

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10697

研究課題名(和文)呼吸器悪性腫瘍における循環腫瘍細胞(CTC)検出法の開発

研究課題名(英文)Development of CTC-detection system for thoracic malignant tumors

研究代表者

田中 文啓(TANAKA, FUMIHIRO)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がんの微小転移の検出とその制御は、がん治療成績向上に必須である。我々は、末梢血液中に存在する微量のがん細胞(循環腫瘍細胞CTC)検出系の開発に取り組み、任意の補足用抗体を結合しうるマイクロ流路システム(CTC-chip)を開発した。本研究では、臨床検体を用いたCTC検出のためのCTC-chipの最適化に取り組み、細胞株を用いた基礎検討により高感度補足システムを構築した。本システムを用いて肺癌や悪性胸膜中皮腫患者から採取した末梢血液を用いて循環腫瘍細胞の検出を行ったところ、既存の標準的循環腫瘍細胞検出システムである"CellSearch"と比較して有意に高感度な検出が可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりがん患者の末梢血液中に存在する微量ながん細胞を高感度に検出するシステムが開発され、採血という侵襲の少ない検査によりがんの早期発見の可能性が開かれた。また検出されたがん細胞の遺伝子変異などの分子生物学的特性を調べることも可能であり、これに基づいた最適の治療、特に標的薬剤や免疫チェックポイント阻害剤などの新規薬剤、の選択が可能となると期待される。またがんの微小転移や生物学的特性の変化をリアルタイムにモニタリングが可能になることから、新たながんの生物学的特性や転移のメカニズムの解明とこれに基づく新薬開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Detection and control of micrometastases are necessary to improve treatment outcomes of patients with malignant tumors. We had tried to detect rare tumor cells that circulate in the peripheral blood (circulating tumor cells, CTCs), and developed a micro-fluidic system (CTC-chip) that could be conjugated with any antibody to capture tumor cells. In the present study, we modified the CTC-chip system to optimize conditions for detection of CTCs in clinical samples, and successfully achieved a sensitive detection of CTCs in experimental studies using cell lines. Next, we tested the performance to detect CTCs in peripheral blood sampled from patients with lung cancer and malignant pleural mesothelioma, and revealed that the CTC-chip system achieved a significant higher CTC-detection performance than the CellSearch system that was most frequently employed CTC-detection system.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：転移 循環腫瘍細胞 肺癌 中皮腫 マイクロ流路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 循環腫瘍細胞(circulating tumor cell, CTC)は、原発巣から遊離して末梢血液中を循環するがん細胞であり、採血により低侵襲に検出可能であるため、がんの診断のほか治療の選択や効果のモニタリングなどに有用性が期待されている。しかしながら末梢血液中に微量にしか存在しないがん細胞を大多数の正常血球細胞から分離検出するのは容易ではなく、現在唯一臨床使用が認可(但し、米国で乳癌・前立腺癌・大腸癌のみ)されている検出システム(CellsSearch)も、微小転移の検出には感度が不十分であることが知られている。特に肺癌などの呼吸器悪性腫瘍においては、我々のこれまでの検討結果も含めて検出感度が特に低いことが報告されている。また CellSearch では、上皮由来のがん細胞の表面に高発現する上皮マーカーEpCAM に対する抗体を用いて CTC を時期分離するため、上皮に由来しない腫瘍細胞や上皮間葉移行(EMT)等により EpCAM 発現が低下～陰性の細胞は原理的に捕捉・検出ができないという欠点がある。

(2) そこで我々はより高感度な CTC 検出システムの開発に取り組み、米国で開発されたマイクロ流路システム(CTC-chip)改良した国産のシステムを用いて呼吸器悪性腫瘍における高感度な CTC 検出系を試作した。この国産のシステムの最大の特徴は任意の捕捉抗体を容易に結合可能な点であり、EpCAM 発現に依存しない CTC の高感度な検出の可能性が細胞株を用いた基礎実験で明らかとなった。しかしながら CTC-chip により呼吸器悪性腫瘍において臨床的に応用可能な程度の CTC の高感度な検出が可能か否か、その至適条件も含めて明らかではなかった。また、捕捉したがん細胞の分子生物学的解析が可能か否かについても不明であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究の第一の目的は、新開発 CTC-chip の CTC 補足条件(捕捉抗体の種類や濃度等)等を最適化し、呼吸器悪性腫瘍(肺癌及び悪性胸膜中皮腫)患者より得た臨床検体を用いた CTC 検出に十分な信頼性と感度を有するシステムを構築することである。

