

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09651

研究課題名(和文) 癌幹細胞性を有する肺癌循環腫瘍細胞解析による分子標的薬耐性克服治療の開発

研究課題名(英文) Analysis of resistance against molecular targeted therapy with circulating tumor cells with stemness properties

研究代表者

長谷 哲成 (Hase, Tetsunari)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30621635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難治性がんである肺がん患者の末梢血から循環腫瘍細胞の捕捉を行い、分子標的薬の耐性の原因を探るための遺伝子解析を行った。まず、肺がんの細胞株を用いて、循環腫瘍細胞の捕捉や遺伝子解析を行えることを確認した。その後、実際に分子標的薬に耐性になった肺がん患者の血液から、循環腫瘍細胞を分離し、遺伝子解析を行った。その結果、分子標的薬の耐性に関わる遺伝子変異を見つけることが可能であった。現在、多くの肺がん患者の協力の下、臨床試験として解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行った循環腫瘍細胞解析は、末梢血からその細胞を分離するため、採取が容易である。肺がん分子標的薬の耐性機序の解析は、これまでに腫瘍組織からの解析で行われていたが、血液から解析が可能になることで、患者への負担は軽減される。また、循環腫瘍細胞の発現解析が可能になれば、新たな耐性機序の解明ができると考えられる。それにより新たな耐性克服治療開発の発展が期待でき、患者に最適な治療を提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we isolated circulating tumor cells from lung cancer patients, and investigated mechanisms underlying resistance to molecular targeted therapy. First, we conducted isolation of lung cancer cell-lines as a model of circulating tumor cells, which were spiked into the blood from healthy donor, and gene analyses were successfully performed. Then, circulating tumor cells were isolated from the blood of lung cancer patients whose tumors exhibited resistance to the molecular target therapy, and gene analyses revealed additional gene alteration related to the resistance of the molecular target drug.

研究分野：肺がん

キーワード：循環腫瘍細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。

これまで開発された循環腫瘍細胞検出デバイスは大きく 2 つに分けられる。一つは循環腫瘍細胞の大きさや密度等の物理学的な手法に基づいたものである。もう一つは癌細胞もしくは血球細胞特異的な細胞表面マーカーによる分離であり、前者は癌細胞に発現している上皮細胞接着分子(EpCAM)等の癌特異的マーカーによる positive selection、後者は CD45 等の血球細胞に発現している蛋白を標的にした negative selection である。

多くの単一の循環腫瘍細胞は既にアポトーシスを起こしている一方で、複数の循環腫瘍細胞が互いに接着し細胞塊を形成した循環腫瘍細胞塊は、アノキス(接着喪失によるアポトーシス)に対し抵抗性を獲得したと考えられている。循環腫瘍細胞塊は、その存在が予後不良因子であり(Hou et al. Am J Pathol 2011、J Clin Oncol 2012)、循環腫瘍細胞の解析を試みている複数の研究グループから注目されている(Sarioglu et al. Nature Methods 2015, Au et al. PNAS 2016, Jansson et al. BMC Cancer 2016, Choi et al. Cancer Research 2015)。

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。EGFR 遺伝子変異と、EML4-ALK 融合遺伝子はその代表的なものでありそれぞれ EGFR 阻害薬、ALK 阻害薬が著効する。しかし、治療経過中耐性腫瘍が生じることが問題となっており、その耐性機構・耐性克服のための治療開発が必要とされている。これまでの研究では、阻害薬の結合部位に生じるゲートキーパー変異や側副経路の活性化、下流の活性化などが報告されている。また、これらの耐性変異以外の耐性機構として、癌幹細胞様形質や、癌幹細胞との関連が報告されている上皮間葉転換(EMT)様形質の獲得が報告されている(Shien et al. Cancer Res 2013, Xie et al. J Cell Biochem 2012)ものの、多くが耐性獲得後に病変部の再生検を行って検討したものであり、転移の原因と想定される循環腫瘍細胞を用いたものではない。

