

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23881

研究課題名（和文）血中循環大腸癌細胞の捕捉と遺伝子解析による遠隔転移関連遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of metastasis-related genes by analyzing genes in captured circulating tumor cells

研究代表者

石橋 嶺 (Ishibashi, Rei)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50843299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌の診療は癌細胞内の遺伝子変異・発現情報に基づいた診療に急速にシフトしつつある。したがって、今後、簡便に、頻回に、癌細胞の遺伝子情報を取得する方法が必須となる。血中循環腫瘍細胞（circulating tumor cell）の捕捉は、その手法のひとつであるが、本研究で簡便なポリマー樹脂CTCチップを応用し、閉塞性大腸癌に対する内視鏡的金属ステント留置術の前後でのCTC数の変化と中心に検討しつつCTCの確実な捕捉法を樹立し、捕捉したCTCのホットスポットの遺伝子変異の解析を行い、今後のCTCの捕捉から、癌細胞の遺伝子の網羅的解析の基盤を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果によって、これまで体に負担がかかっていたがん組織の採取が、血液から行えるようになり、小さい負担で効果的な治療法を選択することが可能となる。血中を循環する癌細胞の正常を詳しく調べることで血行性転移に関わる遺伝子等、新たな治療標的の同定も可能となる。

研究成果の概要（英文）：Recent progress in the cancer systemic therapy has made it possible to choose appropriate therapeutics dependin on the gene mutation signature of the cancer tissues. Because of this trend, frequent and conventional acquirement methods of cancer cells are needed. In this study, custom methods to acquire CTCs conventionally have been developed. Using this method, we can acquire cancer cells with minimum invasion and we could detect gene mutations in the cancer cells, which may open a new avenue to choose appropriate therapeutics.

研究分野：大腸癌研究

キーワード：血中循環腫瘍細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Microsatellite instability の有無による免疫チェックポイント阻害剤の適応決定に代表されるように、癌は遺伝子変異状況によって治療法選択をする時代になりつつある。このことを鑑みると、癌の診断・治療・経過観察において、癌細胞の遺伝子情報を、必要時に非侵襲的に頻回に得ることは、極めて重要となってくると思われる。そのような情報取得を実現する手法として、癌由来の遺伝子や細胞を体液中から得る“Liquid Biopsy”が期待されている。血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) は、末梢血中を流れる癌細胞で、軽微な侵襲で繰り返し採取可能なことから、Liquid Biopsy のひとつとして、臨床応用の期待が以前から大きくかけられている。しかし、現在入手可能な CTC 解析装置として唯一 FDA の承認を得ている“CellSearch”はまったく普及していない。その最大の理由は、本機が特定の上皮マーカーを持つ癌細胞にしか適用できず、採取した細胞の遺伝子解析もできず、測定費用が高額で、利用価値が殆ど無いためと思われる。

本研究者は癌の特異的表面マーカーに対する抗体による CTC 捕捉原理を応用し、癌細胞特異的抗体を結合させたマイクロ流体デバイス「樹脂 CTC チップ」(富山産技研で開発)を応用し、数年前から臨床検体を用いた検討を行っていた。このデバイスは、簡便に安価に CTC 解析ができるという特徴があり大変有用性が高い。しかし、十分な自動化が出来ておらず、また捕捉した CTC から遺伝子解析を行うフローも確立されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト大腸癌症例を対象として、CTC を捕捉回収する方法を開発し、さらに、遺伝子増幅と遺伝子解析のフローを確立し、臨床情報との相関を解析することを目的としている。多くの他の研究が癌原発巣や癌転移巣の遺伝子解析を行っているのに対して、本研究は血中を流れる癌細胞を捕捉するため患者への負担が少ない。さらに、単に CTC の捕捉だけではなく、そこから遺伝子解析をできれば、現状では原発巣などからの生検に頼っている遺伝子解析よりもはるかに非侵襲的に簡便に有用な情報が得られるようになるのでは、と考え、CTC からの遺伝子解析の重要性を考えた。その遺伝子解析を加えることで、今まさに転移に関わる可能性のある癌細胞を用いた研究を進められる。これは、患者さんを前にした CTC 捕捉と回収・遺伝子発現解析の経験が一体とならないとできないことであり、さらに臨床情報との相関解析を行うことで活きた情報での統合解析が可能となる。

CTC チップ自体は、2007 年頃にマサチューセッツ総合病院、ハーバード大の研究者らが提案した CTC 単離デバイス (Nagrath et al., Nature 2007, 1235) が大元であるが、FDA に唯一承認されている CellSearch 以外のデバイスは臨床的に用いられるには至っていない。それには、コスト・flexibility・細胞取得法がないこと、などが主な理由となっている。本研究で用いる樹脂ポリマーを基盤とした CTC チップは安価で取得抗体を任意に変更でき、捕捉された細胞ピックアップも可能なため、本提案研究を行う上で大きなアドバンテージとなる。また、オンコパネルの実用化、遠隔転移における癌幹細胞の概念の確立、など、社会的・学術的状況を鑑みても、CTC 遺伝子解析研究を進める重要な機会と考えられたため、臨床的なバックグラウンドと基礎的知識と技術を融合しその分野をリードする研究を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CTC 捕捉法の確立：