(2) 第二の目的は、捕捉した CTC の遺伝子変異や蛋白発現異常などの分子生物学的解析が可能であるか否かを検討すること、である。

3. 研究の方法

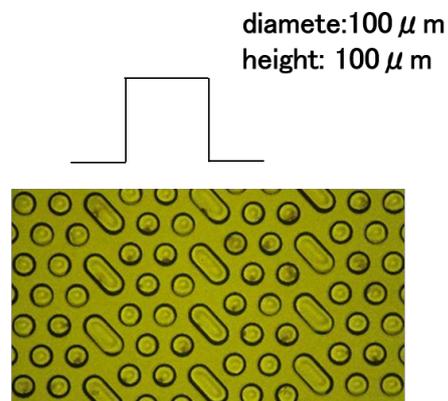
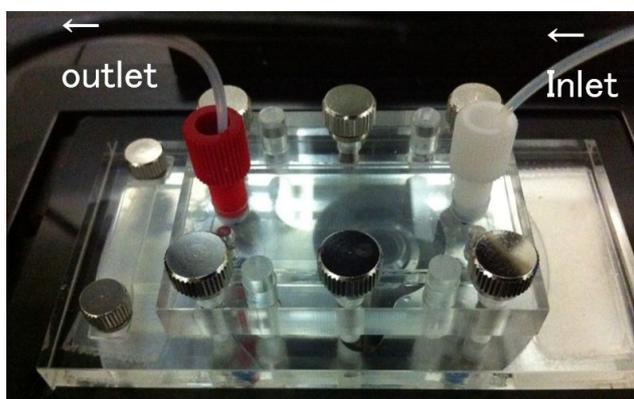
(1) 肺癌及び悪性胸膜中皮腫細胞株を正常人より得た末梢血液中に浮遊させた CTC モデルを用いて、CTC-chip の最適化を図る。すなわち、CTC-chip に結合させる捕捉抗体の種類や濃度、CTC-chip に流す血液の量や流速、等を変化させて最も細胞捕捉効率の高い条件を決定する。

(2) ついで、実際に肺癌や悪性胸膜中皮腫患者より採取した末梢血液を用いて、CTC の捕捉感度を CellSearch と比較検討すると同時に、病期診断や予後予測等の補助マーカーとしての臨床的有用性についても探索的に検討する。

(3) また、CTC-chip で捕捉された腫瘍細胞を CTC-chip 上で各種免疫染色を行い、蛋白発現解析の可否と至適条件を探索する。また CTC-chip で捕捉された腫瘍細胞を回収して遺伝子を抽出し、遺伝子変異や発現解析が可能か否かを検討する。

