

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591568

研究課題名 (和文) 胃癌患者の末梢血中腫瘍細胞の解析：癌幹細胞との関連と臨床応用への展開
 研究課題名 (英文) An analysis of circulating tumor cells in gastric cancer patients: relation to cancer stem cells and towards clinical application

研究代表者

岡部 寛 (OKABE HIROSHI)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10335250

研究成果の概要 (和文)：胃癌患者の遠隔転移が成立するためには、血液中に転移能のある癌細胞が循環していることが必要条件と考えられる。本研究では、がん細胞の抗原を利用して血液中のがん細胞を捕捉して、形態学的に生きた状態のがん細胞の有無の計測を行った。その結果高度に進行した胃癌では、40%近い患者でがん細胞が検出され、また有意に予後不良であることが判明した。近い将来に胃癌の治療効果のモニタリングや、化学療法の適応決定への臨床応用が期待できる。

研究成果の概要 (英文)：For primary gastric cancer to metastasize, it is necessary for tumor cells to circulate in the peripheral blood as a viable state. In this study, viable circulating tumor cells (CTCs) were successfully detected in nearly 40% of patients with highly advanced gastric cancer. Moreover, tumors of patients with positive CTCs were shown to progress earlier. Detecting CTCs can be clinically applied for selecting optimal patients for induction chemotherapy and would be useful for monitoring of therapeutic effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：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：循環血中腫瘍細胞、胃癌、Circulating tumor cell

1. 研究開始当初の背景

胃癌は依然日本における癌罹患数の第1位を占めており、特に進行胃癌の治療成績は不良である。我々は、特に予後の不良なIV期胃癌の治療成績向上のために積極的にテーエスワンとシスプラチンを用いた術前化学療法を施行してきた。術前化学療法の奏効率は約50%とこれまでのレジメンに比して高率で、奏効例では手術施行による明らかな予後延長効果を認めており、今後標準治療として定着する可能性が高いと考えている。しかし、非奏効例では手術による延命効

果を認めず、手術適応にはならない。よって、化学療法の治療効果判定は極めて重要な意味をもつが、胃癌においては主病巣の治療効果の客観的評価が困難で、国際的な固形腫瘍の治療評価基準であるRECISTに従うと多くが評価不能に分類されてしまうという問題がある。複数の画像検査、腫瘍マーカーなどを組み合わせて総合的に判断しているのが現状であるが、判断に迷うことも多く、より客観的かつ非侵襲的な効果判定法の開発が望まれている。

最近、胃癌よりもより化学療法の効果の高

い乳癌においては、末梢循環血液中の腫瘍細胞を検出することが、化学療法の治療効果のモニターや予後の予測に有効であるとの報告がみられ、臨床応用されつつある。以前より、胃癌を含む一部の進行癌患者では末梢血液中に腫瘍細胞が認められることが知られており、末梢血中腫瘍細胞（Circulating Tumor Cell : CTC）と呼ばれてきたが、評価方法により偽陽性が多いことや孤立性の腫瘍細胞は転移能をもたないとの知見などから、その臨床的意義には異論が多かった。しかし、近年免疫磁気法による CTC の自動測定法が開発されたことにより偽陽性率の問題がほぼ解決してきている。同様の方法を用いて胃癌における感受性と特異度の高い CTC の測定方法を確立できれば、胃癌においても化学療法の治療効果判定法や感受性評価法として有効である可能性が高く、高度進行胃癌の実地臨床のうえで使用できる数少ない客観的な指標として極めて有用なものになると考えられる。一方で、「臨床的転移の以前から、CTC が存在しており、転移が成立するかどうかは標的臓器の環境による」（Fisher, Cancer Res 40:3863, 1980）とも考えられ、基礎研究では CTC の量的な検出のみではこの評価法の根拠を与えない立場もある。そこで、我々は最近注目されている癌幹細胞に着目した。癌幹細胞は、tumor initiating cells とも考えられており、まさに転移臓器で腫瘍塊を形成しはじめる細胞である。CTC を質的に評価し、癌幹細胞としての特徴を判定することができれば、より精度の高い予後評価が可能かもしれない。

進行胃癌に対しては、われわれの教室を中心とした臨床試験グループを含め複数の術前化学療法、導入化学療法の臨床試験が行われているが、その適切な対象についてはコンセンサスがないう。臨床検体を用いた本研究により、胃癌に対する化学療法の適応や、治療効果モニタリングに CTC 検出法を臨床応用することができれば極めて有用である。

2. 研究の目的

免疫磁気法を用いた高感度かつ高精度の胃癌末梢血中腫瘍細胞 (CTC) 測定法の開発。乳癌において効果的に CTC を同定できる EpCAM 抗体+サイトケラチン抗体の組み合わせが、胃癌の CTC の検出において同等に有効かどうか調べる。その過程で、CTC が胃癌の幹細胞としての特徴・能力を持つかどうかについても検討する。また、CTC 測定法を用いた高度進行胃癌の治療効果判定法、および化学療法に対する感受性試験法の開発などにつなげることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 胃癌患者血液試料中の CTC 検出

