

受賞対象論文

Shigeyasu K, Tazawa H, Hashimoto Y, Mori Y, Nishizaki M, Kishimoto H, Nagasaka T, Kuroda S, Urata Y, Goel A, Kagawa S, Fujiwara T : Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics. Gut (2015) 64, 627-635.

重安 邦俊

Kunitoshi Shigeyasu

ベイラー大学メディカルセンター

Baylor University Medical Center



<プロフィール>

昭和53年生まれ

平成16年3月 岡山大学医学部医学科卒業

平成16年4月 岡山済生会総合病院

平成18年4月 国立病院機構岩国医療センター

平成21年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科入学

平成22年4月 岡山大学病院

平成22年10月 勝山病院

平成25年4月 国立病院機構岩国医療センター

平成26年6月 ベイラー大学メディカルセンター 博士研究員

平成26年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修了

現在に至る

研究の背景と経緯

大腸癌は全世界で最も発症率の高い癌種のひとつです。近年のスクリーニング技術（免疫化学的便潜血検査や大腸内視鏡）の向上により、早期発見・早期治療が可能となりつつありますが、依然進行癌として発見される場合も多く、手術や化学療法が重要となります。中でも、近年の化学療法の進歩は目覚ましく、癌細胞で活性化しているシグナル経路を阻害する分子標的治療薬が治療の主体となってきました。しかし、その効果は癌細胞の持つ遺伝子情報（増幅や変異）に大きく左右されます。このため、癌細胞のもつ遺伝子情報を症例ごとに調べたうえで、分子標的治療薬の効果を予測して適応を決定する必要があります。

癌細胞の遺伝子情報を得る方法としては、直接病巣から癌細胞を採取する生検や手術が一般的ですが、患者の身体に大きな負担を強いるために頻回の検査は困難です。ところが、最近の報告によると、癌細胞は化学療法に伴い遺伝子情報が変化して次第に治療抵抗性を獲得すると考えられており、経時的な癌細胞の採集・検査による遺伝子情報の確認が必要です。つまり、患者への身体的負担を最小限に抑えながら定期的に行える検査の必要性が大きな課題として残っていました

が、最近血中循環腫瘍細胞（circulating tumor cell : CTC）の検出法がその課題を解決するための有用な方法として脚光を浴びています。

癌細胞は、原発巣から転移先の臓器に移動して転移巣を形成する際に血流に乗る必要があります。この血液中を流れる転移能を持った癌細胞がCTCです。CTCの出現は、原発巣から血行性転移が形成される兆候を示す重要な臨床情報であり、高感度にCTCを検出する診断技術の確立は、癌患者の転移リスクや予後を評価するために有益です。CTCは乳癌¹⁾、大腸癌²⁾、前立腺癌³⁾において有用な予後予測マーカーになりうるものが既に報告されており、その臨床応用が期待されています。現在、EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) などの上皮系マーカーを指標とするCTC検出法が開発されており、中でもCell Search システム (Janssen Diagnostics, 米国) はアメリカ食品医薬品局で認可され、すでに臨床応用されています。一方、悪性度の高い癌細胞は、上皮系から間葉系の形質に変化する上皮間葉系移行 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) を起こし、上皮系マーカーを失う事が知られています。そのため、従来のCTC検出システムでは、上皮系マーカーが失われた悪性度の高いCTCの検出が困難なことが大きな課題でした。

最近、私たちは上皮系・非上皮系癌細胞に広く高発現するテロメラーゼ活性に依存して緑色蛍光タンパク質（green fluorescence protein：GFP）を発現するアデノウイルス製剤（TelomeScan）を用いた新規 CTC 検出システムを開発しました^{4,5}。今回は、このシステムにフローサイトメトリー法（fluorescence activated cell sorting：FACS）による細胞回収と遺伝子解析技術を組み合わせ、上皮系のみならず非上皮系の CTC も回収して遺伝子解析を行える新しい CTC の遺伝子解析技術の確立を目指しました。

