

令和元年度 学 位 論 文

論 文 題 目

〈邦 文〉

新規 NIR 蛍光イメージング法及び CTC 検出装置を用いたがんの
早期診断に関する前臨床的研究

〈欧 文〉

Preclinical Studies on the Early Detection of Cancers
Using Newly Developed NIR Fluorescence Imaging and
CTC Detection Devices

名城大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程

氏 名

伊 藤 彰 洋

目次

緒論	1
第1章 インドシアニングリーン標識ポドプラニン抗体を用いた口腔がん検出のためのリアルタイム近赤外蛍光イメージング法	4
第1節 緒言	4
第2節 材料と方法	6
第3節 結果	10
第4節 考察	20
第5節 小括	22
第2章 ヒト EGFR 変異肺がんと HER2 遺伝子増幅胃がんモデルマウスを用いた分子標的治療における血液中循環がん細胞(CTC)の動態	23
第1節 緒言	23
第2節 材料と方法	25
第3節 結果	28
第4節 考察	35
第5節 小括	37
総括	38
謝辞	40
参考文献	41

論文目録

本学位論文は、以下の学術誌に収載された論文を基礎としたものである。

1. Akihiro Ito, Mitsuhiko Ohta, Yukinari Kato, Shunko Inada, Toshio Kato, Susumu Nakata, Yasushi Yatabe, Mitsuo Goto, Norio Kaneda, Kenichi Kurita, Hayao Nakanishi and Kenji Yoshida : A Real-Time Near-Infrared Fluorescence Imaging Method for the Detection of Oral Cancers in Mice Using an Indocyanine Green-Labeled Podoplanin Antibody. *Technology in Cancer Research & Treatment*, Volume 17 : 1-11 (2018)
2. Akihiro Ito, Hayao Nakanishi, Mayumi Yoshimura, Seiji Ito, Yukihiro Sakao, Yasuhiro Kodera, Yasushi Yatabe and Norio Kaneda : Dynamics of Circulating Tumor Cells Early After Targeting Therapy to Human EGFR-Mutated Lung Cancers and HER2 Gene-Amplified Gastric Cancers in Mice. *Anticancer Research*, 39 : 4711-4720 (2019)

緒論

我が国におけるがんによる死亡者数は、人口の高齢化を主要因として増加し続けている。がんは1980年代初頭以降死因の第1位となり、2017年ではがんで死亡した人は年間約37万人に達し、また新たに診断されたがん罹患者数は年間100万人に達している¹⁾。国民の2人に1人はがんにかかる時代となり、まさにがんは「国民病」といえる。国立がん研究センターがん対策情報センターの統計によれば、高齢者（65歳以上）のがん罹患者の増加はもちろんのこと、生産年齢（15～64歳）におけるがん罹患者数も増加し、社会的にも大きな問題となっている¹⁾。我が国では近年、自治体や職場で受ける「がん検診」が整備され、早期発見・早期治療や内視鏡下切除術など治療技術の発展にともない生存率は改善してきている。しかし、依然としてリンパ節や遠隔臓器に転移した状態で発見される進行がん症例も多く、これらの進行がん患者の5年生存率は大きくは改善されていないのが現状である。このため、がんの原発巣の早期発見・早期治療のみならず、がんの再発・転移に対する早期診断、モニタリングと治療法開発が非常に重要な課題となっている。

現在、がんの早期診断を目指してがん検診で行われている検査法は肺がんや胃がんなどに対するX線検査や内視鏡検査などの画像診断と、消化器がんや前立腺がんなどに対する血清の腫瘍マーカー検査に大きく分けられる。がんの画像診断法としてはComputed Tomography (CT) / Magnetic Resonance Image (MRI) / Positron Emission Tomography (PET)などの放射線や核磁気共鳴、各種標識プローブなど大規模な装置を用いた高コストな検査が主流となっている。しかし、これらはがん検診などの早期がん発見のためのスクリーニング法としては費用対効果、安全性の観点からも適さず、がん検診にはほとんど使われていないのが現状である。この点、がん組織に特異的に集積する蛍光物質やがん細胞が特異的に発現する分子に対する抗体に各種蛍光色素を標識し、プローブとして用いる光イメージング法はCT/MRI/PETほどの高価な装置は必要とせず、低コストで、しかも放射線を使用しないため安全にがんを検出できる次世代型画像診断法として注目されている。しかしながら、光イメージング法は光自身の組織透過性の低さから肺がん、胃がん、子宮がんなどの深部臓器に発生するがんに対する体外イメージング法としては検出能力不足で、臨床への応用はほとんど行われていないのが現状である。これに対し、口腔がんは表層臓器に発生するがんであることから、光の属性である低い組織透過性の問題を乗り越えることが可能であり、臨床においても光イメージング法が適用できる可能性のある数少ないがんと考えられる。

従来の光イメージング法は600 nmより短波長の光を利用した光イメージング法が主流であり、小動物レベルの*in vivo*イメージング法としてはその有効性が認められ、世界的にも広く使用されているが²⁾、主として組織透過性の低さから臨床への応用は未だほとんど進められていないのが現状である。これに対し、650～1000 nmの長波長域、特に近赤外域（700～1000 nm）の光はヘモグロビンや筋組織、脂肪組織による吸収が少なく、高い組織透過性と組織に由来する自家蛍光が低いという利点を有する。近年、この近赤外（near infrared、以下 NIR）光で励起される蛍光色素で標識したプローブを用いることにより、体外から照射した励起光により一定の感度と特異性を有する分子イメージング像を取得することが可能になりつつある^{2, 3)}。

NIR 蛍光イメージング法に用いられる蛍光色素には、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) のように前駆薬として投与後、組織内で活性化され、生成される蛍光分子を検出する方法と、ターゲット分子に対する抗体を NIR 蛍光色素で標識し、その蛍光を検出する方法がある。後者は、前者でしばしば見られるある種の活性酸素に起因する光過敏症のような重篤な副作用の問題がなく、より高い特異性をもち、しかも分子標的治療薬としても利用できる可能性を有するなど、前者の方法より優れており、その潜在的有用性に期待が寄せられている^{3,4)}。抗体を標識する NIR 蛍光色素の一つとして有望な色素がインドシアニングリーン (indocyanin green、以下 ICG) である。ICG は肝機能検査薬として臨床で一般に使用されている薬剤であり、安全性が保証されている数少ない蛍光試薬である。ICG は蛍光色素であることから取り扱いも容易であり、臨床においてもリンパ管やセンチネルリンパ節のイメージング等への応用が進められている^{5,6)}。しかし、ICG 標識抗体を用いたがんの光イメージングに関する研究はほとんど行われていない。

そこで第 1 章では、ICG 標識抗体を用いた口腔がんの早期診断ツールとしての NIR 蛍光イメージング法の開発とその異種移植マウスモデルでの検証および臨床研究への応用の可能性について検討した。

一方、近年、個々のがんの遺伝子変異を検出し、その変異を有する分子を標的とする分子標的治療など、患者に応じた最適な医療を行う個別化医療が進められ、個々のがんの性質をより正確に知ることが必要となっている。そのためには、体表面や消化管内腔または肺や胃などに存在する腫瘍組織に針を刺して組織の一部を採取して調べる生検が必須であり、その病理標本上の腫瘍組織から DNA を抽出し、上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor、以下 EGFR) や RAS などの変異を調べる遺伝子検査が行われている。また化学療法や分子標的治療では、薬剤投与によりその薬剤に耐性化したがん細胞が出現し、これが臨床上大きな問題となっている。この場合にはがん細胞の耐性遺伝子の検査に基づき治療薬を選択する必要があるため、再度生検を行うことが望まれる。しかしながら、組織生検は侵襲性が高く、複数回の実施が難しいこと、肝臓など腫瘍の転移部位によってはリスクが高いため検査自体が実施できないなど問題も多い。そこで近年、原発巣から血液中に流れ出てきた少数の血液中循環がん細胞 (circulating tumor cell、以下 CTC) や微量の腫瘍由来の血清中 DNA (circulating tumor DNA、以下 ctDNA) を調べる体液生検と呼ばれる技術が開発され注目されている⁷⁻⁹⁾。組織生検が困難な場合でも体液生検により組織生検を代替でき、低侵襲な採血によりがん細胞の有無や一部では遺伝子検査を繰り返し行うことや治療効果のモニタリングが可能となりつつある。

体液生検において早くから注目されているのが CTC である。CTC は血流を介して全身を循環するがん細胞で、血行性転移の原因と考えられている^{10,11)}。臨床的には CTC 数が多い患者ほど再発転移が多いなど予後予測や再発の予測因子としての有用性が乳がん、大腸がん、肺がん、前立腺がん患者等において報告されている¹²⁻¹⁴⁾。また CTC から DNA を抽出し、遺伝子を検査するコンパニオン診断などへの利用も再生検の代替法として期待が寄せられている。しかし、CTC は陽性率 (血液中に検出される頻度) が必ずしも高くなく、陽性の場合でも血液 5mL あたりの細胞数が数個～数十個と極めて稀少な細胞であり、CTC の測定は長年にわたり技術的にも困難なテーマ

であった。CTC の検出は、10 年ほど前から E-CAM 抗体などを用いて上皮細胞由来の CTC を選択的に捕捉分離し、蛍光染色で検出するシステム (Cell Search®) の確立により初めて安定して検出することが可能となってきた。しかし、Cell Search®など多くの検出システムでは暗視野での蛍光観察が必要であり、CTC の形態情報や背景細胞の情報が乏しいことなどに加え、診断精度やコストが高いなどの点で課題があり、未だ一般臨床で用いられるには至っていない。このため、診断精度が高く、簡便、低コストな新しい CTC 検出法が期待されている。

一方、転移成立や薬物治療等に対する生体内における CTC の細胞動態など、CTC に関しては基礎的な知見も未だ十分に明らかになっていない。その原因として、ヒトのがん細胞を移植した CTC を検出可能なマウスモデルが少数しか存在しないことが大きな理由であった。したがって、CTC 検出によるがんの薬剤感受性ならびに薬剤耐性の評価や治療効果モニタリングのツールとしての有用性に関しても十分な検討はなされていないのが現状である。

上記より第 2 章では、CTC を光学顕微鏡で簡便に検出できる新しい CTC 検出装置および新規マウス CTC モデルの開発と、それらを用いた転移の早期発見や分子標的治療における治療効果の簡便な経時的モニタリングについて検討し、CTC の基礎的、臨床的意義の一端を明らかにすることを目的とした。

本研究では、早期がんや転移がんに対する早期診断ツールとしての NIR 蛍光イメージング法及び CTC 検出に対する期待と現状における課題を背景として、簡便かつ迅速ながんの早期診断と個別化医療の実現を目指しマウスモデルを用いて前臨床的に検討した。

第1章 インドシアニングリーン標識ポドプラニン抗体を用いた口腔がん検出のためのリアルタイム近赤外蛍光イメージング法

第1節 緒言

口腔がんは、全世界的に6番目に多いがんとして知られている。診断法や治療法は進歩してきているものの、進行した口腔内扁平上皮がん（oral squamous cell carcinoma、以下 OSCC）患者の予後は依然として不良であり、5年生存率は約50%である¹⁵⁾。OSCCの予後不良の主たる要因は、早期発見の困難さ、術後の高い再発率や転移発生率、化学療法に対する耐性出現などである^{16, 17)}。高感度でしかも特異性高く OSCC を検出できる新たな低侵襲な腫瘍イメージング法の開発が OSCC の予後改善のために求められてきた¹⁸⁾。

従来の検査法では、微小な OSCC は少なからず見落とされてしまうことがあったが、口腔がんのスクリーニングや早期診断では、現在でも明視野での目視検査が依然として一般的である。近年、OSCCのスクリーニングを補助するために、青色光照射により誘導される組織自家蛍光を検出するイメージング法が導入されている¹⁹⁾。粘膜内においては、架橋コラーゲン/エラスチン線維内にフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）やニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）などの蛍光性の特定の構成要素が存在し、青色光（436 nm）を照射すると、低エネルギーの蛍光を発生し、それは粘膜の緑色の自家蛍光イメージとして可視化される。一般的に悪性腫瘍は上皮細胞の密度が増加するため、コラーゲン線維からの蛍光が抑制され、緑色自家蛍光が減弱するため正常粘膜より暗色となる。この組織の自家蛍光を利用した簡便なイメージング技術は、米国食品医薬品局（FDA）に承認された安全性の高い手法であるが、悪性腫瘍と前がん病変あるいは良性腫瘍との鑑別に関しては未だに十分な評価がなされていない^{20, 21)}。

上記の組織自家蛍光を利用したイメージング法以外の他の腫瘍イメージング法としては、5-アミノレブリン酸（5-ALA）のような蛍光前駆薬を投与し、腫瘍組織内で生成される蛍光物質を利用する方法⁴⁾や、腫瘍が発現する標的分子に対する蛍光色素標識抗体を利用した蛍光イメージング法³⁾などがある。前者に比べ後者の手法は、光過敏症のような毒性の強い副作用が少なく、しかもより高い特異性を有するという点で、前者より優れており、新規の分子標的治療法として潜在的有用性がある。高感度で特異的かつ安全に口腔がんを検出するためには標的分子の選択が重要である。EGFR は、OSCC の約 90%に高頻度で発現しており、ヒト・マウスキメラ EGFR 抗体であるセツキシマブは、FDA で承認され臨床的に OSCC 患者に投与されている。このため、これまでも分子標的イメージング法の有力な標的分子とされてきた²²⁾。一方、OSCC の分子イメージングの新しい標的分子候補としてポドプラニンがある。ポドプラニンは、C 型レクチン受容体 2 に結合する膜貫通型の O-グリコシド型糖タンパク質で、いくつかの重要な生理機能を有し²³⁻²⁵⁾、扁平上皮がん、精巣腫瘍、中皮腫、脳腫瘍などの種々の悪性腫瘍において高発現することが知られている²⁶⁻²⁹⁾。OSCC ではポドプラニンは少なくとも 70~80%の症例において高発現していることが知られている³⁰⁾。近年、OSCC におけるポドプラニンの発現は腫瘍浸潤性やリンパ節転移に関連していることが報告され³¹⁻³³⁾、またポドプラニンは血小板凝集活性を含む転移促進作用を有している³⁴⁾。さらに、

ポドプラニン は OSCC におけるがん幹細胞の分子マーカーとしても機能していることが報告されている³⁵⁾。したがって、ポドプラニンは分子イメージングと治療の両面において有力な候補分子と考えられる。実際、すでに抗ポドプラニン抗体に関しては悪性中皮腫や悪性脳腫瘍に対する分子標的治療の潜在的ツールになりうる可能性が報告されている³⁶⁻³⁸⁾。しかしながら、筆者らの知る限りでは、OSCC において蛍光抗体プローブを用いたポドプラニンを標的とする分子イメージング法については未だ報告されていない。インドシアニンググリーン (ICG) はすでに FDA に承認され、現在、肝機能検査薬として臨床で使用されている蛍光性分子である。ICG はその最大蛍光波長が生体組織透過性の高い近赤外 (NIR) 領域 (830 nm) にあることからセンチネルリンパ節ナビゲーション手術や肝がんのリアルタイム術中診断に広く利用されている^{5, 6)}。さらに、ICG は分子イメージング用抗体の標識にも利用できるため²⁾、臨床の現場において OSCC の NIR 蛍光イメージングに利用できる可能性が示唆された。

今回、筆者は、ICG 標識ポドプラニン抗体と携帯型 ICG 検出装置からなるリアルタイム NIR イメージング法を新たに開発し、異種移植マウスモデルを用いて腫瘍組織の検出における本法の有用性について、既存の *in vivo* imaging system (以下 IVIS) による NIR イメージング法または非 NIR 組織自家蛍光法と比較検討した。さらに本法が、良性腫瘍あるいは、前がん病変と OSCC との鑑別に有用であるか否かについても検討した。

第2節 材料と方法

1) 試薬

ヒトポドプラニン抗体は、Kato ら³⁸⁾によって作成されたラットモノクローナル抗体 (NZ-1) で、東北大学の加藤博士から提供を受けた。この NZ-1 抗体は分子イメージング、フローサイトメトリーおよびマウス腫瘍の免疫組織化学染色に使用した。臨床標本の免疫組織化学染色にはヒトポドプラニンに対するマウスモノクローナル抗体 (D2-40) (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) ならびにヒト EGFR に対するマウスモノクローナル抗体 (PharmDX staining kit) (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) を使用した。コントロール抗体であるラット免疫グロブリン (IgG) は Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) から購入した。

2) 患者検体と倫理審査

本研究では、線維腫、乳頭腫、白板症、口腔内扁平上皮がんの患者 (各 5~7 人) について検証した。これらの病理検体は、2011~2015 年の間に総合大雄会病院の口腔外科・顎顔面外科で手術を受けた患者検体である。腫瘍は切除生検または頸部郭清を伴わない部分的舌切除によって摘出された。これらの OSCC の腫瘍病期は Stage I であり、組織型は UICC 基準で中分化型扁平上皮がんと診断された。患者から摘出した標本の使用については、総合大雄会病院の倫理審査委員会承認され、治験審査委員会の承認を得た (承認番号: 2015-005、愛知県がんセンター研究所における倫理審査については審議なし)。また、全ての参加者から書面でのインフォームドコンセントを受けている。

