

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861131

研究課題名(和文) 原発性肺癌における肺静脈血中の肺癌幹細胞の探索

研究課題名(英文) Search for lung cancer stem cells in pulmonary venous blood in primary lung cancer.

研究代表者

米田 和恵 (YONEDA, Kazue)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：80724806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 原発性肺癌切除後の予後改善のためには術後の遠隔転移再発の制御が大きな課題である。腫瘍を完全切除し得てもなお再発・遠隔転移を来す例は少なくない。腫瘍の血行性転移には、血液中の循環腫瘍細胞の関与が示唆される。我々はこれまで肺癌患者の末梢血及び肺静脈血のCTCを定量し、遠隔転移との関連を見出した。

そこで本研究では、肺から全身循環へとつながる肺静脈の血液中から、増殖・生着能を持つ肺癌細胞の分離を試み、肺癌治療の新たな標的を見出すことを目的としたが、今回検討を行った肺癌手術例の中で肺静脈中に体外で自己増殖能を持つ癌細胞はほとんど見られなかった。

研究成果の概要(英文)： Control of the recurrence of distant metastases after surgery is a major problem for improvement of prognosis after resection of primary lung cancer. There are not many cases where relapse or distant metastasis still occurs even if tumor can be completely resected. The involvement of circulating tumor cells in the blood is suggested for tumor hematogenous metastasis. We have quantitated the CTC of peripheral blood and pulmonary venous blood of lung cancer patients and found association with distant metastasis. In this study, we aimed to find a new target for lung cancer treatment by trying to isolate lung cancer cells having proliferation and engraftment ability from the blood of the pulmonary vein leading from the lung to the general circulation, but this time in the lung cancer patients who were performed surgery, it is rarely seen that cancer cells in the pulmonary vein blood with self-proliferating ability outside the body.

研究分野：translational research(胸部腫瘍)

キーワード：原発性肺癌 肺静脈血 腫瘍細胞

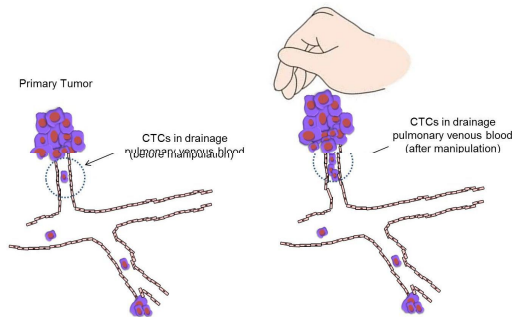
1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の手術成績と術後遠隔転移再発

原発性肺癌では腫瘍を完全切除し得ても術後に遠隔転移再発を来す確率が高い。現在では術後補助化学療法が標準治療として確立しているが、その効果は限定的で術後遠隔転移再発の制御は依然として大きな課題である。

(2) 肺癌手術時の原発巣から肺静脈を通して腫瘍細胞が血中に遊離放出される可能性

肺癌術後の遠隔転移再発は、手術終了時に存在する微小転移が術後に増大して成立するが、このような微小転移は手術開始前に既に存在しているほかに、手術操作により原発巣から腫瘍細胞が遊離して肺静脈から循環血液中に放出されて生じる可能性が指摘されている。(下図)



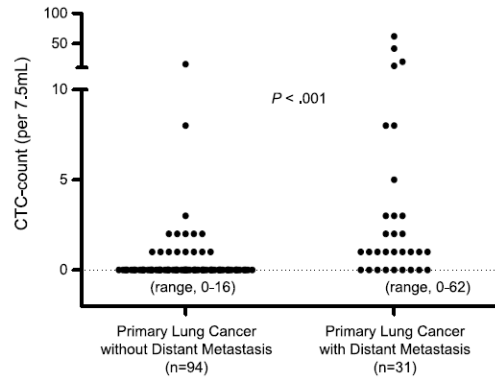
(3) CTC 検出システム (CellSearch) による CTC 定量とその臨床的意義について

血液に含まれる極めて微量の腫瘍細胞を検出することは非常に困難であり、様々な手法が試みられているが、現在のところ十分な信頼性を持ち一般的に利用されているのが CellSearch である。このシステムでは、細胞表面の上皮性抗原 (EpCAM) を標的に CTC を分離・検出する。