研究成果の内容

1. TelomeScan は EpCAM 発現レベルの低い癌細胞に対しても可視化効果を発揮する

CTC の標識に TelomeScan が有用であることを確認するため、まず癌細胞に対する TelomeScan の標識効率を確認しました。TelomeScan はアデノウイルス 5 型を改変し、ウイルス複製に必須遺伝子である E1A, E1B を hTERT プロモーターで制御することにより癌細胞のみで複製するとともに、GFP を産生し腫瘍細胞を可視化できるテロメラーゼ特異的制限増殖型腫瘍融解アデノウイルス製剤です。TelomeScan を癌細胞に感染させると、hTERT プロモーター活性の高い癌細胞を選択的に緑色の蛍光で標識できます。EpCAM が低発現の Panc 1, 低発現と高発現の混在パターンを示す SW480, 高発現の HCT116, HT29 のいずれでも TelomeScan が効率的に感染し、GFP 陽性腫瘍細胞を観察できました。この結果から、TelomeScan は上皮系マーカーに依存せず癌細胞を蛍光標識できることを確認しました。

2. ダイレクトシーケンス法は変異を持つ癌細胞の純度が30%以上必要である

次に、遺伝子解析方法の違いによる CTC 遺伝子変異解析効率を確認することにし、まずダイレクトシーケンス法の性能を検討しました。ダイレクトシーケンス法は、抽出した DNA を用いて PCR でゲノム DNA を増幅した後にシーケンサーで目的の遺伝子領域の塩基配列を直接読み取る方法です。少なくとも変異を持つ癌細胞が 5 個以上あれば PCR でゲノム DNA を増幅し、ダイレクトシーケンス法による遺伝子解析が可能でした。一方、純度に関しては変異を持つ癌細胞の割合が30%以上あれば遺伝子変異を検出

できましたが、30%未満の場合は検出不能であり、高純度のサンプルが必要であると考えられました。

3. 変異特異的 PCR 法は変異を持つ癌細胞の純度が5%以上で遺伝子変異を検出できる

ダイレクトシーケンス法以外の遺伝子解析方法として変異特異的 PCR 法（allele-specific blocker PCR：ASB-PCR）の性能を検討しました。変異特異的 PCR 法では、野生型アレルに対するブロッカーで非特異的増幅を抑制したのち、変異特異的プライマーで変異配列の増幅をリアルタイム PCR で確認しました。ダイレクトシーケンス法と同様に少なくとも変異を持つ癌細胞が 5 個以上あれば変異アレルの増幅が可能でした。一方、純度に関しては変異を持つ癌細胞の割合が 5 % 以上で変異アレルの増幅が可能でした。以上の結果から、変異特異的 PCR 法はダイレクトシーケンス法よりも高感度に遺伝子変異を検出できると考えられました。

4. CTC モデルの検討：ダイレクトシーケンス法は血球系細胞を取り除いたサンプルで癌細胞が10個含まれていれば遺伝子変異を検出できる

次に、CTC を回収する技術を確認するために、癌細胞株を健常人から提供された血液 5 ml に混ぜた CTC モデルを作成し、条件検討を行いました。CTC の回収プロトコルを簡単に説明します。血液を塩化アンモニウム溶液に混ぜて赤血球を溶血させたのち、単核球分画を回収しました。これに TelomeScan を感染させ、24時間ローテータで培養しました。そののち遠心分離して細胞を回収し、パラホルムアルデヒドでウイルスを不活化した後、抗 CD45 蛍光抗体で血球細胞を黄色蛍光標識後に FACS Aria セルソーターで緑色蛍光標識細胞を回収しました。FACS は、細胞に励起光を当てることにより蛍光強度を検出し、細胞が含まれる液滴に電荷を付加することで、目的の蛍光標識細胞を電氣的に回収することができる装置です。ゲート設定は、GFP 陽性細胞分画を P2 ゲート、GFP 陽性かつ CD45 陰性細胞分画を P3 ゲートとしました（図）。

様々な遺伝子変異を持つ癌細胞株（Panc 1, SW480, HCT116, HT29）を血液 5 ml に10個入れた CTC モデルを作成し、TelomeScan を感染後に、FACS Aria を用いて GFP 陽性かつ CD45 陰性分画（P3 分画）を回収しました。DNA を抽出し KRAS, BRAF 遺伝子のダイレクトシーケンシングを行ったところ、すべての細胞株で遺伝子変異を検出できました。ダイレクト