3) 細胞株

HSC-3細胞と Ca9-22細胞はRIKEN CELL BANK (Tsukuba, Japan) より入手した。UMSCC-81細胞はミシガン大学のご厚意により供与された。これらの細胞は、加湿 5%CO₂ インキュベータ内 37 °C 環境下で、10%ウシ胎児血清 (FBS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) とペニシリン (100 U/mL) / ストレプトマイシン (100 µg/mL) 溶液 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (ニッスイ, Tokyo, Japan) にて培養した。

4) フローサイトメトリー

腫瘍細胞をトリプシン/エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) により回収後、FACS 緩衝液 (5 mM EDTA 及び 5 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA) 添加リン酸緩衝液 (PBS)) で 2 回洗浄し、ラット抗ヒトポドプラニン一次抗体 (NZ-1, 1 µg/mL) を加え、30 分間反応させた。FACS 緩衝液で 2 回洗浄後、Alexa Fluor 488 結合ヤギ抗ラット IgG 二次抗体 (Invitrogen, Eugene, OR, USA) を加え 4 °C でさらに 30 分間反応させた。標識細胞を洗浄し、FACS Calibur フローサイトメーター (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) を使用して蛍光強度を測定した。

5) 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 解析

ポドプラニンのmRNA発現を以下のように定量的RT-PCR法にて解析した。回収した培養細胞をPBSで洗浄後、ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) に溶解した。全RNAを抽出し、SuperScript II RNase H-逆転写酵素 (Invitrogen) を使用しcDNAを合成した。この一本鎖cDNAテンプレート、特定のオリゴヌクレオチドプライマーペアおよびTaqman®プローブを使用して、LightCycler (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) を用いてシングルステップリアルタイムRT-PCRを行った。本研究で使用したポドプラニン用プライマーペアの配列とTaqman®プローブ番号(#)はOhtaら³³⁾の報告で記載された通りである。内部コントロールとしてはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を用いた。3つの細胞株におけるポドプラニンmRNA発現量を測定し、統計学的に比較検討した。

6) 前臨床および臨床検体の免疫組織化学染色

患者 (n=5~7) から外科的切除された腫瘍またはヌードマウス (n=3) から摘出された異種移植片は、10%緩衝ホルマリンで24時間固定し、その後パラフィンに包埋し、厚さ5 µmの薄切標本を作成した。抗原賦活化のために、D2-40抗体については切片を98 °Cで15分間マイクロ波処理を、EGFR抗体については室温で5分間プロテアーゼK処理を行った。正常血清で非特異的反応を30分間ブロッキングした後、これらの切片を一次抗体とともに4 °Cで一晩インキュベートし、PBSで洗浄後、二次抗体 (マウスIgGに対するビオチン化ウサギ抗体) とインキュベートし、その後ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) と室温で60分間インキュベートした。EGFR染色では、デキストランポリマー骨格に結合した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体とともに切片をインキュベートした。その後、細胞に結合したペルオキシダーゼを、0.01%ジアミノベンジジンを基質として使用し発色させた。

ポドプラニンの発現は、標本の免疫染色の半定量化により、以下のように評価した。ポドプラニン陽性扁平上皮がん細胞の割合と染色強度に基づいた規定のスコアリングシステムを使用してスコア付けした。各標本の免疫反応性スコア (IRS : 0~15) は、定量スコア (0~5) と染色強度スコア (0~3) ^{39, 40)}を掛けることによって計算し、統計解析 (n=5~7) により定量的評価を行った。

7) 実験動物

マウスには5~6週齢、オスの胸腺欠損ヌードマウス (KSN strain) (日本エスエルシー, Hamamatsu, Japan) を用いた。これらのマウスは、愛知県がんセンター研究所内の特定の病原体が存在しない環境下 (SPF) で飼育した。弱酸処理した滅菌水と5分間オートクレーブ処理したエサは自由に摂取できる環境とし、体重や体毛を含む健康状態は週2回モニターした。マウス実験では腫瘍のサイズは、最大直径は1 cm強であり、実験中に腫瘍の潰瘍形成やマウスの体重減少等は観察されなかった。イメージング実験後、マウスは頸椎脱臼により速やかに安楽死させ、延命による過度の腫瘍増大や体重減少を回避した。すべての動物実験は、愛知県がんセンター研究所の動物実験に関する倫理委員会 (承認番号 : ACC 27-2) の承認を得て、国際ガイドラインの基準にしたが

って実施した⁴¹⁾。

8) OSCC異種移植マウスにおけるICG標識ポドプラニン抗体による*in vivo* NIRイメージング

3つのOSCC細胞株（UMSCC-81、HSC-3およびCa9-22細胞）をトリプシン/ EDTAで回収し、PBSで洗浄後、がん細胞 3～5×10⁶ 個を0.05 mLおよび0.2 mLのPBSに懸濁液し、それぞれ上背部皮内および下背部皮下に注射した。数匹のマウスには、がん細胞（1×10⁶ 個/0.05 mL PBS）をマウス舌先端あるいはがん細胞 3～5×10⁶ 個/0.3 mL PBSを腹腔内に注射した。ヌードマウス（n = 4）の異種移植腫瘍の*in vivo* NIRイメージングのため、抗ポドプラニン抗体（NZ-1またはアイソタイプコントロールとしてラットIgG）をICG-Labeling Kit-NH₂（Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan）を用いて、メーカープロトコールに基づきICG標識した²⁾。このシステムでは、ICGによるポドプラニン抗体の標識効率（ICG：抗体 比）は、次の式に基づいて平均 0.9（0.8～1.0）と評価された。

$$A_{800}/147,000 \div (A_{280} - A_{800} \times 0.075)/E \quad (E: \text{モル吸光係数}, A: \text{吸光度})$$

また、このICG標識抗ポドプラニン抗体の安定性をイメージングの蛍光強度で測定したところ、*in vivo*において（異種移植片において）少なくとも1週間、また*in vitro*では1ヶ月間安定であった。マウスへのICG標識抗体の投与は50 μgのICG標識ポドプラニン抗体に250 μLのPBSを加えて希釈し、シリンジで腹腔内に注射した。皮膚内、皮下、舌および腹腔内腫瘍のICG蛍光イメージの取得は、745 nmの励起フィルターとICG用の約820 nmの蛍光フィルターを備えたIVIS Lumina IIシステム（Xenogen, Alameda, CA, USA）を用いて、ICG標識抗体注射の24～48時間後にイソフルラン麻酔下のマウスで実施した。メーカープロトコールに基づき、“Living Image”ソフトウェアとROI（Region Of Interest）ツールを使用し、蛍光強度を平均蛍光輝度（photons / sec / cm² / sr）として定量化した。この定量化は820 nmにおける腫瘍のICG蛍光強度を、バックグラウンドおよびベースライン強度へ標準化（減算）後、ROIツールを使用して“Image J（Ver. 1.45）”ソフトウェアで行った。しかし、IVIS Lumina IIシステムでは移植腫瘍のリアルタイムイメージングが不可能であるため、NIR発光ダイオード光源（760 nm, 5 mW / cm²）、高感度NIRイメージセンサー（768×494ピクセル）、ICGカメラ（830 nm）を備えた小型のPDE（Photodynamic eye; Hamamatsu Photonics）を携帯型ICG検出装置として使用した。本システムを用いたリアルタイムイメージングは既知の研究と同じ露光時間およびブラックバランス条件で、2, 2, 2-トリブromoエタノール麻酔下マウス（n = 4）で行った⁵⁾。

9) OSCC異種移植マウスにおける組織自家蛍光による*in vivo* イメージング

2, 2, 2-トリブromoエタノール麻酔下ヌードマウス（n = 3）における皮下および皮内移植腫瘍の組織自家蛍光イメージングは、120 Wの金属ハロゲン化物アークランプと430（400～460）nmの青色光生成のために最適化されたフィルターシステムからなるVELscope VXデバイス（LED

Dental Inc, Burnaby, BC, Canada) を使用して行った⁷⁾。正常組織のアップルグリーンの蛍光を背景とし、蛍光が減弱ないし消光した腫瘍部のネガティブ蛍光イメージを、デジタルカメラを用いて撮影した (SONY, Tokyo, Japan)。

10) 統計解析

細胞株間のRT-PCRデータの違いの統計的有意性の検定には、Student's *t* 検定を使用した。ヌードマウスの異種移植腫瘍間のICG蛍光イメージングデータについてはMann-Whitney U 検定によって検定した。患者における良性、前がん性および悪性腫瘍のIRSに基づくポドプラニン発現状態の違いは、一元配置分散分析を行い、その後Tukey's多重比較検定にて解析した。いずれの場合も $p < 0.05$ を有意とみなした。

第3節 結果

1) 良性、前がん性および悪性口腔腫瘍の臨床検体におけるポドプラニンならびにEGFRタンパク質の発現

舌上皮は正常である粘膜下組織の線維腫では、腫瘍周囲のリンパ管を除き、ポドプラニンの発現は認められなかった。免疫組織染色では、正常舌上皮のポドプラニンの発現は弱く、扁平上皮の基底細胞層に局限していた。同様に、上皮性だが良性腫瘍である乳頭腫においてもポドプラニン発現は基底層に局限し、その発現は弱かった。前がん性病変である白板症では、上皮の基底細胞層および薄い上層部で弱～中程度のポドプラニンの発現が観察された。対照的に、扁平上皮癌では、角化層を除き、基底細胞と厚い中間層の両方で中～強度のポドプラニンの発現が認められた (Fig. 1-1A)。IRSスコアリングシステムを使用した定量分析では、ポドプラニンの発現は、病理学的グレードとともに、正常 (線維腫) < 良性 (乳頭腫) < 前がん性 (白板症) < 悪性腫瘍 (SCC) の順に有意に上昇していた ($F(3, 20) = 28.06, p < 0.01$) (Fig. 1-1C)。一方、もう一つの分子イメージングの潜在的ターゲットであるEGFRは、表層の角質層を除いて、正常な扁平上皮では基底層、有棘細胞層に、乳頭腫および白板症ではほぼすべての細胞層で高発現していた (Fig. 1-1B)。定量分析の結果によると、正常、良性、前がん性および悪性腫瘍 (SCC) の間でEGFRの発現は増加傾向であるものの有意差は認められなかった ($F(3, 12) = 2.00, p < 0.01$) (Fig. 1-1D)。このことは、ポドプラニンがEGFRと比較して前がん性および口腔内悪性腫瘍などの悪性腫瘍で明らかに過剰発現し、より悪性腫瘍に対して特異性の高いマーカーになりうることを示している。

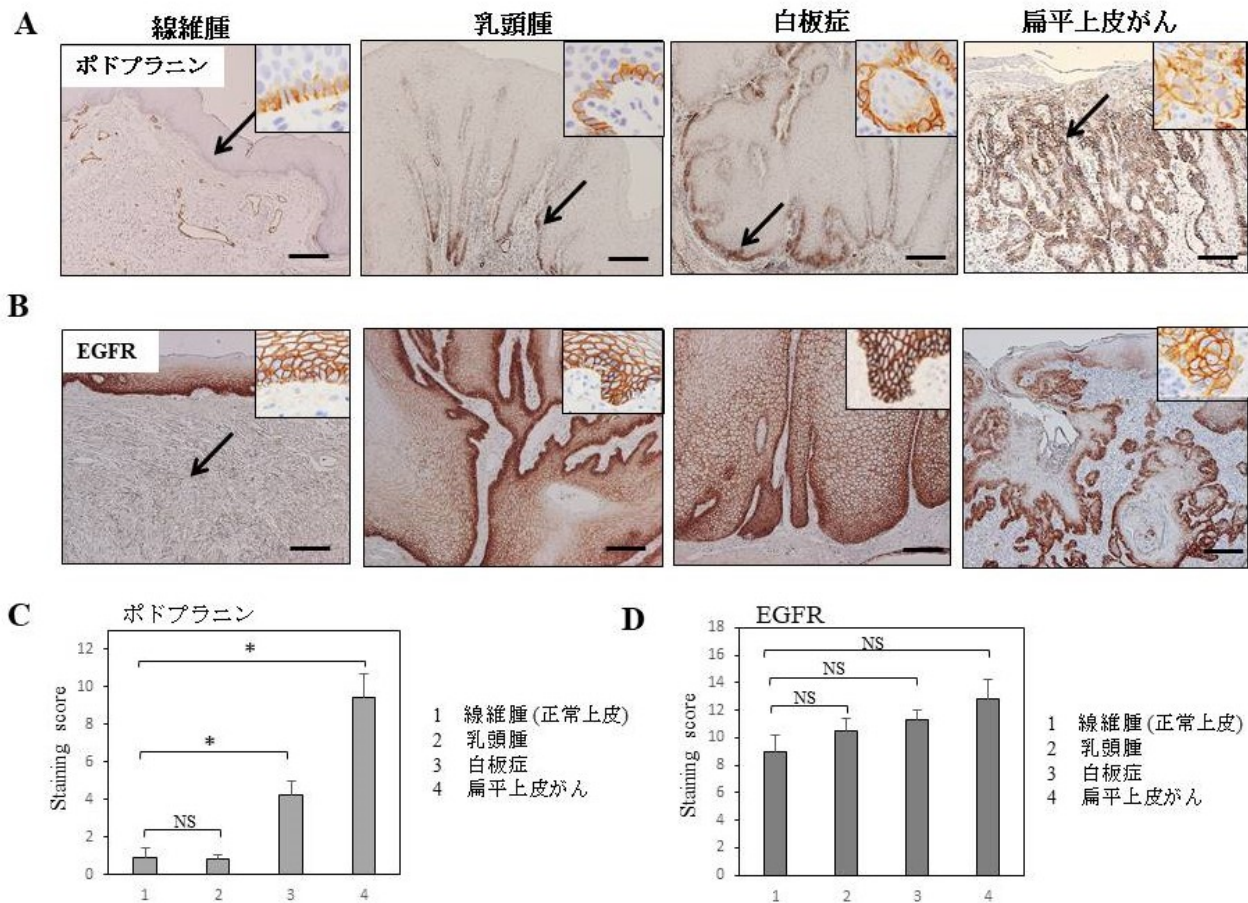


Fig. 1-1 口腔内腫瘍患者由来の臨床検体におけるポドプラニンとEGFRの免疫組織化学的解析

A. 線維腫（正常上皮）、乳頭腫、白板症および扁平上皮がん（SCC）の臨床検体におけるポドプラニンの発現（スケールバー：500 μ m）。挿入図は高倍率視野（対物レンズ40倍）を示す。

B. 上記の臨床検体におけるEGFRの発現（スケールバー：500 μ m）。挿入図は高倍率視野（対物レンズ40倍）を示す。

C. 免疫反応性スコアに基づく、線維腫（正常組織）、乳頭腫、白板症およびSCC組織におけるポドプラニンの免疫染色の強度の定量（ $n = 5 \sim 7$ ）（エラーバー：標準誤差、 $F(3, 20) = 28.06$ 、線維腫（正常上皮）との比較 $*, p < 0.01$ ；NS, 有意差なし）。

D. 免疫反応性スコアに基づく正常組織、乳頭腫、白板症およびSCC組織のEGFRの免疫染色の強度の定量（ $n = 5 \sim 7$ ）（エラーバー：標準誤差、 $F(3, 12) = 2.00$ 、線維腫（正常上皮）との比較 $*, p < 0.01$ ；NS, 有意差なし）。

一元配置分散分析を用い、有意差があった場合はTukey's多重比較検定を用い解析を行った。

2) OSCC細胞株におけるポドプラニンタンパク質の発現

UMSCC-81（低分化型SCC）、HSC-3（中程度分化型SCC）およびCa9-22細胞（高分化型SCC）の3つのOSCC細胞株のポドプラニン発現を*in vitro*ならびに*in vivo*で検討した。フローサイトメトリ解析の結果ではポドプラニンタンパク質の発現はUMSCC-81> HSC-3> Ca9-22の順であった（Fig. 1-2A）。また、培養細胞の定量的RT-PCR解析では、ポドプラニンmRNAの発現はUMSCC-81> HSC-3> Ca9-22の順に有意に高かった（ $p<0.01$ ）（Fig. 1-2B）。同様に、*in vivo*のヌードマウスの皮下移植腫瘍組織の免疫染色でも、これらの腫瘍組織の細胞内のポドプラニンの発現はUMSCC-81> HSC-3> Ca9-22の順に高かった。UMSCC81細胞およびHSC-3細胞は高度および中等度のポドプラニンの発現を示したのに対し、Ca9-22細胞は軽度のポドプラニン発現にとどまっていた（Fig. 1-2C）。