研究代表者らは、循環腫瘍細胞を single cell PCR により解析し、肺がん分子標的薬耐性機構の解析を臨床試験として行っている。この中で捕捉される循環腫瘍細胞には、単一循環腫瘍細胞と循環腫瘍細胞塊が共に検出されている。本研究では捕捉された循環腫瘍細胞塊と単一循環腫瘍細胞に関して、既知の耐性変異の解析を行う。さらにこれらの発現解析を行うことにより、循環腫瘍細胞塊でのアノキス抵抗性や癌幹細胞性の表現型、EMT に関わる遺伝子を探究する。さらに sphere 形成条件で培養することで、癌幹細胞性のある細胞を分離し、形質維持に関与する遺伝子の探索や薬剤感受性を検討する。これらの検討から循環腫瘍細胞中から分子標的薬の耐性機構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。

2. 研究の目的

本研究では捕捉された循環腫瘍細胞塊と単一循環腫瘍細胞に関して、既知の耐性変異の解析を行う。さらにこれらの発現解析を行うことにより、循環腫瘍細胞塊でのアノキス抵抗性や癌

幹細胞性の表現型、上皮間葉形質転換に関わる遺伝子を探究する。これらの検討から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ことを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、患者末梢血から循環腫瘍細胞の捕捉を行う。捕捉された循環腫瘍細胞のうち、循環腫瘍細胞塊と単一循環腫瘍細胞を用いて既知の耐性変異の解析を行う。さらにこれらの発現解析を行うことにより、循環腫瘍細胞塊でのアノキス抵抗性や癌幹細胞性の表現型、上皮間葉形質転換に関わる遺伝子を探究する。これらの検討から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する。

4. 研究成果

まず細胞株を用いて、循環腫瘍細胞の検出を試みた。健常人末梢血に図1の様に細胞株を混入させ、蛍光免疫染色にて循環腫瘍細胞として検出可能かどうか検討し、検出可能であった。

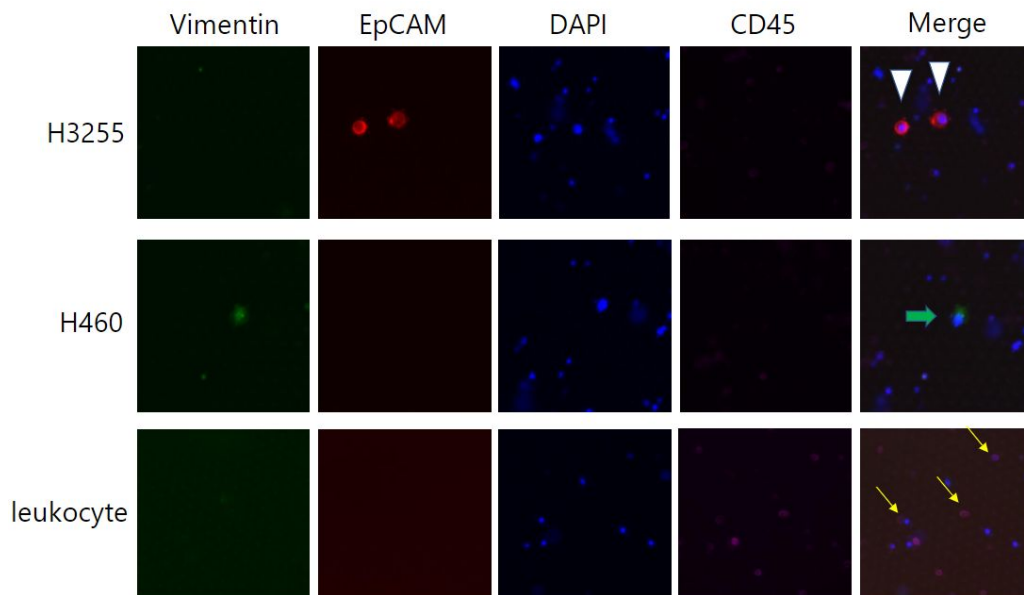


図1 血中からのモデル細胞の分離

次に、これらの細胞を用いて、遺伝子変異解析が可能かどうか検討した。EGFR 遺伝子変異に対する阻害薬を使用した際に出現する代表的な耐性遺伝子である T790M を有する H1975 細胞株を用いて、遺伝子変異の検出をダイレクトシーケンス法にて試みた(図2)。

