

令和元年6月26日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20210

研究課題名(和文)新規マイクロ流体チップを用いた子宮がんCTCの診断マーカー開発

研究課題名(英文)Function analysis of circulating tumor cells using a microfluid chip for colorectal cancer.

研究代表者

大久保 はるな(Ohkubo, Haruna)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：40721551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新開発CTCチップを用いた検出法の子宮がん及び大腸がんへの臨床応用を目指し、細胞株を用いて、本チップにおける検出を行っている。これまでに株細胞におけるCTC捕捉率を確認、捕捉率向上をめざしシステム改良を進めた。これによりCTC補足を効率的にできることを確認した。また、一部の臨床検体を用いて、血中癌細胞を補足することができることを確認し、出力向上のためCTCの濃縮実験を行い、濃縮システムを新たに構築することを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療における課題は、転移・再発への対応であり、そのためには、癌の検出感度の向上に取り組むことが重要である。子宮頸がんや大腸がんは近年増加傾向にある。子宮体がん、卵巣がんは骨盤内にがんが浸潤しやすいため早期発見が困難である。このため、進行がんでの発見が多く手遅れになりやすい事などから早期発見が望まれる。このためとくに採血で容易に、高確率で発見する新たな検査法が必要である。我々は、新たなCTCチップを用いて効率的なCTCの取得のための濃縮実験、子宮癌、大腸癌の癌腫による検出率の違いなどを検証し、癌腫による違いも検証することにより新たな腫瘍マーカーとしてのCTC活用も期待できる。

研究成果の概要(英文)： This work was conducted CTC (circulating tumor cell) detection using newly developed polymeric CTC chip aiming to apply this system to uterine cancer and colon cancer diagnosis. We firstly evaluated the capture efficiency of this CTC chip which was treated with antibodies on its surface using suspensions of a cancer cell line cells. Then it was confirmed that cancer cells could be detected in higher rate with this new system. Also, we captured and identified CTCs in clinical blood samples using this system. Then we confirmed that CTC in clinical blood samples was more sensitively detected with the CTC chip than with conventional blood markers. Furthermore, we tried to concentrated sample blood and sent it to the CTC chip to improve the capture efficiency of the system.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：血中循環腫瘍細胞 子宮がん 腫瘍マーカー 大腸がん

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

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療における課題は、転移・再発への対応であり、がん患者における転移の有無やその性状の把握は予後評価や治療方法を検討する上で重要な情報となっている。そのためには、癌の検出感度の向上に取り組むことが重要である。

子宮頸がんや大腸がんは近年増加傾向にあり、子宮体がん、卵巣がんは骨盤内にがんが浸潤しやすいため、早期発見が困難である。このため、進行がんでの発見が多く手遅れになりやすい事などから、早期発見が望まれる。子宮頸がんでは、検診が浸透し、早期発見すれば比較的予後がよいが、検診に対して侵襲が大きいため依然としてがんの予後改善にはほど遠い状態である。一方、既存の採血による腫瘍マーカーによるがん検出率は、依然として低いため、採血で容易に、かつ早期に高確率で発見する新たなシステムの確立が早急に求められている。

がん細胞、特に進行したがん細胞は、血液の流れに乗って肝臓などの臓器に生着することによって転移を起こす。この血中に浮遊する細胞を血中循環癌細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) と呼ぶ。CTC の捕捉には、抗原抗体反応、誘電泳動力、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 CTC 血中濃度の低さ (検出感度) が課題となっている。既に商品化されていた CTC 検出法では検出感度の低さのほか、特に EpCAM 陰性の CTC を見逃している可能性などの問題が指摘されさらに CTC の捕捉率も悪いなど問題点が多い。

2007 年に、抗原抗体反応を利用した CTC 検出法として、マイクロ流体チップを用いる手法が発表され、既存のシステムと比べて有意に補足率が向上することが示された。

## 2. 研究の目的

従来、主に EpCAM 陽性の血中細胞が血中循環癌細胞と定義されてきた。しかし、がん細胞は原発巣より離脱して血中循環に移動するために浸潤能を亢進する必要がある。上皮間葉移行 (EMT) という、上皮細胞の特性を失い間葉系細胞の特性を獲得する現象が、がん細胞が浸潤能を亢進するために必須の現象であることはよく知られている。しかし EMT を起こし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 を発現していない可能性が高く、大多数の CTC を検出可能なマーカーの同定が望まれている。