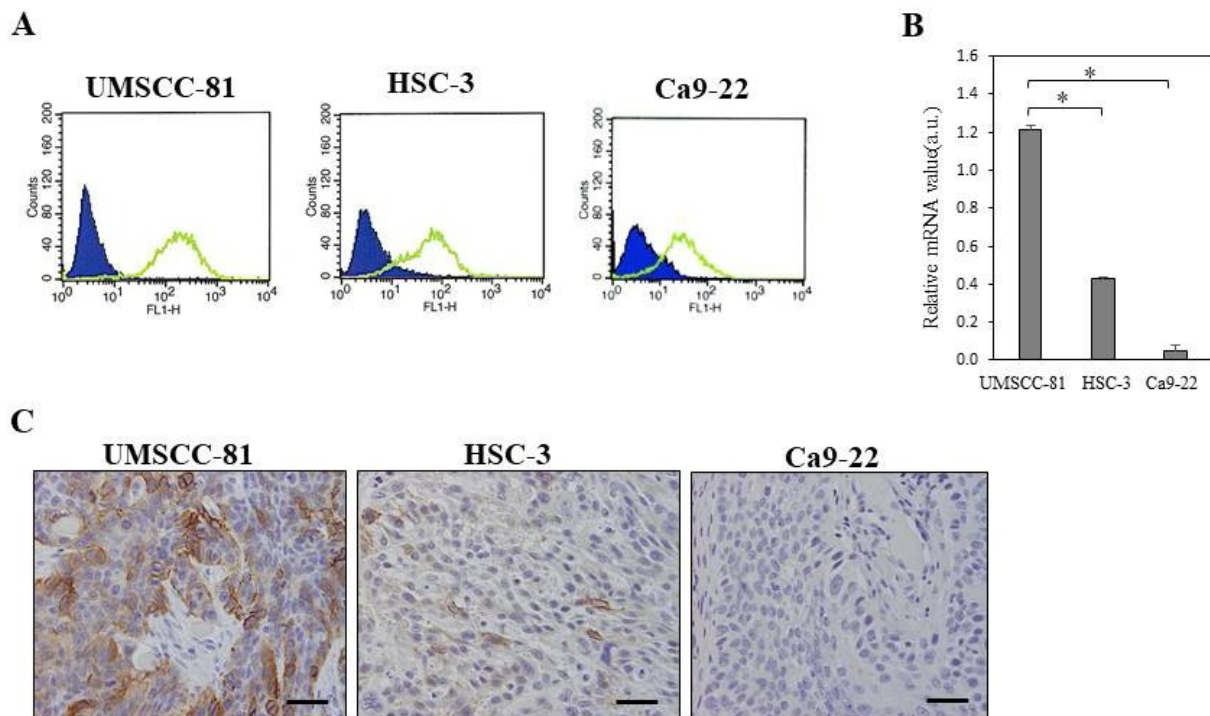


Fig. 1-2 *in vitro*および*in vivo*でのOSCC細胞株におけるポドプラニンの発現

A. 3種のOSCC細胞株のフローサイトメトリ分析。青色ピークはコントロール抗体（ラットIgG）、緑色ピークは抗ポドプラニン抗体による蛍光強度を示す。ポドプラニン発現レベル:UMSCC-81> HSC-3> Ca9-22。

B. 3種のOSCC細胞株におけるポドプラニンmRNAの定量的RT-PCR分析（n = 3）（エラーバー：標準誤差、UMSCC-81細胞との比較 *, $p<0.01$ ）。

C. 3種のOSCC細胞株を皮下移植したヌードマウスの免疫組織化学染色。UMSCC-81、HSC-3およびCa9-22腫瘍において、ポドプラニンはそれぞれ強度発現、中程度発現、非常に弱い発現が観察された。標本はヘマトキシリン-エオジンで対比染色した（スケールバー：100 μ m）。

3) ICG標識抗ポドプラニン抗体とIVISイメージングシステムを用いたNIRイメージング

上記のように、口腔内腫瘍の悪性度に対してはポドプラニン発現の方がEGFR発現よりも特異性が高かった。したがって、本研究では、ヌードマウスにおけるOSCC腫瘍のNIR蛍光イメージングのプロープとして、ICG標識抗ポドプラニン抗体を使用することとした。UMSCC-81細胞の腹腔内転移モデルを用いてICG標識抗体の経時変化をみた実験から、標識抗体はまず腹腔内に貯留し、その後、腫瘍に結合するが未結合の残留抗体は次に肝臓に取り込まれ、最終的に投与約1日後に胆管を経て腸から体外へ排泄されることがわかった。NIR蛍光イメージは、1～7日間観察可能で、標識抗体投与後1～3日で蛍光のピークが観察された (Fig. 1-3A)。ICG標識抗ポドプラニン抗体によるNIRイメージングの特異性を検討するためにブロッキング実験を行った。ICG標識抗ポドプラニン抗体を用いて観察された腹腔内腫瘍のNIR蛍光は、過剰量 (10倍) の非標識ポドプラニン抗体の前投与により抑制されたことからポドプラニン抗体の特異性が確認された (Fig. 1-3B)。

次に、ICG標識抗ポドプラニン抗体を用いたNIR蛍光イメージングの感度を、ポドプラニンの発現レベルが異なる3つのOSCC細胞株を用いて検討した。UMSCC-81細胞 (高発現) およびHSC-3細胞 (中等度発現) によって作られた皮下腫瘍と舌腫瘍はIVISイメージングシステムにより明瞭に可視化された。対照的に、Ca9-22細胞 (低発現) の皮下、舌腫瘍は確認できなかった。さらに、ネガティブコントロール抗体として用いたICG標識ラットIgG抗体の腹腔内注射では腫瘍に有意な蛍光シグナルは検出されなかった (Fig. 1-4A)。ちなみに、このNIRイメージングに使用した移植腫瘍のサイズは直径3 mm程度であった。統計解析の結果、皮下腫瘍のICG蛍光強度 (photons / sec / cm² / sr) はUMSCC-81> HSC-3> Ca9-22の順に高かった (各n = 4、UMSCC-81 vs. HSC-3, NS、UMSCC-81 vs. Ca9-22, $p<0.05$ 、HSC-3 vs. Ca9-22, $p<0.05$) (Fig. 1-4B)。したがって、マウス腫瘍のICG蛍光強度は、*in vitro*での腫瘍細胞のポドプラニン発現とよく相関していた。

しかしながら、IVISイメージングシステムでは、蛍光イメージング画像を取得するために専用の装置 (大型のボックス) 内の暗所での撮影が必要なことや、1枚の画像を撮影するのに5～10秒以上の露光時間が必要なことから、臨床現場でのモニター等を用いたリアルタイムな画像取得や病変の観察は不可能である。

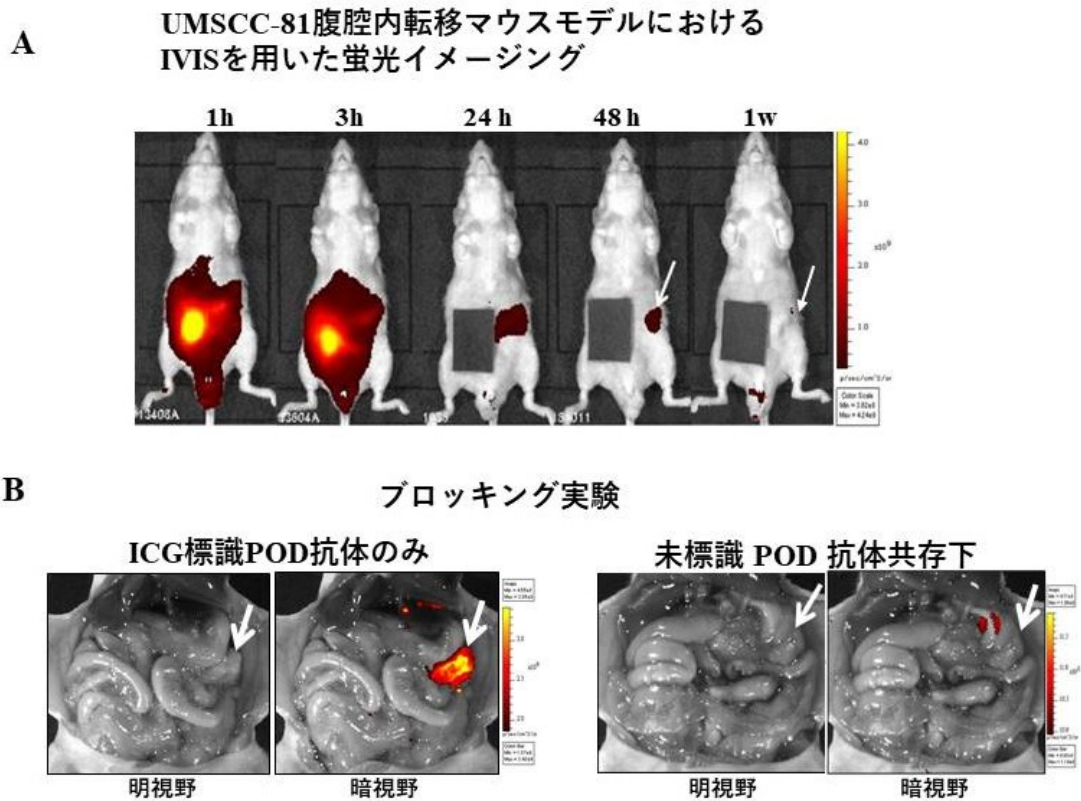


Fig. 1-3 IVIS蛍光システムを用いたマウスにおけるICG標識ポドプラニン抗体投与後の蛍光イメージの変化とポドプラニン抗体の特異性

A. ICG標識ポドプラニン抗体を腹腔内投与した後の蛍光イメージの変化を示す。抗体投与後1～3hの強い蛍光シグナルは投与した標識抗体によるもの。24～48hに腫瘍部位に蛍光シグナルのピークが確認され、その後約1週間後まで観察可能であった。黒いシートは投与部位のハレーション用のカバー。

B. ICG標識ポドプラニン抗体のみを投与したマウスでは腫瘍に蛍光が確認できた。ICG標識ポドプラニン抗体と過剰量（10倍）の非標識ポドプラニン抗体を前投与したマウスではごくわずかしき蛍光が確認できなかった。

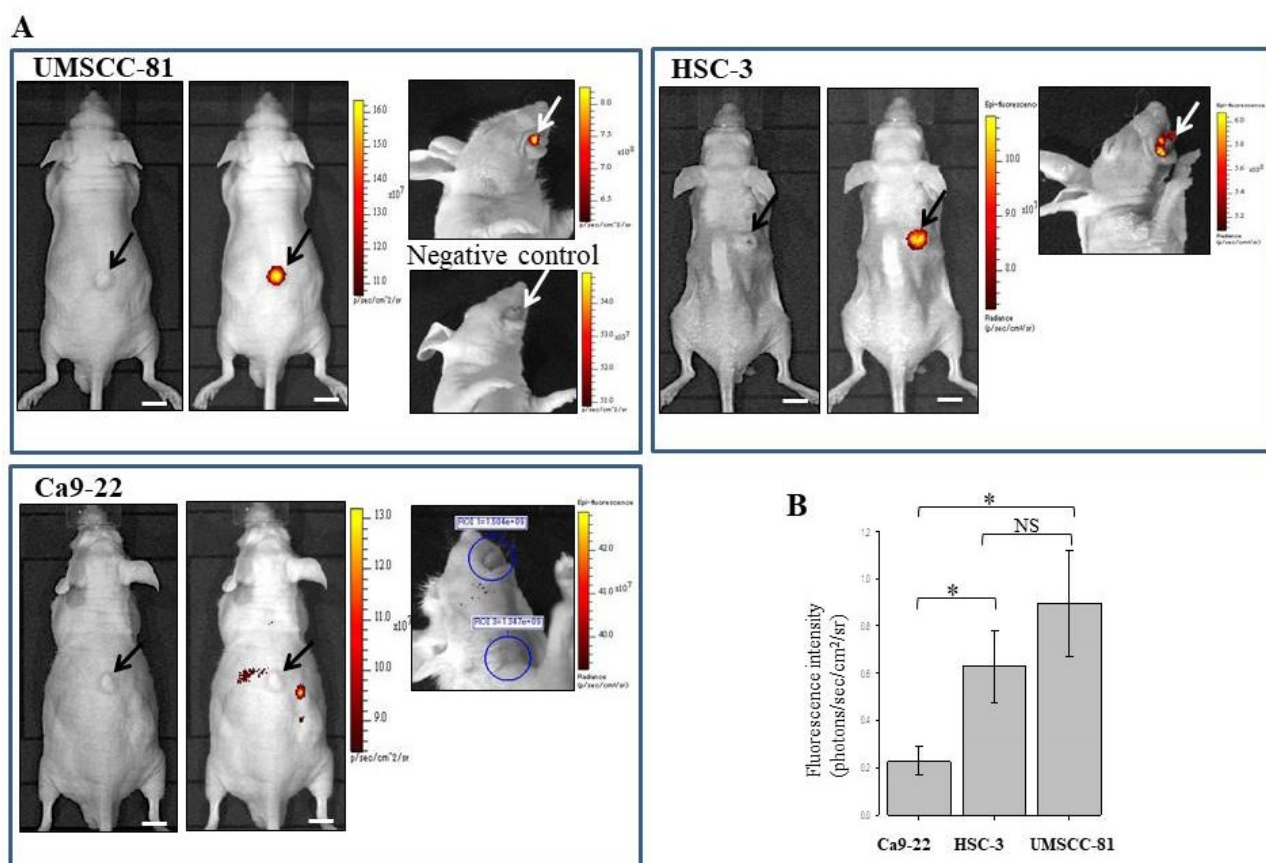


Fig. 1-4 ICG標識ポドプラニン抗体とIVISを使用したマウスのOSCC異種移植腫瘍のNIRイメージング

A. 3種のOSCC細胞株の移植後から約1週間における皮下腫瘍の明視野像(左パネル)および暗視野像(右パネル、疑似カラー画像)(黒矢印)および舌腫瘍の暗視野画像(白矢印)を示す。ポドプラニン発現が高度のUMSSC-81と中等度のHSC-3の皮下腫瘍はそれぞれ明瞭に目視できたが、低度のCa9-22腫瘍ではほとんど確認できなかった。ネガティブコントロールとしてICG標識ラットIgG抗体を投与したUMSSC-81舌腫瘍では、有意なICG蛍光シグナルは観察されなかった(UMSSC-81右下パネル)。

B. マウスにおける3種のOSCC細胞株の移植皮下腫瘍のNIR蛍光強度の定量。ICG蛍光強度(photon/s/cm²/sr)はUMSSC-81> HSC-3> Ca9-22の順に高かった(n = 4)(エラーバー: 標準偏差、UMSSC-81 vs. HSC-3、UMSSC-81 vs. Ca9-22、HSC-3 vs. Ca9-22 *, $p < 0.05$; NS, 有意差なし)。

4) VELscope®を用いた組織自家蛍光イメージング

VELscope®システムを使用した組織自家蛍光法では、皮内腫瘍は「打ち抜き像」として検出されたが、そのイメージはポドプラニンの発現強度にかかわらず、腫瘍サイズに依存していた (Fig. 1-5)。一方、皮下腫瘍では「打ち抜き像」は不明瞭であり、ICG標識抗ポドプラニン抗体を使用したNIR蛍光イメージング法に比べ可視化能は明らかに低かった。これは腫瘍組織の上を覆う皮膚等の青色励起光の透過率が低いことによるためと考えられる。

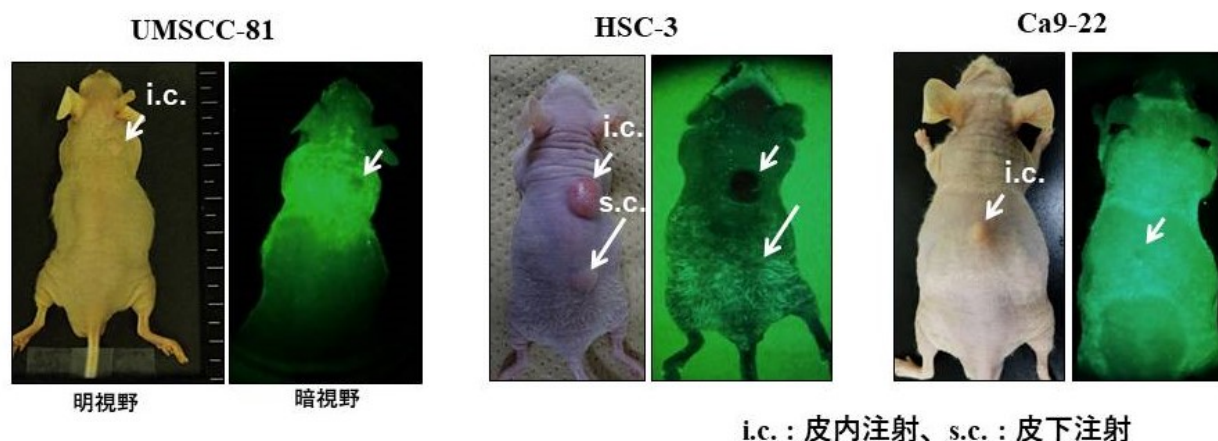


Fig. 1-5 組織自家蛍光に基づくVELscope®を用いたマウスにおけるOSCC異種移植腫瘍の可視光（非NIR）イメージング

3種のOSCC皮内腫瘍（短い白矢印）および皮下腫瘍（HSC-3の長い白矢印）の明視野像（左パネル）および暗視野（右パネル）像を示す。暗視野像では、UMSCC-81およびHSC-3皮内腫瘍が打ち抜き病変として確認された。Ca9-22皮内腫瘍およびHSC-3皮下腫瘍（長い白矢印）はわずかにしか確認できなかった。