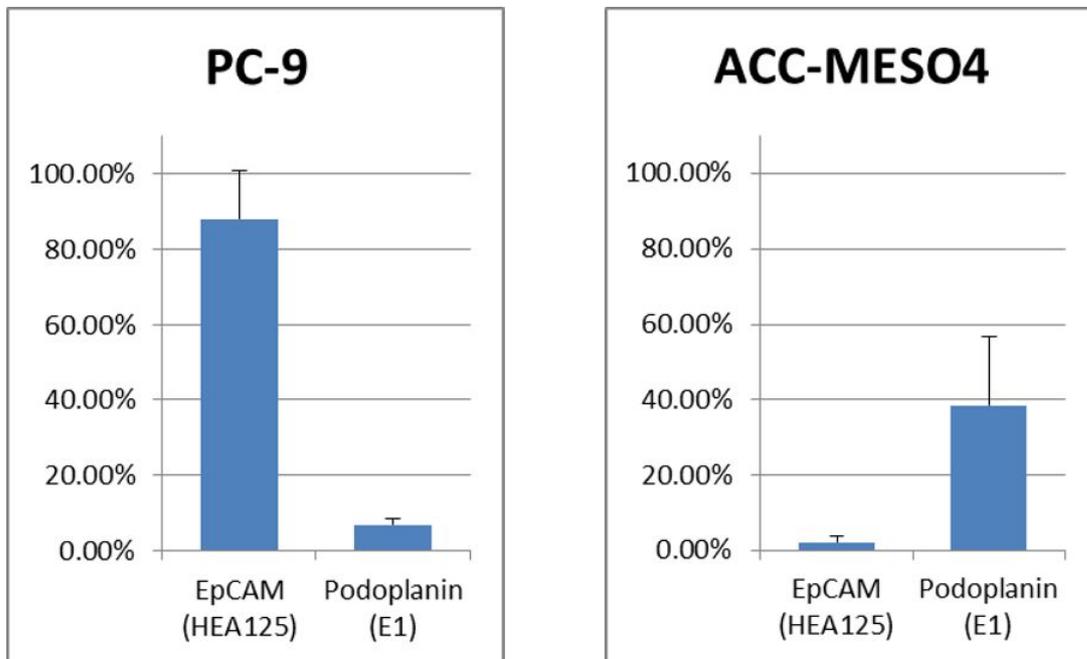
4. 研究成果

(1) まず新開発 CTC-chip を含む細胞捕捉システムの構築を行った。がん細胞株を健康成人より得た末梢血液中に浮遊させてこれを CTC-chip に流し、流速や血液凝固のための振動装置付加等の条件検討を行い、更に細胞観察のための蛍光顕微鏡やビデオ記録装置等も含めた捕捉および検出システムを完成させた(下図)(文献)。

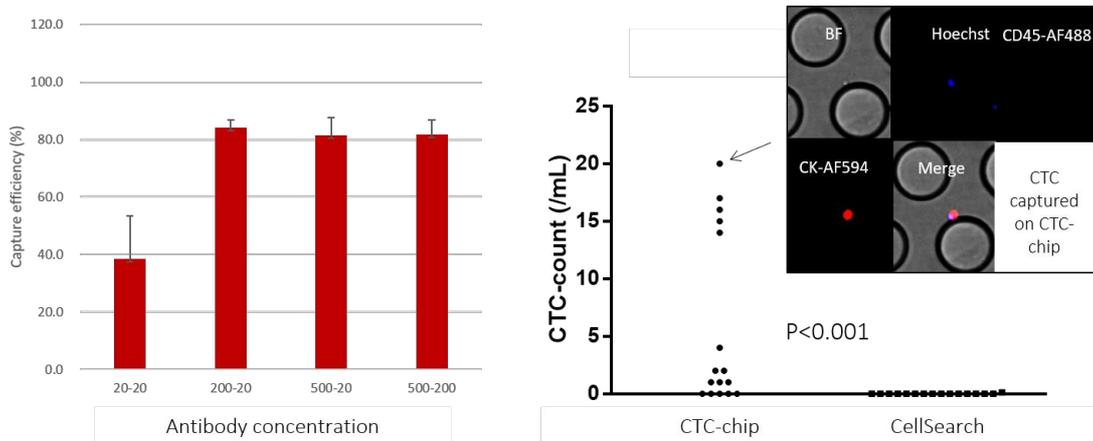


(2) 次に本システムを用いて腫瘍細胞捕捉および検出効率に関する基礎検討を行った。肺癌細胞株(PC-9)を健康成人より得た末梢血液中に浮遊させて CTC モデルを作成し、抗 EpCAM 抗体を捕捉抗体として結合させた CTC-chip に流した場合、ほぼ 100%の腫瘍細胞が捕捉され高感度の捕捉・検出が可能であることが示された。一方、悪性胸膜中皮腫細胞株(ACC-MES04)は、上皮マーカー EpCAM 発現が弱く、抗 EpCAM 抗体ではほとんど捕捉されなかった。そこで CTC-chip に、中皮マーカーであるポドプラニンに対する抗体を補足抗体として結合させると一定の細胞捕捉が可能であった(捕捉効率 40-50%程度)。また、抗ポドプラニン抗体では上皮由来の肺癌細胞株(PC-9)

