

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390339

研究課題名(和文)：消化器癌における循環癌細胞とリンパ節微小転移の臨床的意義

研究課題名(英文)：Clinical Significance of Circulating Tumor Cells and Lymph Node Micrometastases in Gastrointestinal cancer

研究代表者

上之園 芳一 (UENOSONO YOSHIKAZU)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：60398279

研究成果の概要(和文)：

本研究では血液中およびリンパ節に存在する微小癌細胞を検出し、その臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

①胃癌における血中遊離癌細胞(Circulating tumor cells=CTC)

従来よりCTCの存在が指摘されており、胃癌においても再発との関連があるとするとの報告がある。胃癌患者のCTCをCellSearchで検出し検討を行った。T1-3切除胃癌患者50名において主病変切除前に末梢血および門脈血を10ml採取し、CellSearchにより検出した。末梢血18%、門脈血で24%でCTCが検出され、T1: 8%、T2: 26%、T3: 44%で検出された。臨床病理学的因子との関連ではStage ( $p=0.007$ )、vessel invasion ( $p=0.008$ )、lymphatic invasion ( $p=0.007$ )、lymph node metastasis ( $p=0.01$ )に相関を認め、予後との関連性が示唆された。( $p=0.0049$ )

②リンパ節微小転移診断と臨床的意義

胃癌、乳癌において、センチネルリンパ節(SN)生検の術中迅速診断として応用可能なGeneSearchによるRT-PCR法の可能性について検討を行った。

1. 胃癌のRT-PCR法によるリンパ節転移診断において、従来より用いられてきたLightCyclerとGeneSearchに用いるSmartCycler IIによる転移診断能の比較検討を行った。明らかな転移リンパ節47個と、正常リンパ節22個を用いてCEAおよびCK19をプライマーとしたRT-PCR法検出の感度を評価した。LightCyclerでの正診率CEA: 91.5%、CK19: 70.2%、Multiplex: 91.5%であり、SmartCycler IIの正診率はCEA: 97.9%、CK19: 95.7%、Multiplex: 97.9%であった。術中迅速診断法としてのGeneSearchはLightCyclerと比較しても同等以上の精度を持つことが確認された。

2. 乳癌におけるSNの免疫染色も含めた病理診断とGeneSearchによるRT-PCR法診断との比較を行った。対象は117例の乳癌患者で、SN生検を施行し、全てのリンパ節を半割し、半分をCK19とMammaglobinをプライマーに用いたGeneSearchで評価し、残りの半分をHE染色と免疫染色で評価した。SN204個の中で、HE染色にて転移陽性31個であり、更にCK免疫染色にて6個の転移が確認された。GeneSearchでは32症例40個のリンパ節が陽性であった。病理診断の結果は相関し( $p<0.001$ )、TNM分類による転移評価で分類するとMacrometastasis: 95.7%、Micrometastasis: 60.0%、ITC: 55.6%の感度であった。これらの2マーカーを用いたSN生検の術中迅速診断に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

① Circulating tumor cells in blood detected by CellSearch System in gastric cancer  
The purposes of this study are to evaluate CTCs of peripheral blood (PB) and portal vein blood (PV) with gastric cancer patients using CellSearch System (CSS), and to investigate the relation of the recurrence. 【Methods】 In 50 patients with T1-3 gastric cancer, PB was collected 10ml before the gastrectomy, and PV was collected 10ml during operation.

【Results】 CTCs were detected in 18% from PB, 24% from PV and 28% from PB and/or PV. CTCs were found in 8% with T1, 26% with T2, 44% with T3. Detection rate of CTCs were correlated with the results of Stage ( $p=0.007$ ), vessel invasion ( $p=0.008$ ), lymphatic invasion ( $p=0.007$ ) and lymph node metastasis ( $p=0.01$ ). The recurrences were detected in

11 patients (78.5 %) with CTCs, and there was statistically significant difference in over all survival between patients with or without CTCs ( $p=0.0049$ ). **【Conclusions】** The identification of CTCs is very useful to follow up after operation and to perform the adjuvant chemotherapy in gastric cancer.