5) 携帯型ICG検出装置 (PDE) を用いたリアルタイムNIRイメージング

次に、ICG標識ポドプラニン抗体の投与後、マウスOSCC腫瘍をリアルタイムに検出できるかどうかをPDEを用いて検討した (Fig. 1-6A)。その結果、暗視野画像に示されているように、UMSCC-81腫瘍 (ポドプラニン高発現) とHSC-3腫瘍 (中等度発現) においてはPDEにより暗視野下で皮内腫瘍と皮下腫瘍の両方からICG蛍光をリアルタイムに検出できた。しかし、Ca9-22腫瘍 (低発現) は検出できなかった (Fig. 1-6B)。

PDEとImage Jソフトウェアを使用したリアルタイム画像解析によってUMSCC-81、HSC-3およびCa9-22腫瘍のICG蛍光強度を定量的に比較した (Fig. 1-7A)。皮内腫瘍と皮下腫瘍の両方とも蛍光強度はUMSCC-81> HSC-3> Ca9-22の順に高かった (各 n=4、Fig. 1-7Aではそのうち各3匹を示す)。皮内腫瘍では、UMSCC-81とCa9-22では前者が後者に比べ有意に蛍光強度が高かった ($p<0.05$) (UMSCC-81 vs. HSC-3、HSC-3 vs. Ca9-22では有意差なし)。皮下腫瘍では、UMSCC-81とHSC-3では蛍光強度に有意差は見られなかったが、UMSCC-81とCa9-22、HSC-3とCa9-22では、それぞれ前者が後者に比べ有意に高かった ($p<0.05$) (Fig. 1-7B)。これらの結果は、IVISイメージングシステムを用いたNIR蛍光イメージングによって測定した皮下腫瘍のポドプラニン発現の検出結果と一致していた。また、ICGの排泄器官である肝臓では担がんマウスであるかどうかに関係なく、一時的な蓄積による弱いICG蛍光が観察された。

また、PDEを用いたNIR蛍光イメージング法は、大きな設置型かつ静止画の撮影のみにとどまるIVISを用いたイメージング法とは異なり、マウスに移植したOSCCをモニター上でリアルタイムに視覚化することが可能であった。今後、本イメージング法は、前臨床のみならず外来やベッドサイドなどの臨床現場においても口腔内悪性腫瘍の簡便かつ迅速な検出やその後のモニタリングのための有用な診断ツールとなりうることが示唆された。

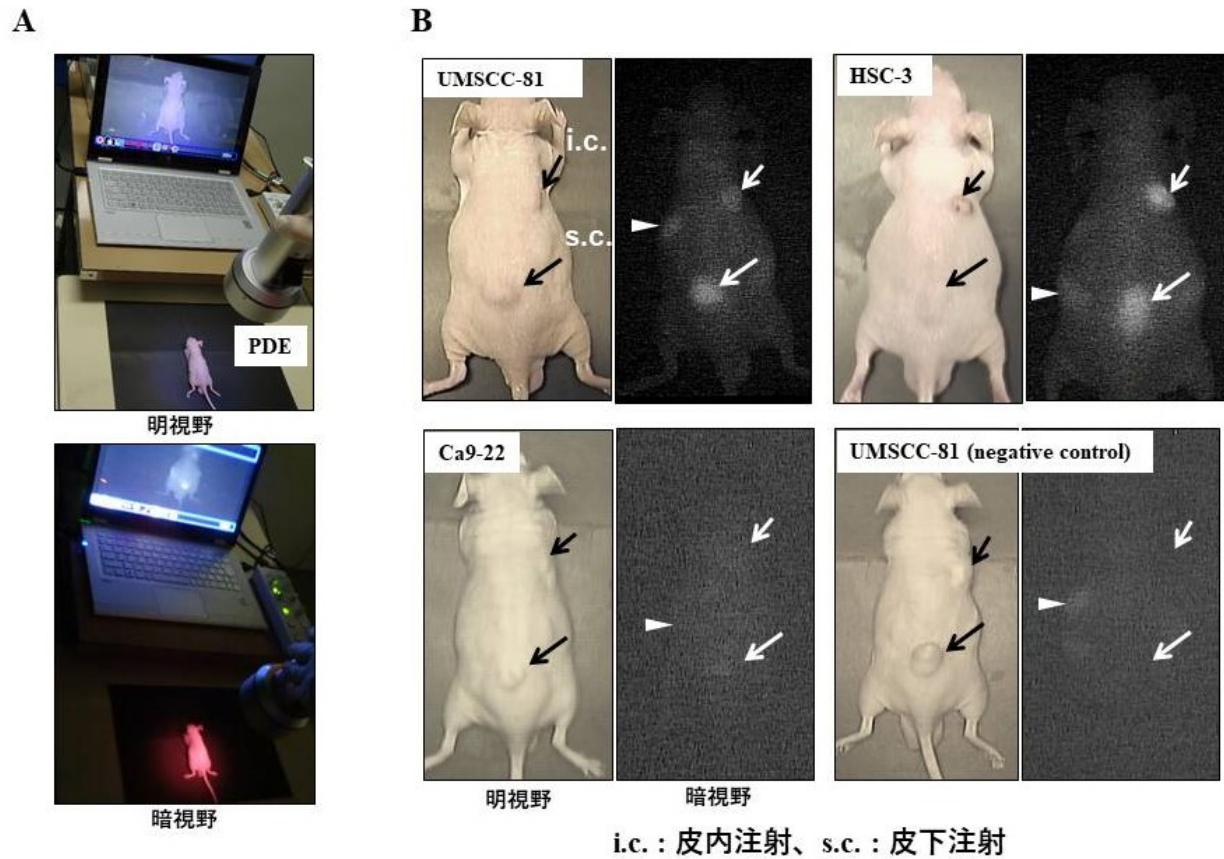


Fig. 1-6 PDEの全体像とICG標識ポドプラニン抗体によるマウスのOSCC異種移植腫瘍のリアルタイムNIRイメージング

A. PDEを用いたリアルタイムNIRイメージングの全体像。明視野（上パネル）と暗視野（下パネル）の様子を示す。暗視野では、励起光を照射しモニター上でリアルタイムに腫瘍が確認できた。

B. UMSCC-81、HSC-3およびCa9-22異種移植腫瘍の典型的なリアルタイムNIR画像。ネガティブコントロールとしてICG標識ラットIgG抗体を使用したUMSCC-81腫瘍では、有意なICG蛍光シグナルは観察されなかった（右下パネル）。短い矢印と長い矢印は、それぞれ皮内腫瘍と皮下腫瘍を示す。矢頭は肝臓を示す。

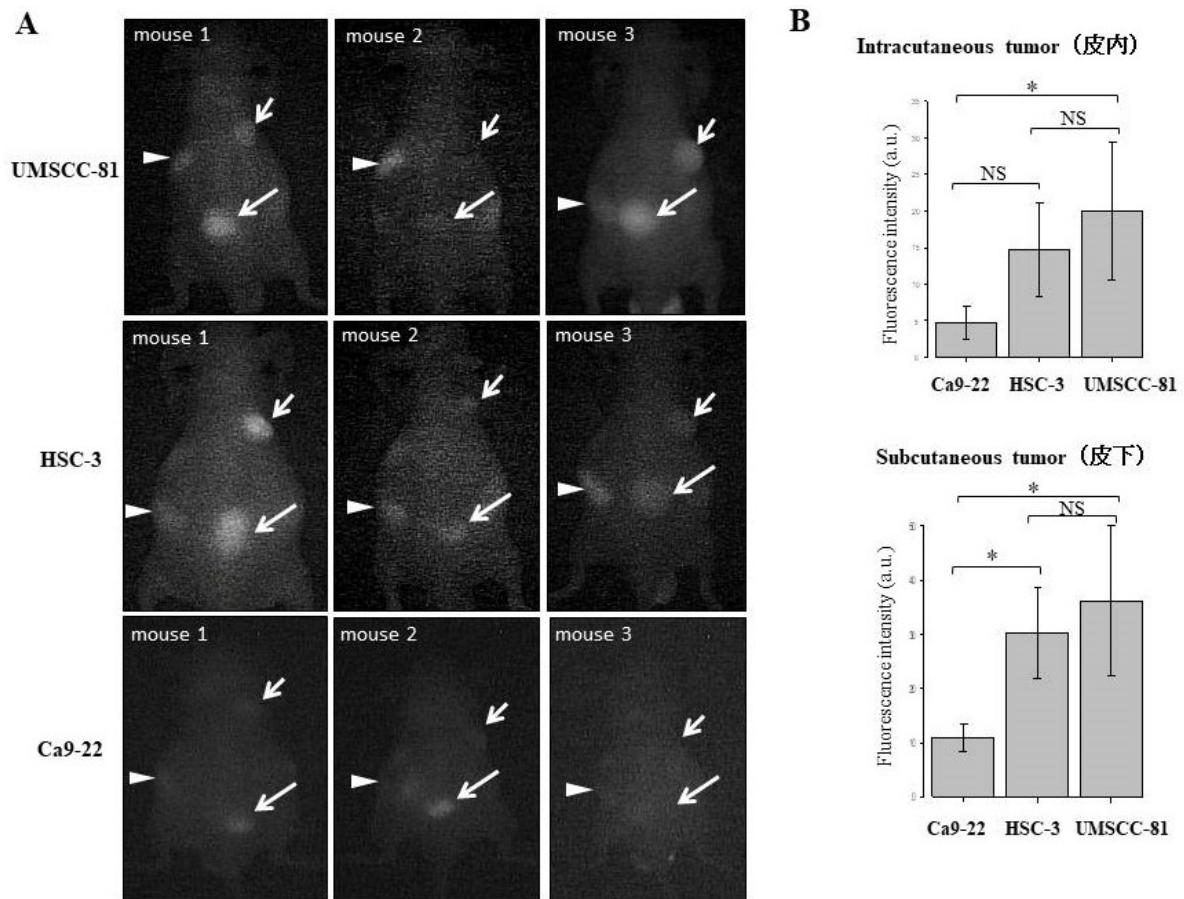


Fig. 1-7 ICG標識抗ポドプラニン抗体とPDEを用いたマウスにおける3種のOSCC異種移植腫瘍のリアルタイムNIR画像とその定量

A. マウス (n = 4) における3種のOSCC皮内腫瘍 (短い矢印) および皮下腫瘍 (長い矢印) のリアルタイムNIR画像 (暗視野) を示す。矢頭は肝臓を示す。

B. UMSCC-81、HSC-3、Ca9-22皮内腫瘍および皮下腫瘍のNIR蛍光強度の定量分析。ICG蛍光強度は、UMSCC-81> HSC-3> Ca9-22の順に高かった (各 n = 4、エラーバー: 標準偏差、UMSCC-81 vs. HSC-3、UMSCC-81 vs. Ca9-22、HSC-3 vs. Ca9-22 *, $p < 0.05$; NS, 有意差なし)。

第4節 考察

本研究ではICG標識抗ポドプラニン抗体とPDEを組み合わせたシステムを確立することにより、OSCC腫瘍をリアルタイムにNIR蛍光イメージングできる新しい手法を開発した。本リアルタイムイメージングシステムは、筆者の知る限りでは世界で最初の報告である。本法は、以下のような利点を有している。1) 組織自家蛍光イメージング法などに比べ、小さな皮内、皮下、舌のOSCC腫瘍でも明瞭な画像が得られること、2) ポドプラニン陽性OSCC腫瘍ではポドプラニン発現依存的な半定量的な検出が行えること、3) 設置型のIVISイメージングシステムに比べ、簡便にOSCC腫瘍をリアルタイムに検出できること、4) 携帯デバイスであるPDEを使用することにより組織自家蛍光法（VELscope®など）に匹敵する小型で簡便な検出が可能であることである^{5, 6)}。これらの利点は、ICG標識ポドプラニン抗体とPDEを用いたこのNIR蛍光イメージング法が、前臨床研究や臨床研究において、OSCCのリアルタイムイメージングの有用なツールとなりうる可能性を示唆している。

一方、ICG標識抗ポドプラニン抗体を使用した本イメージングシステムにはいくつかの課題も存在する。20～30%のポドプラニン陰性OSCCや前がん病変を見落とす潜在的风险がある点である。また、このICGベースのイメージングシステムの他の課題としては、前処理を必要としない自家蛍光法と比較して、本法ではイメージング前にICG標識抗体の静脈内注射を必要とするため、軽度ながら侵襲性があり、抗体投与に関連した副作用の可能性や一定のコストがかかることなどが挙げられる。さらに、ICGそのものの安全性は実地臨床で十分に確立されているものの、ICG分子に活性エステル（スクシンイミジル）基を導入した抗体標識用のNH₂反応性ICGの安全性については未だ検証されていない。さらにコンピューター断層撮影（CT）/磁気共鳴画像（MRI）/ポジトロン放出断層撮影（PET）とは異なり、NIRイメージングシステムや非NIR自家蛍光法を含む光イメージング法の大きな難点は、光そのものの組織透過性が低いため、深部臓器に局在する腫瘍の全身性の体外イメージングへの適用が困難なことである。しかし、口腔がんに関しては腫瘍が主に表在臓器に存在するため、本イメージングシステムの臨床応用においては、励起光の組織透過性の問題は大きな制限要因とはならないものと考えられる。

ICG抗ポドプラニン抗体とPDEを用いる本NIR蛍光イメージング法は、マウス前臨床モデルだけでなく、いくつかの臨床現場においてポドプラニン陽性OSCCの検出にも適用できる可能性がある。可能な臨床応用例として、以下のようなものが考えられる。1) 一つ目は、本システムを用いて腫瘍のマージン（境界）を視覚化することにより、腫瘍残存のリスクを最小限にし、正常組織の切除体積を最小限にするための切除範囲の決定などのイメージガイド下手術への応用である。2) 二つ目は、抗ポドプラニン抗体を使用した将来的な分子標的治療の有効性予測とモニタリングである⁴²⁾。ICG標識抗ポドプラニン抗体がマウスのOSCC移植組織内に長期間（少なくとも1週間）一定の濃度で滞留していたという事実は、既存の抗体薬と同様にOSCCに対する潜在的な治療効果の可能性を示唆している。近年、ポドプラニンは、ポドプラニン陽性の悪性中皮腫や神経膠腫の分子標的療法の優れたターゲットであるとする報告がいくつかなされている。Abeらはポドプラニン抗体（NZ-8 / NZ-1）がナチュラルキラー（NK）細胞を介した抗体依存性細胞傷害（ADCC）により、

悪性中皮腫細胞由来のマウスの皮下移植腫瘍の増殖を著明に抑制したことを報告している³⁶⁾。また、Chandramohanらはグリオーマ（膠芽腫）やメドロブラストーマ（髄芽腫）などの悪性脳腫瘍に対する組換え抗ポドプラニン抗体（NZ-1）による抗腫瘍効果も報告している²⁶⁾。口腔がんの一種であるOSCCに対するポドプラニン抗体の抗腫瘍効果の有無は未だ明らかにされていないものの、将来、抗ポドプラニン抗体が分子標的治療薬として臨床で使用されるようになった場合には、ICG標識抗ポドプラニン抗体とPDEを使用した本イメージング法が薬剤感受性を予測するための有用なツールとなりうる可能性が示唆される。3) 3つ目は、ポドプラニン発現口腔内腫瘍における半定量的評価能に基づいたOSCCと前がん性病変（白板症や紅板症など）を鑑別するための補助ツールとしての有用性である。de Vicenteらは白板症の患者の38%はポドプラニン陽性、残りの62%はポドプラニン陰性で、ポドプラニン陰性症例が多数を占めることを報告している⁴³⁾。同様の結果が紅板症でも報告されており、ポドプラニンの発現が異形成のグレードやOSCCへの悪性化リスクと強く関連していることを示唆している⁴⁴⁾。これらの知見より、本ICGイメージング法を用いたポドプラニン発現の半定量的評価は、口腔内の前がん性病変とOSCCを簡便にスクリーニングするための有用な診断ツールとなりうる可能性がある。

第5節 小括

本研究において、筆者は、ICG標識抗ポドプラニン抗体とPDEを組み合わせた新しいICGイメージングシステムを開発し、本システムによりマウスのOSCCをリアルタイムに明瞭に視覚化できることを明らかにした。しかしながら、今回のPDEを使用したリアルタイムICGイメージング法の検出感度と特異性は、臨床におけるOSCCの早期診断への応用にはまだ不十分と考えられる。今後、さらに強力なLED光源、より高感度かつ小型のICG検出カメラおよびリアルタイム疑似カラーイメージ処理装置などの改良により、将来的には臨床現場において、OSCCを始めとする表層がんのリアルタイム診断、スクリーニングや治療への応用の可能性が期待できる。