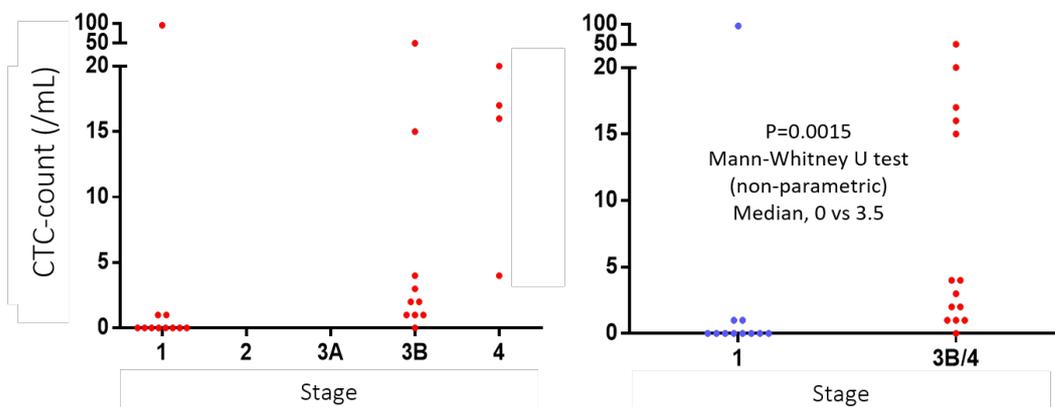
は捕捉されなかった(下図)(文献)。



(3) 次に、抗ポドプランリン抗体による中皮腫細胞株の補足効率を更に上げるために補足抗体濃度を変化させた。その結果、補足抗体を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とすると補足率 80%以上の高感度補足が達成され(下図・左)、CellSearch との比較でも圧倒的に優れた補足率を示した。更に悪性胸膜中皮腫患者より採取した末梢血液を用いて、CTC の検出感度を CellSearch と直接比較検討したところ、CellSearch ではほとんど CTC が検出されなかったのに対して CTC-chip システムでは過半数の症例で多くの CTC が検出された(下図・右) (文献)。

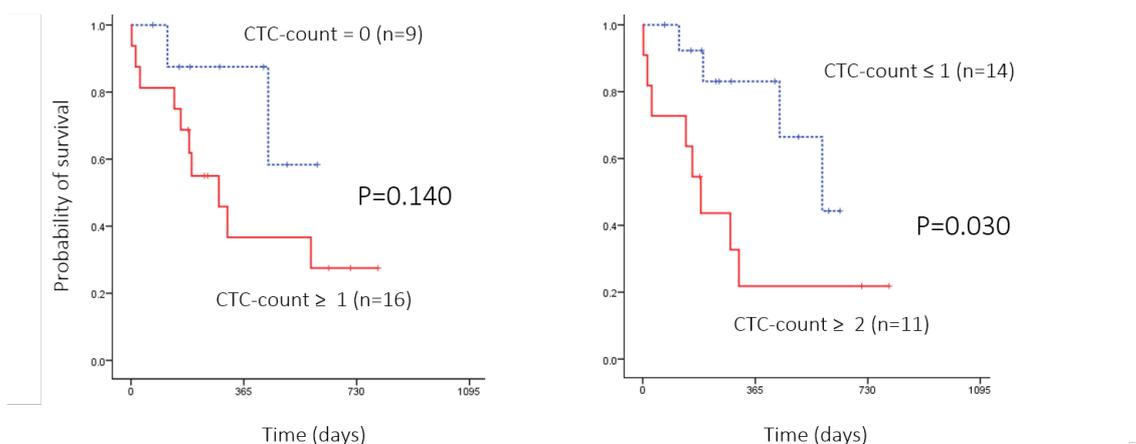


(4) 更に、CTC-chip で検出された悪性胸膜中皮腫における CTC の臨床的意義についての検討を行った。CTC は進行例に有意に多く検出され、進行度の補助診断としての有用性が示唆された。一方で、早期(I 期)例でも検出された症例があることから、臨床的に検出しえない微小転移の存在を示唆していると考えられた(下図・左)。また一般的に悪性胸膜中皮腫で根治切除不能と判断される 3B/4 期では切除可能な 1 期症例に比較して CTC 個数が有意に多く(下図・右)、