なお血中に進入した 99% のがん細胞が数分以内に細胞死に至るため、血中や遠隔臓器で生き残った、ごく少数の細胞死抵抗性の CTC が転移の形成に関与していると想像されている。

本研究で新たに開発した“CTC チップ”は、マイクロ流路表面にポリマーを介して 3 次元的に抗体分子が配置されている。本研究では、この CTC チップを利用し、条件を最適化することで、診断マーカーを創出することを目指した。さらに本研究では、術前治療の有無による効果判定、また血液濃縮することによって CTC 補足効率の向上をも研究の目的とした。

子宮癌、大腸癌の癌腫による検出率の違いなどを検証し、癌腫による違いを検証することにより新たな腫瘍マーカーとしての CTC 活用も期待できる。

本邦初であるこのシステムの実用化により、既存の腫瘍マーカーで検出できなかったがんが採血で容易に診断できれば治療に貢献することができ、医学的な貢献度は大きいと考えられる。

## 3. 研究の方法

CTC 捕捉システムの確立を目指し、下記の方法で研究を進めた。

- (1) PBS および血液にがん細胞を添加した擬似 CTC サンプルを作成、EpCAM 抗体を固定した CTC チップを用いて、血液中の腫瘍細胞が PBS 中と同様に捕捉可能であることを確認した (図 1)。
- (2) EpCAM 抗体を固定した CTC チップに患者の血液を送液し、CTC チップ上に捕捉された 1ml 中の CTC 数を測定した。同じ患者の血液検体の既存腫瘍マーカーでの評価による陽性率と、CTC 検出の有無を比較した。
- (3) 血液検体の濃縮 血液検体中の血球成分の濃縮を行い、この濃縮検体をチップに送液し、捕捉効率向上を評価した。
- (4) 術前治療による変化 術前化学療法を行った患者の治療前後の臨床採血検体を 5 倍濃縮し CTC チップによる捕捉検出を行った。

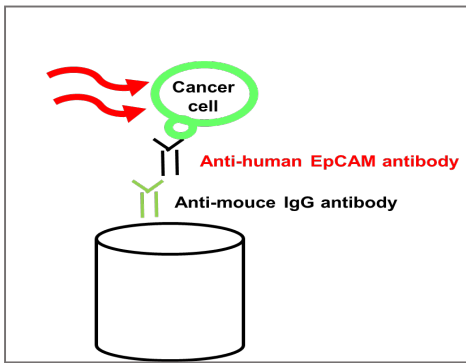
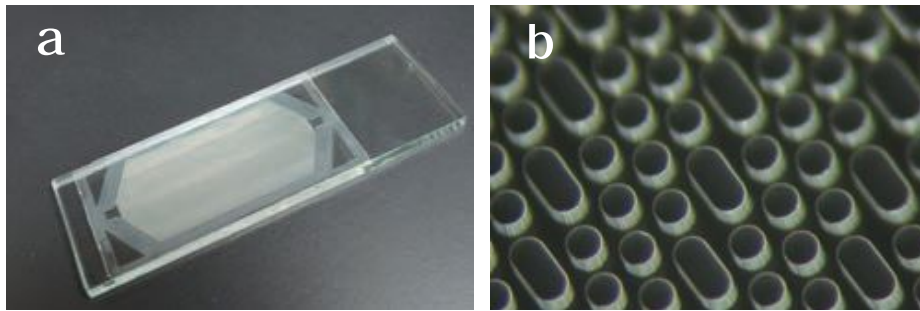


図 1 CTC チップと血中がん細胞捕捉

- a CTC チップ全体像 (Size : 75mm x 25mm)
- b マイクロポスト部分の拡大  
Post diameter : 100  $\mu$ m,  
Post height : 100  $\mu$ m  
The number of post : ~ 30,000
- c 表面を抗体処理 ( 1 次抗体 , 2 次抗体処理 )  
した CTC チップによる がん細胞の捕捉 .

