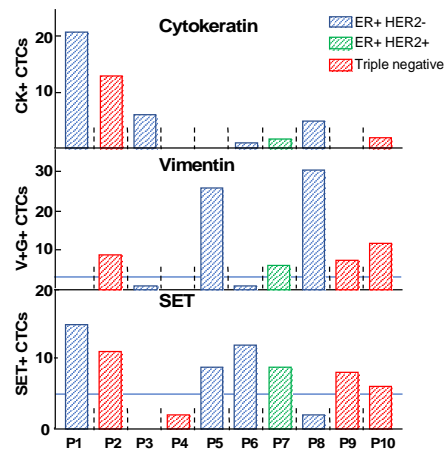


図2. 上皮性CTC、間葉系CTC、とSET陽性CTCの検出

### iii) デジタルPCRを用いた mRNA の検出

採集された細胞には数千の血液細胞と数個～数百個の混合として得られる。通常の Isogen を用いた RNA の抽出法では、回収率が悪く、測定できなかったが、TOYOBO の SuperPrep II Cell Lysis & RT kit を用いることによって、10 個～1000 個の乳がん細胞株から RNA が回収でき、得られた cDNA が定量的であることが確認できたので、この手法を用いて、遺伝子発現の解析を行った。健常者でも血球細胞の混入があるため、CD45 mRNA 量は健常者と乳がん患者で同等であった。一方、SET mRNA は乳がん細胞で過剰発現しているため、SET mRNA のコピー数と SET 陽性 CTC 数は良く相関した(図3)。今後、この cDNA を用いて、遺伝子変異、ホルモンレセプターの発現量などを定量的に解析できると期待される。

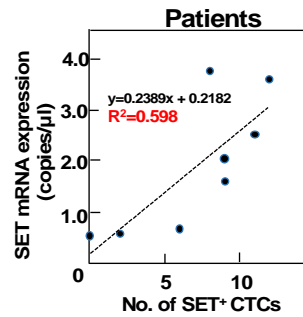


図3 . SET mRNA 発現と SET 陽性 CTC との相関性

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Fujiki, H., Sueoka, E., Watanabe, T., Suganuma, M., The concept of the okadaic acid class of tumor promoters is revived in endogenous protein inhibitors of protein phosphatase 2A. SET and CIP2A, in human cancers. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 144, 2018, pp 2339-2349

DOI: 10.1007/s00432-018-2765-7

② Aihara T, Toyama T, Nagai S., The Japanese Breast Cancer Society Clinical Practice Guideline for systemic treatment of breast cancer, 2015 edition. Breast Cancer. 2016 May;23(3):329-42. doi: 10.1007/s12282-016-0670-y.

[学会発表](計 4 件)

永井 成勲、他、サイズ分画による乳がん末梢血循環腫瘍細胞の分離および解析、日本乳癌学会、2016

戸塚 勝理、永井 成勲、他、Enumeration of heterogenous circulating tumor cells using size-based method in early and metastatic breast cancer patients, San Antonio Breast Cancer Symposium, 2017

戸塚 勝理、永井 成勲、菅沼 雅美、他、サイズ分画による乳がん末梢血循環腫瘍細胞の分離および解析、日本乳癌学会、2017

永井 成勲、戸塚 勝理、菅沼 雅美、他、Heterogenous circulating tumor cells detected by a size-based method in the blood of breast cancer patients, 日本癌学会、2018

## 6 . 研究組織

### (1)連携研究者

連携研究者氏名：戸塚 勝理

ローマ字氏名：(Tozuka katsunori)

連携研究者氏名：菅沼 雅美

ローマ字氏名：(SUGANUMA masami)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。