

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07303

研究課題名(和文) 次世代型テロメスキャンを用いた間葉系循環腫瘍細胞の新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for new biomarkers for mesenchymal circulating tumor cells using next-generation TelomeScan

研究代表者

十合 晋作 (Togo, Shinsaku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80365634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、血中循環癌細胞(CTC)検出システムであるテロメスキャン法を用いた非小細胞肺癌での臨床応用である。テロメスキャンは、癌で高発現しているテロメラーゼを認識する遺伝子組み換えアデノウイルスを感染させることで高感度CTC検出法のプラットフォームの基盤を構築した。また、EML-ALK変異陽性肺癌患者からEMT-ALK変異陽性のCTCを同定し、検出されたCTCはがん細胞であることを証明した。悪性度が高く従来法では検出が困難であった上皮間葉転換を起こしたCTC(EMT-CTC)、免疫チェックポイント阻害剤の奏功に関連するPD-L1を発現するPDL-1-CTCの定量も可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、血中循環癌細胞(CTC)検出システムであるテロメスキャン法を用い悪性度が高く従来法では検出が困難であった上皮間葉転換を起こしたCTC(EMT-CTC)、免疫チェックポイント阻害剤の奏功に関連するPD-L1を発現するPDL-1-CTCの定量が可能となった。非小細胞肺癌の早期診断から個別化医療に向けた革新的な手法であることを立証し、世界初の画期的な臨床応用システムの基盤形成を行った。薬事承認申請までを視野に入れた研究開発であり、テロメスキャンによるCTC検出法から、様々ながん患者のがん関連死亡の減少と生存期間の延長により、国民の生活に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) can provide predictable information about the early diagnosis, prognosis and recurrence period in the various types of cancer. CTCs include a variety of subtypes with different functional characteristics. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is considered as an essential process in the metastatic cascade and acquiring chemoresistance. We established further high speed and sensitive CTCs detection system by using the TelomeScan and clarified CTCs with various phenotype including mesenchymal marker and PD-L1, the immuno-check point inhibitor response marker could be as useful and reliable clinical surrogate biomarkers to predict treatment-sensitivity/resistance and recurrence period. We also succeeded to detect EML4-ALK mutation-CTC derived from the patient of NSCLC with EML4-ALK mutation to demonstrated detected CTC by TelomeScan was defiantly lung cancer cells revealed the drivers oncogene mutation.

研究分野：肺がん

キーワード：循環腫瘍細胞 肺がん バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は血液の流れに乗って遠隔臓器に生着して転移を起こす。この血中に浮遊する細胞を血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) と呼ばれており、その臨床的な測定意義が近年注目されている。採血等でより高感度に CTC の検出が実現化すれば早期診断から再発予測による予防的治療、抗がん剤の奏効/耐性化予測から個別化医療にむけたより効果的な治療法の提供が非侵襲的に評価可能となる。従来 CTC を捕捉するシステム (CellSearch System; CSS) が米国の Veridex 社によって開発された。しかしながら、FDA に承認された CSS では、CTC を捕捉するために上皮マーカーの EpCAM 抗体を用いるため、癌の進行に伴う EpCAM 発現の低下や上皮間葉移行 (EMT) による EpCAM 陰性の CTC の検出には対応していない。よって、この手法では多くの EpCAM 陰性の CTC の検出限界が示唆されている。この CSS の弱点を克服するため、我々は CTC の測定に兎島らのテロメスキャン法を採用した (*J Clin Invest.* 2009)。がん細胞は不老不死に作用するテロメアを維持する分子機構を獲得しておりテロメラーゼの活性により無制限の増殖能を有している。このテロメラーゼを発現する腫瘍細胞を標的とした分子標的ウイルス製剤に GFP を組み込んだアデノウイルスベクターを共感染させると腫瘍細胞選択的にアデノウイルスが増殖する。この測定法により GFP の緑色蛍光発色した生きた CTC のみの計数が可能となり極めて高感度に可能となる。本法は『生きたまま』『進行形』の血中のがんを直接確認できるメリットがある。この方法は、腫瘍壊死や化学療法中の死細胞から遊離した循環腫瘍核酸 (ctDNA、ctRNA) を標的とした検査では捉えることができないがん患者診断にも対応できる。このように、CTC そのものを補足して、そのバイオマーカーを用いた検査は、適応幅が広い説得力の高い診断となる。テロメスキャン法は細胞表面抗原を認識する抗体ではなく、テロメラーゼを指標として高効率に癌を捕捉する手法のため、EMT を起こした EpCAM 陰性の CTC (EMT-CTC) も捕捉可能である。この利点は本研究を遂行する上で非常に重要なポイントとなる。上皮間葉転換 (EMT) は転移機構や抗癌剤の耐性化に重要な役割を持つ。我々は、テロメスキャン法を用い早期非小細胞肺癌から高感度に CTC を同定することに成功し、間葉系の CTC が治療奏効の有用な代用マーカーになることを報告した (*Oncotarget*, 2017 Togo, S)。CTC を検出し制御することが薬剤耐性や再発を防ぎ生存期間を延長につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究は、がん生体外ウイルス診断薬「テロメスキャン」を用いて、血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell : CTC) をハイスループットかつ高感度に検出可能な測定システムを構築し、がん早期診断や治療奏功予測への臨床応用を目的としている。テロメスキャン法で CTC を高感度に検出し、非小細胞肺癌の早期診断から個別化医療に向けた革新的な手法であることを立証し、世界初の画期的な臨床応用システムの実現を目指す。

