

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591679

研究課題名(和文) 肺癌手術中の循環血液中への腫瘍細胞遊離放出と術後遠隔転移再発の解析
 研究課題名(英文) Tumor cell spread during lung cancer operation and postoperative distant metastasis.

研究代表者 長谷川 誠紀 (HASEGAWA SEIKI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10252438

研究成果の概要(和文)：肺癌術後再発の1つのメカニズムとして、手術操作による原発巣からの腫瘍細胞遊離→肺静脈から循環血液中への放出が考えられるが、これを実証することが困難であった。今回我々は、循環血液中腫瘍細胞(CTC)検出システム“CellSearch”を用いて検証した。連続30例の肺癌に対する肺葉切除術症例において術前末梢血中CTCおよび摘出直後の肺静脈血中CTCを測定した。術前末梢血中CTC陽性例は30例中5例(16.7%、CTC細胞数は1、1、2、3、16)で、腺癌よりも扁平上皮癌で有意に高かった($p=0.028$)。肺静脈血中CTCは30例中29例(96.7%、CTC細胞数は平均1195、中央値81)であった。術前末梢血中CTCと肺静脈血中CTCの値に有意な相関関係を認めなかった。以上の結果から、肺癌手術においてほぼ全例で腫瘍細胞が循環血液中に放出されていることが明らかになった。このことは今後の手術術式(肺動脈処理より肺静脈処理を優先させる、など)に大きなインパクトを与えることになる。現在、術前末梢血中CTCおよび肺静脈血中CTC値と再発の有無につき検討中である。

研究成果の概要(英文)：One possible explanation for postoperative recurrence of lung cancer is intraoperative tumor cell spread. To verify the above hypothesis, we measured circulating tumor cell (CTC) count in both preoperative peripheral venous blood and also pulmonary venous blood of the extracted lobe by CellSearchTM system. CTC was detected in peripheral blood in 5 patients (16.7%; the periCTC-count, 1 in 2 patients and 2, 3, 16 in one patient each), and the incidence was higher in squamous cell carcinoma patients than in adenocarcinoma patients ($p=0.028$). CTC was detected in pulmonary venous blood in most patients (29/30, 96.7%), and the mean and median CTC-counts were 1195 and 81, respectively (range, 0-10034). There was no significant correlation between CTC-count in peripheral blood and in pulmonary venous blood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・肺静脈・遠隔転移

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性肺癌では、完全切除しえても半数以上の症例は主に遠隔転移再発により死に至る。その原因は、手術終了時に存在する微小転移と考えられるが、このような微小転移は手術開始前に既に存在しているほかに、手術操作により原発巣から腫瘍細胞が遊離して肺静脈から循環血液中に放出されて生じる可能性が指摘されている。

(2) 従来、手術操作による原発巣からの腫瘍細胞遊離の可能性は指摘されてきたが、これを実証することが技術的に困難であった

(3) 近年、循環血液中腫瘍細胞検出システム(“CellSearch”)が開発され、血液中の腫瘍細胞が定量できることになった。

(4) もしも(1)の仮説が正しいことが立証されれば、現在一般的に行われている“肺動脈→肺静脈”処理順序が逆に行われるべきであり、手術術式が覆される可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、原発性肺癌手術(肺葉切除)の際に、原発巣から腫瘍細胞が遊離して肺静脈から循環血液中に放出され、これが遠隔転移再発の要因となるか否かを検証する。

