

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390374

研究課題名(和文) 肺癌における循環血液中腫瘍細胞と血管内皮細胞の臨床的・探索的検討

研究課題名(英文) Clinical and translational evaluation of circulating tumor cells and circulating endothelial cells in lung cancer

研究代表者

田中 文啓 (TANAKA FUMIHIRO)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：10283673

研究成果の概要(和文)：肺癌の治療成績は不良であり、その最大の原因は高頻度に起こる遠隔転移である。そこでCTやPET等の最新の検査機器を用いても発見が困難な微小転移の指標として、血液中に存在する癌細胞(循環腫瘍細胞)の検出を試みた。その結果、肺癌患者の約30%に循環腫瘍細胞が検出され、肺癌の診断や進行度の評価に有用であることが判明した。また、癌の進行に必要な血管新生の指標である血液中の内皮細胞も同様に肺癌の診断に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prognosis of primary lung cancer patients is not satisfactory, which is mostly caused by frequent development of distant metastasis. We tried to detect circulating tumor cells (CTCs) that circulate in the peripheral blood, because CTC is a marker of distant metastasis. As a result, we revealed that CTCs were detected in about 30% of lung cancer patients, and that the number of CTCs was useful marker in the diagnosis and evaluation of tumor progression. Moreover, we evaluated circulating endothelial cells (CECs), which represent tumor angiogenesis essential for tumor progression, and revealed that CEC-count might be also useful in the diagnosis of lung cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：呼吸器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学・呼吸器外科学

キーワード：肺癌・循環腫瘍細胞・循環内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性肺癌の予後は不良であり、完全切除されても半数以上の患者は再発する。再発予防のために術後に化学療法を行うことが推奨されているが、術後化学療法をより効果的に行うためには、術後化学療法が必要とされる予後不良患者を選択したり、術後化学療法の効果を予測するバイオマーカーの開発や確立が求められていた。

(2) 循環腫瘍細胞(以下CTC)は、原発巣から遊離し血液中を循環する腫瘍細胞であり、微小転移のマーカーとしての有用性が乳癌等で示唆されていたが、肺癌での研究はほぼ皆無であった。

(3) 循環内皮細胞(以下CEC)は、腫瘍進展に必要な血管新生の指標として期待され、腫瘍の進展や抗癌剤の治療効果と示すバイオマーカーとして期待されてきた。しかしながら

肺癌におけるその臨床的意義は不明であった。

(4) CTCやCECを自動的に末梢血液より分離定量するシステム(“CellSearch”システム)が開発され、米国では乳癌・前立腺癌・結腸直腸癌においてCTCの臨床使用が認可された。

2. 研究の目的

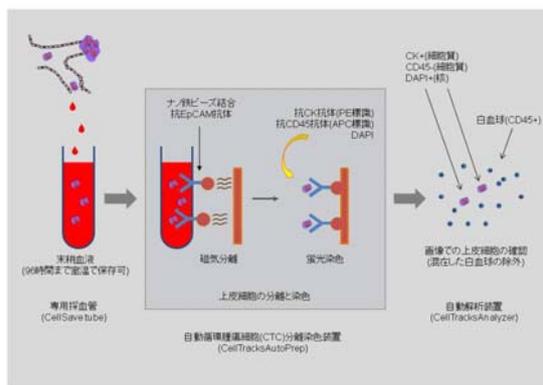
(1) CTCやCECは末梢血液を採取するだけで容易に繰り返し検討しうるバイオマーカーであり、癌の診断や治療の指標として有用性が期待される。そこで本研究では、肺癌における“CellSearch”システムにより検出されたCTCやCECの臨床的意義を明らかにし、同時に今後の臨床応用の可能性を探索的に検討することを目的とした。具体的には以下の通り。