第2章 ヒト EGFR 変異肺がん と HER2 遺伝子増幅胃がんモデルマウスを用いた分子標的治療における血液中循環がん細胞(CTC)の動態

第1節 緒言

末梢血液中を循環するがん細胞 (circulating tumor cell、以下 CTC) は、転移巣の生検に代わる低侵襲な体液生検としての利用が期待されている⁷⁻⁹⁾。今日、末梢血無細胞遊離 DNA (cell-free circulating tumor DNA、以下 ctDNA) は、進行・再発がんにおける遺伝子変異を検出可能な体液生検の新たなツールとして注目されている⁴⁵⁾。しかしながら、ctDNA の再発や転移に対する早期診断や予測マーカーとしての有用性は明らかにされていない。一方、CTC は乳がん、大腸がん、肺がん、前立腺がん患者において、予後・再発予測因子としての臨床有用性が示されてきた¹²⁾。CTC 数は、様々なイメージング技術と同様に、転移性、非転移性担がん患者において予後予測のためのよい指標となる¹³⁾。また CTC のタンパク質や遺伝子プロファイルは、転移乳がん患者において予後と相関することも報告されている¹⁴⁾。このように担がん患者において CTC の予後因子としての有用性に関するエビデンスが増えてきているのに対し、薬剤感受性や薬剤耐性、そして治療効果モニタリングのツールとしての臨床的有用性に関しては十分な検討はなされていない^{46, 47)}。さらに薬物治療に対する CTC の基礎的な細胞動態についても明らかになっていない⁴⁸⁾。

様々な型のチロシンキナーゼ阻害薬 (tyrosine kinase inhibitor、以下 TKI) を含む分子標的薬や抗体療法は、今日、最も急速に進歩している治療領域である⁴⁹⁾。重要なドライバー遺伝子変異である上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor、以下 EGFR) の L858R 変異や Exon 19 欠損のような EGFR 変異をもつ肺がんは、可逆的 TKI であるゲフィチニブ、エルロチニブや不可逆的 TKI であるアファチニブに高い感受性を有する⁵⁰⁾。今日、これらの TKI は進行再発非小細胞肺がんに対するファーストライン (第一選択枝) 治療薬として使用されている⁵¹⁾。トラスツズマブやトラスツズマブエムタンシン (DM1 (メイタンシン誘導体) を結合させたトラスツズマブ、以下 T-DM1) は世界的に HER2 陽性乳がんに対する標準治療として、また HER2 陽性胃がんにおいては術前・術後補助化学療法として用いられている^{52, 53)}。

これまでに複数の研究者が化学療法や分子標的治療後の CTC 数の変化について報告している⁵⁴⁻⁵⁶⁾。これらの報告のほとんどで、長期間の薬物治療により高い腫瘍縮小効果が示された患者では CTC 数の減少が認められている。しかしながら、最近、Martin らは肺がん患者において放射線治療後早期には CTC 数が増加することを報告している^{10, 11)}。このことは、放射線治療の結果、原発腫瘍組織の破壊が起こり、末梢血に CTC が動員される可能性を示唆している。Adachi らもまた最近、乳がん CTC マウスモデルにおいて、パクリタキセルとドキソルビシンによる化学療法後早期に CTC 数が増加することを明らかにしている⁴⁸⁾。これらの知見より、放射線療法のみならず化学療法に対する急性期の反応としても CTC が原発腫瘍より動員される可能性が示唆される。

Nakanishi らは、CTC を半自動的に単離できる 3 次元構造 (以下 3D) をもつ金属フィルターを用いた微小流体デバイスを開発し、さらにスライドガラス上でパパニコロウ (以下 Pap) 染色や免疫細胞化学染色を施し、CTC を光学顕微鏡下で高精度に検出できるシステムを確立した⁵⁷⁻⁵⁹⁾。本

研究では、この細胞診を基盤とした新しい CTC 検出システムおよびヒト肺がん細胞株及び胃がん細胞株由来 CTC マウスモデルを用いて、2 種類の分子標的治療に対する治療後早期の CTC の動態に関して、前臨床的な検討を行った。

第2節 材料と方法

1) 試薬

ヒトサイトケラチンに対し広い種特異性をもつウサギポリクローナル抗体(Ab9377)およびHER2に対するマウスモノクローナル抗体 (Ab16901) はAbcam (Cambridge, UK) より購入した。免疫蛍光法に用いる抗体の直接標識には、Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) の標識キットである Zenon Alexa Fluor-488 および-568 を使用した。核の対比染色には、Hoechst 33342 (Molecular Probes) を使用した。*In vitro* 実験に使用したエルロチニブは Santa Cruz Biotech (Dallas, TX, USA) より購入した。マウス実験用のエルロチニブ(タルセバ®) および T-DM1 は中外製薬 (Tokyo, Japan) から購入した。

2) 細胞株

EGFR 変異型ヒト肺がん細胞株である PC-9 細胞は、ATCC (Manassas, VA, USA) より購入した。HER2 陽性ヒト胃がん細胞株である GLM-1 は愛知県がんセンター研究腫瘍病理学部で確立したものを使用した⁶⁰⁾。これらの細胞株は、加湿 5%CO₂ インキュベータ内 37 °C 環境下で、10% ウシ胎児血清 (以下 FBS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) とペニシリン/ストレプトマイシン硫酸塩 (Sigma-Albrich, St. Louis, MO, USA) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (以下 DMEM) (ニッスイ, Tokyo, Japan) にて培養した。

3) 細胞増殖抑制の検討

PC-9 と GLM-1 細胞株をトリプシン/EDTA により回収し、1×10⁴ 個/well にて 10%FBS 添加 DMEM により 96-well プレート内で 24 時間培養した。段階的に濃度を上げエルロチニブ (0.1, 1.0, 10 μM) または T-DM1 (0.1, 1.0, 10 μg/ml) を添加し、数日間培養した。その後、血球計数板にて細胞数をカウントした。位相差顕微鏡を用いて細胞の形態についても観察し、撮影を行った。

4) アポトーシスの検討

アポトーシスは M30 CytoDEATH staining kit (Roche-Mannheim, Germany) を使用し、これまでの報告にしたがって測定した⁶¹⁾。細胞を 6 cm プラスチックディッシュ上へ生着させ増殖培地にて 24 時間培養後、エルロチニブ (10 μM) と T-DM1 (10 μg/ml) を投与し、さらに 2~3 日間培養した。M30 CytoDEATH staining kit にてアポトーシス細胞を染色し、光学顕微鏡 (Eclipse Ti-S, Nikon, Tokyo, Japan) 下で染色した細胞数を計測した。

5) 免疫蛍光染色と蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (以下 FISH)

スライドガラス上の CTC 標本は、Alexa488 標識マウス抗ヒト HER2 抗体を用いて免疫蛍光により染色した。HER2 遺伝子の増幅は、Passvision HER-2 DNA Probe Kit (Vysis Inc., IL, USA) を用い、メーカーのプロトコールにしたがって二重染色 FISH 法により検討した。すなわち HER-2/neu-Spectrum Orange プローブにより、染色体内の 17q11.2-q12 位に存在するヒト HER2

遺伝子の増幅を赤色蛍光で評価した。コントロールとして、CEP 17 green プローブにより染色体 17 位のセントロメア領域を緑色蛍光で確認した。核は DAPI で染色した。蛍光写真は、デジタルカメラ (DP50, Olympus, Tokyo, Japan) を装着した BX60 蛍光顕微鏡で撮影した。1 細胞当たり HER2 による赤色シグナル 4 個以上を「HER2 増幅あり」と判定した。

6) EGFR 変異の検討

スライドガラス上の腫瘍細胞を、プロテイナーゼ K 溶液で溶解し、54 °C 下 1 時間かけタンパク質を分解した。その後 95 °C で酵素を不活化し、その溶液を直接、遺伝子変異解析のためのテンプレート DNA として使用した。EGFR 遺伝子内の Exon19 欠失の検出はフラグメント解析により行った⁶²⁾。PCR 産物を ABI PRISM 310 にて電気泳動を行い、欠失変異の有無は電気泳動図内に新たなピークとして現れるより短い DNA 断片の検出により行った。この方法により PC-9 細胞では Exon19 に 15 塩基の欠損を認めた。

7) 実験動物

マウス実験には 7~9 週齢、27~30 g のオス胸腺欠損 KSN strain ノードマウス (日本エスエルシー, Hamamatsu, Japan) を使用した。マウスは特定の病原体が存在しない SPF 環境下で飼育し、実験に使用した。すべての動物実験は、愛知県がんセンター研究所の動物実験倫理審査委員会により承認されており (承認番号: 29-16)、国際ガイドラインにより定められた基準に適合した実験プロトコールに基づいて行った⁶³⁾。

8) フィルトレーションに基づく CTC 分離とそのスライドガラスへの転写

CTC の検出は以下の 3 段階で行なった。1) 3D 構造を有する金属 (ニッケル) フィルターを用いたマイクロ流体デバイスを含む半自動 CTC 分離装置 (Optnics Precision Co., Tochigi, Japan) による CTC の濃縮、2) 3D 金属フィルターからスライドガラスへの CTC の転写 (以下 CTC スライドガラス)、3) Pap 染色とケラチンの免疫細胞化学による CTC スライドガラス上での細胞学的検出。

本研究にて改良された半自動 CTC 分離装置は蠕動ポンプ、膜型ポンプ、電磁バルブ、光学液体濃度センサーから構成され、プログラム可能な論理コントローラーにより制御される (Fig. 2-1A)。CTC の検出手順は、マウス心臓より採取した血液 (0.1~0.25 mL) を、0.5 mM EDTA 添加 PBS (PBS/EDTA) で 10 倍希釈し、7 mL/min の流速で半自動 CTC 分離装置にて濾過、濃縮した。試料血液の濾過後、フィルター上にトラップされた CTC を含む細胞を、デバイス内にて 10%ホルマリン液で 30 分間固定後、PBS/EDTA 液で洗浄した。デバイスより取り外したフィルターを、上面を下にしてスライドガラス (MAS coat, Matsunami, Osaka, Japan) 上に置き、PBS/EDTA 液に浸した。フィルター上にトラップされた CTC は、先端にスポンジのついた穏やかな加圧式手動デバイス (Optnics Precision Co.) を用いて速やかにスライドガラスに転写した (Fig. 2-1B)。スライドガラスに転写された CTC は直ちに、Pap 染色する場合は 95%エタノールで再固定、免疫細胞

化学染色を行う場合は 95%エタノール固定後、10%緩衝ホルマリン液で追加固定した。

9) CTC の免疫細胞化学染色

スライドガラス標本の Pap 染色は、全自動染色機 (Sakura Fintec, Tokyo, Japan) を用いて行った。免疫染色では、1%BSA でブロッキング後、汎サイトケラチンに対するウサギ抗体で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、ヤギ抗ウサギ抗体 (EnVision + System, DAKO) を結合させた西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ポリマーを加え 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、液体 DAB 色素/発色システム (DAKO) により発色した。核はマイヤー・ヘマトキシリン溶液で染色した。

10) マウス CTC モデルと治療計画

Hank's 緩衝塩類溶液 (HBSS) に懸濁した PC-9 細胞または GLM-1 細胞 (5×10^6 個) を、マウスの背部に皮下注射した。目的薬剤の抗腫瘍効果を評価するため、PC-9 移植マウスには、エルロチニブ (100 mg/kg/day で移植後 day7 より連日 5 回/週を 5 週間) を胃ゾンデで経口投与した。コントロールマウスは、溶媒 (0.5%ポリソルベートを含む蒸留水) を経口投与した。GLM-1 細胞を移植した腫瘍マウスでは、生理食塩水で希釈した T-DM1 を腹腔内投与した (40 mg/kg/day で週 1 回 4 週間)。コントロールマウスには生理食塩水を投与した。腫瘍の最長径 mm (L) と短径 mm (W) を毎週計測し、次式: $L \times W^2 \times 1/2$ より腫瘍体積 (mm^3) を近似計測した。

分子標的治療後の CTC 動態をモニタリングするため、皮下移植後、約 2 か月間、皮下腫瘍径 1 ~ 2 cm の担がんマウスを使用した。採血 (0.2 mL) は分子標的治療の前後に、麻酔下で心臓穿刺によって行い EDTA 入りのチューブに採取した。なお、予備実験において、最適な複数回 (2 回) の採血経路として尾静脈、眼窩後静脈叢、心臓採血を比較した。採血量、安全性、反復可能性、正常上皮細胞の混入リスクなどを比較検討した結果、心臓穿刺が唯一可能な採血経路である考えられた。本研究で用いた採血の頻度や量は、ガイドラインで推奨されるマウス体重や採血間隔に基づいて決定した^{64, 65)}。マウスの心臓採血は、重篤な副作用のない 2, 2, 2-トリブromoエタノール麻酔下、27G シリンジを使用することで安全に行うことができた。治療前とエルロチニブ (経口投与、100 mg/kg/day、5 回投与) または T-DM1 (腹腔内投与、40 mg/kg/day、1 回) の治療後、血液 0.20 ml を採取した。いくつかの個体では、さらに治療数週間後にも採血した。実験後、マウスを安楽死させ、原発皮下腫瘍と肺転移腫瘍を採取し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色による組織学的検査を行った。

11) 統計学的解析

グループ間のデータにおける違いの統計学的有意差は Student's *t* 検定により評価した。 $p < 0.05$ を有意差あり、 $p = 0.1 \sim 0.05$ は境界有意と評価した。

第3節 結果

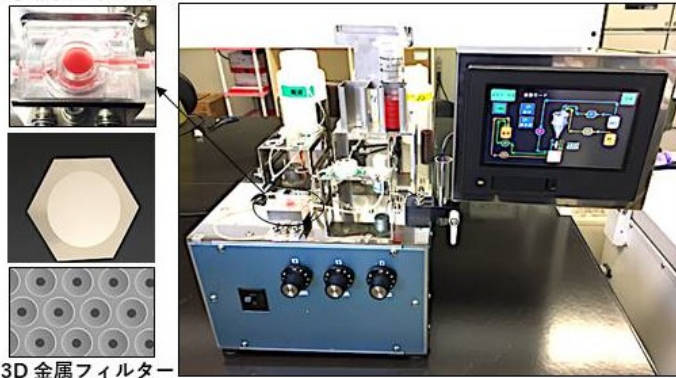
1) 新規の CTC 検出装置とマウス CTC モデルの作成

筆者らの開発した新規 CTC 検出装置による CTC の検出手順は以下の通りである。1) 半自動 3D 濾過フィルターによる CTC の単離 (Fig. 2-1A)、2) 微小加圧デバイスによるフィルターからのスライドガラスへの CTC の転写 (Fig. 2-1B)、3) Pap 染色や免疫細胞化学による CTC の細胞学的評価 (Fig. 2-1C 左)。Hoechst33342 で核を染色し、Alexa488 標識抗ヒトサイトケラチンと PE 標識抗マウス CD45 を使用した CTC 標本の三重免疫蛍光染色を施行したところ、Pap 染色で判定された異型細胞はサイトケラチン陽性かつ CD45 陰性であった。このことより光学顕微鏡下でサイトケラチン陽性かつ Pap 染色で細胞形態学的に異型性を示す細胞が CTC であると正しく判断できることが確認された (Fig. 2-1C、右)。

次に、ヒト肺がん細胞株 PC-9 とヒト胃がん細胞株 GLM-1 を用いた CTC を検出できるマウスモデルを作成した。PC-9 ならびに GLM-1 細胞株はヌードマウスへの皮下移植で自然肺転移を惹起することが知られている。肺転移は皮下移植後、約 1~2 ヶ月経過したマウスで確認され (Fig. 2-1D、左)、肺転移が確認できた時点では CTC 数の増加が認められた ($p<0.05$) (Fig. 2-1D、右)。

A CTC検出装置の全体像と3D金属フィルターデバイス

フィルターデバイス



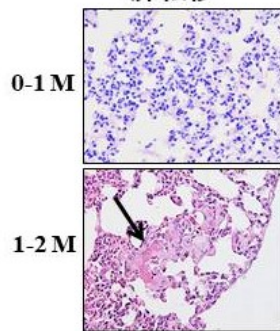
3D 金属フィルター

B 転写Filter on
glass slideCTC
transfer to
glass slide
by pressure
deviceCTC glass
slide

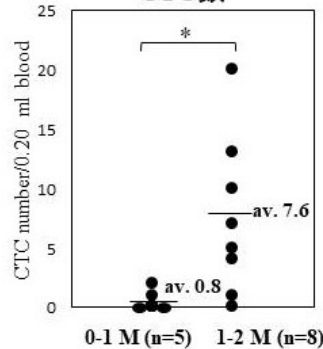
Staining

C マウス肺転移モデルの作成とCTC検出

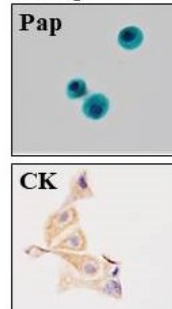
肺転移



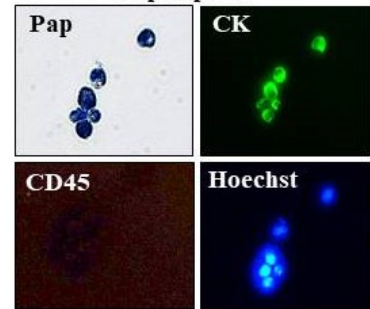
CTC数

**D 染色**

Pap/ICC



Pap/triple IF

**Fig. 2-1 細胞診に基づく半自動 CTC 検出装置の全体像と肺がん転移マウスモデルの作成**A. 3D 金属フィルター（ニッケル製、孔径：8 μm ）と半自動 CTC 濃縮装置を備えた濾過装置。

B. 微小加圧器による CTC のスライドガラスへの転写と、得られる CTC スライドガラス。

C. PC-9 肺がん細胞をヌードマウスに皮下移植し、肺がん転移マウスモデルを作成した。細胞を皮下注射後 1～2 ヶ月（M）で、ヘマトキシリン-エオジン染色にて典型的な肺転移が確認できた。矢印は肺の微小転移を示す（左パネル）。PC-9 細胞の皮下移植後の時間（M）ごとの血液中 CTC 個数を示す（右パネル）（腫瘍移植後 0～1 ヶ月（M）との比較 $*, p < 0.05$ ）。

