

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390257

研究課題名（和文）マイクロフルイディクスによる循環血液癌細胞検出法の開発と癌転移機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of cancer metastasis using circulating tumor cells purified by micro-fluidics techniques

研究代表者

長谷川 好規 (HASEGAWA YOSHINORI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20270986

研究成果の概要（和文）：肺癌の転移機構の解析による治療分子標的の探索を目的として、転移をしている癌細胞そのものを分離・濃縮する技術開発を行い、プロトタイプモデルを作成した。また、循環血液中癌細胞(CTC)の生物学的・遺伝学的特性について解析し、CTCの候補遺伝子の検索をおこなった。EMT 機序の分子メカニズムとして ZEB1 (EMT 制御分子) 解析と Twist 遺伝子解析を行い、これらの分子が肺癌における転移制御の分子標的になる可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To investigate the mechanisms and the search of the molecular targets for lung cancer metastasis, we developed the methods for purifying the circulating tumor cells (CTC) from peripheral blood, and we created the prototype device using the nanopillar technique. We also investigated the genetic profiles of CTC, and selected the genes, which were characteristic for CTC. EMT regulatory molecules of ZEB1 and Twist will become molecular targets for lung cancer metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：循環血液中癌細胞、マイクロフルイディクス、肺癌、上皮間葉系細胞転換

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本におけるがん死亡原因の1位を占める疾患で、さらにその数は増加の一

途をたどっているが、その治療には限界があり一層の進歩が必要である。特に、早期から転移を来しやすいという生物学的特性

が治療を困難にしており、肺癌転移の分子メカニズムの解析と転移抑制のための治療標的の探索が新規の治療展開に必須であると考えられる。我々は、これまで肺の炎症と線維化メカニズムにおける流血中骨髄由来細胞や Cre-loxP system を用いた上皮間葉系細胞転換 (EMT) の役割について研究を展開してきている (JCI 2004)。EMT とは胎生期の臓器形成や創傷治癒においてみられる上皮系細胞から間葉系細胞への転換であるが、近年、がんの浸潤能と転移能の獲得に EMT が関与することが報告され EMT 現象に関与する分子の同定が始まったところである。しかし、実際に転移をしている細胞の細胞形質を研究するために循環血液中癌細胞 (circulating tumor cell, CTC) を分離することは極めて困難であった。近年、ナノバイオデバイスの開発が急速に発達を遂げ、循環血液中腫瘍細胞の検出技術とその臨床応用例が報告された (Nature 2007, NEJM 2008)。本研究は、ナノピラー構造技術の応用 (nanopillar、nanofabrication technique: Baba Y, Anal Chem 2004) により、転移をしている癌細胞そのものを分離・濃縮する技術開発を行い、その技術を用いた CTC の生物学的・遺伝学的特性を明らかにすることである。最終的な目的として、転移メカニズムの分子標的の可能性について追求する。

## 2. 研究の目的

本研究課題は2つの目的を有する。

(1) CTC 検出に関するナノバイオデバイスの開発: 文部科学省先端研究施設共用イノベーション創出事業ナノテクノロジー・ネットワーク 中部地区ナオテク総合支援 (ナノデバイス開発支援—名古屋大学プラズマナノ工学研究センター) のもとに CTC 検出に適するナノ・マイクロピラー構築を作成することである。これにより、病態に応じた CTC を分離・濃縮でき、細胞形質の解析ばかりでなく、治療反応性や予後予測などの病態解析研究へ展開するための基盤を形成する。

(2) EMT 関連遺伝子と CTC の細胞形質の研究: 分離・濃縮した CTC における遺伝子発現と分子間の協調性を確認することにより、転移メカニズムにおける EMT の役割を明らかにする。CTC の生物学的・遺伝学的特性を明らかにすることにより、転移メカニズムの分子標的の可能性について研究する。

## 3. 研究の方法

(1) CTC 検出に適したマイクロフルイディック・デバイスの開発: 文部科学省先端研究施設共用イノベーション創出事業ナノテ

クノロジー・ネットワーク 中部地区ナオテク総合支援 (ナノデバイス開発支援—名古屋大学プラズマナノ工学研究センター 馬場嘉信教授) の研究支援の下に、循環血液中の微小な細胞群の検出に適したナノ・マイクロピラー構造の設計と試作を開始する。その中で、マイクロフルイディック・デバイス流路内のナノピラーへの CTC 結合認識に用いる抗上皮細胞接着分子抗体 (EpCAM, 抗 cytokeratin, CD133) について、そのナノピラーへの至適な化学的結合をアビジン・ビオチン法により確立する。試作されたマイクロフルイディック・デバイスを用いて、肺癌細胞株 NCI-H1650(EpCAM+) を用いた応用化試験を行う。マイクロ流路の流量とナノピラー構造に関する機能の適正化を行う。さらに、細胞株分離効率を NCI-H1299, A549 などの他種類の肺癌細胞で検討する。さらには EMT にて発現が増強する Vimentin、Fibronectin を標的に検討する。