それまで用いていた CTC 捕捉法は、白血球の混在が多く、かつ、サンプルやバッファーの入れ替えのために、マニュアルでの一連の操作のために装置についている必要があった。本研究では、このフローを改善し、白血球の混在を減らすために事前に白血球を除去する方法を運用し、さらに、CTC チップへのアプライ法を機械化することで簡便に術者の負担を軽減した形で CTC 捕捉が出来るように開発を行った。

### (2) 捕捉 CTC の回収方法：

CTC チップで捕捉した CTC を回収する方法を検討した。マイクロマニピュレーターを用いた一細胞ずつの回収も検討したが、その後の簡便性を鑑みて、剥離液を用いて一括して回収する方法を採用した。

### (3) 実際の臨床検体での CTC：

実際の大腸癌患者さんの検体を用いて CTC の捕捉を試みた。チップへの捕捉とともに、細胞染色を行い、捕捉した CTC の数をカウントした。その際、消化管ステントを留置する必要がある閉そく性大腸癌患者を選択し、消化管ステントの留置に伴う CTC 数の変化を経時的に観察した。それによって、至適タイミングを同定することを合わせて検討した。

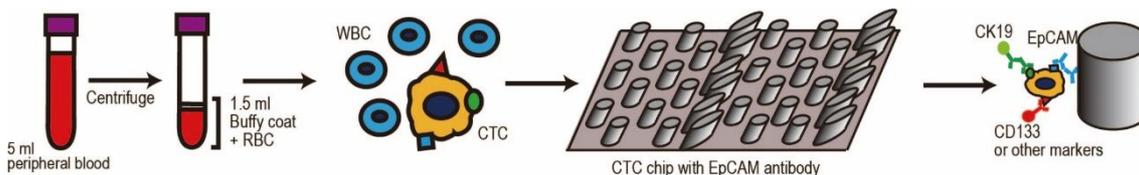
### (4) 捕捉した CTC からの遺伝子解析：

捕捉した CTC から遺伝子解析をするために、捕捉した CTC を細胞剥離液を用いて一括回収し、そこから DNA を抽出したうえで、ゲノムワイドに DNA を増幅し、そこから遺伝子変異を検出するべく実際の臨床検体を用いて検討を行った。

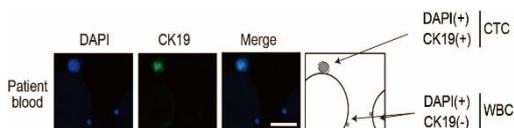
#### 4. 研究成果

##### (1) CTC 捕捉法の確立：

従来の CTC チップを用いた捕捉法は下記のフローに従っていた。



(上図) CTC チップのフロー：CTC を抗 EpCAM 抗体で capture し、他のマーカーで偽陽性を排除する。



(左図) 捕捉した CTC の染色代表例

これでも十分 CTC の捕捉はできていたが、問題点として、白血球の混在が多く、CTC と明確に同定するには細胞染色が必要だった。その場合、CTC 数をカウントするだけであれば問題なかったが、一括して回収し遺伝子解析をするには野生型の遺伝子型を持つ白血球の混在は解析を難しくさせる可能性があった。そこで、本研究内では、CTC チップへのアプライの前に、CD45 ビーズを用いた白血球の除去の過程を入れることで、CTC チップへのアプライ前に極力混在する白血球を除くプロセスを導入した。

##### (2) 捕捉 CTC の回収方法の検討：

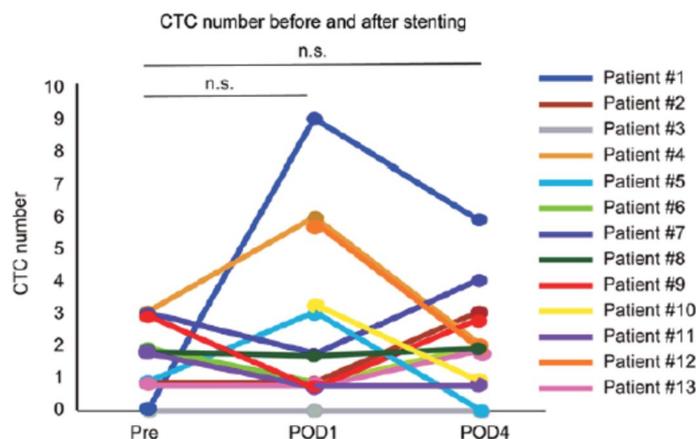
捕捉した CTC を円滑に回収する方法として、細胞剥離液を用いた回収を複数の手法を用いて試した。当初は細胞の形態を保ったまま回収することを試みていたが、剥離液の detergent を濃くしないと十分な回収が出来ないが、いっぽうで細胞の形態は壊れてしまうという状況になった。その後の遺伝子解析のことを鑑みると、細胞の形態が失われても、全量回収することの方がメリットがあると考えられたため、SDS 入りの剥離液を用いて回収した。それによって、解析に足る DNA を含んだ回収が可能となった。