②-1 The utility of rapid diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer using a multiplex real-time RT-PCR assay

The purpose of this study was to evaluate the utility of a prototype RT-PCR assay run on the SmartCycler® that enables the rapid diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer within 40 minutes. The purpose of this study was to verify the utility of the SmartCycler® as compared to conventional RT-PCR using the LightCycler®. **【Patients and methods】** 47 overt metastatic lymph nodes from 8 patients with advanced gastric cancer and 22 benign lymph nodes from patients without malignant tumor who received surgery were obtained with informed consent. We examined the metastatic lymph nodes by RT-PCR using multiple markers using CEA and CK19 by the LightCycler® and SmartCycler®. **【Results】** In the singlex assay, the sensitivity of CEA and CK19 was 91.5% and 70.2% in the LightCycler®, and 97.9% and 95.7% in the prototype assay system, respectively. In the multiplex assay, the sensitivity was 91.5% in the LightCycler® system and 97.9% in the SmartCycler®, respectively. **【Conclusion】** Rapid diagnosis for lymph node metastasis using RT-PCR by the SmartCycler® has equally high precision for detecting lymph node metastasis as the conventional LightCycler®. In this study the SmartCycler® is advantageous for the diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer when run with the prototype assay.

②-2 Utility of the GeneSearch BLN Assay for Rapid Evaluation of Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer

Our goal was to evaluate the clinical application of the Breast Lymph Node (BLN) assay, a real-time RT-PCR assay for SLN metastases, by comparing this test with routine pathological examination. **【Methods】** One hundred seventeen patients with breast cancer underwent breast surgery with SLN biopsy. Each SLN was cut in half along the plane of the longest dimension. Half of each node was examined by the BLN assay's 2 markers, mammaglobin (MG) and cytokeratin 19 (CK19), and the other half was examined by hematoxylin and eosin staining (HE) and immunohistochemical staining (IHC) for pancytokeratins. **【Results】** A total of 204 SLNs were obtained from 117 patients. HE identified metastases in 31 SLNs (15.2%), and IHC detected metastases in 6 SLNs; 40 SLNs from 32 patients were positive for metastasis by the BLN assay. The assay results correlated with the pathological diagnoses by HE and IHC ( $p<0.001$ ). BLN Assay sensitivity compared with pathological findings classified according to TNM was 95.7% for macrometastases, 60.0% for micrometastases, and 55.6% for isolated tumor cells. **【Conclusion】** The 2-marker BLN assay has performance comparable to, and analyzes more tissue than, routine pathological examination. Therefore, clinical intraoperative use of the BLN assay for SLNs may result in reduction of the second surgery for axillary lymph node dissections.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	4,800,000	1,440,000	6,240,000

研究分野：生物系 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：センチネルリンパ節、微小転移、循環癌細胞、消化器癌

## 1. 研究開始当初の背景

全体的構想の究極的な目的は、これら分子生物学的研究ならびに進展・転移に関する癌の進行度の研究成果を、癌の適正な診断・治療の在り方に臨床応用することにある。そのためには個々の転移診断を分子レベルで行い、最適な治療法とりわけ低侵襲の治療や癌化学療法に必要な症例の選択が重要となる。癌治療の個別化を目指した自動超微転移存在診断法を確立し、その臨床的意義をふまえて総合的医療戦略を構築するものである。