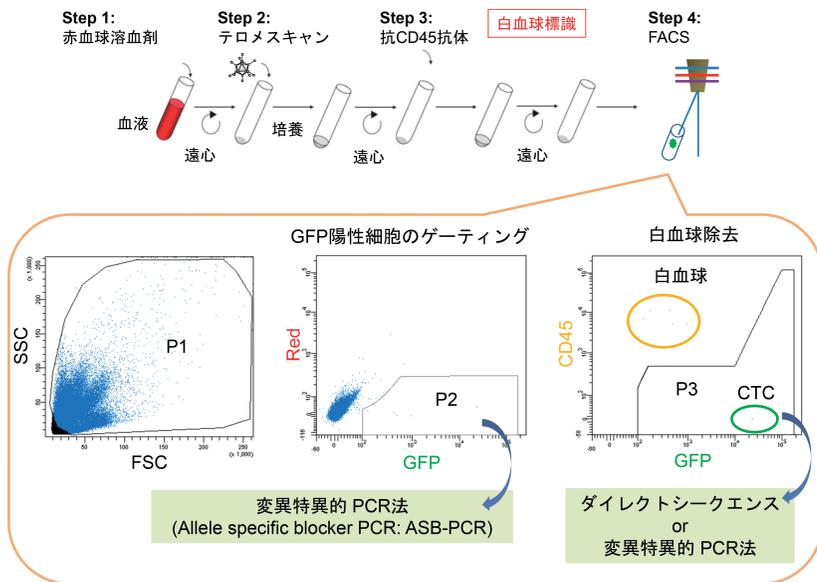


図 TelomeScan を使用した CTC 検出回収システム

TelomeScan で緑色の蛍光を発する CTC は、フローサイトメトリー法で回収される。DNA を抽出し、ダイレクトシーケンスもしくは ASB-PCR 法で遺伝子解析を行った。CTC: Circulating Tumor Cells, FSC: Forward Scatter, GFP: Green Fluorescent Protein, SSC: Side Scatter.

シーケンス法による遺伝子解析にはサンプルの純度が高い必要がありますが、血球系細胞の混入を CD45 抗体で除く P3 分画を用いることでこの問題点を克服でき、CTC の遺伝子解析に耐えられることが示されました。

5. CTC モデルの検討: 変異特異的 PCR 法は血球系細胞を取り除かないサンプルでも癌細胞が10個含まれていれば遺伝子変異を検出できる

様々な遺伝子変異を持つ癌細胞株 (Panc 1, SW480, HCT116, HT29) を血液 5 ml に10個入れた CTC モデルを作成し、TelomeScan を感染後に FACS Aria を用いて GFP 陽性分画 (P2 分画) および GFP 陽性かつ CD45 陰性分画 (P3 分画) を回収しました。DNA を抽出し KRAS, BRAF 遺伝子の変異特異的 PCR を行ったところ、すべての細胞株で遺伝子変異を検出できました。純度の低い P2 分画でも遺伝子解析を行えることが、ダイレクトシーケンシングに対して有利な点です。

6. EMT 誘導癌細胞で作成した CTC モデルでも遺伝子解析を行える

KRAS 遺伝子変異を持つ A549 細胞に TGF- β を作用させて EMT を誘導した A549-EMT 細胞を血液 5 ml に10個入れた CTC モデルを作成しました。ダイレクトシーケンス法と変異特異的 PCR 法で解析したところ、P2 分画と P3 分画において KRAS 遺伝子変異を確認できました。

7. 上皮系マーカー陰性癌細胞で作成した CTC モデルでも遺伝子解析を行える

消化器の間葉系腫瘍から樹立された KIT 遺伝子変異を持つ GIST882 細胞を血液 5 ml に100個入れた CTC モデルを作成しました。ダイレクトシーケンス法で解析したところ、KIT 遺伝子変異を確認できました。以上の結果から、私たちの CTC 検出システムは上皮系のみならず間葉系の CTC も検出して遺伝子解析を行えることを確認できました。

