

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03006

研究課題名(和文) 血中循環癌細胞のシングルセル解析による口腔癌次世代統合精密治療法の開発

研究課題名(英文) Development of next generation CTCs precision therapy for oral cancer by single cell analysis of oral cancer CTCs

研究代表者

杉浦 剛 (SUGIURA, TSUYOSHI)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：40322292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,830,000円

研究成果の概要(和文)：癌の転移において循環癌細胞(CTC)の制御が癌の制御の為には必須である。CTC分離装置を開発し、血液からのCTCの分離能を検討すると99%以上が分離できた。血液中の腫瘍由来の遺伝子(ctDNA, miRNA)について検討した。口腔癌の存在診断、口腔癌の転移診断については血清miRNAが極めて有効であり、6つの血清中miRNA(miR-24, miR-20a, miR-122, miR-150, miR-4419a, miR-5100)を組み合わせたmiRNA indexを定義し、これを用いることで口腔癌の存在を感度55%、特異度92.5%で口腔癌を診断することが可能であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

6つの血清中miRNA(miR-24, miR-20a, miR-122, miR-150, miR-4419a, miR-5100)を組み合わせたmiRNA indexは、従来もちいられていた腫瘍マーカーと比較しても診断能が極めて高いことが示された。これらのmiRNAは細胞内シグナルに重要な分子を標的にすることが明らかになっており、その標的分子は多くの癌腫における悪性化の指標となっていることから今後治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cell plays crucial role in cancer metastasis. In this project, we developed two important techniques for oral cancer early detection and treatment.

1. We developed CTC separating device using size sort chip and its separating performance is around 99% purity from peripheral blood.
2. We developed microRNA based diagnosis system for oral cancer using peripheral blood sample from oral cancer patients. We newly defined "microRNA index for oral cancer detection" using six specific miRNAs(miR-24, miR-20a, miR-122, miR-150, miR-4419a, miR-5100) and it diagnosed oral cancer by sensitivity 55% and specificity 92.5%.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 早期診断 腫瘍マーカー 循環癌細胞 マイクロRNA

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

「真に転移を抑制するためには CTC を標的にすべきか? その方法は?」

(1) プレシジョンメディシンの臨床応用

・ 遺伝子の量的変化だけでなく質的变化が重要 **次世代シーケンス解析が必須**

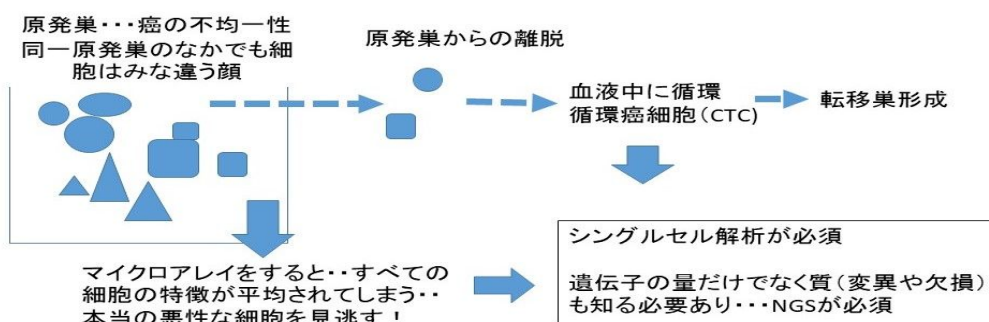
新規抗がん剤や分子標的治療が出現したことで、癌の治療選択肢は多岐にわたり、**口腔癌についても治療を個別化する必要性が生じてきた**。遺伝子情報をもとに治療法を選択するプレシジョンメディスン(精密治療)が実用化され、乳癌や肺癌では遺伝子発現レベルによって数種のグループに分類を行い、この分類によって補助化学療法を選択することが標準となっている。(Fillmore CM et al. EZH2 inhibition sensitizes BRG1 and EGFR mutant lung tumours to TopoII inhibitors. Nature. 2015 Jan 28.) 口腔癌においても遺伝子解析を行わずに癌治療ができない時代が到来しようとしている。このためには遺伝子の発現量と変異診断が同時にできる次世代シーケンスによる解析が必須である。

(2) 癌の不均一性・循環癌細胞 (CTC) への注目・ **シングルセル解析が必要**

さらに、癌細胞の不均一性が癌の浸潤転移や抗がん剤耐性の原因であることが議論されている。しかしながら多くの癌細胞の集団のなかでどれが転移を起こす細胞かを見つけることは不可能である。そこで血液中を循環する癌細胞を捕捉して、遺伝子解析することが必要となる。

(3) 口腔癌の死因は転移である・ **CTC を治療標的にする必要性**

口腔癌は集学的治療により、局所制御率が飛躍的に向上している。一方で転移を抑制することができず、死亡率は全く改善していない。CTC は転移の原因であることは疑う余地がなく、CTC を標的とした治療戦略を研究する必要性がある。