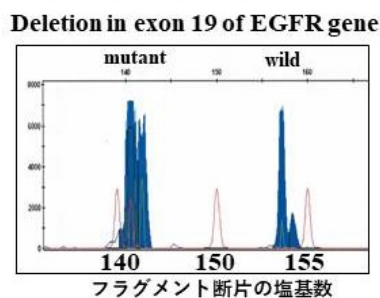
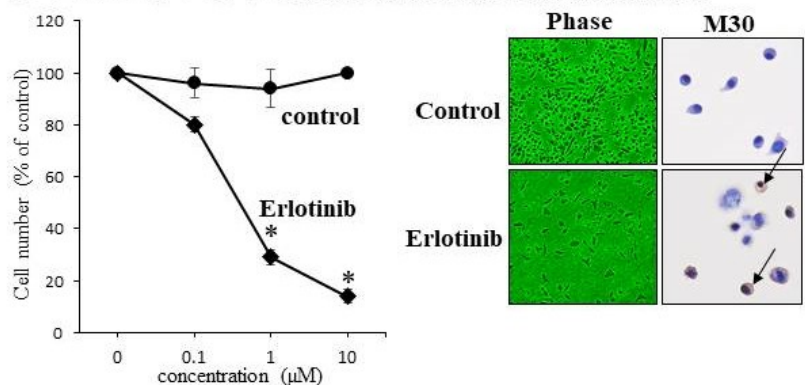
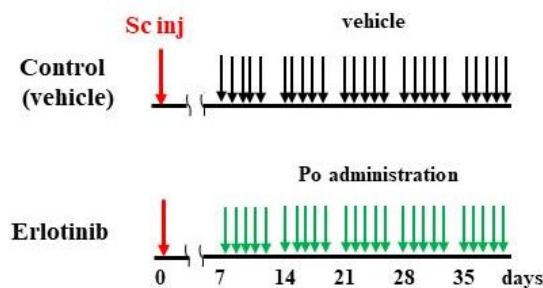
D. 細胞学的染色（Pap）と免疫細胞化学で染色された CTC（左パネル）。Pap と CK / CD45 / Hoechst33342 三重免疫蛍光法で染色された CTC（右パネル）。

Pap：パパニコロウ染色、CK：サイトケラチン、ICC：免疫細胞化学、IF：免疫蛍光法

2) *In vitro* および *in vivo* マウス肺がん転移モデルにおけるエルロチニブによる増殖抑制効果

PC-9 細胞は PCR による増幅産物のサイズ解析により EGFR 遺伝子の Exon 19 に欠失変異を持つことが確認されている (Fig. 2-2A)。そのため、PC-9 細胞はエルロチニブ感受性細胞であることが予想される。実際、*in vitro* 実験において PC-9 細胞の増殖はエルロチニブ濃度依存的に著明に抑制されることを確認した ($p<0.01$)。24 時間の 10 μM エルロチニブ処理群では、多数の小型の浮遊細胞が観察された。M30 CytoDEATH 染色によりこれらの細胞がアポトーシスを起こした腫瘍細胞であることが確認された (Fig. 2-2B)。また *in vivo* 実験では、PC-9 細胞の皮下移植担がんマウスにおいて、エルロチニブ治療群はコントロール (溶媒のみ) 群と比較して著明な抗腫瘍効果が認められた ($p<0.01$) (Fig. 2-2C, 2-2D)。

A フラグメント解析

B エルロチニブによる *in vitro* 細胞増殖抑制効果C *in vivo* 薬物投与スケジュール

D 増殖抑制曲線

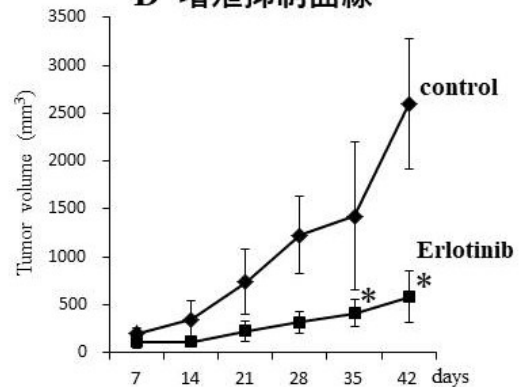


Fig. 2-2 エルロチニブによる PC-9 肺がん細胞の *in vitro* および *in vivo* 増殖抑制効果

A. EGFR 遺伝子の Exon19 の 15 塩基欠失は、一般的なフラグメント解析によって確認した。

B. 培養した PC-9 細胞の増殖 (コントロールとの比較 *, $p<0.01$ 、エラーバー: 標準偏差) (左) および形態に及ぼすエルロチニブの影響 (右)。位相差顕微鏡 (Phase) と M30 染色を示す。96-well プレート内の細胞をエルロチニブ (0~10 μM) で 48 時間処理した後、細胞数をカウントし M30 免疫染色を行った。矢印は M30 によるアポトーシス陽性細胞を示す。

C. 担がんマウス ($n=5$) の治療計画を示す。PC-9 細胞を皮下注射 (sc) 後、マウスモデルにエルロチニブを経口 (po) 投与 (100 mg/kg/day、5 回/週を 5 週間) した。

D. マウスの皮下腫瘍増殖に対するエルロチニブの抗腫瘍効果。(エラーバー: 標準偏差、コントロール (溶媒のみ) との比較 *, $p<0.01$)

3) マウス肺がん転移モデルにおけるエルロチニブ治療前後での CTC の変化

原発皮下腫瘍の組織学的解析では、エルロチニブ治療後(5～10 日)ではアポトーシスを起こした腫瘍細胞の著明な増加が認められたのに対し (Fig. 2-3A,B)、分裂期の腫瘍細胞数は有意に減少していた ($p<0.01$) (Fig. 2-3B)。今回、CTC として判定するための基準は、免疫細胞化学染色でケラチン陽性、ヘマトキシリン核染色で異型核を有する細胞とした。このような基準で判定された CTC には単細胞型と小細胞集塊型の 2 種類が存在した (Fig. 2-3C)。CTC 数はエルロチニブ治療前と比較し、治療後 5～10 日では血液中に有意な増加が見られた ($p<0.01$) (Fig. 2-3D)。Pap 染色により、これらの増加した CTC には、核片の凝集などアポトーシスを起こした CTC と形態学的に異常のない生存 CTC の両方が含まれていることが判明した (Fig. 2-3C)。治療後早期での血液中のアポトーシス CTC の存在は、原発腫瘍での腫瘍細胞のアポトーシス亢進を反映しているものと考えられた。

心臓穿刺の倫理的、技術的理由により、様々な時期 (治療前、治療後 5～10 日、治療後 20～30 日) での連続した CTC 数の系統的な検討は困難であるが、2 匹のマウスから得られた予備データでは治療後 5 日では CTC 数が増加し、25 日目では CTC 数の減少が認められた(データは未掲載)。これは、治療後の CTC 数の増加は、治療に対する一過性かつ急性期の反応である可能性を示唆している。

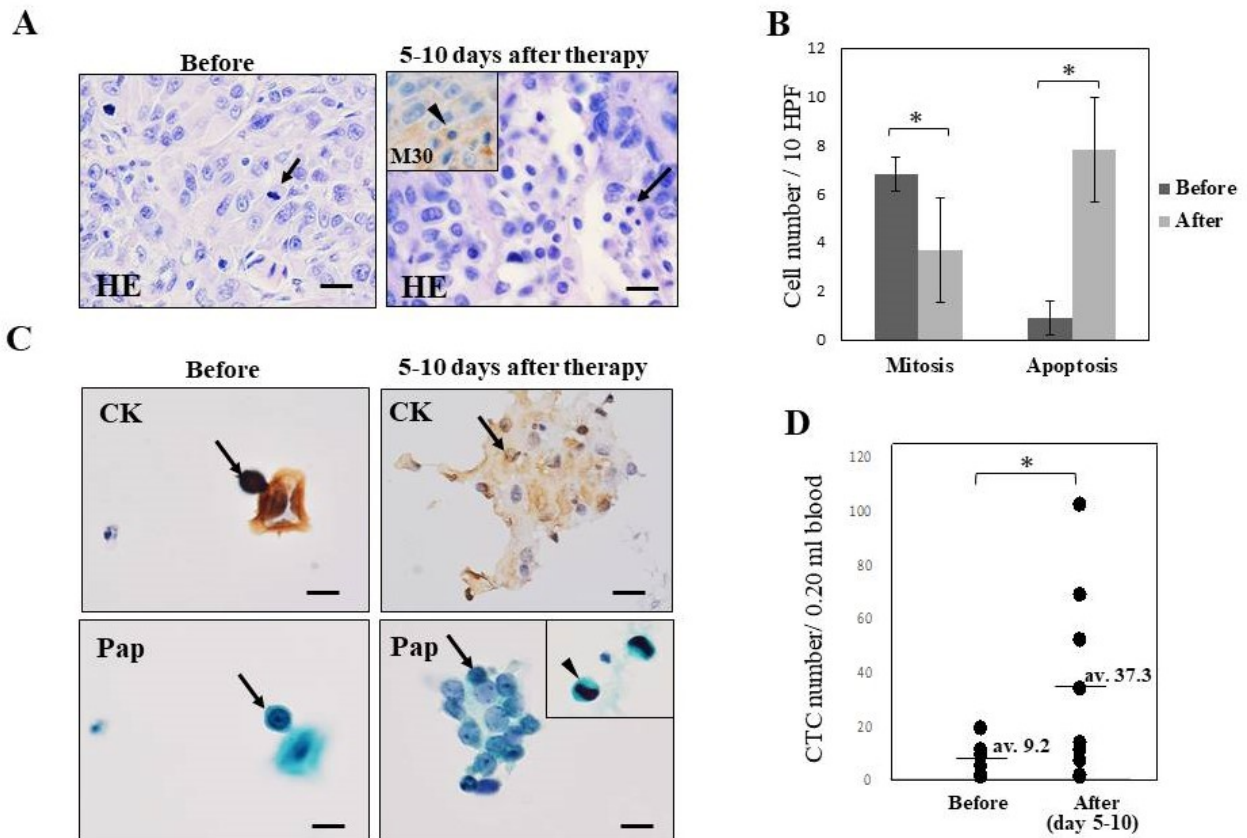


Fig. 2-3 PC-9 担がんマウスにおけるエルロチニブ治療前後の CTC の個数と形態の変化

A. エルロチニブ治療前および治療後 5～10 日の原発皮下腫瘍組織の HE 染色像。有糸分裂腫瘍細胞（左パネル）とアポトーシス腫瘍細胞（右パネル）を矢印で示す。（挿入図）矢頭は M30 で陽性染色されたアポトーシス細胞を示す（スケールバー：20 μ m）。

B. 原発腫瘍組織におけるエルロチニブ治療前後の有糸分裂腫瘍細胞（Mitosis）とアポトーシス腫瘍細胞（Apoptosis）の個数の比較。縦軸は指定細胞（有糸分裂細胞またはアポトーシス細胞）数/ 10 倍率視野（HPF）を示す（ $n = 5$ ）（エラーバー：標準偏差、治療前との比較 *, $p < 0.01$ ）。

C. エルロチニブ治療前および治療後 5～10 日のサイトケラチン（CK）陽性 CTC（上パネル）。エルロチニブ治療前後のパパニコロウ（Pap）染色された CTC（下パネル）。矢印と矢頭は、それぞれ正常 CTC とアポトーシス CTC を示す（挿入図）。

D. PC-9 CTC モデルマウスにおいてエルロチニブ治療前と比較して、治療後 5～10 日では CTC 数の有意な増加が認められた（ $n = 8$ ）（ $p < 0.01$ ）。

4) *In vitro* および *in vivo* マウス胃がんモデルにおける T-DM1 による増殖抑制効果

GLM-1 細胞は、免疫蛍光法による HER2 タンパク質の高発現ならびに FISH 解析による HER2 遺伝子増幅が認められた HER2 陽性胃がん細胞である (Fig. 2-4A)。GLM-1 細胞の増殖は、T-DM1 により濃度依存的に有意に抑制された ($p<0.01$) (Fig. 2-4B)。T-DM1 (10 $\mu\text{g/mL}$) 処理した細胞では多数の小型浮遊細胞が観察された。M30 CytoDEATH 染色によりその多くはアポトーシスを起こした腫瘍細胞であることが確認された (Fig. 2-4B)。GLM-1 による皮下腫瘍担がんマウスにおいて、T-DM1 の腹腔内投与治療群では、溶媒のみを投与したコントロール群と比較して著明な抗腫瘍効果を示した ($p<0.01$) (Fig. 2-4C)。T-DM1 投与治療群では、4 週間の治療完遂後には溶媒を投与したコントロール群と比較してマウス匹数が少ないにも関わらず CTC 数の減少傾向が認められた ($p=0.058$) (Fig. 2-4D)。

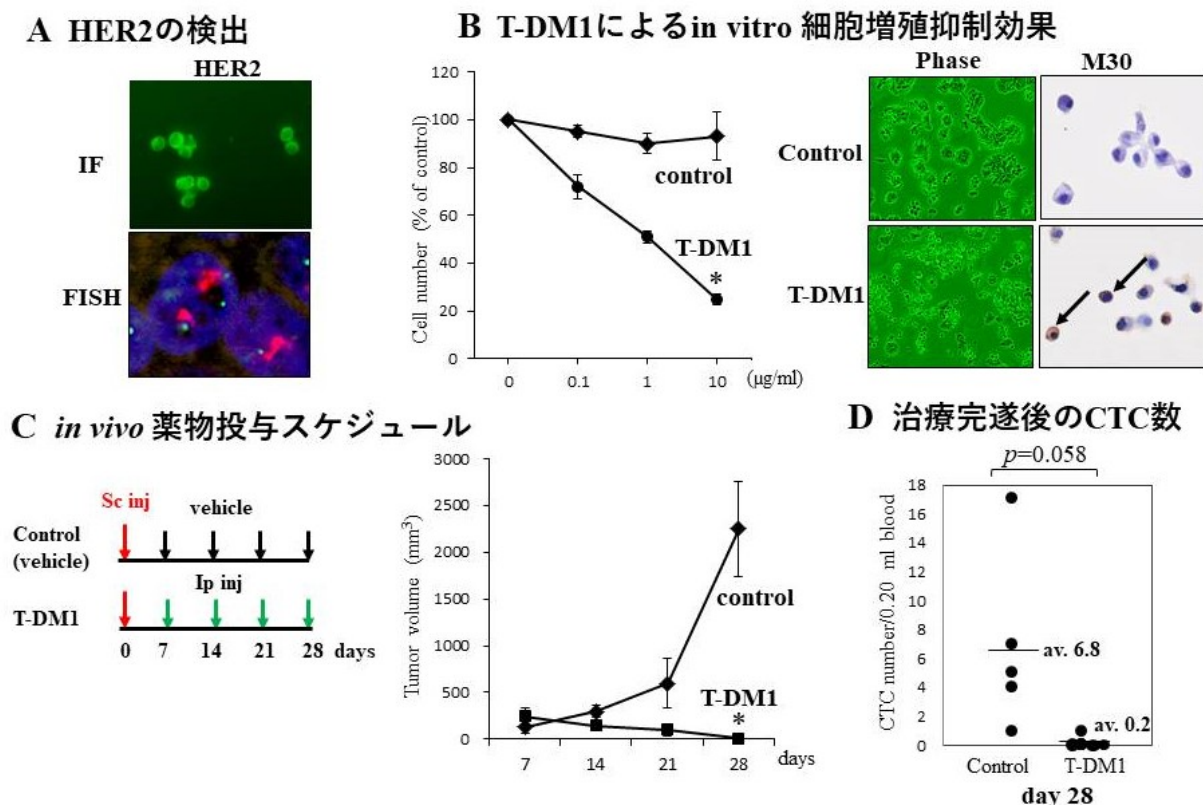


Fig. 2-4 T-DM1 による GLM-1 胃がん細胞の *in vitro* および *in vivo* 増殖抑制効果

A. GLM-1 細胞における HER2 過剰発現および遺伝子増幅は、それぞれ免疫蛍光法 (IF) および FISH 解析によって検出した。

B. 培養した GLM-1 細胞の増殖 (エラーバー: 標準偏差、コントロール (溶媒投与のみ) との比較 *, $p<0.01$) (左パネル) および形態に及ぼす T-DM1 の影響 (右パネル)。位相差顕微鏡 (Phase) と M30 染色を示す。96-well プレートで培養した細胞を T-DM1 (0~10 $\mu\text{g/mL}$) で 3 日間処理した後、細胞数をカウントし M30 染色を行った。矢印は M30 陽性アポトーシス細胞を示す。

C. 担がんマウス ($n=5$) の治療計画を示す。GLM-1 細胞を皮下注射 (sc) 後、マウスモデルへ T-DM1 を腹腔内 (ip) 投与 (40 mg/kg/day 、1 回/週を 4 週間) した (左パネル)。マウスの皮下腫瘍増殖に対する T-DM1 の抗腫瘍効果 (エラーバー: 標準偏差、コントロール (溶媒投与のみ) との比較 *, $p<0.01$)。

