

平成 21年 5月 26日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19599020  
 研究課題名（和文） 血中遊離癌細胞中の cancer stem cell の同定と機能解析  
 研究課題名（英文） Identification and functional analysis of cancer stem cells isolated from circulating tumor cells in gastroenterological cancer patients  
 研究代表者  
 林 尚子（HAYASHI NAOKO）  
 熊本大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：20452899

研究成果の概要：(200字程度で)

## 1. 血中遊離癌細胞の検出

“CellSearch™”により、6名の消化器癌患者から血液15ml当たり100個以上の癌細胞が検出できた。これらの細胞の一部からRNAを抽出し、arrayによる遺伝子発現解析を行い、癌細胞関連遺伝子、幹細胞関連遺伝子が強く発現していることが確認され、遊離癌細胞の中には癌幹細胞が含まれている可能性があることが示された。現在、これらの細胞の培養とNOD/SCID mouseへの移植を行っており、浸潤能、分化能、増殖能、転移形成能について検討する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：実験外科学、遊離癌細胞、癌幹細胞、転移、バイオマーカー、CellSearch™、血中遊離癌細胞、cancer stem cell

## 1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進歩により、従来の診断法では検出し得なかった微量癌細胞の診断が可能になった。当科では、癌特異的遺伝子変異や、mRNAを指標としたPCR法による微量癌細胞の検出法を確立し、担癌患者における血液やリンパ節中の微量癌細胞の検出を行ってきた。その結果、早期癌患者でも血液やリンパ節中に微量癌細胞が検出されることがあり、このような症例では病期に関係なく予後

が不良であることを報告してきた(Hayashi N et al. Lancet 345 1995, Hayashi N et al. Surgery 125 1999)。

微量癌細胞の臨床的意義は明確とはいえなかったが、大規模な臨床研究の結果から、癌腫により遊離癌細胞検出の臨床的意義が異なる可能性が判明した。上皮マーカーを指標とした RT-PCR 法で検出される細胞を遊離癌細胞とすることにコンセンサスが得られつつあったが、大規模臨床研究の結果からは、

例えば胃癌において予後の異なる早期癌から進行癌までほぼ同程度の頻度で血中に微量癌細胞が検出されることが明らかとなり、微量癌細胞を検出することのみでは予後を予測することが困難であることが示された。よって、血液中に存在する遊離癌細胞とされてきたものの中に、癌幹細胞が含まれている可能性がある。

## 2. 研究の目的

癌幹細胞は真の転移能を有する細胞であり、血中に存在する癌幹細胞を同定し、そのマーカーが明らかにされれば、予後因子として非常に有用であるばかりでなく、治療への応用も期待できる。

本研究では、消化器癌患者の末梢血中から真の転移能を有する癌細胞の同定を行い、その特性を明らかにし、それらの細胞を簡便に検出できるような分子マーカーを決定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 血中遊離癌細胞の検出

血液中の循環癌細胞を直接測定・解析するシステムとしてCellSearch™が開発された。上皮細胞に特異的な抗体(EPCAM)で血液中の上皮細胞を分離し、蛍光物質を標識した抗サイトケラチン抗体と抗CD45抗体を用い、白血球と上皮細胞を識別し、さらにDAPIにより核を染色し、完全な形態で機能を有する癌細胞の数を自動的に計測することができる。乳癌において、この方法で検出された循環癌細胞数が予後と相関することが報告され、アメリカでは、転移性乳癌の診断あるいは治療効果判定に臨床応用されている。本研究では、各種消化器癌患者より15mlの末梢血を採取し、このシステムを用い、血液中のサイトケラチン陽性癌細胞(=癌細胞)を検出する。

### (2) 癌幹細胞の同定

CellSearch™で得られたサイトケラチン陽性細胞についてFACS解析を行い、癌幹細胞様細胞(SP分画)が存在するかどうか確認する。SP分画の存在が確認された症例ではその頻度について算出する。細胞数が少なくFACSによる解析が行えない症例では、RNAを抽出し、micro arrayを行い、癌幹細胞に特異的な遺伝子が発現しているかどうか確認する。

### (3) 癌幹細胞の機能解析

もし、上記の手法で十分な数の癌幹細胞が得られれば、癌幹細胞を培養し、浸潤能、分化能、増殖能、転移形成能について、in vitro、in vivoの系で検討する。in vivoの系は、培養した癌幹細胞をSCID mouseに移植し、移植した癌幹細胞が増殖能・転移能を有するのか、どの臓器に転移巣を形成するのか、原発

巣と転移巣間で細胞の性質の違いがあるかなどについても検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 血中遊離癌細胞の検出

血液中の遊離癌細胞を直接測定・解析するシステム“CellSearch™”を用い、消化器癌患者より15mlの末梢血中のサイトケラチン陽性細胞(=癌細胞)の検出を試みた。しかし、十分な細胞数が得られる症例は限られており、しかも、CellSearch™の解析で使用する試薬の費用が高額であるため、全ての症例を最初からCellSearch™で解析するのは非効率的である。よって、末梢血中に十分な量の癌細胞が存在する症例を選別する必要性が生じた。