8. 大腸癌臨床サンプルでも遺伝子解析を行える

最後に原発巣で KRAS 遺伝子変異や BRAF 遺伝子変異が検出された大腸癌患者 8 例 (うち 5 例は遠隔転移を有する) の血液を約 5 ml 採取し、CTC モデルと同様に TelomeScan を感染させて GFP 陽性細胞を回収し、遺伝子解析を行いました。P2 ゲートでソーティングを行い、変異特異的 PCR 法で遺伝子解析を行ったところ、2 例で遺伝子変異を検出しました。この 2 例のうち 1 例は化学療法に耐性となった遠隔転移を有する BRAF 変異大腸癌症例で、もう 1 例は多発肝転移を生じた KRAS 変異大腸癌症例で、いずれも病勢を反映した結果と考えられました。

研究成果の意義

大腸癌における分子標的治療薬の進歩は目覚ましく、特に抗 EGFR 抗体薬は化学療法に必要不可欠となりました。しかし抗 EGFR 抗体薬は KRAS 遺伝子に

変異があると効果が乏しく、KRAS 遺伝子変異は薬剤耐性の重要なバイオマーカーと考えられています。非侵襲的な血液からの癌由来の KRAS 遺伝子変異検出方法としては、主に血中を浮遊する DNA を回収して遺伝子解析する方法と、CTC から DNA を回収して遺伝子解析を行う方法があります。血中を浮遊する DNA に占める腫瘍由来 DNA の割合は 1 万分の 1 以下といわれており、血中 DNA を回収して腫瘍由来の遺伝子変異を解析するのは困難です。一方、CTC は血液中の腫瘍細胞から直接 DNA を回収したうえで遺伝子解析を行えるため、正常細胞由来 DNA によるノイズを低減できることから「liquid biopsy」としての有用性に期待が集まっています。

CTC の検出技術は日進月歩の領域で、様々な検出方法が提案されています。主なものとして、上皮系マーカー（癌細胞は上皮に由来する）、サイズ（癌細胞は血球系細胞よりも大きい）、電荷（癌細胞と血球系細胞の電荷の違い）を利用した方法があります。中でも、米国の FDA で唯一認可された CellSearch システムが一般的でした。これは、上皮系マーカーである EpCAM に対する磁気ビーズ抗体を用い、CTC を捉えるツールです。しかし、悪性度の高い CTC は EMT を経て間葉系に形質転換している可能性が示唆されています。これを考慮すると、上皮系マーカーで CTC を捉える検出系では不十分であると言わざるを得ません。これに対し、私たちの樹立した TelomeScan を用いた CTC 検出システムは、癌細胞に普遍的なテロメラーゼを標識するため、上皮系や間葉系の CTC も捉えることができます。これに FACS や遺伝子解析技術を組み合わせる事で、高感度かつ簡便に CTC の遺伝子変異を検出できる新たなツールを初めて確立しました。これにより、癌患者においていかなる癌細胞の遺伝子プロファイルもリアルタイムかつ非侵襲的に解析することが可能となります。この技術は、癌患者において分子標的治療薬を使用するための重要な情報を提供し、テーラーメイド医療への道を切り開く道標になることを確信しております。

今後の展開や展望

近年、次世代シーケンサーやデジタル PCR など、

遺伝子解析技術の進歩およびコストダウンのスピードは加速的に増えています。今後は、CTC のゲノムワイドな遺伝子解析を行うことで、個々の患者に適した治療方法を提供できるようになると考えられます。私たちのシステムは、真に転移能を有する悪性度の高い間葉系 CTC を捉えることができるため、患者一人一人に最適の治療方法を選択するテーラーメイド医療の発展に貢献できると期待されます。

謝 辞

この度は荣誉ある岡山医学会賞を賜り、さらにこのような発表の機会を頂きまして誠にありがとうございます。選考委員の先生方、および、これまで研究をご指導くださった消化器外科教授、藤原俊義先生をはじめ多くの方々へ感謝申し上げます。

文 献

- 1) Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* (2004) 351, 781-791.
- 2) Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, et al.: Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* (2008) 26, 3213-3221.
- 3) de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* (2008) 14, 6302-6309.
- 4) Kishimoto H, Kojima T, Watanabe Y, Kagawa S, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kyo S, Mizuguchi H, Hashimoto Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T: In vivo imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nat Med* (2006) 12, 1213-1219.
- 5) Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, Kagawa S, Uno F, Kuroda S, Tazawa H, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T: A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *J Clin Invest* (2009) 119, 3172-3181.

平成28年9月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学

電話：086-235-7257 FAX：086-221-8775

E-mail：gmd421045@s.okayama-u.ac.jp