(2) CTCやCECが、肺癌の診断や進行度評価に有用なマーカーか否かを明らかにする。また、治療効果や予後予測のマーカーとしての有用性も明らかにする。

(3) CTCを用いた癌細胞の遺伝子変異解析が可能か否かを検討し、その経時的モニタリングの可能性についても明らかにする。

3. 研究の方法

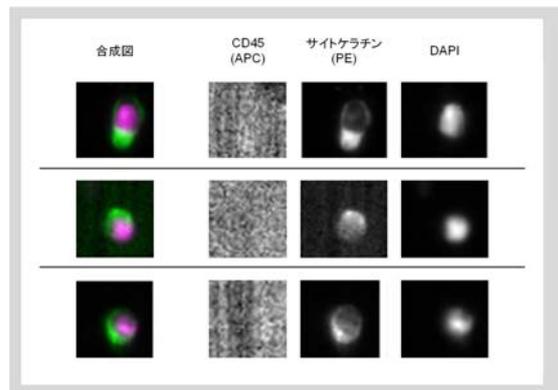
(1) 肺癌患者と非悪性疾患患者の末梢血液を採取し、血液7.5mL中のCTCおよび同4.0mL中のCECを“CellSearch”システムを用いて検出しこれを定量する。手順は以下の通り。
① 末梢血液中のCTCやCECを磁気ビーズに結合した抗EpCAM抗体(CTC)や抗CD146抗体(CEC)を用いて免疫磁気的に分離する(下図)。



② 分離された細胞は、蛍光染色(CD45/DAPIおよびCytokeratin[CTC]やCD105[CEC])され、ディスプレイに表示される。

③ 混入した白血球はCD45陽性となるのでこれを除外し、細胞質がCytokeratin(CTC)

やCD105(CEC)陽性でかつその中にDAPIで染色される核が含まれる細胞をCTCやCECと判定し、これを定量する(下図)。



④ 肺癌患者と非悪性疾患患者のCTC/CECの検出頻度や個数の相違を後ろ向きに検討。

(2) (1)の結果をもとに、肺癌患者と非悪性疾患患者の鑑別や、肺癌患者の進行度評価にCTC/CECが有用か否かを前向きに検討する。すなわち、肺癌疑いで確定診断目的に受診した患者の血液を採取して、全項の方法でCTC/CECを定量。ROC解析等により、CTC/CECの診断能を評価する。また、再発や予後との関連も検討する。

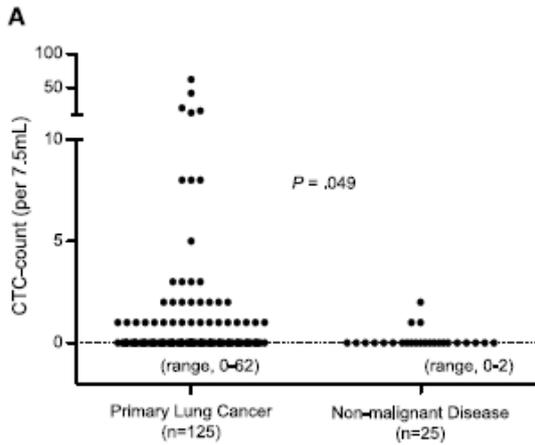
(3) (1)や(2)で分離されたCTCから遺伝子(特にDNA)を抽出し、EGFR/K-ras/p53遺伝子変異の検出が可能か否かを検討する。同時に、化学療法(特にEGFRチロシンキナーゼ阻害剤)施行の経過中にCTCを定期的に採取してその遺伝子変異(特にEGFR遺伝子)をモニタリングし、耐性遺伝子出現などの早期検出が可能か否かを検討する。