Ohnaga T et al, Biomed Microdevices (2013)

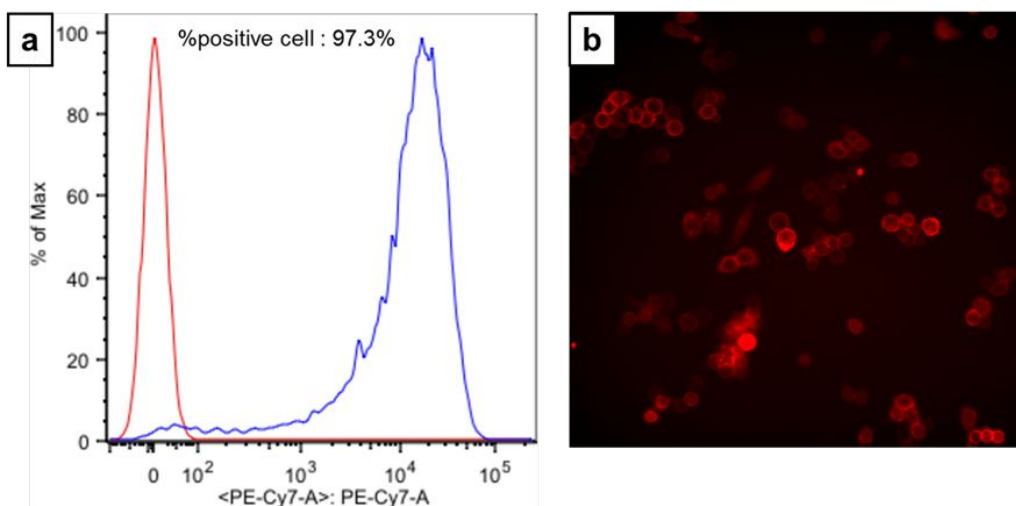
#### 4 . 研究成果

報告者は、まずいくつかの癌細胞株 (HCT-116 など) を用いて EpCAM 発現率を調べた。細胞を染色し EpCAM 陽性細胞を検出する方法により、HCT-116 に EpCAM が強発現していることを確認した (図 2)。

つぎに PBS および血液にがん細胞を添加した擬似 CTC 含有血液サンプルを作成、EpCAM 抗体を固定した CTC チップを用いて、血液中の腫瘍細胞が PBS 中と同様に捕捉可能であることを証明した。また EpCAM 抗体を固定したその結果 CTC チップの腫瘍細胞捕捉効率が、抗体無固定、IgE 抗体などを固定した場合よりも著しく高いことを明らかにした (図 3)。

図 2 HCT-116 の EpCAM 強発現の確認。

- (a) HCT-116 のフローサイトメトリによる蛍光検出。赤線: 未抗体染色, 青線: PE/Cy7-



結合抗 EpCAM 抗体で染色。(b) 蛍光顕微鏡での検鏡像 ( $\times 600$ ) Alexa Fluor 594-結合抗-EpCaM 抗体染色による。

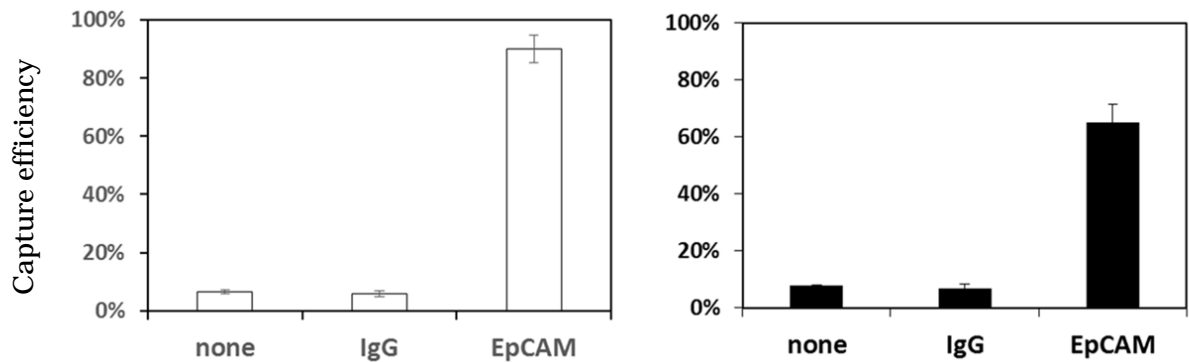


図3 CTCチップの表面抗体処理によるがん細胞捕捉効率の差異 .CTCモデルとしてHCT-116を用いている .  
 (左) PBSに懸濁した場合 (右) 健康者の血液に懸濁した場合 . \* Cell conc.:1000 cells /ml, Flow rate:1.0ml/h .  
 None:未処理, IgG:1次抗体(anti-IgG抗体)処理, EpCAM:1次抗体処理後に2次抗体(anti-EpCAM抗体)処理

さらに患者から手術前に採取した血液サンプルを用い,個々の患者の採血中のCTCを,EpCAM抗体を固定したポリマー製CTC-chipを用いて捕捉,カウントした(図4).

