

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：21601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K10598
研究課題名(和文) 血液・組織検体のEMTモニタリングによるStage Ⅱ・Ⅲ 食道癌個別化医療の試み

研究課題名(英文) Liquid biopsy for esophageal cancer

研究代表者
藤田 正太郎 (Fujita, Shotaro)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20769640
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は主として臨床ステージⅡおよびⅢの食道癌症例に対し、Liquid biopsyを用いたバイオマーカーの確立を目指し、術前化学療法の感受性や臨床転帰との関連を検討するものである。本研究は血中循環腫瘍細胞(CTC)を対象としており、特に上皮型CTC、間葉型CTCを定量的に検出し得る比較的新規のプラットフォームを用いている。当報告時点で、31例の食道癌患者から血液サンプルを採取し、CTC解析を施行した。現在、CTCの数および間葉・上皮型との関連について、臨床病理学的因子、化学療法の臨床的効果・組織学的効果、手術後の腫瘍学的予後などに着目し検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が検出する間葉型または上皮型のCTC定量を用いたLiquid biopsyと、術前化学療法効果、臨床転帰との関連を検討することは、これまでのCTC研究から1段階進んだ独自性の高い研究である。手法が確立すればバイオマーカーとして臨床応用への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to develop liquid biopsy-based biomarkers that can be predictive of the efficacy of pre-operative treatment and of therapeutic outcomes for clinical stage II and III patients with esophageal cancer who treated by pre-operative chemotherapy followed by curative surgery. As of May 2020, we collected blood samples from 31 esophageal cancer patients before and after chemotherapy and circulating tumor cells (CTC) were examined based on a platform that can quantitatively detect not only epithelial type CTC but also mesenchymal type CTC. We are currently conducting sample/clinical data collection and statistical analysis to determine whether the types and counts of CTCs are associated with pre-therapeutic/post-therapeutic clinical factors, clinical/pathological treatment response, and survival outcomes.

研究分野：消化管癌

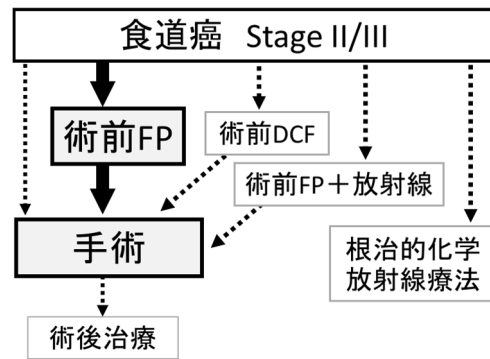
キーワード：食道癌 Liquid biopsy Circulating tumor cells

1. 研究開始当初の背景

本邦における食道癌の疫学と治療の現状

本邦のがん統計によると、食道癌は年間 21965 人が罹患(2012 年)し、11576 人が死亡(2014 年)している。食道癌の 5 年相対生存率は男性 36.0%、女性 43.9%と低く、予後の悪いがんと言える(全部位では男性 59.1%、女性 66.0%)。治療の基本は手術であるが、化学療法、放射線療法、(今後は免疫療法)もそれぞれ重要な治療の柱である。Stage I 症例に対する標準治療は手術であり、局所進行切除不能症例や遠隔転移を伴う Stage IV 症例には化学療法・放射線療法による集学的治療が必要となる。

JCOG9907 試験により、術前 FP 療法(シスプラチン: CDDP+フルオロウラシル: 5FU)が全生存期間を有意に改善する(5 生率: 60%)ことが示され、本邦においては切除可能な Stage II/III 食道癌に対し、2 コースの術前 FP+根治手術が標準治療として位置付けられている。さらにこれら症例を対象として、術前 FP 療法にドセタキセルを追加した術前 DCF 療法、放射線を併用した術前化学放射線療法を比較する 3 アームのランダム化 Phase3 試験が現在進行中である(JCOG1109)。一方で、食道癌手術は極めて侵襲が大きいことも事実であり、耐術能のない患者や手術拒否例に対し、根治的化学放射線療法も選択肢のひとつと言える。治療のシエマを図に示す。