4. 研究成果

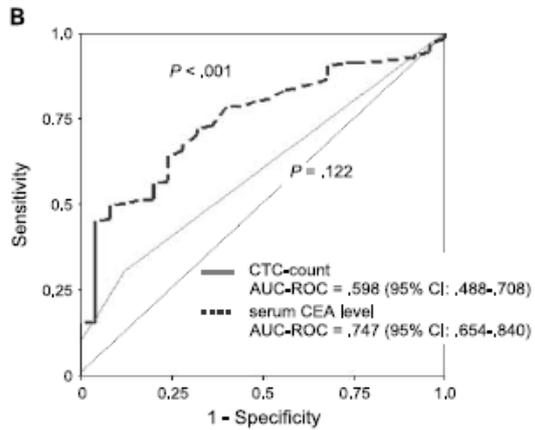
(1) 当初の後ろ向きの検討で、本システムを用いて肺癌患者の末梢血液中に腫瘍細胞が再現性を持って検出されること、また陽性率や個数は非悪性疾患患者と比較して多いことが示された。

(2) 以上の結果を踏まえてCTCの肺癌診断における診断能について前向きに検討を行った。

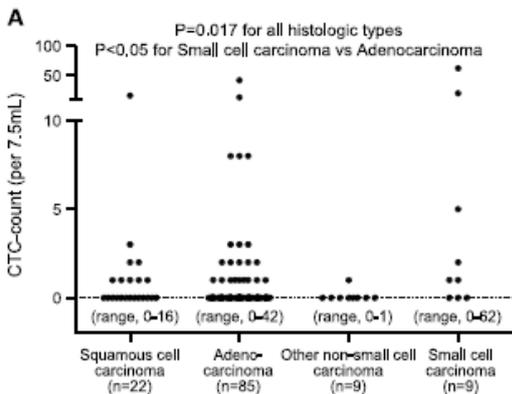
① 原発性肺癌疑いで受診した連続した150例を対象に、CTCを定量した。最終病理診断は、肺癌症例125例で非悪性疾患25例であった。下図に示す通り、肺癌患者および非悪性疾患患者でのCTC陽性率はそれぞれ30.6%(個数は0-62個)および12.0%(個数は0-2個)であり、肺癌患者ではCTC個数が有意に多かった。



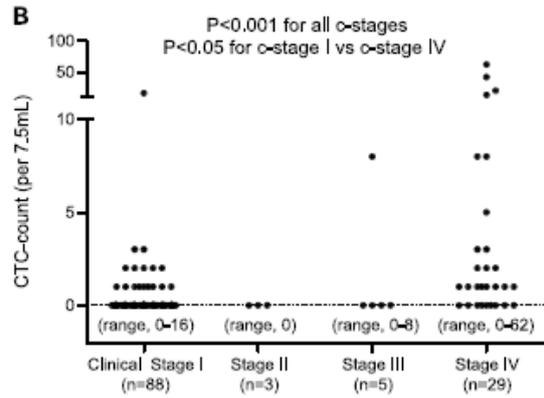
しかしながら、ROC 解析では、CTC は肺癌と非悪性疾患を鑑別するバイオマーカーとしての有用性を示すことができなかった(下図、AUC=0.598; P=0.122)。その最大の理由としては、CTC 検出感度が十分ではない(肺癌患者でも CTC 陽性率 30.6%)ことが挙げられる。