癌の血行性転移の基本となる循環癌細胞 (Circulating Tumor Cells = CTC) と、HE レベルで検出できない微小リンパ節転移を、自動的に検出診断する、Cell Search および Gene Search による自動超微転移存在診断法の開発と癌治療個別化の確立を図ることである。リンパ節転移を予測する手段として SN 生検が提唱され、乳癌やメラノーマにおいて転移陰性例に対する縮小治療が実施されて患者の QOL の向上に寄与している。同様のコンセプトは消化器癌を含む多くの固形癌にも応用されつつある。特に本邦で早期症例の多い胃癌では、EMR や縮小手術の適用の根拠として臨床応用が期待されている。また、消化器癌のなかでも最もリンパ節転移傾向が強く、同時多方向性にリンパ節転移が認められる食道癌では、根治術として頸・胸・腹 3 領域郭清が行われてきたがその手術侵襲は極めて大きく、リスクのある症例に対する縮小手術や至適リンパ節郭清を行うための指針としての応用が期待されている。

## 2. 研究の目的

消化器癌における CTC

循環癌細胞とリンパ節微小転移の診断法の確立と臨床的意義を明らかにし、癌治療個

別化の確立を図ることを目的とする。癌の血行性転移の基本となる CTC を検出、分離可能とする CellSearch と、病理学的 HE 染色レベルで検出困難なリンパ節微小転移を RT-PCR に基づき自動的に検出診断する GeneSearch により行う自動超微転移存在診断法の開発と癌治療個別化の確立を図ることである。

CellSearch による CTC の検出は、癌転移再発の予測や化学療法、放射線療法における効果判定を的確に行うことで、不要な治療の回避および治療の個別化を可能とし、将来的な医療経済効果も期待される。また、リンパ節転移においては、予測を行う手段として SN 生検が提唱され、消化器癌においても応用されつつある。特に胃癌、食道癌では安全な縮小手術につながる手段として期待されており、この SN の正確かつ簡便で再現性のある術中迅速微小転移検出法として GeneSearch の開発が期待される。

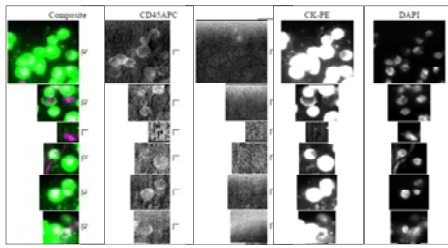
## 3. 研究の方法

### 1) Cell Search による循環血液中の CTC 検出

精度の検証を、胃癌由来細胞株を用いて検証し、抗癌剤感作時の検出能の評価を行う。検出される細胞の Viability の評価は重要であり、コンピューター画像による形態学的評価を行い、評価基準の確立に努める。また、CTC プロファイルキットを用いた細胞分離により細胞培養および動物実験による生着能の検証を計画している。

臨床検体においては胃癌における末梢血および手術時に採取可能な門脈血において検出される CTC の評価を行い、予後、再発の因果関係を明らかにする。化学療法および放射線療法症例ではその効果との相関をみることにより CTC 評価の妥当性および有用性を検討する。

Positive control(MKN45)の蛍光発色Pattern



## 2) Gene Searchによるリンパ節微小転移検出

リンパ節におけるCEAおよびCK19、Mammoglobin等のプライマーを用いたRT-PCRによる評価を胃癌および乳癌において進行しており、Sampleの集積を行う。現在追加で10 geneのプライマーを追加検討予定であり、これらも併せて至適なプライマーの選別、組み合わせを設定し検出キット開発を進行する予定である。SN生検において検証を行い、迅速診断、永久組織診断、pancytokeratinによる免疫組織診断との対比および評価を行い、臨床的意義について検討する予定である。

## 4. 研究成果

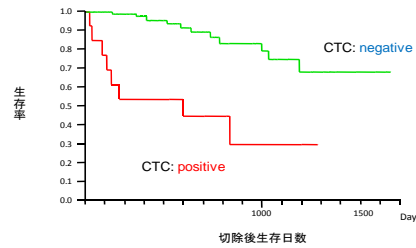
本研究では血液中およびリンパ節に存在する微小癌細胞を検出し、その臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