D. GLM-1 担がんマウス ($n=5$) において、T-DM1 による治療完遂後では、未治療群と比較し治療群では CTC 数の減少傾向を認めた (境界有意 ($p=0.058$))。

5) マウス胃がんモデルにおける T-DM1 治療前後での CTC の変化

原発皮下腫瘍の組織学的解析では、T-DM1 治療後 5~10 日の組織では治療前と比較しアポトーシスを起こした腫瘍細胞数の増加と分裂期の腫瘍細胞数の減少が確認された ($p<0.01$) (Fig. 2-5A, 2-5B)。GLM-1 マウスモデルにおける T-DM1 治療では、治療前と比較し治療後 5~10 日でのサイトケラチン陽性 CTC 数の増加傾向 (境界有意) が認められた ($p=0.071$)。T-DM1 治療後に検出された増加 CTC には、アポトーシスを起こした CTC と形態学的に異常のない生存 CTC が含まれていた (Fig. 2-5C, 2-5D)。

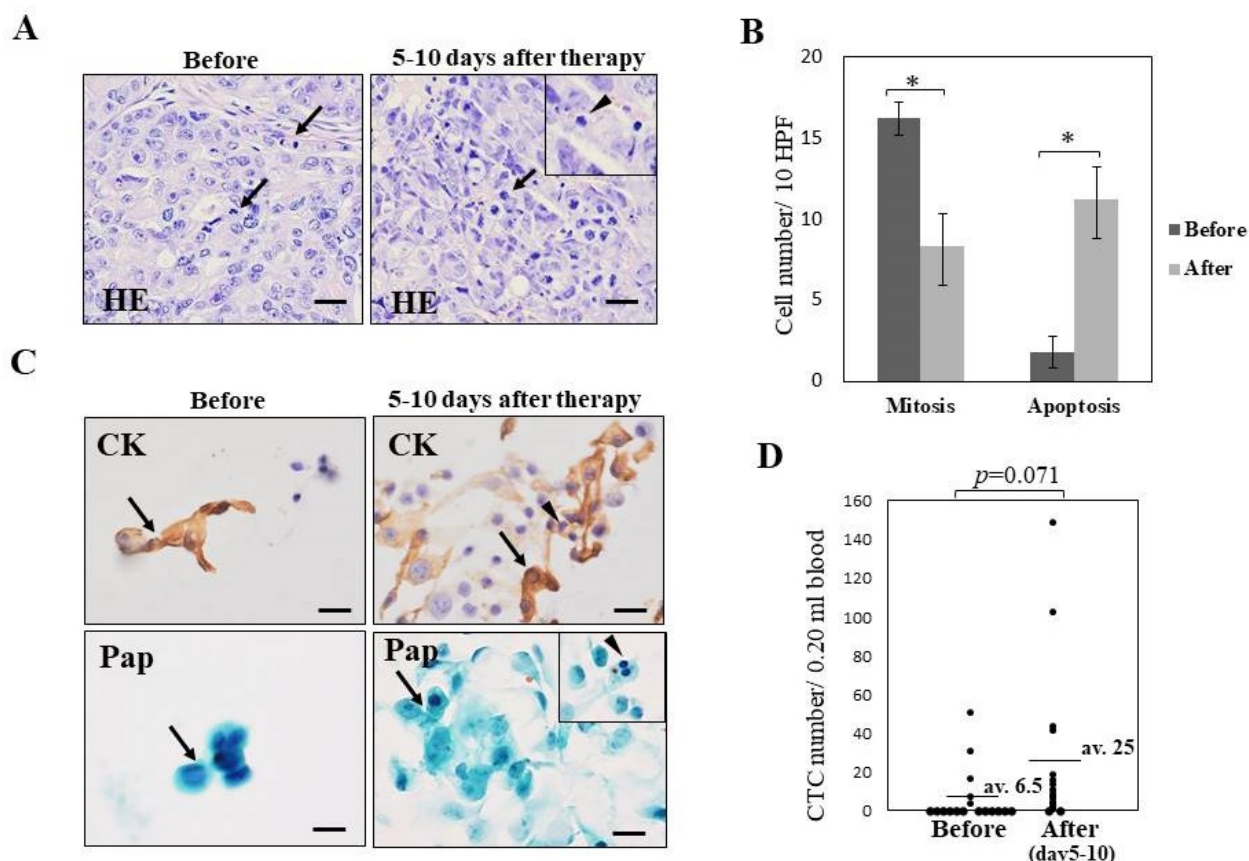


Fig. 2-5 GLM-1 担がんマウスにおける T-DM1 治療前後の CTC の個数と形態の変化

A. T-DM1 治療前および治療後 5~10 日後の HE 染色による原発皮下腫瘍の組織像。有糸分裂腫瘍細胞 (治療前) および M 期停止腫瘍細胞 (T-DM1 治療後) を矢印で示す。 (挿入図) 矢頭は M30 で陽性染色されたアポトーシス細胞を示す (スケールバー: 20 μ m)。

B. 原発腫瘍組織における T-DM1 治療前後の有糸分裂細胞 (Mitosis) とアポトーシス腫瘍細胞 (Apoptosis) の個数の比較。縦軸は指定細胞 (有糸分裂細胞またはアポトーシス細胞) 数/ 10 倍率視野 (HPF) を示す ($n=5$) (エラーバー: 標準偏差、治療前との比較 *, $p<0.01$)。

C. T-DM1 治療前および治療後 5~10 日の血液中より検出されたサイトケラチン (CK) 陽性 CTC (上パネル)。T-DM1 治療前後に Pap 染色された CTC (下パネル)。矢印と矢頭は、それぞれ正常 CTC とアポトーシス CTC を示す。

D. GLM-1 腫瘍担がんマウス ($n=20$) において T-DM1 治療前と比較し、治療後 5~10 日では CTC 数の増加傾向が認められた (境界有意 ($p=0.071$))。

第4節 考察

CTC の薬物治療に伴う体内動態に関しては動物実験レベルでも臨床研究レベルでも詳細な研究は数少ない。従来の研究では、効果的な抗腫瘍療法により腫瘍が顕著に縮小した治療後期の段階では血中の CTC 数が減少することが報告されてきた程度であった^{46, 47)}。しかしながら、近年 Martin らは、臨床のがん患者において放射線治療後早期には原発腫瘍から CTC が動員されることにより逆に一過性に血中 CTC 数が増加することを報告している^{10, 11)}。Adachi らは、乳がんのマウス CTC モデルを用いた 2 つの前臨床試験において、パクリタキセルとドキシソルビシンによる化学療法後早期の CTC の動態を検証し、治療後 5~10 日の早期では、一過性に CTC 数が増加することを報告している⁴⁸⁾。そこで、今回の研究では、肺がんのマウスモデルを用いて、化学療法剤だけでなく、TKI 型の分子標的治療後の早期にも同様に急性期の CTC 動員が起こるか否かを検討した。その結果、マウスにおける EGFR 変異 PC-9 肺がんの異種移植腫瘍において、エルロチニブ治療後早期 (5~10 日) に CTC 数が有意に増加することを明らかにした。また、新規開発した光学顕微鏡で CTC を細胞診として詳細に観察できるデバイスを用いることにより、増加した CTC 群がアポトーシスにより変性した CTC と形態がよく保存され生存可能な CTC の両者から構成されていることを初めて形態学的に明らかにした。さらに、本実験では倫理的、技術的な理由から 3 回以上の採血が困難なため実験できたマウスの個体数 (n=2) は少ないものの、治療後晩期 (2~3 週間) では治療前のレベルまで CTC が減少する傾向にあることも確認している。このことからエルロチニブ治療後早期 (5~10 日) の CTC の増加は一過性の増加であることが示唆される。エルロチニブ治療後早期 (5~10 日) における原発腫瘍の組織学的解析では、原発皮下腫瘍の中には多数のアポトーシスに陥ったがん細胞と生存がん細胞の両者が認められたが、これは、エルロチニブ治療後に増加する CTC がアポトーシス CTC と無傷な生存 CTC の両者からなることと対応している。これらの知見は、分子標的治療の抗腫瘍効果による腫瘍組織の変性壊死のため、CTC が原発腫瘍から血液中へ一時的に動員される可能性を示唆している。筆者の知る限りでは、今回の研究は、肺がんマウスモデルにおける TKI を用いた分子標的治療後早期の CTC 動員に関する初めての前臨床研究報告である。

分子標的治療後早期の CTC 数増加の普遍性を検証するため、さらに、HER2 陽性胃がんマウスモデルを用いて、もう一つの代表的な分子標的薬である抗体薬物複合体 (T-DM1) について CTC の初期変化を検討した。その結果、TKI 治療と同様に T-DM1 に関しても、治療後 5~10 日に CTC の増加傾向が認められた ($p=0.071$)。本新規デバイスを用いて T-DM1 治療後の CTC の細胞形態を詳しく検討したところ、CTC はアポトーシス CTC、細胞分裂サイクルの M 期で停止した CTC および形態的に異常のない生存可能な CTC から構成されることが示された。M 期停止 CTC は、抗体に結合した微小管重合阻害剤であるエムタンシンによる微小管形成阻害のためと考えられた⁶⁶⁾。このような CTC の形態の多様性は、T-DM1 で障害された原発腫瘍組織内で観察される腫瘍細胞群の不均一性をよく反映しているものと思われる。これらの結果は、TKI (エルロチニブ) や抗体薬 (T-DM1) などの分子標的治療でも、それに対する早期反応として CTC 数が増加することを示している。化学療法と同様、分子標的治療においても薬物療法に対する急性期反応として原発腫

瘍組織の破壊により血液中への腫瘍細胞の動員がおきている可能性が強く示唆される⁴⁸⁾。

分子標的治療後早期の CTC 数の増加の精細なメカニズムは明らかになっていない。一つの仮説として、腫瘍細胞の壊死、細胞間相互作用の崩壊や腫瘍血管の破壊の結果、原発腫瘍からアポトーシスに陥った CTC と同時に、生存可能な CTC が受動的に血管内に流入し、血中への CTC 動員が促進されるという機構が考えられる¹¹⁾。もう一つの仮説としては、ゲフィチニブのような EGFR TKI などによって引き起こされる薬剤耐性の一つの結果としての上皮間葉転換（以下 EMT）との関連である⁶⁷⁾。EMT は腫瘍細胞の運動能を促進させることがよく知られており、細胞の運動能の活性化が腫瘍細胞の能動的な血管内浸潤を引き起こす可能性が考えられる。本研究で用いた抗体は、EMT をきたした上皮性腫瘍細胞も認識する広いスペクトラムを持つサイトケラチン抗体であり、検出した CTC が EMT を起こした CTC を含む可能性が高い。実際、EMT の表現型を有する CTC の存在は、分子標的治療を施行された乳がん患者の臨床研究でも報告されている⁶⁸⁾。CTC の動員メカニズムがいずれであるにせよ、分子標的治療後早期における形態のよく保存された生存 CTC の全身血管系への動員は、肺のような遠隔臓器への転移に対する潜在的リスクである可能性が示唆される。この可能性は、放射線治療や抗がん剤治療後の CTC の動員が血行性転移を促進し、患者の予後にも影響するという Martin らの報告とも矛盾しない¹¹⁾。

今回、細胞診に基づく新規半自動 CTC 検出装置のユニークな特徴が本研究における CTC の体内動態に関する新たな知見獲得に貢献した。既存の CTC 検出法のほとんどは、サイトケラチン⁺/E-CAM⁺/CD45⁻/DAPI⁺発現など暗所での免疫多重蛍光法を基準としてきた^{7,8)}。免疫蛍光法のような暗視野でのアプローチの難点は、CTC の正確な形態学的、細胞学的な評価が困難であることである。そのため、抗がん治療によって惹起されたアポトーシス CTC、M 期停止 CTC などの変性した CTC の同定が困難である⁶⁹⁾。今回開発した半自動 CTC 検出装置は Pap 染色と免疫細胞化学を施した CTC スライドガラスの永久標本を用いた光学顕微鏡下での診断が可能のため^{58,59)}、抗がん剤治療により影響を受けた CTC の質的な評価が可能となった。今後は、がん患者の臨床検体を用いて、実地臨床における薬物療法後急性期の CTC の動態や CTC 動員の可能性を検討していく必要があると考える。

第5節 小括

新たに開発した半自動 CTC 検出装置とマウス CTC モデルを用いて、筆者は、TKI と抗体療法という代表的な2種類の分子標的治療に対する急性期の CTC の動態について検討し、分子標的治療後早期に CTC が増加すること、またその CTC の不均一性は治療による原発腫瘍の組織学的な変化を良く反映していることを明らかにした。今回開発した光学顕微鏡により簡便、低コストに CTC 検出を可能とする装置を用いた治療早期からの CTC の経時的なモニタリングは、分子標的治療に対する原発腫瘍の反応性を、早期に簡便・迅速に予測できる有用な治療のモニタリングツールになることが期待される。

総括

本研究では、新規近赤外（NIR）蛍光イメージング法および血液中循環がん細胞（CTC）検出デバイスを開発し、それらの初期がんおよび転移がんの早期診断や治療効果モニタリング等への応用の可能性についてマウスモデルを用いて検討した。

第1章では、我々は、口腔の良性腫瘍に比べ口腔扁平上皮がん（OSCC）において高発現するポドプラニンに着目し、インドシアニングリーン(ICG)標識抗ポドプラニン抗体と設置型および携帯型 ICG 検出装置を用いた新しい NIR 蛍光イメージング法を開発し、ヌードマウスの皮下移植腫瘍の可視化を試みた。設置型 (*In Vivo* Imaging System: IVIS) と携帯型 (Photodynamic eye: PDE) 検出装置を用いた NIR 蛍光イメージング法は、両者ともヌードマウス移植腫瘍を検出することが可能であったが、このうち PDE を用いた NIR 蛍光イメージング法はマウス移植腫瘍をリアルタイムに検出することが可能であった。さらに、PDE を用いた NIR 蛍光イメージング法は既存の組織自家蛍光に基づく携帯型の緑色蛍光イメージング法と比較し、より微小なポドプラニン陽性 OSCC を検出することが可能であった。この結果から、本イメージング法が口腔内悪性腫瘍のスクリーニングや早期診断のための有用な診断ツールとなりうる可能性が示唆された。一方、ICG 標識抗ポドプラニン抗体を使用した本イメージング法の課題としては 20~30%のポドプラニン陰性あるいは弱陽性の OSCC を見落とす可能性があること、またイメージングの前処置として一定のコストがかかる ICG 標識抗体を静脈注射する必要があることなどが挙げられた。一般に光イメージング法は、光の組織透過性が低いため、深部臓器に局在する腫瘍の体外イメージングへの適用が困難なことが大きな難点である。しかし、口腔癌に関しては腫瘍が口腔という表在臓器に局在するため、NIR イメージングシステムの臨床応用においては組織透過性の問題は大きな阻害要因とはならないと考えられる。今後、さらに強力な LED 光源、より高感度かつ小型の ICG 検出カメラおよびリアルタイム疑似カラーイメージ処理装置などの改良により感度と特異性をさらに向上させることにより、将来的には臨床現場における口腔内悪性腫瘍のスクリーニングや早期診断、さらに治療効果のモニタリング等への応用が期待できる。

第2章では、従来の免疫多重蛍光法を用いた暗視野での検出によらずに CTC をスライドグラス標本として光学顕微鏡で簡便、低コストに検出できる新しい半自動 CTC 検出システムを開発し、CTC の転移や再発に対する早期診断マーカーとしての有用性ならびに治療効果モニターとしての有用性、さらにより基礎的に治療前後の CTC の細胞動態を検討した。このために筆者は、EGFR 変異ヒト肺がん細胞株 (PC-9) と HER2 陽性ヒト胃がん細胞株 (GLM-1) を用いて分子標的治療を検証できる新規マウス CTC モデルを独自に開発した。その結果、CTC は肺転移の出現と一致して血液中出现することを見出し、CTC が転移の早期診断に有用である可能性を示唆した。また、チロシンキナーゼ阻害剤であるエルロチニブおよび抗体-チューブリン重合阻害剤複合体であるトラスツズマブエムタンシン (T-DM1) による分子標的治療後の早期 (5~10 日) に CTC 数が一過性に有意に増加することも見出した。興味深いことに、治療後に増加した CTC にはアポトーシスによる変性細胞と形態異常の少ない生存細胞の両者が認められた。この CTC の細胞不均一性

は、治療による原発腫瘍組織の変性・壊死などの治療効果を反映するものと考えられた。このことは原発巣から一過性に動員され増加する CTC は治療効果に依存していることを示しており、本デバイスによる CTC の継続的モニタリングが分子標的治療の効果予測や効果判定の有用な診断ツールになる可能性を示唆している。

今回、簡便で低コストな NIR 蛍光イメージング法と CTC 検出装置を新規に開発した。前者のイメージング法は初期の口腔内悪性腫瘍の簡便なスクリーニングと早期発見に、また後者の CTC 検出装置は転移・再発がんの早期診断と治療効果モニタリングに有用なツールであることを、マウスモデルを用いて明らかにした。今後は、臨床試験としてヒト検体を用いてこれらのデバイスの検証、評価を行い、初期がんや転移がんの早期発見のためのツールとして臨床応用を目指していきたい。

