

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460700

研究課題名(和文) マイクロ流体チップを用いた大腸癌での血中循環癌細胞の機能解析

研究課題名(英文) Function analysis of circulating tumor cells using a microfluid chip for colorectal cancer.

研究代表者

富木 裕一 (Tomiki, Yuichi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40245725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新開発のポリマー製マイクロ流体チップ(CTC-chip)による大腸癌でのCTC捕捉システムの確立を目指した。癌の転移に関与するとされる微量の血中循環癌細胞(CTC)を採血から検出する事は容易ではない。我々は、EpCAM抗体処理したCTC-chipを用い、大腸癌細胞株ではPBS、血中の癌細胞を高率で捉えられることを確認した。また大腸癌患者の術前採血を用い、血中CTCの捕捉を試みた結果、CEA、CA19-9等の既存のマーカーよりも正確に癌の存在を確認できた。本システムの検出力の高さ、CTCが予後予測因子として有望であること等から、本研究結果は大腸癌医療の進歩に貢献すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) survived in blood and /or tissues distant from these origins are considered to be responsible for distant metastasis of cancers. It is not easy to detect CTCs because of their extremely low concentration in blood, however. We aimed at the establishment of a CTC capturing system for colorectal cancer with a microfluid chip (CTC-chip), a newly-developed device, made by a polymer. In blood samples collected from colorectal cancer patients before surgery, CTCs were detected at high rates with the CTC-chip which had been treated with the monoclonal antibody against epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). Then the detection rates of CTCs by this device were significantly higher than positive rates by existing tumor markers, CEA or CA19-9. This novel system should be powerful and convenient for cancer diagnosis especially in early stages and might make CTCs a prognostic factor of colorectal cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：血中循環癌細胞 マイクロ流体チップ 大腸がん CTC捕捉システム 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、日本人のがん死亡要因 3 位 (女性 1 位, 男性 3 位) である。昨今の食文化の欧米化に伴い日本人の大腸がんは増えてきた。その一方で大腸がんの検診等での検出率は依然低く、このことが死亡率の上がらない要因でもある。大腸がんをより容易に高確率で発見するシステムの確立が求められるが、未だに腫瘍マーカーと呼ばれるものの検出率は低く、同時に 3 種類 (CEA, CA19-9, 抗 p53 抗体) のマーカーを検査した場合でも 50~60% 前後である。

がん細胞、特に進行したがん細胞は、血液の流れに乗って肝臓などの臓器に生着することによって転移を起こす。この血中に浮遊する細胞を血中循環癌細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) と呼ぶ。CTC の捕捉には、抗原抗体反応、誘電泳動力、細胞形態識別を利用した手法の開発が行われているが、いずれも CTC 血中濃度の低さ (検出感度) が課題となっている。

既に商品化されている CTC System では、多くの EpCAM 陰性の CTC を見逃している可能性が指摘され、さらに CTC の捕捉率も悪いなど問題点が多い。

2007 年に、抗原抗体反応を利用した CTC 検出法として、マイクロ流体チップを用いる手法が発表され、既存のシステムと比べて有意に補足率が向上することが示された。

2. 研究の目的

従来、主に EpCAM 陽性の血中細胞が血中循環癌細胞と定義されてきた。しかし、がん細胞は原発巣より離脱して血中循環に移動するために浸潤能を亢進する必要がある。上皮間葉移行 (EMT) という、上皮細胞の特性を失い間葉系細胞の特性を獲得する現象が、がん細胞が浸潤能を亢進するために必須の現象であることはよく知られている。しかし EMT を起こした多くのがん細胞は、CTC マーカーとして使われている EpCAM や CK を発現していない可能性が高く、大多数の CTC を検出可能なマーカーの同定が望まれている。また、血中に進入した 99% のがん細胞が数分以内に細胞死に至るため、血中や遠隔臓器で生き残った、ごく少数の細胞死抵抗性の CTC が転移の形成に関与していると想像されている。