(2) EMT 関連遺伝子と CTC の細胞形質の研究: CTC の分離・濃縮に先駆けて、肺癌転移に関わる EMT, Stem-like phenotype の解析を実施する。EMT 関連遺伝子として、ZEB1、Twist、EpCAM) の発現ベクターの作成を実施する。さらに、cdk4 とテロメラーゼ導入により不死化細胞株として樹立された HBEC 細胞に EMT 関連遺伝子を導入し、悪性細胞への形質転換におよぼす影響について、軟寒天中の増殖能や浸潤能を検討する。また、EMT の獲得形質を上皮系細胞マーカー (E-cadherin, Desmoplakin, Cytokeratin) と間葉系細胞マーカー (N-cadherin, Vimentin) を指標に評価する。EMT 関連遺伝子を肺癌細胞株に遺伝子導入し、その獲得形質を解析すると同時に、これまで知られている肺癌において高頻度にみられる遺伝子異常 (p53 変異、変異型 EGFR, 変異型 RAS 等) の遺伝子発現に与える効果とその協調性について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 循環血液中の微小な細胞群の検出に適したナノピラー構造の設計と試作を開始し、プロトタイプモデルを作成した。その結果、プロトタイプのマイクロチップは癌細胞の捕捉率が低くチップデザインの改良の検討を始めると同時に、チップの生産性の向上を目的とした材質変更のための、抗上皮細胞接着分子抗体 (EpCAM) の新材料への固定化法の検討を開始した。マイクロフルイディック・デバイス流路内のナノピラーへの CTC 結合認識に用いる抗上皮細胞接着分子抗体 (EpCAM, 抗 cytokeratin, CD133) について、そのナノピラーへの至

適な化学的結合をアビジン・ビオチン法により確立し、試作品を用いた実証実験を開始した。さらに、新しいデバイス開発として、ナノポア構造による CTC trapping の試作と応用を開始した。

(2) CTC の分離・濃縮に先駆けて、肺癌転移に関わる EMT, Stem-like phenotype の解析を実施した。非小細胞肺癌株を用いて EMT 制御因子である Snail, Slug, ZEB1, SIP1, Twist の発現を測定した。同時に Vimentin (間葉系) と E-cadherin (上皮系) の発現量の比により、EMT と EMT 制御因子との関連を検討した。その結果、Vimentin と E-cadherin は逆相関することが示された。その中で、EMT 制御因子として ZEB1 の発現が最も E-cadherin と逆相関し、Vimentin と正の相関をしており、Vimentin/E-cadherin ratio (VER) と ZEB1 の発現に強い相関が認められた。次に、Twist においても関連は認められたが、一方、Snail, Slug, SIP1 の発現と VER との相関は乏しかった。

続いて、ZEB1、Twist の生物学的特性を解析した。ZEB1 の RNA 干渉法による遺伝子発現抑制により、E-cadherin の発現上昇にともない、癌細胞の増殖能の低下、液体培地および軟寒天中でのコロニー形成能の抑制が認められた。一方で、caspase-3 蛋白の発現上昇、細胞周期解析における sub-G1 相の増加が見られ、アポトーシスの誘導が示唆された。ZEB1 の発現が miRNA の発現と関与する可能性があることから、肺癌における役割を検討した。その結果、ZEB1 の発現と miR-200c と miR-205 の発現が有意に逆相関していた。

以上のことから、ZEB1 は肺癌の EMT において中心的な役割を果たす分子であり、ZEB1 の発現抑制は癌細胞の増殖を阻止することから、今後の重要な肺癌治療標的の一つとなると予測された。

これらの現象が、肺癌以外の癌腫でも観察されるかどうかを検証する目的で、悪性胸膜中皮腫での検討を実施した。その結果、ZEB1 の一時的遺伝子発現抑制は悪性胸膜中皮腫細胞の増殖を劇的に抑制するが、安定的遺伝子発現抑制は EpCAM の発現上昇を引き起こし ZEB1 遺伝子発現抑制による増殖抑制効果を減弱させることが明らかになった。従って、癌腫によっては ZEB1 遺伝子発現抑制に伴う他遺伝子群の発現変化を考慮する必要があると示唆された。