この装置を用いて定量した CTC の数が多いと予後が悪いことが検証されており (Hayes DF, et al. Clin Cancer Res 2006 他) 乳癌などでは CTC 検出の医療用機器として FDA に唯一認可されている。

(4) 肺癌患者における CTC

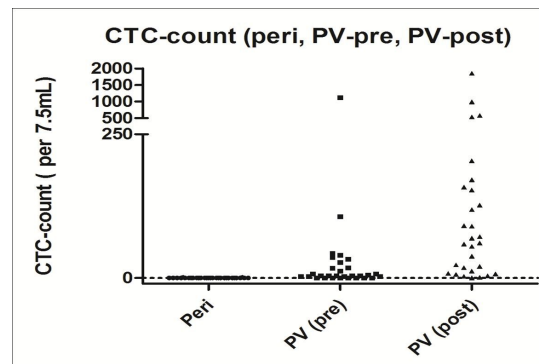
我々はこれまで、肺癌や悪性胸膜中皮腫などの胸部悪性腫瘍における末梢血や肺静脈血の CTC を測定し、その診断能と遠隔転移との関連を検証した。その結果、原発性肺癌において CTC は非悪性疾患に比べて肺癌で多く検出され、転移がある肺癌では転移が無い場合に比べて有意に多かった。(右上図、研究業績 8)



更に、原発性肺癌の肺葉切除例において

術前末梢血 : Peri
 切除前肺動脈血 : PV(pre)
 切除後肺動脈血 : PV(post)

の CTC を CellSearch System を用いて測定したところ、術後の肺静脈血には多くの CTC が検出された。(下図、Hashimoto M, et al. EACTS 2013)



2. 研究の目的

以上のことから、原発性肺癌において CTC は転移との関連があり、肺からの排出血管である肺静脈には高濃度の CTC が存在していることが明らかになった。

しかしながら肺癌患者の末梢血では検出感度が低く、遠隔転移がある臨床病期でも CTC 陽性率は 7 割に満たない。その理由として以下のことが考えられる。

(1) 肺癌細胞は非常に悪性度が高く、極めて少数でも生着能・転移形成能が高い。

(2) 形質を変えたものが血液中に存在するため、上皮抗原での捕捉を免れているのか?

従って、本研究では肺静脈中の CTC が転移に直接関与しているのか、つまり自身が生存能を持ち腫瘍を形成する能力があるのかを検証することにより、肺癌の転移

に関わる新たな治療標的、つまり肺癌幹細胞を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

肺癌患者の手術後の肺静脈血を採取後、様々な方法にて CTC を単離し、培養により生存能の確認を行った。

(1) 肺静脈血/末梢血液の採取

術前に単核球抽出用の末梢血を採取。肺静脈血は治癒切除可能と考えられる原発性肺癌症例において、手術後に切除肺葉から還流する肺静脈より血液を EDTA 採血管に採取した。

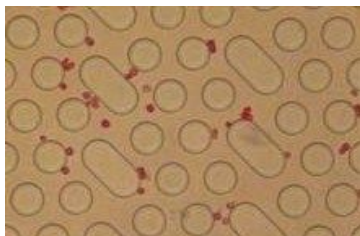
(2) 血液からの細胞分離

採血後は速やかに下記の方法により目的細胞の分離・培養を行った。

CellSearch
Profile Kit を用いて
上皮細胞接着因子
(EpCAM) 抗体結合ナノ鉄
ビーズにより上皮性細胞
を捕捉し磁気分離した。
(右図)



CTC-chip
樹脂製基盤のマイクロポストに抗体を結合させ、そこに血液を流すことによって腫瘍細胞を分離した。(右図 Chikaishi Y, et al. AACR 2013)



ScreenCell
腫瘍細胞のサイズが血球細胞より大きいことを利用して、サイズにより分離した。

密度勾配遠心法
Ficoll を用いた密度勾配遠心により血液中の単核球分画 (赤血球・多核球を除く単核細胞) を分離した。

溶血
溶血試薬により血球の大部分を占める赤血球を除去した。

(3) 培養

細胞培養により分離した細胞の生存能、増殖性を確認した。増殖性細胞が得られた

場合にはその一部を用いて細胞の生物学的特性の解析を行った。

(4) 単核球分画における遺伝子発現の確認

当科にて集積している肺癌患者の末梢血単核球分画より RNA を抽出し逆転写により cDNA を得た。RT-PCR の標的遺伝子は上皮性マーカー (サイトケラチン、EGFR など)、間葉系マーカー (Vimentin 等)、他癌種の幹細胞マーカー (CD44, CD133 等) について検討。