食道癌バイオマーカーの必要性

標準治療で長期予後を得られる症例の一方、術前治療中に病勢が進行する症例や、術前治療後に肉眼的根治手術が可能でも早期に再発し不良な転帰をたどる症例が存在する。一方上述の臨床試験が今後食道癌治療の戦略に大きな影響を与えるとともに治療選択肢が増える可能性もある。したがって、術前治療の抵抗性や、標準治療後の予後(無再発生存・全生存)を予測するバイオマーカーが求められていると言え、これらバイオマーカーが術前治療の強化や異なる治療法の選択、術後補助療法、術後サーベイランスなど、食道癌診療の個別化に役立つものと考えている。

2. 研究の目的

非侵襲的食道癌バイオマーカーの確立に向けて

食道癌患者からの検体採取にあたり、生検組織や手術摘出組織は、侵襲的であることは避けられず、組織採取のタイミングは極めて回数が限られ、その都度の医療的・社会的コストも大きいと言える。

本研究では Liquid biopsy を採用し、末梢血から血中循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cells: CTC)を検出する手法により食道癌バイオマーカーの有用性について検討する。簡便な手技で、非侵襲的に、繰り返し検体採取が可能という点で、リアルタイムの病勢評価につながるバイオマーカーとして大きなアドバンテージを有する。

がん患者の末梢血中には、CTC が存在することが知られ、種々の癌において CTC 数と予後の関連が報告されてきた。現在、CTC 診断において唯一 FDA 承認がなされているのは Veridex 社の CellSearch®システムだが、本研究では、これとは異なるマイクロ流体回路チップ技術を用いた新規プラットフォームを用いる。先行技術(CellSearch®)と比較し、CTC 検出感度が極めて高い(94% vs 61%)こと、on-chip で single-cell を解析できることなどが利点である(PLoS One 2016)。また従来の上皮細胞マーカーである EpCAM に依存せず、Pan-CK(+), DAPI(+)細胞を CTC として検出すること、CD45 により白血球を negative selection することで高感度を実現している。さらに EMT (Epithelial Mesenchymal Transition: 上皮間葉移行)マーカーである Vimentin 染色を加えることで、Vimentin(+)の間葉型 CTC を検出できることが重要である。EpCAM 依存的な先行技術において、上皮マーカーを発現しない(つまり EMT 形質を持つ)

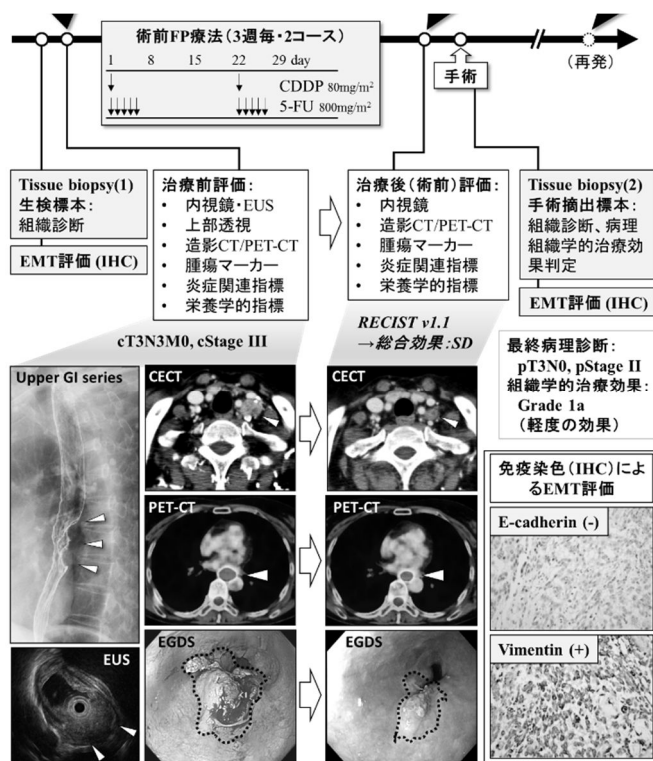
CTC が検出できないという問題 (Cell 2016) が理論上は解消されていると言える。

