

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13802  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2011～2012  
課題番号：23659295  
研究課題名（和文）全ゲノムシーケンスを軸とした循環腫瘍細胞、原発巣・転移巣の特性解明と検査への応用  
研究課題名（英文）Property investigation of circulating tumor cells, primary and metastatic cancer tissues by use of whole genome sequencing and application to laboratory testing  
研究代表者 前川 真人 (MAEKAWA MASATO)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号 20190291

研究成果の概要（和文）：大腸癌患者の原発巣（腫瘍中心部、浸潤先端部）、転移巣（リンパ節転移、肝転移）、末梢血中の循環腫瘍細胞のゲノムを中心として解析を行い、その性状を把握し臨床検査に役立つ技術を開発することを目的として研究を開始した。

大腸癌細胞株の培養細胞をボランティアの健常人血液に混合した血液から腫瘍細胞を単離する実験を行った。磁気抗体分離法およびフローサイトメトリーを利用して捕捉し、スライドガラス上に回収するとともに、抗サイトケラチン抗体による免疫細胞染色によりがん細胞であることを同定する実験方法を確立した。ただし、癌患者血中の CTC は微量であり、特に早期の大腸癌患者ではほとんど CTC をつかまえるのは困難であった。

大腸癌の腫瘍マーカーを iTRAQ 法 (isobaric tags for relative and absolute quantitation method) で解析した。その結果、癌部で 1.62 倍高発現している LRPPRC (Leucine rich PPR motif containing protein) を見出した。この LRPPRC の発現を Tissue-Microarray 法を用いて免疫組織化学染色で調べたところ、癌の分化度との関連性を認めたので予後診断の指標となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated primary focus, metastatic focus and circulating tumor cells (CTC) in colorectal cancer (CRC) patients by genomics approach in order to develop a novel clinical laboratory testing.

CRC cell lines were mixed with peripheral blood from healthy volunteer, and isolated from the mixture. Captured by magnetic cell separation and flow cytometry, the cancer cell lines were collected and confirmed by immunostaining with anti-cytokeratin antibody. The technologies were established, however, CTC could not be isolated from CRC patients in early stage.

We implemented iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) method to develop a novel CRC biomarker, and found LRPPRC (Leucine rich PPR motif containing protein) that was expressed 1.62 fold higher in cancer tissues. Tissue-Microarray and immunohistochemistry revealed that the expression level of LRPPRC was related to cancer differentiation. LRPPRC could be a novel marker for prognosis prediction.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：循環腫瘍細胞、オミックス解析、リポミクス、次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

癌による死因の殆どは浸潤、転移によるものであり、転移に関する理解が深まれば癌の予後予測や標的治療の開発に大いに役立つ。近年、転移に関して新しいモデルが提唱された。すなわち、癌細胞が形成したごく初期に癌細胞が血液中に出現しており、そのうち一部が生き残って転移先の組織に生着し増殖を開始した後に栄養血管の新生が行われ、転移巣を形成するというものである (Klein, Science 2008)。高感度な癌細胞の検出方法を用いると、局所のリンパ節、末梢血、骨髄にも初期から癌細胞が検出される (Pantel and Brakenhoff, Nat Rev Cancer 2004)。しかし、癌細胞のいかなる変化が転移の成立に重要であるかは、E-cadherin や上皮-間葉組織転換 (EMT) などの解析などがなされているものの、未だ解明されていないことが多い。

我々は、手術材料の腫瘍組織などを使用して、癌のゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノムなどを解析してきた (Shimura et al, Pathol Int; Maekawa, CMC 2007; Watanabe et al, Gene 2008; Watanabe et al, Gene 2009; Watanabe and Maekawa, CMC 2010; Adv Clin Chem 2010 など)。また、癌患者の末梢血中の CTC を分離して、質量分析法によりその生物学的特性を明らかにする試みを行っている。今回、癌の原発巣と転移巣、CTC の遺伝子変化を調べることで、癌の生物学的特性を知り、存在診断、予後診断、治療効果判定に繋がる知見を得るために、癌の遺伝子変化を全ゲノムから捉えることを計画した。すなわち、原発巣、転移巣、CTC を全ゲノム配列の解読 (次世代シーケンサーによりメチル化シトシンも読み込む)、FISH および CGH アレイによる解析によってゲノムの変化を明らかにする。最終的に転移に関与すると考えられる CTC を解析対象に加えることで、採血により固形癌の情報を得ることができるため、少ない侵襲で診療面の大きな飛躍が期