本研究で新規開発した“CTC チップ”は、マイクロ流路表面にポリマーを介して 3 次元的に抗体分子が配置されている。本研究では、この CTC チップを利用し、大腸がん向けに条件を最適化することで、従来の腫瘍マーカーより飛躍的にがんの検出率の高い早期診断マーカーを創出することを目指した。

さらに本研究では、CTC の細胞特性、つまり、CTC と転移の関係を解明することで、大腸がん診断への応用のみならず、新規治療薬

の開発への基盤形成までを目的の範疇とした。

3. 研究の方法

大腸がんにおける CTC 捕捉システムの確立を目指し、下記の方法で研究を進めた。

(1) PBS および血液にがん細胞を添加した擬似 CTC サンプルを作成、EpCAM 抗体を固定した CTC チップを用いて、血液中の腫瘍細胞が PBS 中と同様に捕捉可能であることを確認した。

(2) EpCAM 抗体を固定した CTC チップを用いて、大腸がん患者の血液 1ml 中の CTC 数をカウントした。同じ患者のサンプルの他の既存腫瘍マーカーでの評価と、CTC 検出の有無を比較した。

4. 研究成果

本研究ではまず HCT-116 (ヒト結腸腺癌由来細胞株) における EpCAM 発現率を調べた。細胞を染色し EpCAM 陽性細胞を検出する方法により、HCT-116 に EpCAM が強発現していることを確認した。

つぎに PBS および血液にがん細胞を添加した擬似 CTC 含有血液サンプルを作成、EpCAM 抗体を固定した CTC チップを用いて、血液中の腫瘍細胞が PBS 中と同様に捕捉可能であることを証明した。また EpCAM 抗体を固定した CTC チップの腫瘍細胞捕捉効率が、抗体無固定、IgE 抗体などを固定した場合よりも著しく高いことを明らかにした。

次に Stage I, II, IV の患者から大腸癌の手術前に採取した血液サンプルを用い、個々の患者の採血中の CTC を、EpCAM 抗体を固定したポリマー製 CTC-chip を用いて捕捉、カウントした。

同じ採血サンプルにおいて、既存のマーカーのうち CEA, CA19-9 による陽性率をポリマー製 CTC-chip による CTC 検出率を比較したところ、ステージ I, II, IV ではポリマー製 CTC-chip によりすべての検体で CTC が検出され CEA, CA19-9 陽性率よりも有意に検出力が高かった。

本システムにおいてステージの進んだ大腸癌においては既存マーカーよりも検出力が高いことが明らかになり、このことから本システムを新たな診断マーカーとして臨床応用する可能性を提示できた。

以上、本研究では、新規に開発したポリマー製の CTC-chip に EpCAM 抗体を処理、大腸癌患者の抹消血液において CTC を計測し、がん細胞を高率に捉えることに成功した。さらに、この CTC チップは、従来の CTC 捕捉システムと比べて、捕捉に使う抗体を任意の抗体に変更できる点や、従来の癌マーカーよりも検出感度の点で優れたマーカーとなり得ることを確認した。

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](10件)

Kawai M,[†] Komiyama H,^{*†} Hosoya M, Okubo H, Fujii T, Yokoyama N, Sato C, Ueyama T, Okuzawa A, Goto M, Kojima Y, Takahashi M, Sugimoto K, Ishiyama S, Munakata S, Ogura D, Niwa S, Tomiki Y, Ochiai T, Sakamoto K: Impact of chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer on liver metastasis. *Oncology Letters* (査読有), Vol 11 2016. (in press)

<https://www.spandidos-publications.com/ol>

*Corresponding author, †These authors contributed equally to this work.