EMT において、癌細胞は接着能を失い間葉系様の細胞へと変化、原発巣から遊離し、浸潤・遊走能を獲得し脈管侵襲を経て全身の血流に侵入する。これら血中に入った癌細胞 (CTC) は、遠隔臓器に生着し転移巣を形成すると考えられる。このように EMT は癌の進展・転移における中心的なプロセスである。さらに近年、EMT が化学療法抵抗性を誘導することが示されている (Fischer et al. Nature 2015, Zheng et al. Nature 2015)。また CTC の数と表現型も化学療法前後で変化するとされ、治療抵抗症例では間葉型 CTC 数が増加し、治療奏効例では CTC 数の減少とともにより上皮様形質が主体となる (Yu et al. Science 2013)。このような知見から、個々の食道癌症例において、化学療法の抵抗性や転移・再発リスクを判断するにあたり、CTC および EMT 形質を有する CTC の検出が有用なツールになる可能性がある。

3. 研究の方法

切除可能な Stage II/III 食道癌の標準治療である術前 2 コースの FP 療法を施行する過程で、化学療法の前後に、Liquid biopsy を行う。CTC 測定および Vimentin 陽性の間葉型 CTC を検出する。これら経時的な血液モニタリングと並行して、(C)CT、PET をはじめとした画像検査・病理検査による治療効果判定や既存の予後指標、(D)再発を含む臨床転帰を統計学的に解析することで、食道癌の化学療法抵抗性、再発・転移における CTC の意義を解析する。

一連の診療・検査プロトコルを図に示す。内視鏡生検による組織学的診断ののち、内視鏡、超音波内視鏡、造影 CT、PET-CT、上部消化管透視などを用いて、深達度、リンパ節転移、遠隔転移などを評価し臨床的に Stage 判定を行う。同時に一般血液検査に加え、既存の腫瘍マーカー等を測定する。主な対象としては、切除可能 Stage II/III 食道癌症例に対し、術前 FP 療法を 2 コース行い、治療後評価として、適宜内視鏡、造影 CT、PET-CT、および血液検査を行う。さらに、放射化学療法症例、術前治療が適応とならない症例についても検討する。

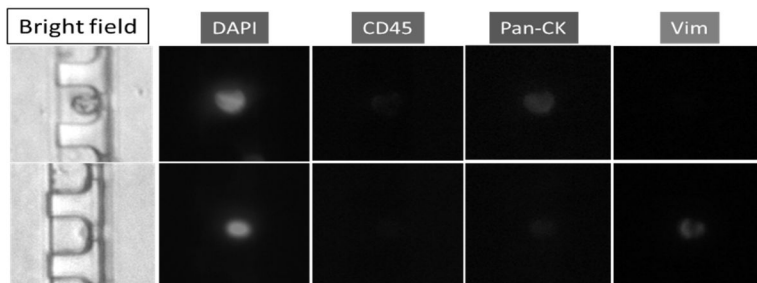


RECIST に基づき治療効果を判定する。FP 療法後であれば 4-8 週以内に食道癌根治手術を行い、摘出標本は病理学的最終診断に加え、組織学的治療効果判定 (Grade 0-3) を行う。この診療過程において、化学療法前・後に Liquid biopsy が可能となる。最終的には、Liquid biopsy による CTC および間葉型 CTC の定量的評価と、血液・画像・病理の各種モダリティによる臨床病理学的因子・治療効果・化学療法抵抗性および既存の予後指標を含む各種因子の定量的・定性的評価、さらに再発などの予後指標についてそれぞれ統計学的に関連を検討することで、新規バイオマーカーとしての可能性に迫る。