同じ採血サンプルにおいて,既存のマーカーのうちCEA,CA19-9による陽性率をポリマー製CTC-chipによるCTC検出率を比較し,ポリマー製CTC-chipによりCTCが検出されCEA,CA19-9陽性率よりも有意に検出力が高いことがわかった(投稿準備中).

本システムにおいてステージの進んだ大腸癌においては既存マーカーよりも検出力が高いことが明らかになり,このことから本システムを新たな診断マーカーとして臨床応用する可能性を提示できた.

すなわち本研究では,新規に開発したポリマー製のCTC-chipにEpCAM抗体を処理,患者の採血中のCTCを計測し,がん細胞を高率に捉えることに成功した.さらに,このCTCチップは,従来のCTC捕捉システムと比べて,捕捉に使う抗体を任意の抗体に変更できる点や,従来の癌マーカーよりも検出感度の点で優れたマーカーとなり得ることを確認した.

また,血液濃縮の有る無しによってCTC検出効率の差異を調べた.血液濃縮前の平均CTCが7個だったのに対して,39個のCTCを補足することができた.この方法で術前治療によるCTC濃度の変化を確認,治療効果を評価できることが示された.

以上から採血を濃縮することによってより精確なCTC数を得ることが可能であることが確認され,今後の画像によるCTC解析を見込んだ測定法の改良の可能性を本研究で提示できた.

今後は,CTC測定についてさらに改良を加えていくことともに子宮癌,卵巣癌と大腸癌の比較解析についてもさらなる解析,研究を行い,各種がんの特徴を検出し,がんマーカーとしてのCTCの可能性を追求していく.

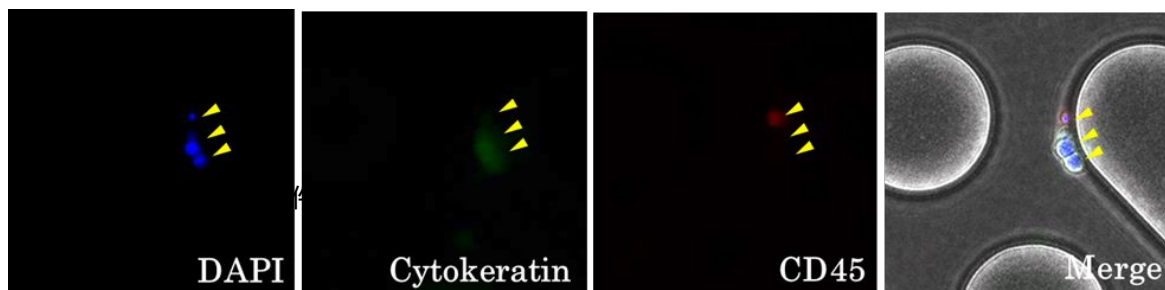


図4 .CTCチップに捕捉された採血患者検体中CTCの蛍光顕微鏡下での検出 . DAPI(+), Cytokeratin(+), CD45(-)の細胞をCTCとして同定した

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kawai M, Komiyama H, Hosoya M, Okubo H, Fujii T, Yokoyama N, Sato C, Ueyama T, Okuzawa A, Goto M, Kojima Y, Takahashi M, Sugimoto K, Ishiyama S, Munakata S, Ogura D, Niwa S, Tomiki Y, Ochiai T, Sakamoto K: An impact of Chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer on liver metastasis. *Oncology letters*, 12:4773-4778. 2016

### 〔学会発表〕(計 1 件)

土谷祐樹, 呉 一眞, 細谷 理樹, 大久保はるな, 深谷 緑, 植山孝, 恵 河野眞吾, 石山 隼, 杉本起一, 神山博彦, 小見山博光, 高橋 玄, 小島 豊, 奥澤 淳司, 富木裕一, 大永 崇, 坂本一博: ポリマー製マイクロ流体チップを用いた大腸癌患者における CTC の測定の有用性について. 第 87 回 大腸癌研究会, 三重, 2017.

### 〔その他〕

ホームページ

順天堂大学下部消化管外科学(消化器外科学講座)

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab0/kabusyoukakan/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

: なし

### (2)研究協力者

: なし

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。