待できると考えた。

### 2. 研究の目的

大腸癌患者の原発巣 (腫瘍中心部、浸潤先端部)、転移巣 (リンパ節転移、肝転移)、末梢血を収集して、全ゲノムシーケンス、FISH および CGH アレイ解析を行うことによって、転移の各段階におけるゲノム・エピゲノムの変化を網羅的に明らかにする。既に手がけているプロテオーム、メタボロームの解析結果と比較検討し、ゲノム、エピゲノムの変化の生物学的意味について考察する。さらにその結果に基づいて、コンパニオン診断・治療の途を探る。

### 3. 研究の方法

#### 1) サンプル収集

未治療の大腸癌患者の原発巣、転移巣 (リンパ節転移、肝転移)、末梢血を収集する。また原発巣に関しては腫瘍の中心部と浸潤先端部の細胞をマイクロダイセクションにより回収して比較検討する。転移巣はリンパ節と肝臓を対象とする。CTC の収集法として 2 通りを計画している。一つは、現在我々が使用している方法で、磁気細胞分離システムである MACS (ミルテニーバイオテック) を使用して、白血球特異抗原 CD45 に対する磁気標識抗体を反応させて末梢血から白血球を除去した後、エンリッチされた癌細胞に蛍光色素標識抗体を反応させて、フローサイトメトリー FACS Aria (ベクトンディッキンソン) で検出・回収を行うものである。細胞がインタクトで収集できるので、プロテオームやメタボロームの解析まで可能である。もう一つは、MACS 及び蛍光顕微鏡を使用して CTC を検出・収集する方法で、全血から上皮性細胞である CTC を磁気標識した抗上皮細胞接着因子抗体を用いて分離し、その細胞浮遊液を蛍光顕微鏡で免疫組織化学的手法により観察するものである。この方法では DNA の解析は可能であるが、プロテオームとメタボロームの

解析には使用困難であるため、適宜使い分けの予定である。

## 2) ゲノム、エピゲノム解析

大腸癌患者より収集した原発巣、転移巣、CTC について次世代シーケンサーを使用した全ゲノムシーケンス法により DNA の一次構造を決定する。また、FISH 解析、CGH アレイ解析を行い、遺伝子異常の概要をスクリーニングする。FISH 解析は、遺伝子の増幅や欠落が疑われる領域に絞る。固形腫瘍用 FISH プローブ (フナコシ社)、および研究分担者の梶村が保有する quality control 済みの BAC probe (700 種) などを用いる (Sugimura, Carcinogenesis 2008)。

## 3) プロテオーム、メタボロームの解析

膜蛋白を標的として、Multiple Reaction Monitoring (Stahl-Zeng et al, Mol Cell Proteomics 2007) の手法を応用して、O-GlcNAc について検討し、CTC 特有のプロテオミクスマーカーを見出す。見出されたマーカーについては、免疫組織染色、他の免疫学的手法により確認する。

LC により分離溶出された分子を、イオン強度の高い順に MS/MS 測定する網羅的な手法で解析する。その比較対比によって、特定の分子群に焦点を絞り、precursor ion scanning や neutral loss scanning によって特定の分子構造の代謝産物を包括的に同定し、比較検討する。

## 4) 異常遺伝子の機能解析

ゲノムの比較により探索した遺伝子異常のうち、特に癌の浸潤、転移などに関与する可能性があるものについて、大腸癌細胞株に形質移入することでその遺伝子の機能を解析する。

本研究によって、原発巣の癌細胞、転移巣の癌細胞、CTC の DNA の一次構造情報を比較検討し、生物学的・病理学的意義について明らかにし、診断・治療に役立つ遺伝子マーカーを探索する。