なお本研究は当施設の倫理委員会により承認済みであり、個々の患者の文書による同意を得て施行している。

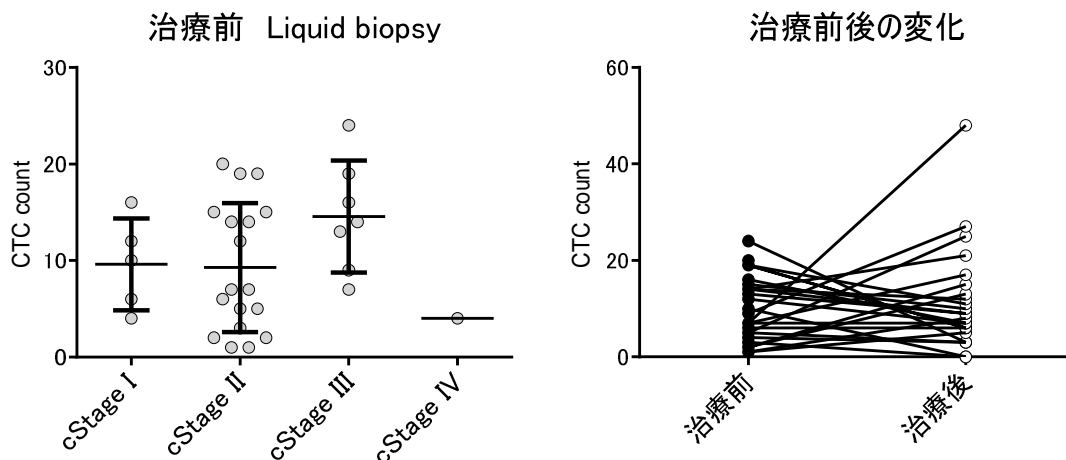
4. 研究成果

本報告書作成段階で、31名の食道癌患者にLiquid biopsyを行った。組織型は1例のみが低分化癌でそれ以外扁平上皮癌である。大半がcStage IIないしIIIであるが、cStage I症例を一部含む。31症例全例に対して治療前の血液サンプルからCTC解析を行い、うち25例については術前治療後の血液サンプルからもCTC解析を行った。大半の症例では術前治療後に根治手術が施行されたが、一部症例では根治的放射線化学療法に移行した。



現在臨床データを集積中であり、特にRECIST判定、組織学的治療効果判定、予後などにつき中間的解析を行っている。CTCについてはCTC全数に加え、間葉型CTCにも着目し定量的測定をしている。現在は解析が進行中の段階である。