ROC(receiver operating characteristics)曲線解析では CTC は根治切除可能症例と不能症例の判定に有用なバイオマーカーであることが示された(AUC=0.851, P=0.003 ; カットオフ値を 1 または 2 とすると、感度/特異度はそれぞれ 93%/73%および 64%/91%)(文献)。

(5) 最後に、CTC の予後因子としての検討を行った。その結果、CTC 個数が 2 以上の患者は 1 以下の患者に比べて有意に予後不良であった(下図・右) (文献)。



以上の結果より、新規 CTC-chip は、悪性胸膜中皮腫患者の病期診断・治療法の選択および予後予測に有用なマーカーであることが示唆された。今回は単施設の探索的検討であり、バイオマーカーとしての臨床的意義の検証のため前向き他施設共同研究に向けて検体保存や輸送条件などにつき更なる検討を行う予定である。

尚、中皮腫に高発現しているメソテリンに対する抗体を捕捉抗体として用いた基礎検討も行ったが、期待に反して中皮腫細胞株において十分な補足効率は得られなかった(文献)。その理由は不明であるが抗メソテリン抗体の結合力の弱さの可能性もあり、現在他の抗体も試みている。また、ポロブニン発現も低い中皮腫株(ACC-MESO-1 等)は抗ポドプラニン抗体では捕捉効率が低く(文献)、現在抗 EGFR 抗体などの他の抗体による補足も試みている。

(6) 肺癌の CTC に関しては現在、肺癌患者より得た末梢血を本 CTC-chip と CellSearch の両方で解析すると同時に、肺癌治療に伴う変動などについてもデータ収集中である。解析結果が判明すれば発表の予定である。

(7) 捕捉したがん細胞の分子生物学的解析に関しては、細胞株を用いて PD-L1 の発現解析が CTC-chip 上での免疫染色により可能であること、捕捉された細胞より DNA を抽出して EGFR 遺伝子変異の検出が可能なのは確認した。その臨床応用の可能性などについては今後の検討課題である。

<引用文献>

- Chikaishi Y, Yoneda K, Ohnaga T, Tanaka F, EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip', *Oncol Rep*, 2017, 37 巻, 77-82
- Yoneda K, Kuwata T, Chikaishi Y, Mori M, Kanayama M, Takenaka M, Oka S, Hirai A, Imanishi N, Kuroda K, Ichiki Y, Ohnaga T, Tanaka F, Detection of circulating tumor cells with a novel microfluidic system in malignant pleural mesothelioma, *Cancer Sci*, 2019, 110 巻, 726-733
- Yoneda K, Chikaishi Y, Kuwata T, Ohnaga T, Tanaka F, Capture of mesothelioma cells with 'universal' CTC-chip, *Oncol Lett*, 2018, 15 巻, 2635-2640

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- Yoneda K, Kuwata T, Chikaishi Y, Mori M, Kanayama M, Takenaka M, Oka S, Hirai A, Imanishi N, Kuroda K, Ichiki Y, Ohnaga T, Tanaka F, Detection of circulating tumor cells with a novel microfluidic system in malignant pleural mesothelioma, *Cancer Sci*, 査読有, 2019, 110 巻, 726-733
DOI: 10.1111/cas.13895
- Yoneda K, Imanishi N, Ichiki Y, Tanaka F, A liquid biopsy in primary lung cancer, *Surg Today*, 査読有, 2019, 49 巻, 1-14
DOI: 10.1007/s00595-018-1659-2
- Yoneda K, Chikaishi Y, Kuwata T, Ohnaga T, Tanaka F, Capture of mesothelioma cells with 'universal' CTC-chip, 査読有, *Oncol Lett*, 2018, 15 巻, 2635-2640
DOI: 10.3892/ol.2017.7619

Hashimoto M, Tanaka F, Yoneda K, Takuwa T, Kuroda A, Matsumoto S, Okumura Y, Kondo N, Tsujimura T, Nakano T, Hasegawa S, The clinical value of circulating tumour cells (CTCs) in patients undergoing pulmonary metastasectomy for metastatic colorectal cancer, J Thorac Dis, 査読有, 2018, 10 巻, 1569-1577