## 4. 研究成果

### 1) 循環腫瘍細胞の分離・採取

癌患者の血液中を循環しているがん細胞 (circulating tumor cells、以下、CTC) を対象として検討を行った。まず、CTC を磁気

細胞分離法システムである MACS (ミルテニーバイオテク)、フローサイトメトリー FACS Aria (ベクトンディッキンソン) を用いて適切に分離する条件を検討した。患者の循環腫瘍細胞 (CTC) の代わりに大腸癌細胞株の培養細胞をボランティアの健康人血液に混合した血液から腫瘍細胞を単離する実験を行った。その結果、血液中にごくわずかに存在するがん細胞を、磁気抗体分離法およびフローサイトメトリーを利用して捕捉し、スライドガラス上に回収するとともに、抗サイトケラチン抗体による免疫細胞染色によりがん細胞であることを同定する実験方法を確立した。ただし、予想以上に癌患者血中の CTC は微量であり、特に早期の大腸癌患者ではほとんど CTC をつかまえるのは困難であった。大腸癌だけではなく乳癌でも試してみたが、きれいに CTC だけを分離するのは困難であった。そこで、よりきれいに分離するための方策として、最初に比重遠心による分離を行うことを考えた。まず最初に赤血球、多核白血球を効率よく除く。現時点で完成された条件の確立途上である。

### 2) 次世代シーケンサーによるゲノム解析

大学の共同実験施設にイルミナ社の MiSeq が導入され、得られた CTC の全ゲノム解析を計画していたが、共同実験施設における MiSeq の稼働が大幅に遅れ、期限内に解析することができなかった。

### 3) プロテオーム解析

原発巣である大腸癌の腫瘍マーカーを iTRAQ 法 (isobaric tags for relative and absolute quantitation method) で解析した。iTRAQ 法 (isobaric tags for relative and absolute quantitation method) は、最大 8 種類の細胞や組織におけるタンパク質の発現量の相対比を比較できるため、バイオマーカーの探索における強力なツールとなり、その有用性が認知されるにつれ iTRAQ 法によるプロテオーム解析の報告例が増えつつある。

大腸癌 10 例の手術検体から癌部と近傍の正常粘膜の組織を得た。

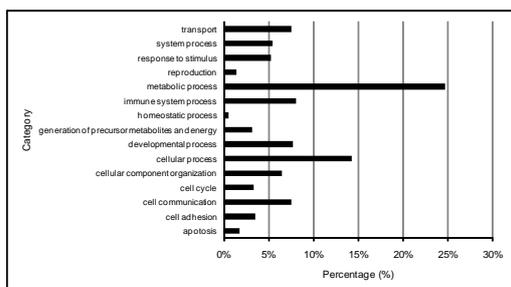
表1. iTRAQ法の解析対象

| No. | Age | Sex    | Location* | Type**      | Identified proteins (> 90% confidence) |
|-----|-----|--------|-----------|-------------|--|
| 1   | 41  | Male   | S         | well        | 267                                    |
| 2   | 54  | Male   | T         | well to mod | 208                                    |
| 3   | 63  | Male   | R         | mod         | 190                                    |
| 4   | 67  | Male   | T, S      | mod         | 272                                    |
| 5   | 84  | Female | T         | well to mod | 242                                    |
| 6   | 62  | Female | R         | mod         | 233                                    |
| 7   | 66  | Male   | S         | well to mod | 217                                    |
| 8   | 60  | Female | R         | mod         | 237                                    |
| 9   | 42  | Female | R         | well        | 229                                    |
| 10  | 54  | Male   | R         | mod         | 239                                    |

\* S, sigmoid colon; T, transverse colon; R, rectum  
 \*\* well, well differentiated type ; mod, moderately differentiated type

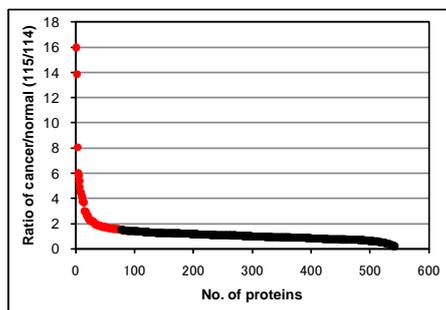
これらの iTRAQ 法によるプロテオーム解析を行ったところ、延べ 570 種類のタンパク質を同定した。同定した 570 種類のタンパク質を生物学的機能によって分類したところ、最も多いのが metabolic process に関与するタンパク質であり、以下、cellular process、immune system process、developmental process、cell communication、transport という順であった。

図1. iTRAQ法で同定されたタンパク質の機能分類



同定した 570 種類のタンパク質を癌部における発現が高くなっている順に並べたところ、正常部と比較して癌部で 1.5 倍以上高発現しているタンパク質が 77 種類見出された。