##### (3) 実際の臨床検体での CTC：

大腸癌狭窄に対する内視鏡的な金属ステント留置術の功罪(穿孔や転移を惹起してしまい、かえって予後を短くするのではないか)が議論されていたこともあり、内視鏡的ステント留置術後の CTC 数の変化を経時的に見ることを臨床検体での応用として、最初に試みた。

その結果、下記の図のように一過性に CTC 数は増えるものの、すみやかにベースラインに戻るものが示された。

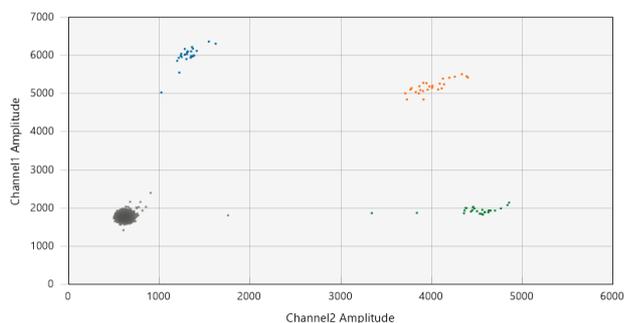
この結果は、CTC がきちんと捕捉されるということを担保するだけでなく、金属ステント留置による CTC の放出が一過性にあるものの、その後は永続的には続かない、ということを示しており、ステント留置後に CTC を捕捉すれば効率的に CTC を捕捉することが出来るだろうということが推定された。



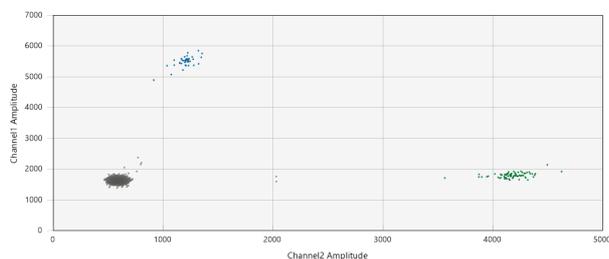
##### (4) 捕捉した CTC からの遺伝子解析：

捕捉した CTC から細胞剥離液を用いて遺伝子を回収し、それをゲノムワイドに Phi polymerase

を用いて増幅した。その後、もともと存在の分かっている Kras 遺伝子の変異が検出可能かどうか、digital PCR を用いて検討した。その結果、下記の図のように、Wildtype と mutant type の Kras 遺伝子の増幅が確認され、ヘテロで変異を持っていることが検出できた。



ただし、この場合、Wildtype と mutant type の両方が一つの droplet 内で増幅している場合が多いことが理解しにくかった。その理由として、ゲノムワイド増幅の際に DNA がアニーリングしていることが想像されていたので、denature の過程をいれたり、preamplification の過程を導入したりすることで、それらの droplet は検出されなくなったので、これでフローを確定した。



これらの検討によって、検体処理のフロー、遺伝子解析のフローが確定し、今後、網羅的な遺伝子解析や任意の遺伝子変異の検証ができるようになった。

今後は今回樹立した方法を用いて、臨床的な有用性を確認するとともに、血行性転移に関わる遺伝子の探索・同定、あるいは、DNA メチル化や RNA 発現量の検討、などにも用いていくことが出来れば、と考えている。

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 Ishibashi Rei, Yoshida Shuntaro, Odawara Nariaki, Kishikawa Takahiro, Kondo Ryo, Nakada Ayako, Hakuta Ryunosuke, Takahara Naminatsu, Tanaka Eri, Sekiba Kazuma, Seimiya Takahiro, Ohnaga Takashi, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Detection of circulating colorectal cancer cells by a custom microfluid system before and after endoscopic metallic stent placement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 6397-6404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.11047	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 Tanaka Eri, Miyakawa Yu, Kishikawa Takahiro, Seimiya Takahiro, Iwata Takuma, Funato Kazuyoshi, Odawara Nariaki, Sekiba Kazuma, Yamagami Mari, Suzuki Tatsunori, Ishibashi Rei, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Expression of circular RNA CDR1AS in colon cancer cells increases cell surface PDL1 protein levels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1459-1466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7244	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
---------	---------