(5) 臨床背景との関連

肺静脈血から分離した細胞の増殖能及び形態、その他の性質と臨床背景との関連を検討。更に単核球遺伝子解析の結果より転移との関連を探索。

4. 研究成果

(1) 肺静脈血/末梢血液の採取

原発性肺癌の肺葉切除例において、手術前の末梢血と切除肺葉の静脈血から採血を行った。術前の末梢血液は血漿分離後、Ficoll を用いた密度勾配遠心法にて単核球分画を得た。単核球分画は細胞保存液に懸濁し、3分して凍結保存した。

肺静脈血研究期間内に 133 例の肺静脈血を採取し、1mL 以上の量が得られたのは 83 例であった。肺静脈血は採取後速やかに非血球系細胞を分離し培養した。十分な血液量がある場合は一部を CTC 数の定量に用いた。

(2) 血液からの細胞分離

肺静脈血は、採取可能な量が状況により大きく異なったため、採取できた量に応じて下記の方法について検討した。

CellSearch
5mL 以上採取できた例 (11 例) について CTC カウントと Profile Kit による細胞回収を行った。検出された CTC は 1mL あたり 0~500 以上の幅があり、集塊状になった細胞も多くみられた。

CTC-chip
肺静脈中の標的細胞を捕捉するための条件検討及び捕捉された細胞の回収方法について検討を行った。

ScreenCell
3mL の血液を用いて短時間での細胞分離が可能であったが、微細な孔があるフィルターのため、前述のような集塊状細胞が多

い場合にはフィルターが目詰まりを起こす場合が多く、肺静脈血の細胞分離には実用的ではなかった。

密度勾配遠心法

全血から主にリンパ球などの単核細胞と赤血球及び多核細胞を分離する方法で、単核の癌細胞もこの分画に含まれるため癌細胞を含む単核細胞をこの方法によって得た。

溶血

採血量がごく微量しか得られなかった場合は血漿分離後に溶血試薬により赤血球を溶血させ白血球集団を得た。

(3)培養

初年度では、上記のうちで増殖性細胞が得られたのは2例のみであった。そのうちの1例は盛んな細胞増殖能を示し8か月にわたり継代可能であった。肺静脈血のCTC数と培養した細胞の生着には明らかな相関は見られなかった。

CellSearch Profile Kitにより回収した細胞は、表面に磁気粒子が付着しているためか細胞増殖は見られなかった。

CTC-chipでは細胞株による基礎検討を行い、回収した細胞の培養が可能であることが示された。しかし前日からの準備と分離に時間を要することから、実際の肺静脈血での細胞分離培養はできなかった。

溶血による方法は残存する血球が多すぎ、経時的な評価が困難であった。したがって採血量が少ない場合は培養に単核球分画を用いた。

(4) 単核球分画における遺伝子発現の確認

末梢血単核球分画よりRNAを抽出しRT-PCRによりCK19, CEA, CD133の発現について検討を行った。

(5) 臨床背景との関連

CTCカウント、細胞培養状況、増殖性細胞の出現等が、手術後の再発と関連するのか、フォローアップ及び臨床背景との関連について解析中。

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 3件)

1. Chikaishi Y, Yoneda K, Ohnaga T, Tanaka F. EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with

a 'universal CTC-chip'. *Oncol Rep.* 2017 Jan;37(1):77-82. (査読有) DOI: 10.3892/or.2016.5235.