図2. 癌部と正常組織における発現比



| Protein Name  | Sample No. |      |      |      |      |      |      |      |      |      | AVG  |
|---|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|   | 1          | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |      |
| CEA (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5) | 3.85       | 6.10 | 5.64 | 4.74 | 3.56 | 2.08 | 5.25 |      |      |      | 4.46 |
| LDHA (L-lactate dehydrogenase A chain)                          | 3.06       | 1.60 | 1.59 | 1.36 | 1.35 | 2.44 | 2.00 | 1.51 | 1.12 | 1.49 | 1.78 |
| LRPPRC (Leucine-rich PPR motif-containing protein)              |            |      | 1.53 | 1.85 | 1.29 |      | 2.45 | 1.01 |      |      | 1.62 |
| GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)                | 1.00       | 1.17 | 1.05 | 1.15 | 1.51 | 1.17 | 1.17 | 1.07 | 1.08 | 1.15 | 1.15 |

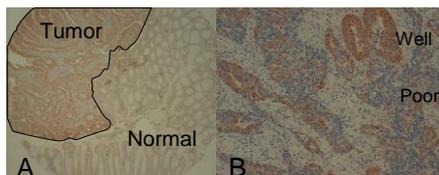
なお、iTRAQ 法の解析結果から、例えば、実際に消化器癌の腫瘍マーカーとして実用化されている CEA は 4.46 倍、悪性腫瘍の指標となる乳酸デヒドロゲナーゼは 1.75 倍、癌部で高発現しているデータが得られ、また、内部標準として使用されるハウスキーピングタンパク質である GAPDH は 1.15 倍であり、正常部と癌部で発現量の差は認められなかった。このことから、iTRAQ 法による定量データは信頼性が高いと判断した。

この 77 個のタンパク質のうち、論文で大腸癌における発現が未報告であり、癌部で 1.62 倍高発現しているデータが得られた LRPPRC (Leucine rich PPR motif containing protein) について解析を行うこととした。

#### 4) LRPPRC の解析

LRPPRC の発現を免疫組織染色で解析した代表例を示した。

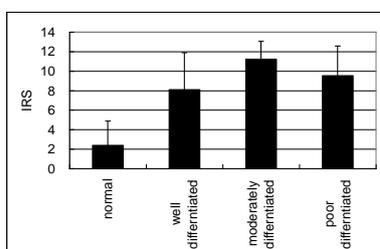
図3. LRPPRCタンパク質の免疫組織染色



パネル A は正常部と癌部の境界域の組織に対する LRPPRC の免疫組織染色の結果である。組織学的に癌と認められる黒い枠線で示した領域が強く染色され、LRPPRC が癌部で高発現している傾向が認められた。また、パネル B は、高分化型と低分化型の癌組織を含む組織切片を示しているが、興味深いことに高分化型癌では染色強度が強いものに対して、低分化型癌では染色強度が明らかに弱くなっている傾向が認められた。さらに、Tissue-Microarray 法を用いて大腸癌組織および正常組織 216 サンプルの免疫染色を行った。Remmele らの確立した免疫組織染色の評価方法に従って免疫染色強度 (immunoreactive score, IRS) を 0~12 のスコアで数値化した。その結果、正常組織と比較して癌部で高値となる傾向が認められた。また、大腸癌の分化度によっても異なり、中分化型癌は低分化および高分化型癌と比較して染色が強かった。

図4. LRPPRCタンパク質の免疫組織染色

|                           | No. positive samples (%) (IRS > 3) | IRS results |       |
|---------------------------|------------------------------------|-------------|-------|
|                           |                                    | Mean ± SD   | Range |
| normal                    | 27/83 (33%)                        | 2.39±2.47   | 0-12  |
| well differentiated       | 30/32 (94%)                        | 8.09±3.79   | 1-12  |
| moderately differentiated | 64/64 (100%)                       | 11.22±1.85  | 4-12  |
| poor differentiated       | 36/37 (97%)                        | 9.53±3.05   | 0-12  |



次に、遺伝子の発現の段階から癌部で高発現しているかどうか調べるために、real-time PCRを行った。その結果、解析を行った8症例のうち、正常組織と比較して癌部でLRPPRC mRNAの発現に2倍以上の差が見られるサンプルが3検体存在し、そのうち2検体については5倍以上の差が認められたものの、逆に正常組織と比較して癌部でLRPPRC mRNAの発現量が僅かに低い検体も2症例認められた。

以上のように、大腸癌の分化度は予後診断の指標となりうるため、LRPPRCを予後診断マーカーとして使用できる可能性が考えられる。なお、今回の検討においてLRPPRC mRNAの発現亢進ははっきりと認められなかったため、免疫組織染色が実用化に最も近いと考えられた。