杉本起一, 丹羽浩一郎, 石山 隼, 神山博彦, 小見山博光, 高橋 玄, 小島 豊, 五藤倫敏, 富木裕一, 坂本一博: Stage III 結腸・直腸 S 状部癌における決定木分析を用いたデータマイニングによる予後解析. *日本外科系連合学会雑誌*, Vol 41, 2016 (掲載決定)

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kotake K, Sugihara K: Proposal of new classification for Stage III colon cancer based on the lymph node ratio: Analysis of 4172 patients from multi-institutional database in Japan. *Ann Surg Oncol* (査読有), 22(2): 528-534, 2015. DOI: 10.1245/s10434-014-4015-9

Kure K, Kawai M, Ishiyama S, Kamiyama H, Tomiki Y, Sakamoto K, Arakawa A, Yao T: Complete Endoscopic Submucosal Dissection of a Giant Rectal Villous Adenocarcinoma with Electrolyte Depletion Syndrome. *Case Rep Gastroenterol* (査読有), 9:126-131, 2015. DOI: 10.1159/000382070.

Takahashi R, Ichikawa R, Ito S, Mizukoshi K, Ishiyama S, Sugimoto K, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Yao T, Sakamoto K: A case of metastatic carcinoma of anal fistula caused by implantation from rectal cancer. *Surgical Case Report* (査読有), 1:123, 2015. DOI: 10.1186/s40792-015-0125-2

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H, Takahashi M, Ishiyama S, Niwa K and Okubo H: Efficacy of postoperative adjuvant chemotherapy according to prognostic factor in patients with Stage III colon cancer. *Journal of Cancer Therapy* (査読有), 5: 806-816, 2014. DOI:10.4236/jct.2014.58088

Takahashi M, Niwa K, Ishiyama S, Sugimoto K, Komiyama H, Yaginuma Y, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y, Sakamoto R: An effective 5-fluorouracil, leovorin, and oxaliplatin therapy for recurrent breast cancer: a case report. *J. Med Case Rep* (査読有), 8: 234(1-6), 2014. DOI: 10.1186/1752-1947-8-234 .

Okazawa Y, Takahashi R, Mizukoshi K, Takehara K, Ishiyama S, Sugimoto K, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y, Yao T, Sakamoto K: A case of clear cell adenocarcinoma arising from endometriosis of the rectum treated by laparoscopic surgery. *International Journal of Surgery Case Report* (査読有), 5: 579-983, 2014. DOI:10.1016/j.ijscr.2014.10.034

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H: The validity of predicting prognosis by lymph node ratio in node-positive colon cancer. *Dig Surg* (査読有), 30: 368-374, 2013. DOI:10.1159/000355444

Nagayasu K, *Komiyama H, Ishiyama S, Ogura D, Takahashi R, Tashiro Y, Niwa K, Sugimoto K, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Niwa S, Sakamoto K: Investigation of free cancer cells in peripheral blood using CEA mRNA expression in perioperative colorectal cancer patients. *Mol Clin Oncol* (査読有), 1: 668-674, 2013.

*corresponding author.

DOI: 10.3892/mco.2013.109

(6) [学会発表] (計 11 件)

呉 一真, 細谷理樹, 塚本亮一, 伊藤慎吾, 本庄 薫平, 岡澤 裕, 水越 幸輔, 宗像慎也, 石山 隼, 杉本 起一, 神山博彦, 小見山 博光, 高橋 玄, 柳沼 行宏, 小島 豊, 五藤倫敏, 奥澤淳司, 富木裕一, 坂本一博, 大永 崇: Polymeric CTC-chip を用いた大腸癌 CTC の検出. 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年 4 月 15 日, 大阪.

呉 一真, 細谷理樹, 小見山博光, 富木裕一, 落合 匠, 大永 崇, 坂本一博: The detection of colorectal CTC by the use of polymeric microfluidic devices. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日, 名古屋 .

Sakamoto K, Tsukamoto R, Ichikawa R, Sugimoto K, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y: Laparoscopic abdominoperineal resection for rectal cancer. 46th World Congress of Surgery, Bangkok, Thailand, August 23-27, 2015.

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H, Takahashi M, Kamiyama H, Ishiyama S, Niwa K, Ito S, Kawai M, Takehara K, Tashiro T, Munakata S, Aoki J, Okazawa Yu O, Takahashi R, Mizukoshi K, Ro H, Ichikawa R, Kure K, Honjo K, Tsukamoto R: Comparisons of long-term outcomes for locally advanced colon cancer between laparoscopic colectomy and open colectomy; propensity score analysis. 23th International Congress of the EAES, Bucharest, Romania, June 03-06, 2015.