次に、Twist の生物学的特性を解析した。ZEB1 と同様に Vimentin/E-cadherin ratio (VER) と正の相関があり、Twist 遺伝子の強制発現により、上皮系マーカー発現減少と間葉系マーカー発現の増加を認めた。その結果、細胞遊走能が 40 倍に増加し、

転移形質の獲得を示唆する所見であった。miRNA200family の発現は Twist 遺伝子の強制発現により影響は受けなかった。FAK のリン酸化は Twist 遺伝子発現の増加により 1.5 倍の増強を認めた。

以上の事から Twist 発現の程度は肺癌細胞により異なり、その遊走能の差を反映すると同時に、MMP や FAK の活性化と関連しており、肺癌の浸潤転移過程に Twist の発現を介する EMT 獲得が関与している可能性が示唆された。Twist もまた、転移抑制における新たな分子標的になり得ると考えられる。

これまでの研究で用いられてきた CTC 分離マーカーとしての EpCAM の機能を検討した。非小細胞肺癌株および不死化ヒト正常気道上皮細胞 HBEC 株を定量的リアルタイム PCR 法および western blot 法により EpCAM の発現を測定した。EpCAM 高発現株を対象に、RNA 干渉法による遺伝子発現抑制、ならびに short hairpin RNA (ShRNA) を用いてそれぞれ一時的、恒常的ノックダウンを施行した。結果は、72% の肺癌細胞株で不死化ヒト正常気道上皮細胞 HBEC 株よりも高い EpCAM の発現を認めた。Western blot 法にて確認した蛋白レベルの EpCAM の発現は mRNA の発現と相関していた。EGFR 遺伝子変異株においては EGFR 遺伝子野生株と比較し、EpCAM の高い発現を認めた。SiRNA を用いた遺伝子発現抑制では、EpCAM をノックダウンした細胞株で 4~6 割の細胞増殖の抑制を認め、また液体培地中の足場依存性のコロニー形成能の抑制、ならびに軟寒天中での足場非依存性のコロニー形成能の抑制を確認した。PI 染色による細胞周期解析では、sub-G1 分画の上昇を認め、アネキシン V アッセイではアポトーシス分画の増加が認められた。一方、不死化ヒト正常気道上皮細胞 HBEC 株をノックダウンした場合はアポトーシスの増加は軽度に留まった。これらの結果より、EpCAM もまた、転移抑制における新たな分子標的になり得ると考えられる。