RT-PCR法にかわる方法として、低温反応と迅速性を特徴とする新しい核酸増幅法が続々と登場してきた。TRC(transcription-reverse transcription concerted reaction)法は、RNAを直接増幅すること、増幅産物を特異的に検出すること、検査手技が極めて簡便であることから、迅速診断法として有望である。CellSearch™による血中遊離癌細胞の検出のために採取した15mlの末梢血の一部を使用し、その中に遊離癌細胞が存在するかどうか迅速に判断できれば、採血を繰り返すことなく、この血液検体をそのままCellSearch™による解析へ使用することができる。TRC法による高感度で特異性の高い迅速診断法を確立できたため、この方法でCEAを指標とした末梢血中遊離癌細胞のスクリーニングを行い、血液中に循環癌細胞が多く存在すると考えられる消化器癌患者を抽出し、“CellSearch™”を用い、15mlの末梢血中のサイトケラチン陽性癌細胞(=癌細胞)を検出した。その結果、大腸癌患者2名、胃癌患者3名、食道癌患者1名で血液15ml当たり100個以上の癌細胞が検出できた。

### (2) 癌幹細胞の同定

CellSearch™で得られたサイトケラチン陽性細胞についてFACS解析を行う予定であったが、細胞数が少なかったため、RNAを抽出し、arrayによる発現解析を行った。その結果、癌細胞関連遺伝子、幹細胞関連遺伝子が強く発現していることが確認され、CellSearch™で得られたサイトケラチン陽性細胞は癌幹細胞の可能性があると考えられた。

### (3) 癌幹細胞の機能解析

(2)で得られたサイトケラチン陽性細胞(癌幹細胞?)を培養しているが、細胞増殖のスピードが遅く、浸潤能、分化能、増殖能、転移形成能についてin vitroの系での検討はまだ行っていない。

in vivo の系は、単離したサイトケラチン陽性細胞を直接 NOD/SCID mouse に移植(皮下と腎皮膜下)し、移植した癌幹細胞が増殖能・転移能を有するのか、どの臓器に転移巣を形成するのか、観察を行っているところであるが、やはり、細胞の増殖のスピードが遅く、増殖を待っているところである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 22 件)

Hayashi N, Mima K, Nagai Y, Baba Y, Imamura Y, Hiyoshi Y, Nakamura T, Yoshida N, Toyama E, Miyanari N, Watanabe M, Baba H: Small gastric submucosal tumour developed in a young girl. Gut 掲載予定, 査読有

Watanabe M, Yoshida N, Karashima R, Sato N, Hirashima K, Imamura Y, Hiyoshi Y, Nagai Y, Iwagami S, Toyama E, Hayashi N, Baba H: Trans cervical superior mediastinal lymph node dissection combined with transhiatal lower esophageal dissection before transthoracic esophagectomy: a safe approach for salvage esophagectomy. J Am Coll Surg 208: e7-e9, 2009, 査読有

Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Watanabe M, Baba H: MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 15: 1915-1922, 2009, 査読有

Hiyoshi Y, Watanabe M, Imamura Y, Nagai Y, Baba Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Baba H: The relationship between the glucose transporter type 1 expression and F-fluorodeoxyglucose uptake in esophageal squamous cell carcinoma. Oncology 76: 286-292, 2009, 査読有

平島浩太郎, 林 尚子, 佐藤伸隆, 辛島龍一, 今村 裕, 日吉幸晴, 長井洋平, 外山栄一郎, 渡邊雅之, 馬場秀夫: 大腸癌化学療法の実際 ファーストライン どう選ぶ, どう行うか FOLFOX. 消化器の臨床 11: 491-498, 2009, 査読有

Hayashi N, Imamura Y, Hiyoshi Y, Takamori H, Beppu T, Hirota M, Baba H: Rapid Genotyping of Tumor Necrosis Factor Alpha with Fluorogenic Hybridization Probes on the LightCycler™. Clin Exp Med 8: 217-224, 2008, 査読有

Baba Y, Iyama K, Ikeda K, Ishikawa S, Hayashi N, Miyanari N, Sado Y, Ninomiya Y, Baba H: The expression of type IV collagen 6 chain is related to the prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol 15:555-65, 2008, 査読有

Baba Y, Iyama K, Hirashima K, Nagai Y, Yoshida N, Hayashi N, Miyanari N, Baba H: Laminin-332 promotes the invasion of oesophageal squamous cell carcinoma via the PI3K activation. Br J Cancer 98: 974-980, 2008, 査読有

Beppu T, Horino K, Komori H, Sugiyama S, Masuda T, Hayashi H, Okabe H, Ohtao R, Imseung C, Hayashi N, Watanabe M, Baba H: Thermal ablation for colorectal liver metastases. Thermal Medicine 24:83-89, 2008, 査読有

Beppu T, Horino K, Komori H, Masuda T, Hayashi H, Okabe H, Okabe O, Hayashi N, Takamori H, Baba H: Advances in endoscopic surgery for hepatocellular carcinoma. J Microwave Surg 26: 67-72, 2008, 査読有