2. 研究の目的

がん転移の原因として循環癌細胞 (CTC) が考えられている。原発癌との遺伝子変異比較により CTC の機能と生物学的意義を明らかにし、CTC の捕捉と次世代シーケンスによる超早期診断から治療までを統合した次世代のプレシジョンメディスンを目指す。

方法：研究には動物転移モデルおよび口腔癌患者から分取した血液を用い、原発巣と CTC の比較を次世代シーケンスにより行う。

- (1) 口腔癌原発巣と CTC の遺伝子比較による転移原因遺伝子変化の同定
- (2) 転移原因遺伝子の in vitro, in vivo 機能解析
- (3) CTC の培養法の確立 病態解析モデルの樹立
- (4) 遺伝子変化をバイオマーカーとする転移超早期診断法の確立
- (5) 癌転移原因遺伝子の抑制法の開発
- (6) 患者病理標本での発現解析・予後解析

3. 研究の方法

(1) **CTCの分離**：現在数種の機器が販売されている。しかし、実際は細胞表面マーカーをもちいるものが多く、細胞の前処理をすることでCTCがダメージを受け培養できず、そもそも用いているCTCの細胞表面マーカーが正しいのか、細胞表面マーカーを発現していないCTCが捕捉されないことが大きな問題となっていた。さらに極めて高額で、通常の研究費で導入できない。CTCは患者から採血後すぐに分離操作を行う必要があり、外注もできない。富山県工業技術センター 高田はH26～H28基盤C (26350557)において、CTCをサイズで分離するマイクロ流路チップを開発し、特許出願 (特願2016-077717) した。特に分離が困難な白血球の癌細胞分画への混入は、1mL当たり1000個程度と、従来型のチップ (Ozkumur et al. Sci Transl Med. 5, 179ra47, 2013) の10分の1以下で、高価な装置は一切不要、採血後、そのままシステムに展開でき、1検体あたりにかかる費用も4000円程度である。我々は口腔癌分野のCTC分離に関して共同研究を行っており、細胞の前処理が不要で分離能が優れるこのシステムはCTCの培養への展開が可能である。

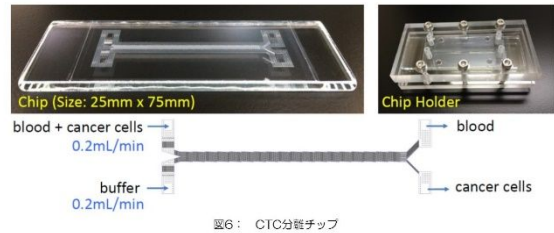
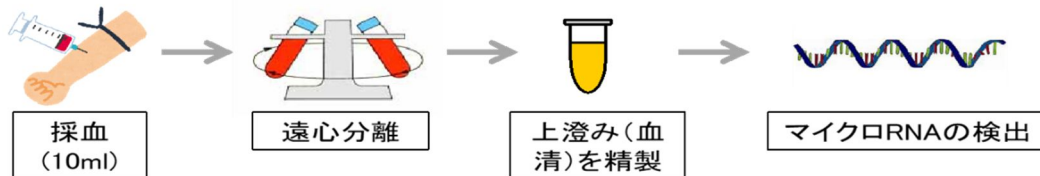


図6: CTC分離チップ

(2) **血清miRNAによる口腔癌およびリンパ節転移診断**

担癌患者と健常ボランティア血清・唾液・尿とのmiRNA比較、各種培養癌細胞のmiRNAとの比較により口腔癌特異的miRNAを検索する。先行して進めている予備検討を多施設共同で症例を拡充して行う。

口腔癌特異的miRNAを特定し、統計手法により、検出式(miRNA-index)を策定する。この方法により口腔癌の存在診断、リンパ節転移の診断が可能である。



4. 研究成果

(1) **循環癌細胞の分離についての技術開発**

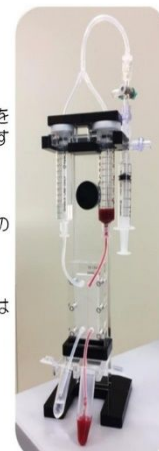
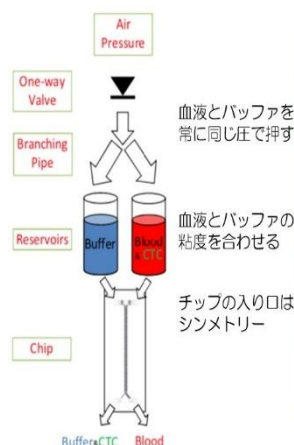
循環血液中の癌細胞(循環癌細胞:Circulating Tumor Cell(CTC))が転移を起こすことは明白な事実である。米国では循環癌細胞を分離することで患者予後の診断を行うシステムが確立している。しかし装置が高額であること、抗体による補足システムであることからCTCの一部を分取しているに過ぎないことが問題となっている。共同研究者の高田は、純国産戦略で細胞のサイズ分取によるCTC分取システムを確立しており、我々は口腔癌への適用を進めている。CTCは「どんな状況でも現在のリアルタイムサンプリングができる」ことからがんゲノム医療にも有効であると考えられる。

