

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16326

研究課題名(和文)大腸内視鏡的粘膜下層剥離術における遊離腫瘍細胞と局所再発に関する研究

研究課題名(英文)Study of exfoliated tumor cells and local recurrence after colorectal endoscopic submucosal dissection

研究代表者

井上 隆 (Inoue, Takashi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60623478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD, Endoscopic Submucosal Dissection)15症例のESD後腸管内洗浄液中遊離腫瘍細胞の細胞活性を測定した。回収直後/3時間後/6時間後/12時間後に測定したが、時間経過によって細胞活性は低下しなかった。回収直後の洗浄液に消毒液を付加し測定した。消毒液濃度0%/0.5%/1%/2%で測定すると、2%では細胞活性が低下した。大腸ESD4症例のESDで切除した腫瘍とESD後の洗浄液中の遊離腫瘍細胞のDNAを抽出し、次世代シーケンサーにて遺伝子変異を比較した。遺伝子変異の一致率は4例中2例が100%、2例が94.3%と非常に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで内視鏡治療における局所再発の機序は証明されていなかったが、今回大腸ESDで切除した腫瘍とESD後の洗浄液中の遊離腫瘍細胞の遺伝子変異の一致率が高く、従来の内視鏡治療よりも比較的長時間の腫瘍に対する物理的刺激を伴うESD操作にて腫瘍から細胞が腸管内に遊離したと考えられ、その遊離腫瘍細胞はviabilityを持っており、大腸ESD後の局所再発の機序がimplantationであることを裏付ける結果となった。遊離腫瘍細胞のviabilityは時間経過では低下せず、消毒液付加で低下したため、大腸ESD後に消毒液を付加した液で洗浄することで大腸ESD後の局所再発の予防につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The viability of exfoliated tumor cells in intraluminal lavage samples after 15 colorectal endoscopic submucosal dissection were measured. The viability did not decrease over time, at the end of ESD, 3 hours, 6 hours, and 12 hours after ESD. However, the viability did significantly decrease, when 2% povidone iodine were added. DNA samples were extracted from resected tumors and exfoliated tumor cells in intraluminal lavage samples with positive cytology. Each extracted sample was analyzed by next gene sequencer. Evaluation of gene mutations between resected tumors and exfoliated tumor cells showed 100% concordance in two patients and 94.3% concordance in two patients in the screening of 19 gene mutations.

研究分野：消化器外科学

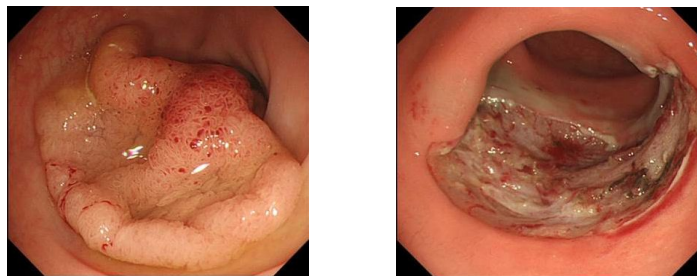
キーワード：大腸粘膜下層剥離術 遊離腫瘍細胞 局所再発 viability povidone iodine implantation 遺伝子変異 腸管内洗浄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD, Endoscopic Submucosal Dissection)は、進達度の浅い癌に対して粘膜下層に局注液を注入して病巣を挙上させ、粘膜下層を剥離して病変を切除する日本で開発された内視鏡治療である。従来からの内視鏡的粘膜切除術(EMR, Endoscopic Mucosal Resection)では、大きいために分割切除となっていた腫瘍をESDでは大きさにかかわらず一括切除できる。EMRで分割切除した場合は一定の確率で剥離面に局所再発をきたす。腫瘍の分割切除による遺残が原因と考えられてきたものの、その機序は証明されていない。しかし、我々はESD後の局所再発症例を経験した。ESDで一括切除したにもかかわらず局所再発をきたしたため、局所再発の機序として分割切除による遺残ではなくimplantation(播種/生着)が示唆された。