謝辞

本研究の機会を与えていただきました名城大学大学院薬学研究科教授 金田典雄先生に心より感謝致します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました愛知県がんセンター中央病院遺伝子病理診断部 中西速夫先生に深く感謝の意を表します。副査として本論文の作成にあたりご指導を賜りました名城大学大学院薬学研究科教授 山田修平先生（病態生化学研究室）ならびに同 湯川和典先生（生理学研究室）に心より厚く御礼申し上げます。

また、研究上数々の御助言と御奨励を賜りました愛知県がんセンター研究所 吉村真弓氏ならびに、多忙な業務の中、本研究遂行の機会を与えていただきました中部労災病院薬剤部長 伊藤功治先生および同前薬剤部長 河井良智先生に厚く御礼申し上げます。

最後に、多忙な中、ご支援・ご協力いただきました名城大学薬学部 生体機能分析学研究室の皆様、中部労災病院薬剤部の皆様に感謝いたします。

参考文献

1. **Hori M, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H ; Japan Cancer Surveillance Research Group:** Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project *Jpn J Clin Oncol*, **45(9)**, 884-891 (2015)
2. **Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H:** New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice *Gastric Cancer*, **17(3)**, 497-507 (2014)
3. **Barrett T, Koyama Y, Hama Y, Ravizzini G, Shin IS, Jang BS, Paik CH, Urano Y, Choyke PL, Kobayashi H:** In vivo diagnosis of epidermal growth factor receptor expression using molecular imaging with a cocktail of optically labeled monoclonal antibodies *Clin Cancer Res*, **13**, 6639-6648 (2007)
4. **Kitada M, Ohsaki Y, Matsuda Y, Hayashi S, Ishibashi K:** Photodynamic diagnosis of pleural malignant lesions with a combination of 5-aminolevulinic acid and intrinsic fluorescence observation systems *BMC Cancer*, **15(1)**, 174 (2015)
5. **Noura S, Ohue M, Seki Y, Tanaka K, Motoori M, Kishi K, Miyashiro I, Ohigashi H, Yano M, Ishikawa O, Miyamoto Y:** Feasibility of a lateral regionsentinelnode biopsy of lower rectal cancer guided by indocyanine green using a near-infrared camera system *Ann Surg Oncol*, **17(1)**, 144-151 (2010)
6. **Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N:** Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging *Cancer*, **115(11)**, 2491-2504 (2009)
7. **Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, MillerMC, 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*, **351**, 781-791 (2004)
8. **Riethdorf S, O'Flaherty L, Hille C, Pantel K:** Clinicalapplications of the CellSearch platform in cancer patients *AdvDrug Deliv Rev*, **125**, 102-121 (2018)
9. **Tan Y, Wu H:** The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and metaanalysis *Curr Probl Cancer*, **42(1)**, 95-106 (2018)
10. **Martin OA, Anderson RL, Russell PA, Cox RA, Ivashkevich A, Swierczak A, Doherty JP, Jacobs DH, Smith J, Siva S, Daly PE, Ball DL, Martin RF, MacManus MP:** Mobilization of viable tumor cells into the circulation during radiation therapy *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **8(2)**, 95-403 (2014)
11. **Martin OA, Anderson RL, Narayan K, MacManus MP:** Does the mobilization of circulating tumour cells during cancer therapy cause metastasis? *Nat Rev Clin Oncol*, **14(1)**, 2-44 (2017)
12. **Hardingham JE, Grover P, Winter M, Hewett PJ, Price TJ, Thierry B:** Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer-20 years of progress *Mol*

Med, **21**, S25-31 (2015)

13. **Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF:** Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer *Clin Cancer Res*, **12**(21), 6403-6409 (2006)
14. **Mostert B, Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, van Galen A, Peeters DJ, Dirix LY, Seynaeve CM, Jager A, de Jongh FE, Hamberg P, Stouthard JM, Kehler DF, Look MP, Smid M, Gratama JW, Foekens JA, Martens JW, Sleijfer S:** Gene expression profiles in circulating tumor cells to predict prognosis in metastatic breast cancer patients *Ann Oncol*, **26**(3), 510-516 (2015)
15. **Ong TK, Murphy C, Smith AB, Kanatas AN, Mitchell DA:** Survival after surgery for oral cancer : a 30-year experience *Br J Oral Maxillofac Surg*, **55**(9), 911-916 (2017)
16. **Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK:** Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival *Lancet Oncol*, **11**(1), 21-28 (2010)
17. **Naik PP, Das DN, Panda PK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Praharaj PP, Agarwal R, Bhutia SK:** Implications of cancer stem cells in developing therapeutic resistance in oral cancer *Oral Oncol*, **62**, 122-135 (2016)
18. **Kossatz S, Weber W, Reiner T:** Detection and delineation of oral cancer with a PARP1-targeted optical imaging agent *Mol Imaging*, **16**, 1536012117723786. (2017)
19. **Rashid A, Warnakulasuriya S:** The use of light-based (optical) detection systems as adjuncts in the detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: a systematic review *J Oral Pathol Med*, **44**(5), 307-328 (2003)
20. **Bhatia N, Matias MA, Farah CS:** Assessment of a decision making protocol to improve the efficacy of VELscope™ in general dental practice: a prospective evaluation *Oral Oncol*, **50**(10), 1012-1019 (2014)
21. **Warnasukaluriya S:** Diagnostic adjuncts on oral cancer and precancer: an update for practitioners. *Br Dent J*, **223**(9), 663-666 (2017)
22. **Day KE, Sweeny L, Kulbersh B, Zinn KR, Rosenthal EL:** Preclinical comparison of near-infrared-labeled cetuximab and panitumumab for optical imaging of head and neck squamous cell carcinoma *Mol Imaging Biol*, **15**(6), 722-729 (2013)
23. **Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D:** Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis *Am J Pathol*, **51**(14), 1141-1152 (1997)
24. **Kato Y, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M, Tsuruo T:** Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors *J Biol Chem*, **278**(51), 51599-51605 (2003)
25. **Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, Hess PR, Sen A, McDaniel JM, Pan Y, Sheng M, Yago T, Silasi-Mansat R, McGee S, May F, Nieswandt B, Morris AJ, Lupu F, Coughlin SR, McEver**

- RP, Chen H, Kahn ML, Xia L: Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2 *Nature*, **502(7469)**, 105-109 (2013)
26. Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A: Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung *Cancer Sci*, **100(11)**, 2054-2059 (2009)
 27. Kahn HJ, Bailey D, Marks A: Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas *Mod Pathol*, **15(4)**, 434-440 (2002)
 28. Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T: Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors *Oncogene*, **23(52)**, 8552-8556 (2004)
 29. Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M: Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression *Acta Neuropathol*, **111(5)**, 483-488 (2006)
 30. Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L: Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome *Cancer*, **107(3)**, 563-569 (2006)
 31. Wicki A, Christofori G: The potential role of podoplanin in tumour invasion *Br J Cancer*, **96(1)**, 1-5 (2007)
 32. Huber GF, Fritzsche FR, Züllig L, Storz M, Graf N, Haerle SK, Jochum W, Stoeckli SJ, Moch H: Podoplanin expression correlates with sentinel lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx *Int J Cancer*, **129(6)**, 1404-1409 (2011)
 33. Ohta M, Abe A, Ohno F, Hasegawa Y, Tanaka H, Maseki S, Kondo E, Kurita K, Nakanishi H: Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF- β and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines *Oral Oncol*, **49(1)**, 20-26 (2013)
 34. Toyoshima M, Nakajima M, Yamori T, Tsuruo T: Purification and characterization of the platelet aggregating sialoglycoprotein gp44 expressed by highly metastatic variant cells of mouse colon adenocarcinoma 26 *Cancer Res*, **55(4)**, 767-773 (1995)
 35. Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A: Podoplanin, a novel marker of tumor initiating cells in human squamous cell carcinoma A431 *Biochem Biophys Res Commun*, **373(1)**, 36-41 (2008)
 36. Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y: A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplaninantibody *J Immunol*, **190(12)**, 6239-6249 (2013)
 37. Chandramohan V, Bao X, Kato Kaneko M, Kato Y, Keir ST, Szafranski SE, Kuan CT, Pastan IH, Bigner DD: Recombinant anti-podoplanin (NZ-1) immunotoxin for the

treatment of malignant brain tumors *Int J Cancer*, **132**(10), 2339-2348 (2013)

38. **Kaneko MK1, Kunita A, Abe S, Tsujimoto Y, Fukayama M, Goto K, Sawa Y, Nishioka Y, Kato Y:** Chimeric anti-podoplanin antibody suppresses tumor metastasis through neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity *Cancer Sci*, **103**(11), 1913-1919 (2012)
39. **Rodrigo JP, Garcí'a-Carracedo D, González MD, Mancebo G, Fresno MF, Garcí'a-Pedrero J:** Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas *Mol Cancer*, **9**, 48 (2010)
40. **Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, Feng L, Lee JJ, Kim E, Hong WK, Lippman SM, Mao L:** Podoplanin: anovel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy *J Clin Oncol*, **26**(3), 354-360 (2008)
41. **Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham DA, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA: Committee of the National Cancer Research Institute:** Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research *Br J Cancer*, **102** (11), 1555-1577 (2010)
42. **Kato Y, Kaneko MK:** A cancer-specific monoclonal antibody recognizes the aberrantly glycosylated podoplanin *Sci Rep*, **4**, 5924 (2014)
43. **de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, Garcí'a-Pedrero JM:** Podoplanin expressionin oral leukoplakia: tumorigenic role *Oral Oncol*, **49**(6), 598-603 (2013)
44. **Feng JQ, Mi JG, Wu L, Ma LW, Shi LJ, Yang X, Liu W, Zhang CP, Zhou ZT:** Expression of podoplanin and ABCG2 in oral erythroplakia correlate with oral cancer development *Oral Oncol*, **48**(9), 848-852 (2012)
45. **Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS:** Tumor cells and circulating tumor DNA: challenges and opportunities on the path to clinical utility *Clin Cancer Res*, **21**(21), 4786-4800 (2015)
46. **Hall C, Karhade M, Laubacher B, Anderson A, Kuerer H, DeSynder S, Lucci A:** Circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy in Stage I-III triple-negative breast cancer *Ann Surg Oncol*, **22**, S552-558 (2015)
47. **Peeters DJ, Van Dam PJ, Van den Eynden GG, Rutten A, WuytsH, Pouillon L, Peeters M, Pauwels P, Van Laere SJ, van Dam PA, Vermeulen PB, Dirix LY:** Detection and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer according to immunohistochemical subtypes *Br J Cancer*, **110**(2), 375-383 (2014)
48. **Adachi Y, Yoshimura M, Nishida K, Usuki H, Shibata K, Hattori M, Kondo N, Yatabe Y, Iwata H, Kikumori T, Kodera Y, Nakanishi H:** Acute phase dynamics of circulating tumor cells after paclitaxel and doxorubicin chemotherapy in breast cancer mouse models *Breast Cancer Res Treat*, **167**, 439-445 (2018)
49. **Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M:** EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy

Science, **304**(5676), 14197-1500 (2004)

50. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M, West Japan Oncology Group: Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small cell lung cancer harbouring mutations of the EGFR (WJTOG3405): an open label, randomized phase 3 trial *Lancet Oncol*, **11**(2), 121-128 (2010)
51. Park K, Bennouna J, Boyer M, Hida T, Hirsh V, Kato T, Lu S, Mok T, Nakagawa K, O'Byrne K, Paz-Ares L, Schuler M, Sibilot DM, Tan EH, Tanaka H, Wu YL, Yang JC, Zhang L, Zhou C, Märten A, Tang W, Yamamoto N: Sequencing therapy following first-line afatinib in patients with EGFR mutationpositive non-small cell lung cancer *Lung Cancer*, **132**, 126-131 (2019)
52. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, Olsen S, Blackwell K, EMILIA Study Group: Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer *N Engl J Med*, **369**(19), 1783-1791 (2012)
53. Thuss-Patience PC, Shah MA, Ohtsu A, Van Cutsem E, Ajani JA, Castro H, Mansoor W, Chung HC, Bodoky G, Shitara K, Phillips GDL, van der Horst T, Harle-Yge ML, Althaus BL, Kang YK: Trastuzumab emtansine versus taxane use for previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric or gastrooesophageal junction adenocarcinoma (GATSBY): an international randomised, open-label, adaptive, phase 2/3 study *Lancet Oncol*, **18**(5), 640-653 (2017)
54. Torphy RJ, Tignanelli CJ, Kamande JW, Moffitt RA, Herrera Loeza SG, Soper SA, Yeh JJ: Circulating tumor cells as a biomarker of response to treatment in patient-derived xenograft mouse models of pancreatic adenocarcinoma *PLoS One*, **9**(2), e89474 (2014)
55. Rossi E, Fassan M, Aieta M, Zilio F, Celadin R, Borin M, Grassi A, Troiani L, Basso U, Barile C, Sava T, Lanza C, Miatello L, Jirillo A, Rugge M, Indraccolo S, Cristofanilli M, Amadori A, Zamarchi R: Dynamic changes of live/apoptotic circulating tumour cells as predictive marker of response to sunitinib in metastatic renal cancer *Br J Cancer*, **107**(8), 1286-1294 (2012)
56. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, Grisanti S, Generali D, Garcia-Saenz JA, Stebbing J, Caldas C, Gazzaniga P, Manso L, Zamarchi R, de Lascoiti AF, De Mattos-Arruda L, Ignatiadis M, Lebofsky R, van Laere SJ, Meier-Stiegen F, Sandri MT, Vidal-Martinez J, Politaki E, Consoli F, Bottini A, Diaz-Rubio E, Krell J, Dawson SJ, Raimondi C, Rutten A, Janni W, Munzone E, Carañana V, Agelaki S, Almici C, Dirix L, Solomayer EF, Zorzino L, Johannes H, Reis-Filho JS, Pantel K, Pierga JY, Michiels S: Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data *Lancet Oncol*, **15**(4), 406-414 (2014)
57. Yusa A, Toneri M, Masuda T, Ito S, Yamamoto S, Okochi M, Kondo N, Iwata H, Yatabe Y, Ichinosawa Y, Kinuta S, Kondo E, Honda H, Arai F, Nakanishi H: Development of a new

- rapid isolation device for circulating tumor cells (CTCs) using 3D palladium filter and its application for genetic analysis *PLoS One*, **9**(2), e88821 (2014)
58. **Dejima H, Nakanishi H, Kuroda H, Yoshimura M, Sakakura N, Ueda N, Ohta Y, Tanaka R, Mori S, Yoshida T, Hida T, Sawabata N, Yatabe Y, Sakao Y:** Detection of abundant megakaryocytes in pulmonary artery blood in lung cancer patients using a microfluidic platform *Lung Cancer*, **125**, 128-135 (2018)
 59. **Tsutsuyama M, Nakanishi H, Yoshimura M, Oshiro T, Kinoshita T, Komori K, Shimizu Y, Ichinosawa Y, Kinuta S, Wajima K, Sakakibara Y, Yatabe Y, Ito S, Kodera Y:** Detection of circulating tumor cells in drainage venous blood from colorectal cancer patients using a new filtration and cytology-based automated platform *PLoS One*, **14**(2), e0212221 (2019)
 60. **Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H:** Lapatinib sensitivity of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines *Gastric cancer*, **17**(3), 450-462 (2014)
 61. **Rossi E, Basso U, Celadin R, Zilio F, Pucciarelli S, Aieta M, Barile C, Sava T, Bonciarelli G, Tumolo S, Ghiotto C, Magro C, Jirillo A, Indraccolo S, Amadori A, Zamarchi R:** M30 neoepitope expression in epithelial cancer: quantification of apoptosis in circulating tumor cells by CellSearch analysis *Clin Cancer Res*, **16**(21), 5233-5243 (2010)
 62. **Yatabe Y, Hida T, Horio Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T:** A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer *J Mol Diagnostics*, **8**(3), 335-341 (2006)
 63. **Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham DA, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA, Committee of the National Cancer Research Institute:** Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research *Br J Cancer*, **102**(11), 1555-1577 (2010)
 64. **Hoff J:** Methods of blood collection in the mouse *Lab Anim*, **29**(10), 47-53 (2000)
 65. **Morton D, Abbot D, Barclay R, Ewbank R, Gask D, Heath M, Mattic S, Poole T, Seamer J, Southee J, Thompson A, Trussell B, West C, Jennings M:** Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/ UFAW Joint Working Group on Refinement *Lab Anim*, **27**(1), 1-22 (1993)
 66. **Cassady JM, Chan KK, Floss HG, Leistner E:** Recent development in the maytansinoid antitumor agents *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **52**(1), 1-26 (2004)
 67. **Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E, Nakanishi H:** Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 β /snail signalling pathway *Br J Cancer*, **106**(6), 1196-1204 (2012)
 68. **Polioudaki H, Agelaki S, Chiotaki R, Politaki E, Mavroudis D, Matikas A, Georgoulas V, Theodoropoulos PA:** Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer *BMC Cancer*, **15**, 399 (2015)

69. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P: Isolation by the size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells *Am J Pathol*, **156**, 57-63 (2000)