

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005 年～2008 年
 課題番号：17591381
 研究課題名（和文） 血中微小癌細胞の再発因子としての有用性の検証：食道癌における多施設前向き臨床研究
 研究課題名（英文） Circulating cancer cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma: A multicenter clinical trial
 研究代表者 神田 達夫（KANDA TATSUO）
 新潟大学・医歯学系・講師
 研究者番号：80303147

研究成果の概要：2006 年 7 月から新潟県内 4 医療施設において切除可能胸部食道扁平上皮癌患者を対象に臨床試験が開始された。血中微小癌細胞の同定は PCR 法による癌特異蛋白(CEA, SCC) mRNA の検出によった。2007 年 8 月までに 20 名の患者の分析が行われたが、有意な癌特異蛋白 mRNA が検出された患者はおらず、試験は途中中止となった。PCR 法による血中微小癌細胞分析を臨床検査として一般化するには、いまだ課題が多い。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	1,600,000	0	1,600,000
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,600,000	270,000	3,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：血中癌細胞、PCR、食道癌、再発、臨床試験

1. 研究開始当初の背景

Polymerase chain reaction (PCR) を始めとする分子生物学的手法の普及により、癌患者の循環血液中に癌細胞が検出されることが知られていた。これらの微小癌細胞は遠隔転移をもつ高度進行癌の患者のみならず切除可能な段階の患者にも一定頻度で認められることも明らかになりつつあった。このような血中微小癌細胞が検出される患者では癌再発のリスクが高いとする報告も散見されるようになっていた。その一方、このような分子レベルでの癌細胞同定の信頼性は確

立しておらず、再発予測因子として臨床で使い得るものであるかどうかは全く未確定であった。

2. 研究の目的

PCR 法に基づく血中微小癌細胞分析が、切除可能胸部食道癌患者の再発予測に役立つ臨床検査法であるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 研究デザイン

多施設共同前向き臨床試験。本研究は2005年9月に新潟大学医学部倫理委員会の承認を得た(承認番号378)。

2) 参加施設

新潟大学医歯学総合病院第一外科、新潟県厚生連長岡中央総合病院外科、新潟県立がんセンター新潟病院外科、新潟市民病院外科の4施設。

3) 患者と方法

癌の既往をもたない75歳未満の胸部食道癌患者で臨床的に根治切除が可能と診断されたものを適格とした。患者より試験参加の同意を得た後に、連結可能匿名化を行い、研究事務局に患者を登録した。予定症例数は120名とした。

登録患者から、手術前に末梢動脈血10~15mLを採血し、EDTA入り専用試験管に封入し、4℃に保管した。この血液検体は採血当日に回収され、分析センター(株式会社ビー・エム・エル)に送付され、同センターで血中微小癌細胞分析が行われた。

4) 微小癌細胞分析

血中微小癌細胞の同定は癌特異蛋白であるSCCとCEAのmRNAの検出による。患者血液から専用試薬を用いて直接、total RNAを抽出(QIAampRNA Blood Mini Procedure)得られたtotal RNAを鋳型にSCC、CEA-mRNAの特異プローブを用いて定量的PCRを施行した(ABI PRISM 7900)。