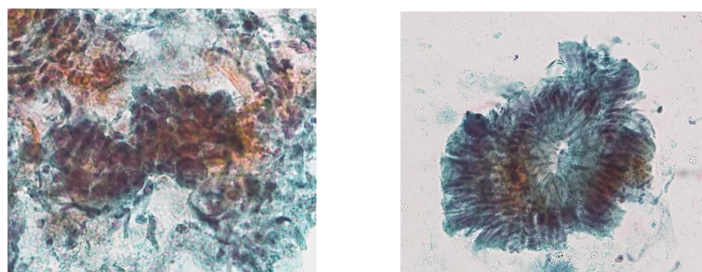
これまで直腸癌外科手術においては、術中操作によって腸管内に遊離した癌細胞による吻合部再発が報告されている。その対策として吻合前の腸管内洗浄が有効で、洗浄により局所再発が有意に減少したことが報告された。消化管内に遊離した癌細胞は正常粘膜には生着しないが、正常粘膜欠損部には生着すると報告されている。また、口側に存在する大腸癌から腸管内に遊離した癌細胞が、その肛門側の痔瘻や痔核切除部位、生検部位にimplantationした報告を認める。さらに我々が経験した症例と同様に、ESD後の剥離面にimplantationした報告も認める。しかし、これらの報告では局所再発の機序としてimplantationが示唆されたものの、証明はされていない。さらに、大腸ESD後の局所再発の機序としてのimplantationに関する研究は国内外で全く行われたことがない。



大腸腫瘍(左)とESD後(右)の剥離面

2. 研究の目的

我々は大腸ESD後の腸管内洗浄液に遊離腫瘍細胞が高率に存在することと、ESD操作によって遊離した腫瘍細胞の腸管内洗浄による除去効果も世界で初めて報告した。そこで、大腸ESD後の局所再発の原因が遊離腫瘍細胞のimplantationなのかどうかを明らかにすることを目的に本研究を計画した。ESDで腫瘍を一括切除したにもかかわらずimplantationにて局所再発をきたすことが明らかになれば、従来から分割切除による遺残が原因と考えられてきたものの証明されていない内視鏡治療後局所再発の機序の解明に貢献するものと期待できる。さらに、遊離腫瘍細胞のimplantationが原因だとすれば、ESD後に洗浄することが局所再発の予防につながると考えた。



腸管洗浄液中の遊離癌細胞(左)と腺腫細胞(右)

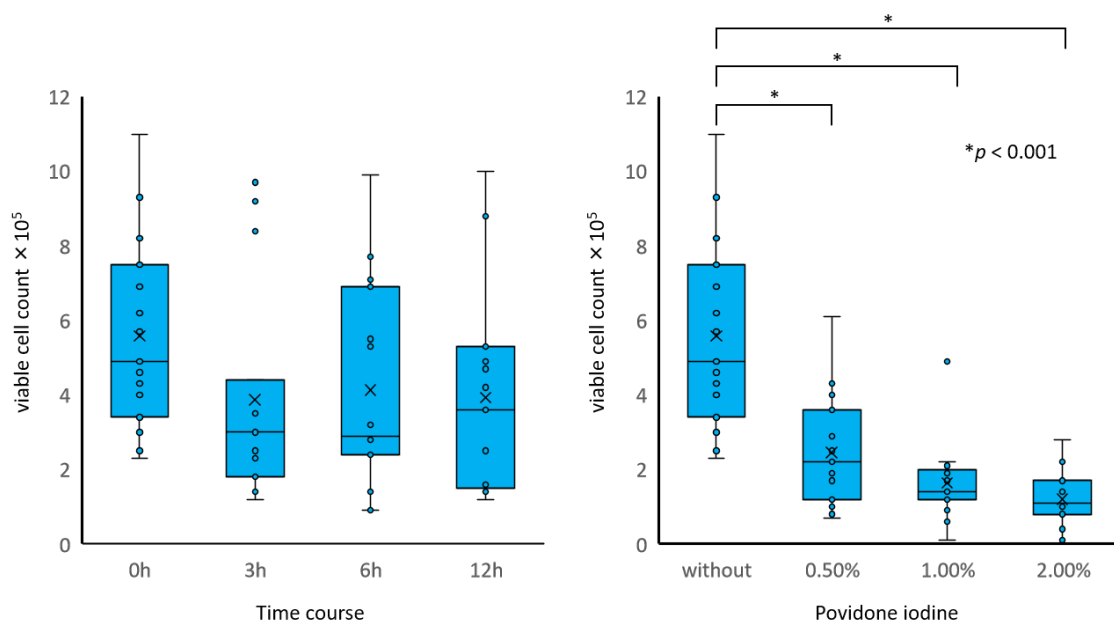
3. 研究の方法

(1) 術中操作によって腸管内に遊離した癌細胞は高い活性を持つ。大腸ESD操作によって腸管内に遊離した腫瘍細胞も、正常粘膜欠損部に生着できるほどの高い活性を持つと考える。よって、ヒトの大腸ESD後に腫瘍を摘出してから内視鏡下にて30mlの生理食塩水にて腸管内洗浄を行い、回収した洗浄液にTrypan blue液を加え、全自動セルカウンターで細胞活性(viability)を測定する。回収直後、3時間後、6時間後、12時間後に測定し、時間経過によるviabilityの変化を検討する。さらに回収直後の洗浄液に消毒液(povidone iodine)を付加し、viabilityを測定する。povidone iodineの濃度は0%(付加なし)、0.5%、1%、2%とし、殺細胞活性を伴った液付加によるviabilityの変化を検討する。