DOI: 10.21037/jtd.2018.03.05

Hashimoto M, Tanaka F, Yoneda K, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, Kondo N, Tsujimura T, Nakano T, Hasegawa S, Positive correlation between postoperative tumor recurrence and changes in circulating tumor cell counts in pulmonary venous blood (pvCTC) during surgical manipulation in non-small cell lung cancer, J Thorac Dis, 査読有, 2018, 10 巻, 298-306

DOI: 10.21037/jtd.2017.12.56

Imanishi N, Hirai A, Yoneda K, Shimajiri S, Kuwata T, Tashima Y, Takeuchi M, Iwai Y, Ichiki Y, Tanaka F, Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in pleomorphic carcinoma of the lung, J Surg Oncol, 査読有, 2018, 117 巻, 1563-1569

DOI: 10.1002/jso.25041

Hirai A, Yoneda K, Shimajiri S, Kuroda K, Hanagiri T, Fujino Y, Tanaka F, Prognostic impact of programmed death-ligand 1 expression in correlation with human leukocyte antigen class I expression status in stage I adenocarcinoma of the lung, J Thorac Cardiovasc Surg, 査読有, 2018, 155 巻, 382-392

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2017.05.106

Chikaishi Y, Yoneda K, Ohnaga T, Tanaka F, EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip', Oncol Rep, 査読有, 2017, 37 巻, 77-82

DOI: 10.3892/or.2016.5235

〔学会発表〕(計 9 件)

米田和恵, 悪性胸膜中皮腫における循環腫瘍細胞(CTCs)の分離検出に関する検討, 第 3 回 Liquid Biopsy 研究会, 2019

米田和恵, 桑田泰治, 近石泰弘, 森 将鷹, 金山雅俊, 平良彰浩, 名部祐介, 篠原伸二, 竹中 賢, 岡 壮一, 平井文子, 田嶋裕子, 今西直子, 黒田耕志, 市来嘉伸, 大永 崇, 田中文啓, 悪性胸膜中皮腫における循環腫瘍細胞: 新規 CTC チップの開発と臨床応用, 第 59 回日本肺癌学会総会, 2018

米田和恵, 大永 崇, 田中文啓, 新規 CTC チップを用いた悪性胸膜中皮腫(MPM)における循環腫瘍細胞(CTC), 第 77 回日本癌学会総会, 2018

米田和恵, 田中文啓, "Universal" CTC-chip と抗 EGFR 抗体(Cetuximab)を用いた EpCAM 陰性中皮腫細胞の捕捉, 第 22 回日本がん分子標的治療学会学術総会, 2018

米田和恵, 呼吸器悪性腫瘍における Liquid Biopsy, 第 2 回 Liquid Biopsy 研究会, 2018
Kazue Yoneda, Taiji Kuwata, Fumihiro Tanaka, Capture of tumor cells in blood with "Universal CTC-chip", AACR Annual Meeting, 2018

Kazue Yoneda, Taiji Kuwata, Yasuhiro Chikaishi, Kenichi Kobayashi, Sakiko Yura, Hiroki Matsumiya, Masatoshi Kanayama, Akihiro Taira, Yusuke Nabe, Shinji Shinohara, Masaru Takenaka, Soichi Oka, Ayako Hirai, Yuko Tashima, Naoko Imanishi, Koji Kuroda, Fumihiro Tanaka, Detection of CTCs in thoracic malignant tumors with "universal" CTC-chip, AACR Annual Meeting, 2017

米田和恵, 桑田泰治, 大永 崇, 田中文啓, "universal CTC-chip" を用いた胸部悪性腫瘍における循環腫瘍細胞(CTCs)の検出, 第 76 回日本癌学会総会, 2017

Kazue Yoneda, Taiji Kuwata, Yasuhiro Chikaishi, Kenichi Kobayashi, Rintaro Oyama, Sakiko Yura, Hiroki Matsumiya, Akihiro Taira, Yusuke Nabe, Shinji Shinohara, Masaru Takenaka, Soichi Oka, Ayako Hirai, Yuko Tashima, Naoko Imanishi, Koji Kuroda, Takashi Ohnaga, Fumihiro Tanaka, Sensitive detection of CTCs in thoracic malignant tumors with "universal" CTC-chip, 17th World Conference on Lung Cancer, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kitakyusyu-gan.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：米田 和恵
ローマ字氏名：YONEDA, kazue
所属研究機関名：産業医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：80724806

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。