2. Kuwata T, Yoneda K, Kobayashi K, Oyama R, Matsumiya H, Shinohara S, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Inanishi N, Kuroda K, Tanaka F. Circulating Tumor Cells as an Indicator of Postoperative Lung Cancer: A Case Report. *Am J Case Rep.* 2016 Sep 15;17:663-665. (査読有) DOI: 10.12659/AJCR.898934
3. Yoneda K, Tanaka F. Circulating Tumor Cells: A Novel Detection System with "Universal" CTC-chip. *Proceedings of World Automation Congress* 631-634, 2016. (査読有)

[学会発表](計 13件)

1. Kazue Yoneda, Taiji Kuwata, Yasuhiro Chikaishi, Fumihito Tanaka. Capture of tumor cells in blood with "Universal CTC-chip". 24th International Molecular Med TRI-CON February 19-24, 2017 SAN FRANCISCO, USA
2. 米田和恵、栗田泰治、近石泰弘、由良冨希子、小林健一、小山倫太郎、松宮弘喜、金山雅俊、平良彰浩、名部裕介、篠原伸二、竹中賢、岡壮一、平井文子、田嶋裕子、今西直子、黒田耕志、大永崇、田中文啓「Universal CTC-chipによる血液中腫瘍細胞の捕捉」第1回 Liquid Biopsy 研究会 2017年1月21日 京王プラザホテル(東京都新宿区)
3. Yoneda K, Kuwata T, Chikaishi Y, Kobayashi K, Oyama R, Yura S, Matsumiya H, Taira A, Nabe Y, Takenaka M, Oka S, Hirai A, Tashima Y, Imanishi N, Kuroda K, Ohnaga T, Tanaka F. Sensitive Detection of CTCs in Thoracic Malignant Tumors with "Universal" CTC-Chip. *IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) 17th World Conference on Lung Cancer.* December 4-7, 2016 Vienna, Austria
4. Kazue Yoneda, Takashi Ohnaga, Fumihito Tanaka. 「"Universal CTC-chip"を用いた血液中腫瘍細胞の捕捉」第75回日本癌学会学術総会 2016/10/6-8(発表は10/7) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. 米田和恵、栗田泰治、近石泰弘、由良冨希子、小林健一、小山倫太郎、松宮弘喜、平良彰浩、名部裕介、竹中賢、岡壮一、平井文子、田嶋裕子、今西直子、黒田耕志、田中文啓「"Universal CTC-chip"による血液中の中皮腫細胞捕捉」第7回 JMIG 研究会 2016/9/3 JP

タワー名古屋ホール&カンファランス
(愛知県名古屋市)

6. Kazue Yoneda, Fumihito Tanaka. Circulating Tumor Cells: A Novel Detection System with “Universal” CTC-chip. World Automation Congress 2016 Japan Satellite Session August 7, 2016 じばさんビル(兵庫県姫路市)
7. 米田和恵 近石泰弘、田中文啓 「“Universal CTC-chip”による血液中腫瘍細胞の捕捉」第1回CTC臨床応用研究会 2016/7/17 東大寺総合文化センター(奈良県奈良市)
8. 米田和恵、加藤幸成、田中文啓 「“Universal CTC-Chip”と抗ポドプラニン抗体 NZ-1 を用いた中皮腫細胞の捕捉」第20回(2016年)日本がん分子標的治療学会(別府)5月31日別府国際コンベンションセンター(大分県別府市)
9. Yoneda K, Chikaishi Y, Ohnaga T, Tanaka F. Capture of EpCAM-negative mesothelioma cells with a “Universal CTC-chip”: Sensitivity tests and comparison with EpCAM-based standard method. AACR Annual Meeting (Apr 19, 2016) New Orleans, USA
10. Yoneda K, Chikaishi Y, Kawashima E, Ohnaga T, Tanaka F. Improvement of capture performance in EpCAM-negative tumor cells with a “Universal CTC-Chip”. AACRTumor Metastasis (Dec 1, 2015), Austin, USA
11. 米田和恵 田中文啓 「胸部悪性腫瘍における Cell-based Liquid Biopsy」第75回日本呼吸器学会・日本結核病学会日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会九州支部 秋季学術講演会 ホテルグランデはがくれ 2015/10/02 (佐賀県佐賀市)
12. 米田和恵、田中文啓 “Universal CTC-Chip”によるEpCAM陰性循環腫瘍細胞の捕捉 第19回日本がん分子標的治療学会学術集会 松山全日空ホテル 2015年6/11(愛媛県松山市)
13. Yoneda K, Chikaishi Y, Kawashima E, So T, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F. Capture of EpCAM-negative circulating tumor cells (CTCs) with a “Universal CTC-Chip” American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting. (April 19, 2015) Philadelphia, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

米田 和恵 (YONEDA, Kazue)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：80724806