下図のように、CTC数は必ずしも臨床的Stageとは相関せず、治療前後で増加する症例、減少する症例の両者が存在する。



中間的な解析では、再発と間葉型CTCが関連する傾向が見られているが、さらなる症例の集積と臨床データ収集、統計学的解析が必要な状況である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Thar Min Aung Kyi, Okayama Hirokazu, Saito Motonobu, Ashizawa Mai, Aoto Keita, Nakajima Takahiro, Saito Katsuharu, Hayase Suguru, Sakamoto Wataru, Tada Takeshi, Hanayama Hiroyuki, Saze Zenichirou, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Sato Yusuke, Motoyama Satoru, Mimura Kosaku, Kono Koji	4. 巻 7
2. 論文標題 Epithelial-mesenchymal transition-converted tumor cells can induce T-cell apoptosis through upregulation of programmed death ligand 1 expression in esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3321 ~ 3330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/cam4.1564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mimura Kosaku, Yamada Leo, Ujiie Daisuke, Hayase Suguru, Tada Takeshi, Hanayama Hiroyuki, Thar Min Aung Kyi, Shibata Masahiko, Momma Tomoyuki, Saze Zenichiro, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 64
2. 論文標題 Immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma: a review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FUKUSHIMA JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE	6. 最初と最後の頁 46 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5387/fms.2018-09	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kono Koji, Mimura Kousaku, Yamada Reo, Ujiie Daisuke, Hayase Suguru, Tada Takeshi, Hanayama Hiroyuki, Min Aung Kyi Thar, Shibata Masahiko, Momma Tomoyuki, Saze Zenichirou, Ohki Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Current status of cancer immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Esophagus	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10388-017-0596-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoto Keita, Mimura Kousaku, Okayama Hirokazu, Saito Motonobu, Chida Shun, Noda Masaru, Nakajima Takahiro, Saito Katsuharu, Abe Noriko, Ohki Shinji, Ohtake Tohru, Takenoshita Seiichi, Kono Koji	4. 巻 39
2. 論文標題 Immunogenic tumor cell death induced by chemotherapy in patients with breast cancer and esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 151-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.6097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 権田 憲士, 柴田 昌彦, 遠藤 英成, 佐久間 芽衣, 氏家 大輔, 青砥 慶太, 多田 武士, 花山 寛之, 渡辺 洋平, 佐瀬 善一郎, 大木 進司, 河野 浩二
2. 発表標題 食道癌患者におけるVEGFと免疫、炎症と予後の検討
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青砥 慶太, 三村 耕作, 岡山 洋和, 齋藤 元伸, 千田 峻, 野田 勝, 中島 隆宏, 斎藤 勝治, 阿部 宣子, 大木 進司, 大竹 徹, 竹之下 誠一, 河野 浩二
2. 発表標題 乳癌および食道癌患者における化学療法が惹起するImmunogenic tumor cell deathの検討
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大木 進司, 遠藤 英成, 氏家 大輔, 楡井 東, 青砥 慶太, 多田 武志, 花山 寛之, 権田 憲士, 佐瀬 善一郎, 門馬 智之, 河野 浩二
2. 発表標題 cT4食道癌に対する化学放射線療法の治療効果予測および予後予測に関する検討
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 権田 憲士, 柴田 昌彦, 仲野 宏, 氏家 大輔, 多田 武士, 花山 寛之, 早瀬 傑, 佐瀬 善一郎, 大木 進司, 河野 浩二
2. 発表標題 食道癌患者における末梢血骨髓由来免疫抑制細胞(MDSC)と予後の検討
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Gonda K, Shibata M, Yamada L, Nakano H, Ujiie D, Nirei A, Tada T, Hanayama H, Hayase S, Saze Z, Ohki S, Kono K
2. 発表標題	Myeloid-derived Suppressor Cells are Increased and Correlated with Malnutrition, Inflammation and Poor Prognosis in Patients with Esophagus Cancer
3. 学会等名	26th Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Ujiie D, Okayama H, Endo E, Yamada L, Nirei A, Tada T, Hanayama H, Gonda K, Saze Z, Momma T, Ohki S, Mimura K, Kono K
2. 発表標題	Evaluation of Circulating Tumor Cells in Esophageal Cancer Patients.
3. 学会等名	SGCC 11th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Ujiie D, Ohki S, Okayama H, Yamada L, Tada T, Hanayama H, Hayase S, Gonda K, Saze Z, Momma T, Kono K
2. 発表標題	Evaluation of Circulating Tumor Cells in Esophageal Cancer Patients
3. 学会等名	16th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	三村耕作, 氏家大輔, 多田武志, 花山寛之, 早瀬傑, 権田憲士, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 大木進司, 河野浩二
2. 発表標題	食道扁平上皮癌における化学療法・免疫チェックポイント阻害剤併用療法の可能性
3. 学会等名	第72回日本食道学会学術集会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 佐久間芽衣, Aung Kyi Thar Min, 岡山洋和, 齋藤元伸, 早瀬傑, 多田武志, 花山寛之, 佐瀬善一郎, 大木進司, 佐藤雄亮, 本山悟, 三村耕作, 河野浩二
2. 発表標題 食道扁平上皮癌における上皮間葉移行(EMT) とPD-L1 発現
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡山 洋和 (Okayama Hirokazu) (20583397)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	大木 進司 (Ohki Shinji) (20381361)	福島県立医科大学・医学部・特任教授 (21601)	
研究分担者	河野 浩二 (Kono Koji) (40283204)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	