(2) 腫瘍細胞は従来の内視鏡治療よりも比較的長時間の腫瘍に対する物理的刺激を伴うESD操作により腸管内に遊離したと考える。よって、ESDで切除した腫瘍と大腸ESD後の洗浄液中の遊離腫瘍細胞のDNAを抽出し、次世代シークセンサーにて遺伝子変異を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 大腸ESD15症例をESD後に内視鏡下に腸管内洗浄を行い、回収した洗浄液中の遊離腫瘍細胞のviabilityを評価した。回収直後、3時間後、6時間後、12時間後にviabilityを測定した。それぞれのviabilityの中央値が24(9-33)%、24(8-50)%、16(8-48)%、21(6-46)%で、時間の経過によって細胞活性が有意に低下することはなかった($P=0.87$)。さらに回収直後の洗浄液に消毒液(povidone iodine)を付加し、viabilityを測定した。povidone iodineの濃度は0%(付加なし)、0.5%、1%、2%とした。それぞれのviabilityの中央値が、24(9-33)%、20(10-33)%、17(1-30)%、11(0-16)%で、povidone iodine2%付加ではpovidone iodine付加なしに比べ細胞活性が有意に低下した($P<0.01$)。大腸ESD後の遊離腫瘍細胞のviabilityは12時間では低下せず、洗浄による除去が必要と考えられた。2%の消毒液(povidone iodine)を付加した液で洗浄することで遊離腫瘍細胞のviabilityを低下させ、大腸ESD後の局所再発の予防につながると考えられた。



(2) ESD後の腸管内洗浄液の細胞診陽性症例4例で、ESDで切除した腫瘍と大腸ESD後の洗浄液中の遊離腫瘍細胞のDNAを抽出し、次世代シークセンサーにて遺伝子変異を比較した。1例目は

APC/FGFR3/PDGFR α /KIT/KDR/CSF1R/FLT3/SMAD4にともなひ変異を認めた(一致率100%)。2例目はAPC/ATM/FGFR3/PDGFR α /KDR/CSF1R/SMO/RET/FLT3にともなひ変異を認めたが、切除した腫瘍のみFBXW7に変異を認めた(一致率94.3%)。3例目はAPC/MLH1/PTEN/FGFR3/PDGFR α /KDR/CSF1R/FLT3にともなひ変異を認めたが、切除した腫瘍のみERBB2に変異を認めた(一致率94.3%)。4例目はAPC/TP53/KRAS/ALK/FGFR3/PDGFR α /KDR/CSF1R/HRAS/FLT3にともなひ変異を認めた(一致率100%)。ESDで切除した腫瘍と大腸ESD後の洗淨液中の遊離腫瘍細胞の遺伝子変異は高率で一致した。よって、従来の内視鏡治療よりも比較的長時間の腫瘍に対する物理的刺戟を伴うESD操作により腫瘍から細胞が腸管内に遊離し、大腸ESD後の局所再発の機序がimplantationであることを裏付ける結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi Inoue, Fumikazu Koyama, Hiroyuki Kuge, Takeshi Ueda, Shinsaku Obara, Takayuki Nakamoto, Yoshiyuki Sasaki, Yasuyuki Nakamura, Masayuki Sho	4. 巻 2
2. 論文標題 Short-term outcomes of endoscopic submucosal dissection versus laparoscopic surgery for colorectal neoplasms: An observational study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JOURNAL OF THE Anus, Rectum and Colon	6. 最初と最後の頁 97-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.23922/jarc.2017-027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中本貴透、小山文一、久下博之、井上隆、佐々木義之、石岡興平、福岡晃平、岩佐陽介、松本弥生、庄雅之
2. 発表標題 大腸ESD後腸管内洗浄液中遊離細胞の検討
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会近畿支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中本貴透、小山文一、久下博之、井上隆、佐々木義之、石岡興平、福岡晃平、岩佐陽介、松本弥生、庄雅之
2. 発表標題 大腸ESD後腸管内洗浄液中遊離細胞におけるviabilityの検討
3. 学会等名 第73回日本大腸肛門病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中本貴透、小山文一、久下博之、井上隆、佐々木義之、石岡興平、福岡晃平、岩佐陽介、松本弥生、庄雅之
2. 発表標題 大腸ESD後腸管内洗浄液中遊離細胞の検討
3. 学会等名 奈良県消化器内視鏡研究会
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
--	---------------------------	-----------------------	----