画像評価もしくは腹腔鏡検査で進行癌と診断された胃癌患者を対象に、治療前に末梢血液を 10mL 採取した。血液試料は磁気ビーズに結合した抗 EpCAM 抗体を用いて、EpCAM 陽性細胞をソーティング・回収したのちに、抗サイトケラチン (CK8/CK18/CK19) 抗体および CD45 抗体による免疫染色を行った。抗サイトケラチン陽性細胞のうち、CD45 抗体陽性細胞は好中球として除外し、細胞膜が保たれており、細胞質内に核が正常の形態で存在しているものを Viable な循環血液中腫瘍細胞 (CTC) と定義して、その個数をカウントした。なお、本解析には Veridex 社の CellSearch system を用いて、CTC 候補細胞の自動撮影を行い、最終判定を目視によって行った。

個々の症例での検討項目は、CTC 数 (血液 7.5ml 中の腫瘍細胞数) に加えて、胃癌取り扱い規約第 14 版に沿った臨床的病期診断 (T, N, M, H, P, CY 因子) と遠隔転移部位とした。また、手術施行例では手術後の最終病期診断と病理学的治療効果のデータも採取した。CTC 陽性患者については治療後 (手術後もしくは化学療法後) の血液試料も採取して CTC 測定を行い、治療による CTC の増減の検討を行った。

以上の血液試料を用いる臨床研究は京都大学医学研究科および医学部附属病院の医の倫理委員会の承認を得たうえで、対象患者に研究内容について説明文書を用いたインフォームドコンセントを行ない、文書による同意を得たうえで血液試料を採取して行ない、研究期間中に 79 名の患者の血液試料の分析を行った。

(2) 胃癌 CTC のマーカーの妥当性の検討

マーカー検討は retrospective な系で行う。図 1 を参照して、EpCAM 陽性として採取される CTC が CD45 陰性で、CK8/18/19 陽性であることを指標としている。同じ表現系が手術摘出した細胞と同じであることを検討する。

- 1) 手術標本を、CK8/18/19 で免疫染色する。また、EpCAM での免疫染色を施行。
- 2) 手術標本から胃癌細胞株を分離・培養する。FACS にて、EpCAM の陽性の割合を調べる。
- 3) RT-PCR, western blot で確認する。

(3) 癌幹細胞の性質の検討

患者血液試料から回収された CTC を用いて、既知の幹細胞候補マーカーの発現の検討や、マイクロアレイを用いた主病巣の癌細胞との遺伝子発現プロファイルの違いの検討や、ヌードマウスへの細胞移植による腫瘍形成能の検討による幹細胞特性の解析などを予定していたが、胃癌における CTC 検出率は成果 4-(1) にあるように高度転移陽性胃癌では

一定の頻度がみられたものの、その個数は試料中に平均数個以内にとどまっており、予定していた通りの方法での回収 CTC を用いた研究は困難と考え断念した。

2) 癌細胞株を用いた実験

胃癌の血行性転移モデルはまだよいものがなく、MKN シリーズの胃癌細胞株あるいは上記実験で確立した胃癌細胞を用いてこのモデルを作成する。ヌードマウス脾臓内注射し、肝臓への腫瘍形成能を調べる。転移がみられたものを複数回移植を繰り返し、高転移株を樹立する。このモデルを作成ののち、この細胞株に GFP 発現ベクターを遺伝子導入する。血液中の GFP 陽性細胞を採取・培養し、上記 1) と同様の実験を施行する。

4. 研究成果

(1) 進行胃癌における CTC の検出率

治療前の胃癌臨床進行度 (cStage) 別に CTC 陽性率をみたものが下記表 1 である。研究対象は腫瘍深達度 MP 以上の進行癌だが、リンパ節転移のない進行度 I 期の症例では CTC 陽性例を認めなかった。一方、遠隔転移を伴う進行度 IV 期例では 39.1% に CTC 陽性を認めた。対象症例全体の CTC 陽性率は 19.0% であった。

表 1 : 臨床進行度別 CTC 陽性率

cStage	n	CTC 陽性	陽性率(%)
I	16	0	0.0
II	14	1	7.1
III	26	5	19.2
IV	23	9	39.1
total	79	15	19.0

(2) CTC 陽性例に関連する病理学的因子

CTC 陰性・陽性例の各臨床因子を比較したものが表 2 である。CTC の陽性率は、腫瘍の漿膜浸潤の有無、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、腹膜転移および腹腔細胞診の陽性、腫瘍マーカーの上昇、の各因子と有意に相関していた。

多変量解析 (ロジスティック回帰解析) では遠隔転移の有無がオッズ比 7.2 (P=0.004) と最も有意に CTC 陽性と相関しており、癌性血液中の腫瘍細胞の出現が、遠隔転移の成立に密接に関連していることが示唆された。