以上、本研究課題により、CTC 検出に関するナノバイオデバイス開発においてプロトタイプ作成を達成することが可能であった。また、CTC の分離・濃縮に先駆けて、肺癌転移に関わる EMT, Stem-like phenotype に関わると考えられる分子群の生物学的特性を解析した。今後、これらの分子を標的として、CTC 分離と分子標的治療薬開発への展開が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Horio M, Hasegawa Y, et al. (15 人中 15 番目) Transient but not stable ZEB1 knockdown dramatically inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. *Ann Surg Oncol*. 2011 Nov 16. [Epub ahead of print](査読有り)
2. Matumura Y, Hasegawa Y, et al. (11 人中 10 番目) Clinical characteristics of *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV patients and prognostic factors including microbiological genotypes *BMC Infectious Diseases*. 2011, 11:76 (査読有り)
3. Nishiyama O, Hasegawa Y, et al. (14 人中 12 番目) Phase II study of S-1 monotherapy as a first-line treatment for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: the Central Japan Lung Study Group trial 0404 *Anti-Cancer Drugs*. 2011, 22:811-816 (査読有り)
4. Maeda M, Hasegawa Y, et al. (11 人中 9 番目) ARHGAP18, a GTPase-activating protein for RhoA, controls cell shape, spreading, and motility. *Mol Biol Cell*. 2011; 22:3840-52(査読有り)
5. Nakamura T, Hasegawa Y, et al. (9 人中 8 番目) Attenuation of transforming growth factor- $\beta$ -stimulated collagen production in fibroblasts by quercetin-induced heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011, 44:614-20(査読有り)
6. Hibino Y, Hasegawa Y, et al. (11 人中 11 番目) Capsaicinoids regulate airway anion transporters through Rho kinase- and cyclic AMP-dependent mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 45:684-91(査読有り)
7. Saito S, Hasegawa Y, et al. (10 人中 9 番目) Mesenchymal stem cells stably transduced with a dominant-negative inhibitor of CCL2 greatly attenuate bleomycin-induced lung damage. *Am J Pathol*. 2011; 179:1088-94(査読有り)
8. Tachi T, Hasegawa Y, et al. (10 人中 9 番目) A clinical trial for therapeutic drug monitoring using microchip-based fluorescence polarization immunoassay. *Anal Bioanal Chem*. 2011; 401:2301-5(査読有り)
9. Hase T, Hasegawa Y, et al. (14 人中 14 番目) Pivotal role of epithelial cell adhesion molecule in the survival of lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2011; 102:1493-500 (査読有り)
10. Oguri T, Hasegawa Y, et al. (7 人中 7 番目) Pharmacokinetic analysis of carboplatin in patients with cancer who are undergoing hemodialysis. *Cancer Chemoth Pharm*. 2010; 66:813-7 (査読有り)
11. Shimokata T, Hasegawa Y, et al. (10 人中 10 番目) Prospective evaluation of pharmacokinetically guided dosing of carboplatin in Japanese patients with cancer. *Cancer Sci*. 2010; 101:2601-5 (査読有り)
12. Usami N, Hasegawa Y, et al. (10 人中 3 番目) Central Japan Lung Study Group. Phase II study of carboplatin and gemcitabine as adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: a report from the Central Japan Lung Study Group, CJLSG 0503 trial. *Int J Clin Oncol*. 2010; 15:583-7(査読有り)
13. Morise M, Hasegawa Y, et al. (10 人中 10 番目) Heterogenous regulation of anion transporters by menthol in human airway epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2010; 635:204-11(査読有り)
14. Hashimoto N, Hasegawa Y, et al. (8 人中 8 番目) Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 43:161-72(査読有り)
15. Ito S, Hasegawa Y, et al. (10 人中 9 番目) Actin cytoskeleton regulates stretch-activated  $Ca^{2+}$  influx in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 43:26-34 (査読有り)
16. Sakamoto K, Hasegawa Y, et al. (12 人中 12 番目) Serum KL-6 in fibrotic NSIP: Correlations with physiologic and radiologic parameters. *Resp Med*. 2010; 104:127-133(査読有り)
17. Takeyama Y, Hasegawa Y, et al. (13 人中 13 番目) Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. *Cancer Letters* 2010; 296:216-224(査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1. Momen A, Hasegawa Y, et al. (10 人中 10 番目) The circadian clock gene *BMAL1* as a possible therapeutic target for malignant pleural mesothelioma 第 7

0 回日本癌学会学術総会 名古屋  
2011.10.3-5

2. Horio M, Hasegawa Y, et al. (11 人 11 番目) Transient But Not Stable ZEB1 Knockdown Dramatically Inhibits Growth Of Malignant Pleural Mesothelioma Cells: Implication Of Epcam Up-Regulation Induced By ZEB1 Knockdown ILSLC 14TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER. Amsterdam, The Netherlands 2011.7.3-7
3. Kondo M, Hasegawa Y, et al. (10 人 10 番目) The Functional Role Of Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM) IN The Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines ILSLC. 14TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER. Amsterdam, The Netherlands 2011.7.3-7
4. Aoyama D, Hasegawa Y, et al. (7 人 7 番目) Inhibition Of TGF-Beta-Induced Phenotype Alterations Through Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) In Lung Cancer By Gene Modulation Of Phosphorylations Sites In Tumor Suppressor Pten. American Thoracic Society International Conference 2011 Denver, Colorado, USA 2011.5.13-18
5. Kohno T, Hasegawa Y, et al. (7 人 7 番目) Gene Modulation Of Phosphorylation Sites In Tumor Suppressor PTEN Inhibits Hypoxia-Induced Phenotype Changes Through Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) In Lung Cancer. American Thoracic Society International Conference 2011 (ATS · 2011). Denver, Colorado, USA 2011.5.13-18
6. Sakamoto K, Hasegawa Y, et al. (9 人 9 番目) Modulated Expression Of Surfactant Protein D In Acute Lung Injury Might Be Associated With Epithelial-Mesenchymal Transition In Epithelial Cells. American Thoracic Society International Conference 2011 (ATS · 2011) Denver, Colorado, USA 2011.5.13-18

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 好規 (HASEGAWA YOSNINORI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20270986

### (2) 研究分担者

橋本 直純 (HASHIMOTO MAOZUMI)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30378020  
近藤 征史 (KONDO MASASHI)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：00378077