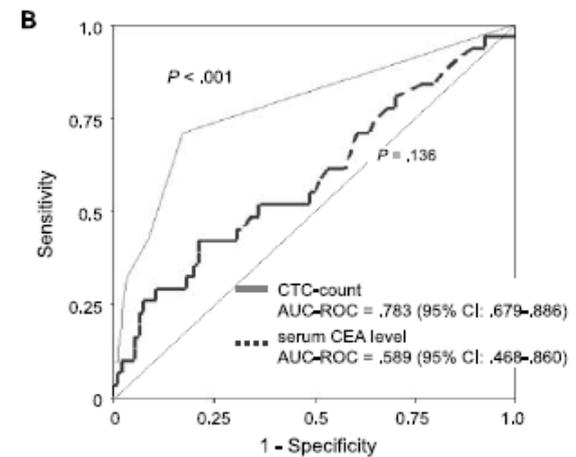
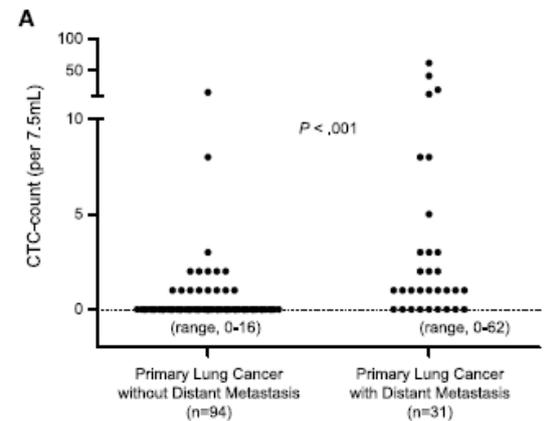
② 一方、肺癌の中でも小細胞肺癌では CTC 陽性率が 67%と高く(下図)、有用な診断マーカーとなりうる可能性があり、現在前向きに予後や治療効果との関連を検討中である。



③肺癌の病期別の検討では、病期の進行とともに有意に CTC 陽性率や個数が増加が見られ、腫瘍進行度の指標として期待される(下図)。

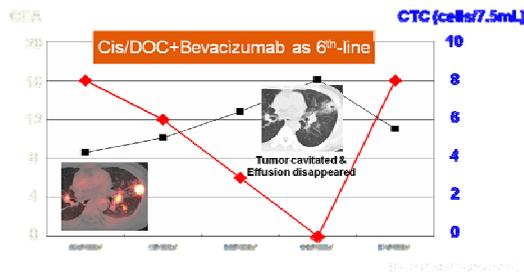


④ 特に、遠隔転移陰性例と陽性例では、CTC が有意に遠隔転移陽性肺癌症例で多く(下図上段)、ROC 解析でも CTC が遠隔転移の有無の診断に有用なマーカーであることが示された(下図下段、AUC=0.783; P<0.001)。



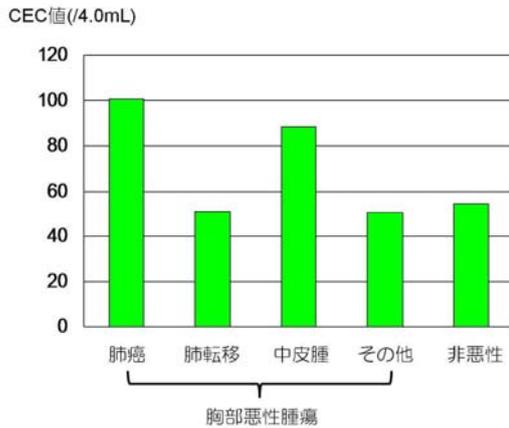
⑤ 現在、上記症例の手術後の再発や予後の経過観察中であり、予後因子としての意義についても明らかにする予定である。また、化学療法の効果との関連についても、検討中であり、少数例であるが CT/PET よりも治療効果をより反映する可能性が示唆された(下図、化学療法中の CTC や CT/PET および血清 CEC 値の変動。空洞化により CT では腫瘍縮小の評価が困難であったが CTC は陰性化、治療後

長期生存し CTC が治療マーカーとして有用で合った症例)

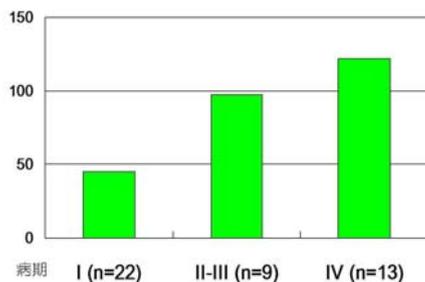


(3) CEA 値の肺癌におけるバイオマーカーとしての有用性を後ろ向きに検討した。

① その結果、原発性肺癌では CEA が非悪性疾患と比較して有意に高く (平均値はそれぞれ 100 個および 56 個)、肺癌と非悪性疾患の鑑別に有用なマーカーである可能性が示された (下図)。