SCC、CEA-mRNAの測定に使用した特異プローブおよびプライマーを表1に示す。

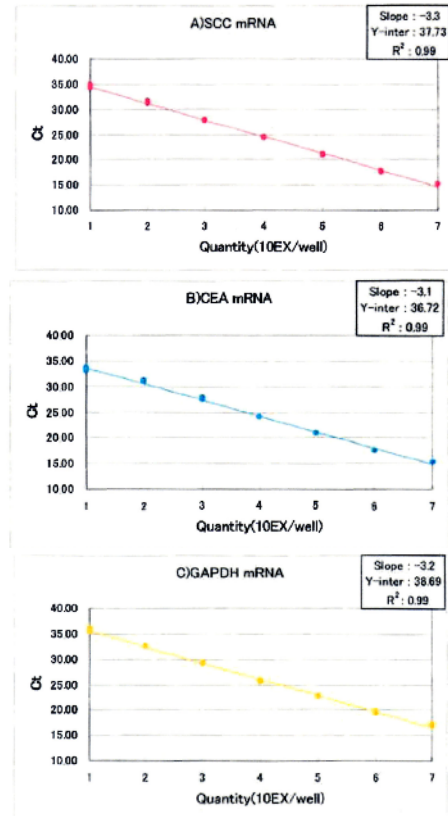
表1 リアルタイムPCR定量系のTaqManプローブ、プライマー配列

A) SCC mRNA	
TaqMan Probe	: FAM-CAGAAGCTTGAAGAGAACTCACTGCTGA-TAMRA (29mer)
F primer	: CTGCCAAATGAAATCGATGGT (21mer)
R primer	: TGCAAACCTTGCCATTCATCA (22mer)
Product size	: 80bp
B) CEA mRNA	
TaqMan Probe	: FAM-CGACGATCAGTCTATGCAGAGCCAC-TAMRA (27mer)
F primer	: GTGCCAAGCCATAACTCAGA (21mer)
R primer	: TTGGAGTTGCTGCTGATGA (22mer)
Product size	: 105bp

定量的PCRの反応条件は50℃を2分、95℃を10分行った後、95℃で15秒、60℃で1分の反応を40サイクルとした。

各遺伝子組み込みプラスミドを標準とし、プラスミド混合液を材料としたPCRでは、各遺伝子に特異的かつ定量的な測定が行い得た(図1)。

図1 DNA Standard による定量性の確認



健康人血液を対照としてSCCないしはSCCの有意な増幅が認められたものを微小癌細胞陽性と判定した。血液中のRNAの精度確認と定量基準はGAPDHに対するPCRで行った。

陽性コントロールとして分析したヒト胃癌細胞株(KATO)、ヒト扁平上皮癌細胞株(EBC-1)およびヒト食道扁平上皮癌組織(外科切除検体)の抽出液を用いた定量的PCRでは上記腫瘍マーカーは良好に増幅された(表2)。

表2 陽性コントロールの測定

サンプル	SCC mRNA	CEA mRNA	GAPDH mRNA
KATO III細胞	2.7E+1	2.1E+6	3.5E+7
	3.7E+1	2.1E+6	3.4E+7
EBC-1細胞	3.6E+1	1.8E+3	2.7E+7
	4.5E+1	2.2E+3	2.6E+7
施設A食道癌組織	1.5E+6	3.6E+4	1.5E+7
	1.4E+6	3.3E+4	1.5E+7
施設B食道癌組織	5.1E+7	8.1E+3	1.2E+2
	5.0E+7	9.4E+3	1.3E+2

4. 研究成果

1) 臨床試験成績

2007年8月までに20名の胸部食道扁平上皮癌患者が登録された。全20名の内訳は男性18名女性2名。登録時の平均年齢は64.2歳(44歳~78歳)であった。登録時の臨床的腫瘍壁深達度は、T1が11名、T2が4名、

T3 が 5 名であった。臨床的リンパ節転移は、N0 が 14 名、N1 が 6 名であった。患者の臨床背景を表 3 に示す。

全 20 名の癌患者の血液分析で、有意な CEA- ないし SCC-mRNA の増幅が認められた患者はいなかった。GAPDH を標的とした PCR では、いずれの患者血液から抽出された RNA も良好な増幅を示した (表 4)。

この結果を受け、本試験は 2007 年 8 月 24 日をもって途中終了となった。

表3 登録症例の臨床背景(臨床ステージ)