### ①胃癌におけるCTC

従来よりRT-PCR法などによる血中CTCの存在が指摘されており、胃癌においてCTCは再発と関連があるとするとの報告が見られてきた。今回胃癌患者におけるCTCを、CellSearchにより検出し、再発予後との関連に付き検討を行った。

T1-3切除胃癌患者50名において主病変切除前に末梢血および門脈血を10ml採取し、CellSearchにより検出を行った。結果は末梢血18%、門脈血で24%においてCTCが検出された。T1で8%、T2で26%、T3で44%に検出

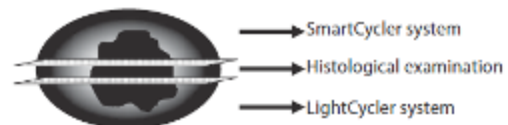
されており、臨床病理学的因子との関連をみるとStage ( $p=0.007$ ), vessel invasion ( $p=0.008$ ), lymphatic invasion ( $p=0.007$ ), lymph node metastasis ( $p=0.01$ )に相関を認めた。1年以内に再発を見た14例中11例(78.5%)がCTC陽性で、予後との関連性も示唆された。( $p=0.0049$ )



### ②リンパ節微小転移診断と臨床的意義

固形癌におけるリンパ節転移は重要な予後因子となり、正確なリンパ節転移診断はSN検を用いた縮小手術や補助療法の選択において重要な情報となる。我々は、SNの微小転移を含めた転移診断を念頭に、胃癌に加えてすでにSN生検が臨床応用されている乳癌も併せて、術中迅速診断として応用可能なGeneSearchによるRT-PCR法の可能性について検討を行った。

1. 胃癌のRT-PCR法によるリンパ節転移診断において、従来より用いられてきたLightCyclerとGeneSearchに用いるSmartCycler IIによる転移診断能の比較検討を行った。8例の患者から得られた明らかな転移リンパ節47個と、非担癌患者から得られた22個の正常リンパ節を用いてCEAおよびCK19をプライマーとしたRT-PCR法検出の感度を評価した。



その結果はLightCyclerでの正診率CEA:

91.5%, CK19: 70.2%, Multiplex: 91.5%であり、SmartCycler IIでの正診率はCEA: 97.9%, CK19: 95.7%, Multiplex: 97.9%であり、術中迅速診断法としての GeneSearch は従来の検出法である LightCycler と比較しても同等以上の精度を持つことが確認された。

**Table 2.** Evaluation of the results of the LightCycler and SmartCycler systems

	LC-CK19		p value
	negative	positive	
SC-CK19			
Negative	22	2	0.0027
Positive	14	31	
	LC-CEA		p value
	negative	positive	
SC-CEA			
Negative	23	0	0.0833
Positive	3	43	
	LC-CK19 or CEA		p value
	negative	positive	
SC-CK19 or CEA			
Negative	22	0	0.0455
Positive	4	43	

LC = LightCycler system; SC = SmartCycler system.

2. 乳癌におけるSNの免疫染色も含めた病理診断と GeneSearch による RT-PCR 法診断との比較を行った。対象は 117 例の乳癌患者で、全例で SN 生検を施行した。全てのリンパ節は半割し、半分を CK19 と Mammaglobin をプライマーに用いた GeneSearch で評価し、残りの半分で HE 染色と免疫染色で評価した。SN 204 個中で、HE 染色にて 31 個が転移陽性であり、更に CK 免疫染色にて 6 個の転移が確認された。

GeneSearch では 32 症例 40 個のリンパ節が陽性であった。HE、免疫染色の結果は相関し ( $p < 0.001$ )、TNM 分類による転移評価で分類すると Macrometastasis: 95.7%、Micrometastasis: 60.0%、Isolated tumor cells: 55.6%の感度であった。

**Table 4.** Correlation between BLN assay and pathological finding of lymph node

BLN assay		MA	MM	ITC	Negative
CK	MG				
+	+	13	2	1	1
+	-	9	1	1	5
-	+	0	0	3	4
-	-	1	2	4	157
Positive rate of BLN assay		95.70%	60.00%	55.60%	6.00%