Sakamoto K, Ro H, Kure K, Honjo K, Aoki J, Okazawa Yu, Takehara K, Takahashi R, Ishiyama S, Sugimoto K, Yaginuma H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y: Laparoscopic abdominoperineal resection for rectal cancer. The 14th World Congress of Endoscopic Surgery, Paris, France. June 25-28, 2015.

Sugimoto K, Humbert A, Lu Z, Chen C, Rodgers K, Lee B, Griffin C, Sato K, Orita H, Ito T, Komiyama H, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K, Brock M: CHFR methylation is an independent prognostic marker of poor prognosis in gastric cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Pennsylvania, USA, April 18-22, 2015.

高橋里奈, 吳一眞, 本庄薫平, 盧尚志, 青木順, 岡澤裕, 水越幸輔, 河合雅也, 高原一裕, 宗像慎也, 石山隼, 杉本起一, 小見山博光, 高橋玄, 柳沼行宏, 小島豊, 五藤倫敏, 奥澤淳司, 冨木裕一, 坂本一博: 大腸癌における血清 p53 抗体の検討. 2014 JDDW 第12回日本消化器外科学会大会, 2014年10月23日~2014年10月26日, 神戸.

河合雅也, 小見山博光, 吳一眞, 本庄薫平, 盧尚志, 岡澤裕, 高橋里奈, 水越幸輔, 高原一裕, 宗像慎也, 丹羽浩一郎, 石山隼, 杉本起一, 神山博彦, 高橋玄, 柳沼行宏, 小島豊, 五藤倫敏, 冨木裕一, 坂本一博: Comparative Genomic Hybridization (CGH) を用いた大腸がんの肝転移と予後因子の検討. 2014 JDDW 第12回日本消化器外科学会大会, 2014年10月23日~2014年10月26日, 神戸.

永易希一, 河合雅也, 高原一裕, 田代良彦, 丹羽浩一郎, 石山隼, 杉本起一, 秦政輝, 小見山博光, 高橋玄, 小島豊, 五藤倫敏, 奥澤淳司, 冨木裕一, 坂本一博: 大腸がん

周術期における末梢血 CEAmRNA 測定の検討. 第51回日本癌治療学会学術集会, 2013年10月24日~2013年10月26日, 京都.

杉本起一, 河合雅也, 小見山博光, 市川亮介, 本庄薫平, 吳一眞, 盧尚志, 伊藤慎吾, 細谷理樹, 藤井智明, 大久保はるな, 柳沼行宏, 奥澤淳司, 冨木裕一, 坂本一博: 大腸癌における染色体異常を指標とした肝転移と予後の比較解析. 第24回日本消化器癌発生学会 2013年09月05日~2013年09月06日, 金沢.

河合雅也, 小見山博光, 高橋里奈, 杉本起一, 神山博彦, 小島豊, 五藤倫敏, 奥澤淳司, 冨木裕一, 坂本一博: CGH による大腸がん原発巣ゲノム変異と肝転移および予後に関する検討. 第68回日本消化器外科学会. 2013年07月17日~2013年07月19日, 宮崎.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計1件)

名称: 血液中の浮遊癌細胞を捕捉できるマイクロチップ

発明者: 大永 崇, 小幡 勤, 高田 耕児, 村口 篤, 岸 裕幸, 嶋田 裕, 塚田 一博

権利者: 富山県、富山大学

種類: 特許

番号: 第5799395号

取得年月日: 平成27年10月28日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

順天堂大学 下部消化管外科

<http://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/daicho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

冨木 裕一 (TOMIKI YUICHI)

順天堂大学 医学部 准教授

研究者番号: 40245725

(2) 研究分担者

大永 崇 (ONAGA TAKASHI)

富山県工業技術センター・中央研究所

材料技術課 研究員

研究者番号: 10416133

(3) 研究分担者

小見山 博光 (KOMIYAMA HIROMITSU)

順天堂大学 医学部 講師

研究者番号: 30348982