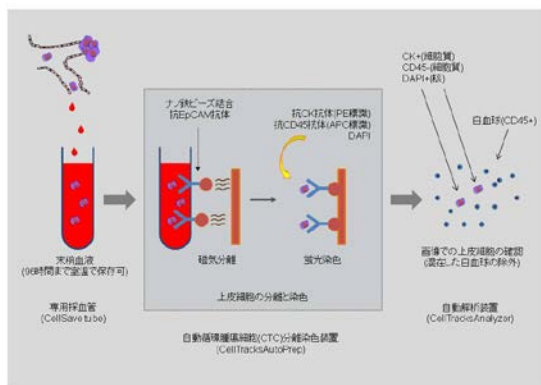
3. 研究の方法

(1) 原発性肺癌に対して肺葉切除を行った連続30例を対象とする。

(2) 採血量は7.5mL、以下の2ポイントで採血した。開胸直前の末梢静脈血、および、摘出直後の肺静脈血。

(3) 血液中腫瘍細胞数の定量化は“CellSearch”システムを用いて行った。手順は以下の通り。

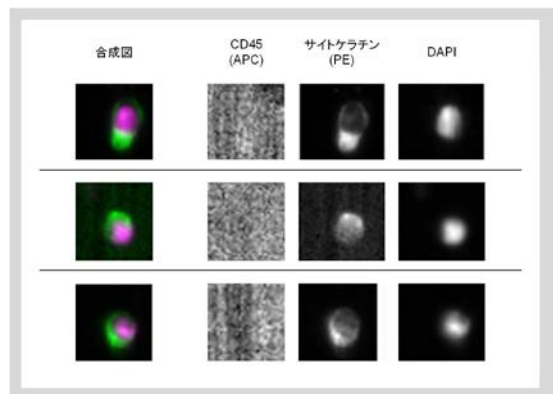
① 末梢血液中のCTCを磁気ビーズに結合した抗EpCAM抗体(CTC)を用いて免疫磁気的に分離する(下図)。



② 分離された細胞は、蛍光染色(CD45/DAPIおよびCytokeratin)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)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と判定し、これを定量する(下図)。



(4) 評価項目

測定された末梢静脈血および肺静脈血中CTC値と患者背景(組織型、病期、腫瘍の局在、血管内腫瘍細胞浸潤の有無、リンパ管内腫瘍細胞浸潤の有無)の関連性を解析する。また、末梢静脈血と肺静脈血中CTC値の相関の有無も解析する。

術後2年間のフォローアップ中の遠隔転移の有無を調査し、遠隔転移が末梢静脈血や肺静脈血中CTC値と何らかの相関があるかどうかを解析する。

4. 研究成果

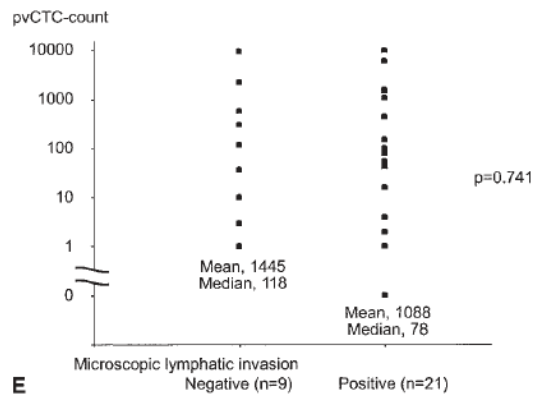
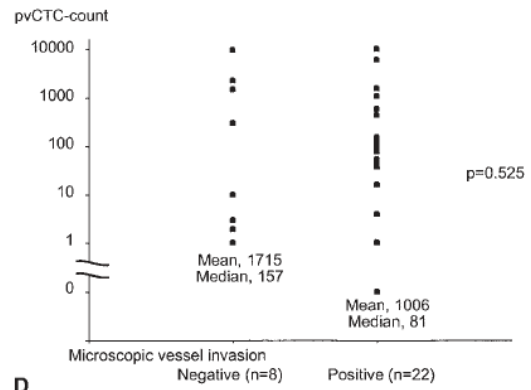
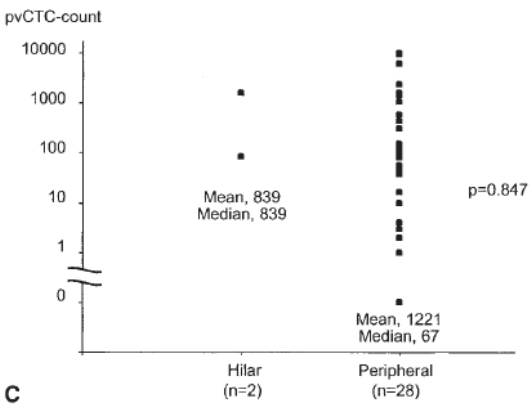
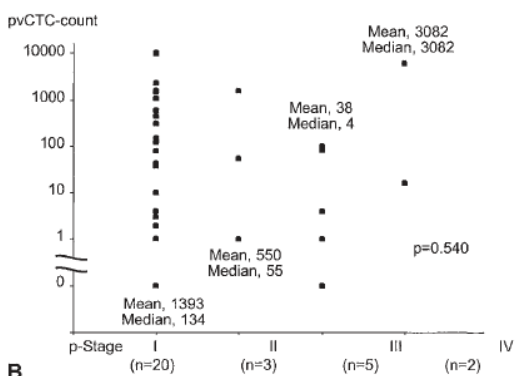
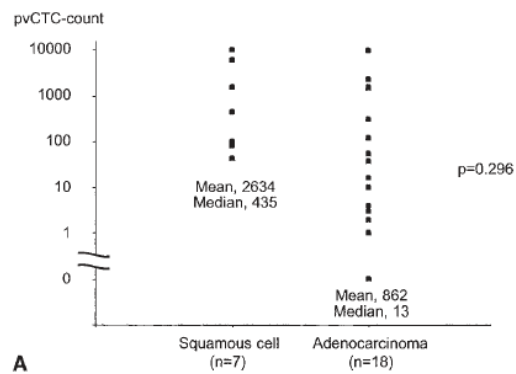
(1) 対象肺癌患者30人の詳細は以下の通りであった。