3. 研究の方法

テロメスキャンを用い、高速かつ高効率な測定化を実現させ、EMT を含む様々な表現型を持つ CTC 測定が有用で信頼性のある代用マーカーになり得るか検証を行う。テロメスキャンにより生きた CTC は GFP 陽性に可視ラベル化が可能で、抗-vimentin、抗-PD-L1 抗体などの治療選択決定につながる様々な抗体を細胞免疫染色で解析する。CTC を EMT など

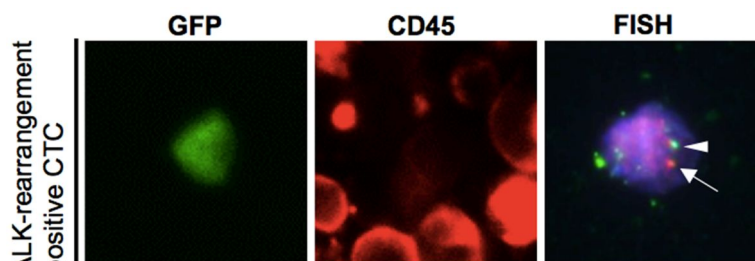
の表現型別に分別捕捉するだけでなく、免疫チェックポイント阻害剤の奏効に関連する PDL-1 タンパクの CTC 上の発現も解析した。また、肺がん分子標的治療薬の奏効予測に関わるがん遺伝子変異(EGFR 変異、EML4-ALK 変異など)の CTC の発現解析を行った。更に進行期肺がん患者を対象に、化学療法直前、投与後 2 コース後で、実際の抗がん剤の奏効と CTC の経時変化の解析から抗がん剤の奏効予測、再発/耐性予測バイオマーカーとしての有用性を検証した。また CTC の表現型解析に着目した。

4. 研究成果

申請者はがんで高発現しているテロメラーゼを蛍光標識することで EMT-CTC の補足効率を高めた高感度 CTC 検出法のプラットフォームの基盤を構築した。非小細胞肺がん患者の 3mL の血液から生きた CTC の 高効率な濃縮方法を開発し、特許出願を行った。本システムによって、早期肺がん症例からも 85%以上の高感度検出に成功している。また、悪性度が高く従来法では検出が困難であった上皮間葉転換を起こした CTC (EMT-CTC)、免疫チェックポイント阻害剤の奏効に関連する PD-L1 を発現する PDL-1-CTC の定量も可能となった。

また、EML-ALK 変異陽性肺がん患者から上皮間葉転換を起こした CTC、ALK 融合遺伝子陽性の CTC が FISH 法で検出された CTC はがん細胞であることを証明した(Oncotarget 2018)。

2020 年度から、非小細胞肺がん患者の抗癌剤及び免疫チェックポイント阻害剤治療前後における、CTC 数の推移のモニタリングを開



始した。2021 年 12 月に計 100 例の患者登録を終了した。解析の結果、PD-L1 陽性の CTC 数の推移は、投与 2 コース後の採血のタイミングで奏効判定との間に有意な相関がみられた。Vimentin 陽性の EMT-CTC が検出された症例数は少ないが、再発症例の一部では EMT-CTC 数が増加することから肺がん治療の奏効予測マーカーになりえることが確認された(論文投稿準備中)。本研究結果から間葉系 CTC の臨床的な意義の重要性を総説で論文報告(Cancers Basel 2020)した。

本邦初の CTC 捕捉システムであるテロメスキャン法を用いた臨床研究の確立、臨床応用の早期実現は、特許および臨床検査法として医学へ貢献するのみならず日本の知的財産の活用という側面でも非常に貴重な意義のある研究である。本技術の全国的な普及により少量採血による簡便な早期がん診断法としてドックや検診への導入を促進し、必要最小限の費用で国民本位の効率的で質の高い医療サービスを国民へ提供する。全てのがん種を早期発見・治療介入が可能となれば、がん治療に掛かる高額な医療コストの削減が見込める。がん死因第 1 位の肺がんから全がん種の患者の治療奏効率の向上と生存期間の延長で国民生活の質の向上と社会経済の発展への貢献が期待される。

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 Okabe Takahiro, Togo Shinsaku, Fujimoto Yuichi, Watanabe Junko, Sumiyoshi Issei, Orimo Akira, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Mesenchymal Characteristics and Predictive Biomarkers on Circulating Tumor Cells for Therapeutic Strategy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3588 ~ 3588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12123588	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 Watanabe J, Togo S, Sumiyoshi I, Namba Y, Suina K, Mizuno T, Kadoya K, Motomura H, Iwai M, Nagaoka T, Sasaki S, Hayashi T, Uekusa T, Abe K, Urata Y, Sakurai F, Mizuguchi H, Kato S, Takahashi K.	4. 巻 9 (35)
2. 論文標題 1.Clinical features of squamous cell lung cancer with anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearrangement: a retrospective analysis and review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 24000-24013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.16818.	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	小見山 博光 (komiyama hiromitsu) (30348982)	順天堂大学・医学部・非常勤講師 (32620)	

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
---------	---------