これらの 2 マーカーを用いた SN 生検の術中迅速診断に応用できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Utility of the GeneSearch BLN Assay for Rapid Evaluation of Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer, Funasako Y, Uenosono Y, Hirata M, Arigami T, Yanagita S, Arima H, Ehi K, Kijima Y, Yoshinaka H, Natsugoe S, Cancer. 2010 ( in press)

2. Sentinel node navigation surgery in esophageal cancer, Uenosono Y, Arigami T, Arima H, Yanagita S, Okumura H, Matsumoto M, Ohwaki T, Ishigami S, Natsugoe S. Nippon Geka Gakkai Zasshi. 2009 Mar;110(2):63-7.

3. The utility of rapid diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Funasako Y, Hirata M, Kozono T, Ehi K, Arima H, Green G, Wang Y, Aikou T. Oncology. 2009;77(3-4):205-11.

4. CCR7 and CXCR4 expression predicts lymph node status including micrometastasis in gastric cancer. Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Yanagita S, Arima H, Hirata M, Ishigami S, Aikou T. Int J Oncol. 2009 Jul;35(1):19-24.

5. Morphological distribution of

metastatic foci in sentinel lymph nodes with gastric cancer. Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Arima H, Kozono T, Ehi K, Arigami T, Higashi H, Aikou T. Ann Surg Oncol. 2008 Mar; 15(3):770-6.

[学会発表] (計 13 件)

1. 上之園芳一, 有上貴明, 柳田茂寛, 平田宗嗣, 小園勉, 船迫和, 衣斐勝彦, 石神純也, 愛甲 孝, 夏越祥次: 胃癌におけるセンチネルリンパ節概念に基づく縮小手術. (シンポジウム) 第 33 回日本リンパ学会総会, 高槻市, 7 月 18 日, 2009
2. Uenosono Y., Arigami T., Kozono T., Yanagita S., Hirata M., Arima H., Ishigami S., Aikou T., Natsugoe S. : Circulating tumor cells in blood detected by the CellSearch system are a predictive factor of recurrence in gastric cancer (Symposium) , 8<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress, Krakow Poland, 6 月 12 日, 2009
3. 上之園芳一, 夏越祥次, 小園勉, 柳田茂寛, 有上貴明, 船迫和, 有馬豪男, 中条哲浩, 石神純也, 愛甲 孝: 胃癌症例における血中遊離癌細胞の検出による再発予測の可能性. 第 46 回日本癌治療学会総会, 名古屋市, 10 月 30 日, 2008
4. 上之園芳一, 夏越祥次, 有上貴明, 柳田茂寛, 有馬豪男, 平田宗嗣, 船迫和, 小園勉, 石神純也, 愛甲 孝: 胃癌における Sentinel Node Navigation の現状と将来展望. (シンポジウム) 第 10 回 Sentinel Node Navigation Surgery 研究会学術集会, 秋田市, 9 月 20 日, 2008
5. Uenosono Y., Natsugoe S., Yanagita S., Funasako Y., Kozono T., Arigami T., Arima H., Ehi K., Ishigami S., Aikou T. : Investigation of false negative

cases in SN mapping with cT1-2N0 gastric cancer, 6<sup>th</sup> BIENNIAL INTERNATIONAL SENTINEL NODE SOCIETY MEETING, SYDNEY AUSTRALIAN, 2 月 19 日, 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上之園 芳一 (UENOSONO YOSHIKAZU)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号: 60398279

### (2) 研究分担者

愛甲 孝 (AIKOU TAKASHI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 60117471  
夏越 祥次 (NATSUGOE SHOJI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 70237577  
石神 純也 (ISHIGAMI SUMIYA)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号: 90325803  
北菌 正樹 (KITAZONO MASAKI)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号: 30398276