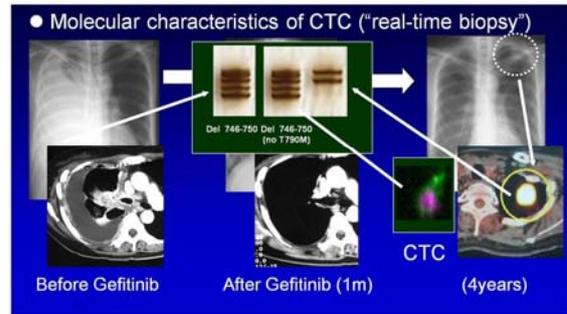
② また、肺癌患者の中では、CEA 値は病期の進行とともに増加する傾向があり、肺癌進行度のマーカーとしての有用性が示唆された (下図)。



③ 以上の結果に基づき、(2)に含まれる症例において CEA の肺癌診断におけるバイオマーカーとしての意義を前向きに検討中である。

(4) CTC から直接抽出した DNA を鋳型とした PCR 反応は信頼性に欠けることが明らかとなった。そこで、CTC 検出の蛍光染色過程を省力して PCR による遺伝子増幅を試みたところ、EGFR 遺伝子については肺癌で高頻度に変異

を認めるエクソン 19、20 および 21 ともに再現性をもって PCR 増幅可能でありまた遺伝子変異が可能であることが判明した。現在、これを用いて EGFR 遺伝子変異陽性例について、EGFR-TKI 治療中の経時的な EGFR 遺伝子変異 (抵抗性変異出現有無) のモニタリングを探索的に行っている (下図、EGFR エクソン 19 欠損変異例に対してゲフィチニブを 4 年間にわたって投与中の症例。CTC を経時的に採取してその EGFR 変異をモニタリングしている)



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tanaka F, Yoneda K, Hasegawa S, Circulating tumor cells (CTCs) in lung cancer, Lung Cancer Targets and Ther, 1 巻、査読有、2010、77-84
- ② Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, Rahman S, Tsubota N, Tsujimura T, Kuribayashi L, Fukuoka K, Nakano T, Hasegawa S, Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer, Clin Cancer Res, 査読有、15 巻、2009、6980-6986
- ③ Okumura Y, Tanaka F, Yoneda K, Hashimoto M, Takuwa T, Kondo N, Hasegawa S, Circulating tumor cells in pulmonary venous blood of primary lung cancer patients, Ann Thorac Surg, 査読有、87 巻、2009、1669-1675
- ④ Tanaka F, Yoneda K, Okumura Y, Hasegawa S, Tumor cells in the pulmonary vein, Ann Thorac Surg, 査読有、88 巻、2009、2071

[学会発表] (計 4 件)

- ① 田中文啓、血中のがん細胞の検出と臨床的意義、第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 23 日、大阪市
- ② Tanaka F, Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer, 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA) (International Session)、2009 年 10 月

1日、横浜市

- ③ Tanaka F, circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer, 7th International Symposium on Minimal Residual Cancer, 2009年9月19日、アテネ市(ギリシャ)
- ④ Tanaka F, Circulating tumor cells (CTCs) and endothelial cells (CECs) in malignant pleural mesothelioma (MPM) and primary lung cancer (LC), 44th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2008年6月3日、シカゴ市(米国)

[その他]

ホームページ情報:

http://www.uoeh-hospital.jp/hospital/introduction/sec_fac/006.html

または

http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/2geka/intro_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 文啓 (TANAKA FUMIHIRO)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10283673

(2) 研究分担者

近藤 展行 (KONDO NOBUYUKI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50402889

奥村 好邦 (OKUMURA YOSHITOMO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30388813
(H20→H21: 研究分担者)

多久和 輝尚 (TAKUWA TERUHISA)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00412049
(H20→H21: 研究分担者)