下の表は各種の培養がん細胞を正常末梢血に浮遊させた場合の分離効率を示している。

白血球除去率は99%を超え、純度の高いがん細胞

分離装置

シンプルな装置の開発 (特願2018-042205)



胞が分離可能となった。

細胞株	蛍光細胞数 (M)				無蛍光細胞数 (N)				細胞株分画培養細胞数 (Z)	細胞株分画白血球数 (U)	試料白血球数 (V)	白血球回収率 (%) ($W=U*100/V$)	白血球除去率 (%) $100-W$
	B	C	D	計	B	C	D	計					
SCCKN	79	58	70	207	208	201	184	593	1739.3	4982.5	7,500,000	0.0664	99.9336
H1299	105	110	111	326	266	232	267	765	2402.8	5638.6	7,500,000	0.0752	99.9248
MCF7	40	44	48	132	195	156	166	517	1185.0	4641.3	7,500,000	0.0619	99.9381

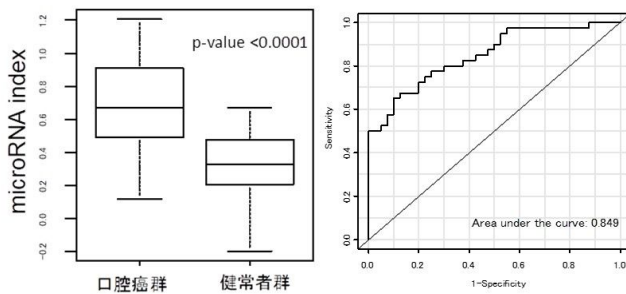
(2) 血清miRNAによる口腔癌およびリンパ節転移診断

血清中の miRNA のプロファイルから、口腔癌を診断するアルゴリズムを発見した。口腔癌のリンパ節転移についても同様のアルゴリズムで予測可能であることを発見した。

口腔癌診断アルゴリズム

microRNA index=

$$\begin{aligned}
 & -0.31567 + (0.09049 \times \text{miR-24}) + (0.21063 \times \text{miR-20a}) \\
 & - (0.04705 \times \text{miR-122}) - (0.08418 \times \text{miR-150}) \\
 & + (0.14492 \times \text{miR-4419a}) - (0.22962 \times \text{miR-5100})
 \end{aligned}$$

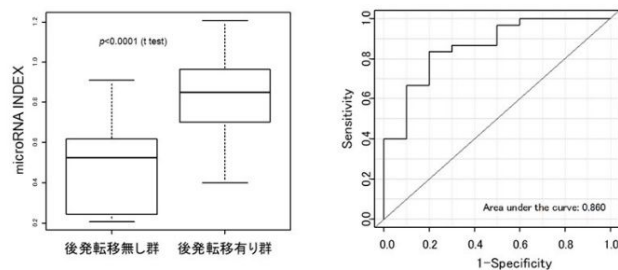


口腔癌転移診断アルゴリズム

microRNA index=

$$\begin{aligned}
 & -1.36744 + (0.84173 \times \text{miR-O}) + (0.27273 \times \text{miR-}\Delta) \\
 & - (0.30080 \times \text{miR-x}) - (0.13447 \times \text{miR-}\bullet / \text{miR-}\blacktriangle) \\
 & + (0.07004 \times \text{miR-}\odot / \text{miR-}\nabla)
 \end{aligned}$$

(miRNA名は特許の関係上マスクしています)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Kodai, Hiyake Naomi, Hamada Tomofumi, Yokoyama Seiya, Mori Kazuki, Yamashiro Kouta, Beppu Mahiro, Sagara Yasuaki, Sagara Yoshiaki, Sugiura Tsuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Circulating microRNA Panel as a Potential Novel Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 449 ~ 449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13030449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugiura Tsuyoshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Noninvasive precision diagnosis and real-time monitoring for oral cancer based on patient's time axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society of Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 153 ~ 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5843/jsot.32.153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉浦剛
2. 発表標題 患者時間軸を重視した非侵襲口腔癌精密診断とリアルタイムモニタリング
3. 学会等名 第38回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村吉晃、杉浦剛
2. 発表標題 マイクロ流体チップによるCTC の検出
3. 学会等名 第63 回日本口腔外科学会総会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村吉晃、杉浦剛
2. 発表標題 Capture of CTC using SS-Chip
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村吉晃、杉浦剛
2. 発表標題 マイクロ流体チップによるCTCの検出
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 口腔癌判定装置、口腔癌判定方法、プログラム及び口腔癌判定キット	発明者 中村康大、杉浦剛、 浜田倫史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2020-068673	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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	加藤 護 (Kato Mamoru) (40391916)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・部門長 (82606)	
研究分担者	高田 耕児 (Takata Koji) (40530621)	富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・主任研究員 (83205)	

6. 研究組織（つづき）

	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	新井 康仁 (Arai Yasuhito) (80222727)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員 (82606)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関