#### 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9件)

1. Hamada E, Taniguchi T, Baba S, Maekawa M: Investigation of unexpected serum CA19-9 elevation in Lewis-negative cancer patients. *Ann Clin Biochem* 49(Pt 3) 266-272 2011. doi:10.1258/acb. 査読有
2. Kono M, Nakamura Y, Suda T, Kato M, Kaida Y, Hashimoto D, Inui N, Hamada E, Miyazaki O, Kurashita S, Fukamachi I, Endo K, Ng P, Takehara K, Nakamura H, Maekawa M, Chida K: Plasma Ccn2 (connective tissue growth factor ; CTGF) is a potential biomarker in idiopathic

pulmonary fibrosis (IPF).

*Clinica Chimica Acta* 412 2211-2215 2012

doi:10.1016/j.cca.2011.08.008 査読有

3. Sato R, Watanabe H, Genma R, Takeuchi M, Maekawa M, Nakamura H: Future perspective on pharmacogenomics of severe hypoglycemia associated with sulfonylureas : reply from the authors. *Pharmacogenomics* 13(1) 9-10 2012 doi: 10.2217/PGS.11.163 査読有
  4. Maekawa M, Sugiura A, Iwahara K, Sakai Y, Kishi K: Effect of the inhibition of mitochondrial creatine kinase activity on the clinical diagnosis of suspected acute myocardial infarction. *The Open Clinical Chemistry Journal* 5 1-6 2012 査読有
  5. Sato R, Watanabe H, Shirai K, Ohki S, Genma R, Morita H, Inoue E, Takeuchi M, Maekawa M, Nakamura H: A cross-sectional study of glucose regulation in young adults with very low birth weight : impact of male gender on hyperglycaemia. *BMJ Open* 2 1-7 2012 doi: 10.1136/bmjopen-2011-000327 査読有
  6. Watanabe Y, Maekawa M: Methods and Strategies to Determine Epigenetic Variation in Human Disease. *Epigenetics in Human Disease* 2 2-27 2012 doi: 10.1016/B978-0-12-388415-2.00002-0 査読有
  7. Hamada E, Taniguchi T, Baba S, Maekawa M: Investigation of unexpected serum CA19-9 elevation in Lewis-negative cancer patients. *Annals of Clinical Biochemistry* 49(3) 266-272 2012 doi: 10.1258/acb.2011.011213. 査読有
  8. Inaba K, Sakaguchi T, Kurachi K, Mori H, Tao, H, Nakamura T, Takehara Y, Baba S, Maekawa M, Sugimura H, Konno H: Hepatocellular adenoma associated with familial adenomatous polyposis coli. *World Journal of Hepatology* 4(11) 322-326 2012 doi: 10.4254/wjh.v4.i11.322 査読有
  8. Watanabe Y, Maekawa M: R/G-band boundaries: Genomic instability and human disease. *Clinica Chimica Acta* 419 108-112 2013 doi: 10.1016/j.cca.2013.02.011. 査読有
  9. 前川真人: エピジェネティクスの検査 *Medical Technology* 40(13) 1630-1631 2012 査読有
- [学会発表] (計4件)
1. Maekawa M, Taniguchi T, Ishikawa J: Efficiency of COLD-PCR and High Resolution Melting for

- detecting K-ras mutation American Association for Clinical Chemistry 2011/7/26 Atlanta, USA
2. Hamada E, Fujiwara A, Maekawa M: Study for basic performance of automated glucose analyzer GA09 model. American Association for Clinical Chemistry 2011/7/27 Atlanta, USA
  3. Maekawa M: Laboratory automation system in molecular diagnostic testing. The 8th International Conference of Clinical Laboratory Automation. 2012/4/11  
Seoul, Korea
  4. Maekawa M: Standardization for Laboratory Medicine and National EQA Survey Program in Japan. Korean Association of Quality Assurance for Clinical Laboratory's 2012 autumn symposium  
Seoul, Korea
- 〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前川 真人 (MAEKAWA MASATO)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20190291

### (2) 研究分担者

渡邊 良久 (WATANABE YOSHIHISA)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00362187

瀬藤 光利 (SETOU MITSUTOSHI)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20302664

中村 利夫 (NAKAMURA TOSHIO)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40283353

梶村 晴彦 (SUGIMURA HARUHIKO)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00196742