患者	年齢/性	腫瘍	リンパ節	遠隔転移	ステージ
1.	64/M	T3	N1	M0	III
2.	44/M	T1	N0	M0	I
3.	68/M	T2	N0	M0	IIA
4.	66/M	T2	N1	M0	IIB
5.	57/M	T1	N0	M0	I
6.	70/M	T1	N0	M0	I
7.	78/M	T1	N0	M0	I
8.	77/M	T2	N0	M0	IIA
9.	72/M	T3	N1	M0	III
10.	74/M	T1	N0	M0	I
11.	67/M	T3	N0	M0	III
12.	66/M	T1	N0	M0	I
13.	61/F	T3	N0	M0	IIA
14.	65/M	T2	N0	M0	IIA
15.	50/M	T1	N0	M0	I
16.	70/M	T1	N1	M0	IIB
17.	68/M	T1	N0	M0	I
18.	52/F	T1	N1	M0	IIB
19.	60/M	T3	N0	M0	IIA
20.	54/M	T1	N0	M0	I

表4 登録症例の測定結果

患者	SCC mRNA	CEA mRNA	GAPDH mRNA
1.	n.s.	n.s.	2.7E+6
2.	n.s.	n.s.	3.4E+6
3.	n.s.	n.s.	4.0E+6
4.	n.s.	n.s.	1.3E+6
5.	n.s.	n.s.	2.4E+6
6.	n.s.	n.s.	9.1E+6
7.	n.s.	n.s.	1.9E+4
8.	n.s.	n.s.	8.7E+6
9.	n.s.	n.s.	4.8E+6
10.	n.s.	n.s.	3.6E+6
11.	n.s.	n.s.	3.9E+6
12.	n.s.	n.s.	2.9E+6
13.	n.s.	n.s.	4.2E+6
14.	n.s.	n.s.	2.7E+6
15.	n.s.	n.s.	3.7E+6
16.	n.s.	n.s.	3.6E+6
17.	n.s.	n.s.	8.4E+6
18.	n.s.	n.s.	7.5E+6
19.	n.s.	n.s.	3.0E+6
20.	n.s.	n.s.	2.5E+6

n.s., no signal

2) 考察

20 名の分析を終えた時点で 1 名の陽性患者も得られなかったことから、本臨床試験は途中終了となった。食道癌患者の外科切除後再発率は 70%程度と報告されている。それに基づけば、本試験の患者群は T1 症例が約半数含んでいるものの、数名の陽性患者がいてしかるべきと思われる。また、本試験と別個に行った切除不能・再発食道癌患者 5 名の分析でも、PCR 上、陽性を示した患者は得られなかった。一方、腫瘍組織を用いた PCR では再現性をもって良好な増幅曲線が得られており、CEA および SCC を標的にした定量的 PCR そのものには問題がないものと思われた。

このような結果からは、本試験で陽性患者が得られなかった最大の要因は、患者血液の採取、保存、運搬、RNA 抽出の過程のいずれかに問題があったものと推察された。ただ、本試験で使用された採血管および抽出法は胃癌患者を対象とした臨床研究に採用されているものと同じであり、分析元からは、胃癌試験では約半数の患者で陽性を得ているとの報告を受けている。

本臨床試験では、採血から RNA 抽出に至る過程で何らかの技術的障害があったものと思われるが、本研究期間中には、その原因を同定することはできなかった。

3) 結論

PCR 法による血中微小癌細胞分析を、食道扁平上皮癌患者における臨床検査として一般化するには、検体の品質管理を中心に、いまだ多くの課題が残る。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神田 達夫 (KANDA TATSUO)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：80303147

(2)研究分担者

小杉 伸一 (KOSUGI SHIN-ICHI)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：90401736

小山 諭 (KOYAMA YU)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：10323966

(3)連携研究者

河内 保之 (KAWACHI YASUYUKI)
厚生連長岡中央総合病院・外科・部長
研究者番号：なし

藪崎 裕 (YABUSAKI HIROSHI)
県立がんセンター新潟病院・外科・部長
研究者番号：なし

片柳 憲雄 (KATAYANAGI NORIO)
新潟市民病院・外科・部長
研究者番号：なし

大橋 学 (OHASHI MANABU)
都立駒込病院・外科・部長
研究者番号：なし

山口 敏和 (TAMAGUCHI TOSHIKAZU)
株式会社ビー・エム・エル・先端技術開発
本部臨床ゲノム開発部・チーフ
研究者番号：なし