Hirota M, Kanemitsu K, Takamori H, Chikamoto A, Hayashi N, Horino K, Baba H: Percutaneous trans fistulous pancreatic duct drainage and interventional pancreatojejunostomy as a treatment option for intractable pancreatic fistula. Am J Surg 196: 280-284, 2008, 査読有

Toyama E, Honda S, Baba Y, Ishikawa S, Hayashi N, Miyanari N, Baba H: "Tornado Roux-en-Y" anastomosis in laparoscopy-assisted distal gastrectomy. Gastric Cancer 11: 181-185, 2008, 査読有

Toyama E, Nagai Y, Baba Y, Yoshida N, Hayashi N, Miyanari N, Baba H: A case of thoracoscopically resected benign esophageal schwannoma with high uptake on FDG-PET. Esophagus 5: 167-170, 2008, 査読有

Imamura Y, Baba Y, Ishikawa S, Hiyoshi Y, Nagai Y, Nakamura T, Hayashi N, Miyanari N, Iyama K, Baba H: Heterogeneous prognoses of patients with tumors invaded within muscularis propria according to tumor depth in the layers of the muscularis propria, Gastric Cancer. 11: 219-225, 2008, 査読有

馬場秀夫, 本田志延, 林 尚子, 宮成信友, 別府 透: 大腸がん. MEDICO 39: 18-22, 31-33, 2008, 査読有

田中 洋, 高森啓史, 中原 修, 坂本快郎, 堀野 敬, 林 尚子, 別府 透, 廣田昌彦, 馬場秀夫: がん化学療法の実践 肝癌・胆道癌 胆道癌の化学療法. 外科治療 98: 626-630, 2008, 査読有

外山栄一郎, 外山栄一郎, 岩上志朗, 吉田直矢, 林 尚子, 渡邊雅之, 馬場秀夫: 鈍的剥離を中心とした腹腔鏡下直腸切除術の工夫 2時間で行える低位前方切除術. 手術 62: 1561-1566, 2008, 査読有

馬場秀夫, 宮成信友, 林 尚子: 24 進行胃癌に対する術前化学療法の適応と問題点について教えてください. 消化器癌の外科治療 1: 133-137, 2008, 査読有

吉田直矢, 林 尚子, 渡邊雅之, 馬場秀夫: 小手術各論 CV ポート造設法(解説/特集). 外科 70: 1461-1464, 2008, 査読有

佐藤伸隆, 林 尚子, 今村 裕, 辛島龍一, 平島浩太郎, 日吉幸晴, 長井洋平, 渡邊雅之, 馬場秀夫: オンコロジーエマージェンシーへの対応 消化器系 腹部領域における Oncologic Emergency. 癌と化学療法 35: 2316-2320, 2008, 査読有

21馬場秀夫, 別府透, 石河隆敏, 本田志延, 外山栄一郎, 堀野敬, 林尚子, 宮成信友, 高森啓史, 廣田昌彦: 大腸癌肝転移に対する new strategy. 臨床外科 62: 1211-1217, 2007, 査読無

22馬場秀夫, 本田志延, 外山栄一郎, 林 尚子, 宮成信友, 廣田昌彦: 癌の治療の最前線. Frontiers in Gastroenterol 12: 10-17, 2007, 査読無

〔学会発表〕(計 7 件)

林 尚子; 熊本県における切除不能・再発大腸癌に対するベアジズマブの使用状況. 第42回制癌剤適応研究会, 2009年2月20日, 東京

林 尚子; H2およびH3の肝限局性転移を有する結腸・直腸における術前化学療法(mFOLFOX6+Bevacizumab)の有効性と安全性の検討. 第1回熊本大腸癌肝転移治療研究会, 2009年1月30日, 熊本

林 尚子; 直腸癌に対する集学的治療 直腸癌局所再発の外科治療を中心に. 第46回日本癌治療学会総会, 2008年11月1日, 名古屋

林 尚子: 再発大腸癌に対する治療の現状と展望. 第63回 日本消化器外科学会総会, 2008年7月17日, 北海道

林 尚子: Isolated tumor cell の臨床的意義と臨床応用の可能性. 第108回 日本外科学会定期学術集会, 2008年5月17日, 長崎(サージカルフォーラム)

林 尚子: 新しい核酸増幅法“TRC法”を用いた迅速遊離癌細胞診断法の確立とその臨床応用. 第4回日本消化管学会総会学術集会, 2008年2月8日, 大阪国際会議場

Yu Imamura: Rapid Genetic Diagnosis with the Transcription Reverse-transcription Concerted reaction (TRC) method is useful for detection of a few gastrointestinal cancer cells with carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA. AACR-NCI-EORTC International conference, October 22-26, 2007, San Francisco USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 尚子 (HAYASHI NAKO)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20452899

(2)研究分担者

廣田 昌彦 (HIROTA MASAHIKO)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医  
師  
研究者番号：80284769

(3)連携研究者

三森 功士 (MIMORI KOOSHI) (2007 年度  
は研究分担者)  
九州大学・生体防御医学研究所・助教  
研究者番号：50322748