

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17684

研究課題名(和文) 高感度循環腫瘍細胞検出法：テロメスキャン法を用いた肺癌臨床マーカーの検討

研究課題名(英文) Investigation of Clinical Markers for Lung Cancer Using TelomeScan technology

研究代表者

藤本 雄一 (FUJIMOTO, Yuichi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：80807363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血中循環腫瘍細胞(CTC)は原発巣から末梢血中に放出されるがん細胞であり、予後予測や治療奏効予測バイオマーカーとしての応用が期待される。FDA認可のCellSearch Systemは上皮系マーカーを用いてCTCを濃縮し、上皮間葉転換(EMT)を起こしたCTCに対応していない。本研究では、EMT-CTCとがん免疫逃避マーカーであるPD-L1を発現するCTCに着目してテロメスキャンを基盤技術とするCTC検出システムを開発し、肺癌患者臨床血液検体中のEMT-CTCとPD-L1 CTCを捕らえることに成功した。最終的には、PD-L1 CTCの治療奏効予測バイオマーカーとしての有用性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テロメスキャンを基盤技術とし、悪性度が高いEMT-CTCやPD-L1を発現するCTCを検出できるシステムは、様々な臨床的研究への応用が期待され、その学術的意義は大きい。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。また、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癌診断法としてドックや検診への導入促進、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。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) are cancer cells released in the peripheral blood from the primary tumor lesion. The detection of CTCs has the potentials as the predictive biomarkers of prognosis and treatment response. CellSearch System, the FDA-approved CTCs detection system, employs representative epithelial marker, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) to capture the rare CTCs and thus results in underestimate the CTCs expressed epithelial mesenchymal transition (EMT) measurement. In the present study, we developed the new technology TelomeScan which achieved the high sensitive CTC detection including the capture of EMT-CTCs. The developed CTCs detection system based on TelomeScan technology succeeded the capture of EMT-CTCs and CTCs expressing Programmed Death Ligand 1(PD-L1) in the peripheral blood of lung cancer patients. Finally, we demonstrated that the usability of number of PD-L1 CTCs as a predictive biomarker for the chemical treatment.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：血中循環腫瘍細胞 非侵襲的高感度測定 治療奏効予測バイオマーカー 早期癌判定バイオマーカー 転移再発予測 循環腫瘍細胞 肺癌 テロメスキャン

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

血液中の癌細胞、すなわち血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) 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直接原因となる。肺は血流が極めて豊富な臓器であるが故、早期発見による根治的手術症例でも再発率が高く 9 割は転移再発病巣の合併症により死亡する。採血で簡易に高感度な 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、抗癌剤の奏効/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。医療承認(FDA)を得た、CTC 捕捉システムの CellSearch®System (CSS) は、CTC 表面の上皮マーカーの EpCAM 抗体を用いるため、癌の進行や上皮間葉転換(EMT)による EpCAM 発現の低下した 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

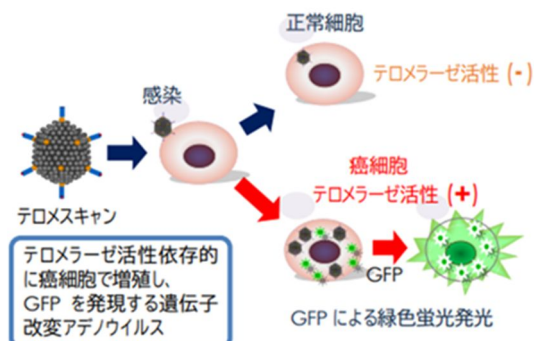


図1 がん体外診断薬テロメスキャン

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、申請者らは CTC の測定に児島らのテロメスキャン法を採用した(Kojima et al. J Clin Invest. 2009)。癌細胞は初期段階から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し、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検出が可能となった。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全ての癌種診断にも対応できる。本法を用いた CTC 検出の意義は、間接的癌遊離マーカーではなく、生きた癌細胞そのものを直接捕捉するため、適応幅が広い説得力の高い癌臨床バイオマーカーとしての診断価値がある。申請者らのグループはこのテロメスキャン法の将来性に着目し、既に臨床検体を用いた CTC の捕捉試験を行っている。癌細胞は初期段階からテロメラーゼ活性が高く、その性質を応用したテロメスキャンは、癌の早期検出のみならず、癌細胞に対する分子標的ウイルス製剤への応用まで、広範な可能性を秘めている。血中循環に移動するために EMT を起こし浸潤能が亢進させた多くの癌細胞は、上皮系 CTC マーカーとして使われている EpCAM や CK の発現を喪失している可能性が高い。テロメスキャン法は細胞表面抗原として上皮系マーカー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(図 1)。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。肺癌原発巣では早期段階から EMT マーカーが発現しそのようなタイプの肺癌は早期での根治手術後も再発の生存期間が短いことが報告されている。また、乳癌患者では抗癌剤の耐性化と再発時に EMT-CTC が増加し EMT を起こした CTC は癌幹細胞と関連が強く治療抵抗性で悪性度が高いと考えられている(Yu et al. Science. 2013)。よって EMT-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事が期待される。

## 2 . 研究の目的

申請者らのグループは既に EML4-ALK 融合遺伝子変異陽性の CTC を FISH 法で検出し、ALK 阻害剤の奏効/耐性例における ALK 変異 FISH 陽性 CTC の推移を報告している(Watanabe et al. Oncotarget. 2018)。

本研究では非小細胞肺癌での CTC 捕捉技術を向上するため、上皮間葉転換 (EMT) を起こした EMT-CTC に注目し、テロメスキャンによる検出精度を評価し、臨床応用での有用性を証明することを目的とした。また、近年、免疫チェックポイント阻害剤が肺癌での有効性が注目されているが、その奏効に関連する PD-L1 の CTC 上の発現も解析した。特に治療抵抗性で悪性度の高い EMT-CTC におけるこれらバイオマーカーの表現型に着目した。

## 3 . 研究の方法

まず、EMT-CTC を高効率で回収するために必要な EpCAM 非依存的な濃縮法を検討した。その後、開発した濃縮プロトコルを用いて、肺癌患者の CTC サンプルから血球系マーカー CD45 の陰性の確認と間葉系 (Vimentin) EMT マーカーの細胞免疫染色を行い、EMT-CTC の存在を調べた。進行期肺癌患者を対象に、化学療法直前、投与後 1、2 コース後で、実際の抗癌剤の奏効と EMT-CTC の経時変化の解析から抗癌剤の奏効予測、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。近年、免疫チェックポイント阻害剤が肺癌での有効性が注目されているが、その奏効に関連する PD-L1 の CTC 上の発現も解析する。特に治療抵抗性で悪性度の高い EMT-CTC におけるこれらバイオマーカーの表現型にも着目した。

## 4 . 研究成果

( 1 ) 濃縮・染色法を新たに開発し、肺癌患者の 3 mL の末梢血から EMT-CTC や PD-L1 を発現する EMT-CTC の検出を達成した。

( 2 ) 薬剤投与直前と 2 コース後において、肺がん臨床血液検体中の EMT-CTC 検出数と治療奏効との相関は確認されなかった。しかしながら、がん免疫逃避マーカーである PD-L1 CTC 検出数は、RECIST PD 症例で統計学的有意差をもって増加し、RECIST PR 症例では有意に減少した。

以上の結果より、本研究で開発した CTC 検出システムは悪性度が高いと推測される EMT-CTC と PD-L1 CTC を検出でき、かつ PD-L1 CTC の治療奏効予測バイオマーカーとしての有用性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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