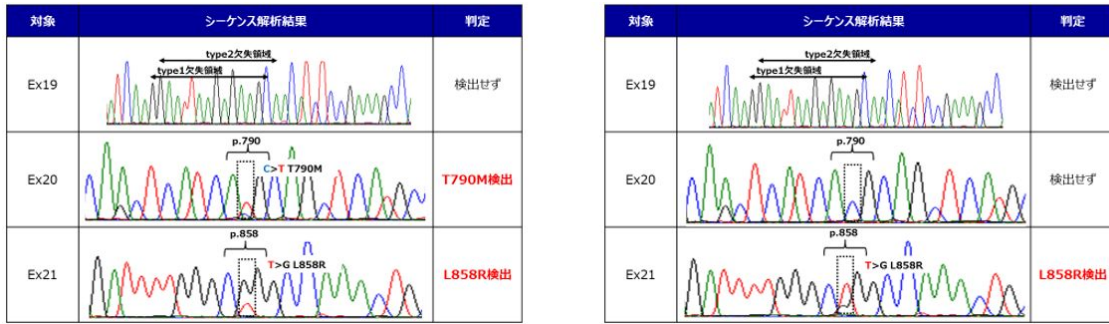


図 2 血中からのモデル細胞の遺伝子変異の解析(ダイレクトシーケンス)

図 2 の様に、白血球の混入の程度により、耐性変異として重要な T790M の検出にばらつきが出るため、リアルタイム PCR を用いた高感度方の検討を試みた (図 3)。

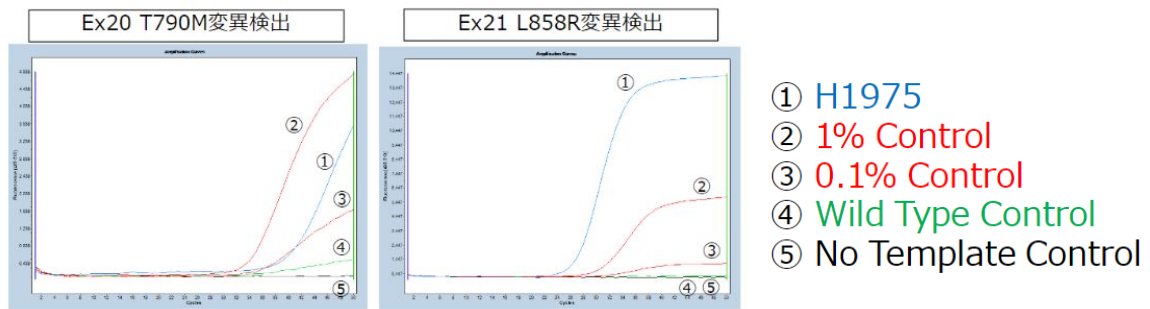


図 3 血中からのモデル細胞の遺伝子変異の解析(リアルタイム PCR)

これにより、微量の細胞からも遺伝子変異の検出が可能であった。

この系を用いて、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。

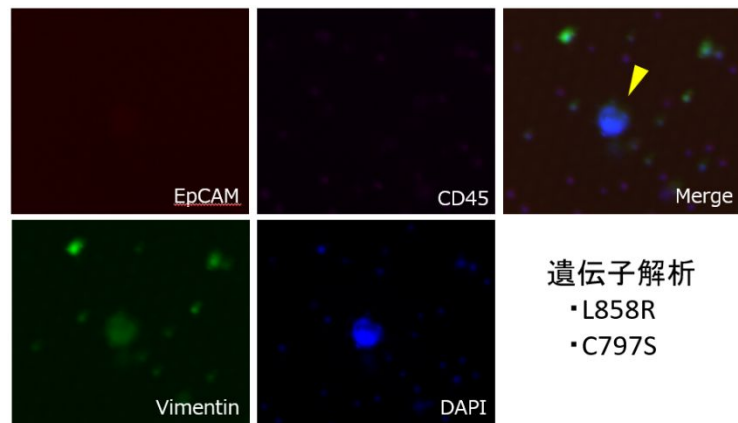


図 4 患者検体での循環腫瘍細胞と遺伝子変異の解析の結果

図 4 は、T790M が検出された後にオシメルチニブ投与を投与中、増悪した患者から得られた循環腫瘍細胞の解析結果である。EpCAM の発現が失われ、遺伝子変異解析ではもともと有していた L858R の遺伝子変異と、オシメルチニブの耐性変異の一つである C797S 変異の検出が可能であった。現在症例を積み重ねると同時に発現解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 光夫 (Sato Mitsuo) (70467281)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授 (13901)	