表 2 : 臨床因子と CTC

臨床因子	CTC 陰性 (n=64)	CTC 陽性 (n=15)	P value*
Sex M/F	27/37	3/12	0.145
Age 平均	67.7	61.2	0.061**
組織型 Int/Dif	20/44	2/13	0.212
漿膜 浸潤	29/35	1/14	0.007
cN:0/1	24/40	1/14	0.029
cM:0/1	50/14	6/9	0.009
CY:0/1	50/8	7/6	0.030*
cP:0/1	53/9	8/7	0.016
CEA :0/1	54/10	8/7	0.015
CA19-9 :0/1	54/10	8/7	0.015

* Fischer's exact test

** Student's t-test

(3) CTC 消失と化学療法奏効度との相関、特に評価可能例では腹膜播種、腹腔内細胞診陰性化との相関

CTC 陽性例 15 例中、10 例で化学療法が先行して施行された。うち 2 例は報告書作成時点で化学療法施行中であり、化学療法の奏効と CTC の相関の解析が評価可能な症例は 8 例であった。

臨床評価 (画像評価) による化学療法奏効度の内訳は、CR 0 例、PR 4 例、SD 1 例、NE 3 例であった。8 例中 3 例で化学療法後の血液サンプル中の CTC の消失が確認されたが、その臨床評価の内訳は、PR 1 例、SD 1 例、NE 1 例であり、対象症例は少ないものの臨床評価との相関はみられなかった。

無増悪期間中央値でみると、CTC 消失例は 382 日、CTC 残存例は 136 日と CTC 消失例でより長い傾向がみられ、画像評価よりも治療効果判定として優れている可能性もあり、さらに症例数を増やして検討する価値があると考えられた。

(4) 手術による治癒度と CTC 消失の相関

手術適応例での CTC 陽性率が低く、手術前に CTC 陽性の状態で手術が施行されたのは 5 例のみであった。5 例中 4 例で R0 切除 (遺残なし) が達成されたが、うち 1 例では CTC が残存していた。CTC 陽性例の予後は術後 3 カ月現在無再発であるが予後追跡中である。手

術治療度の評価としての CTC の有用性は検討の余地が残されているが、ベースラインの陽性率が低いことから、高度進行例を除いては有用性が乏しいのではないかと考えられた。

(5) 治療前開始前 CTC 陽性と生存予後との関連

CTC 陰性群 (n=64) と陽性群 (n=15) の生存期間中央値はそれぞれ 914 日、564 日で有意差は認めなかった (P=0.142) が、無再発生存期間でみると、陰性群は中央値にまだ達していないのに対し、陽性群は 176 日と有意に CTC 陽性群は予後不良であった (P<0.0001)。

(6) 胃癌 CTC の至適マーカーについて

胃癌サンプルからの初代培養により胃癌細胞株を作成し、臨床標本中と細胞株中の EpCAM 陽性細胞の割合や、幹細胞候補マーカーの染色の検討を行う予定であったが、初代培養による細胞株樹立効率が非常に悪く、本研究期間内に一定の成果を出すことはできなかった。今後、既報告の候補マーカーについて、臨床検体および CTC 中の発現の検討を行い、より specificity を挙げる研究を行うことを検討している。

まとめ：胃癌患者においては遠隔転移陽性の高度進行胃癌患者群で 40%近い患者で CTC 陽性であることが示された。予後予測の強力なマーカーであることも示され、高度進行胃癌患者を対象とした臨床応用への道筋がみえてきたといえる。胃癌に対する CTC の有用性は未だ報告されておらず、国際的にも大変貴重なデータになると考えられる。

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 3 件)

- ①岡部 寛、坂井義治、Stage IV 胃癌に対する「術前化学療法」：切除率の向上を目指して、癌の臨床 2010; 56(4):303-310、査読無
- ②岡部 寛、坂井義治、切除不能未分化胃癌の治療、外科治療、2010; 103(4): 371-379、査読無
- ③Okabe H, Ueda S, Obama K, Hosogi H, Sakai Y, Induction chemotherapy with S-1 plus cisplatin followed by surgery for the treatment of gastric cancer with peritoneal dissemination, Ann Surg Oncol. 2009; 16(12):3227-3236、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ①岡部 寛、小濱和貴、姜 貴嗣、田中英治、伊丹 淳、坂井義治、Stage IV 胃癌に対する

「術前化学療法」：切除率の向上を目指して日本外科学会、2010年4月9日、名古屋
②細木久裕、岡部 寛、小濱和貴、田中英治、伊丹 淳、坂井義治、切除可能進行胃癌に対する術前化学療法としての S-1+CDDP 併用療法の治療成績、日本消化器外科学会、2009年7月16日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 寛 (OKABE HIROSHI)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10335250

(2) 研究分担者

小濱 和貴 (KAZUTAKA OBAMA)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50322649

(3) 連携研究者

なし