	No. of Patients (%)
Sex	
Male	21 (70.0)
Female	9 (30.0)
Age	
Mean (years)	65.2
Range	41-80
Histology	
Squamous cell carcinoma	7 (23.3)
Adenocarcinoma	18 (60.0)
Large cell carcinoma	2 (6.7)
Adenosquamous cell carcinoma	1 (3.3)
Pleomorphic carcinoma	1 (3.3)
Small cell carcinoma	1 (3.3)
Pathologic stage	
I	20 (66.7)
II	3 (10.0)
III	5 (16.7)
IV	2 (6.7)
Site of primary tumor	
Hilar	2 (6.7)
Peripheral	28 (93.3)
Extent of lung resection	
Pneumonectomy	2 (6.7)
Lobectomy	28 (93.3)
Vessel invasion of primary tumor	
Negative	8 (26.7)
Positive	22 (73.3)
Lymphatic invasion of primary tumor	
Negative	9 (30.0)
Positive	21 (70.0)
Total	30 (100)

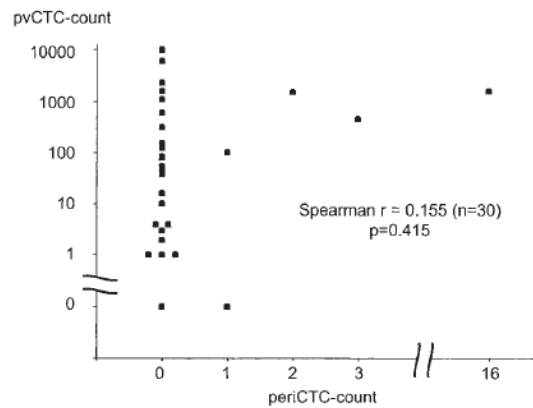
(2) 術前末梢静脈血中 CTC 陽性例は 30 例中 5 例 (16.7%) で、CTC 細胞数はそれぞれ 1、1、2、3、16 であった。CTC 値は腺癌よりも扁平上皮癌で有意に高かった ($p=0.028$)。

(3) 肺静脈血中 CTC は 30 例中 29 例 (96.7%) で陽性であった。CTC 細胞数は平均 1195、中央値 81、レンジ 0-10034 であった。

肺静脈血中 CTC 値は、肺癌組織型 (図 A)、肺癌病期 (図 B)、肺癌発生部位 (図 C)、脈管侵襲の有無 (図 D)、リンパ管浸潤の有無 (図 E) いずれとも相関関係を認めなかった。



(4) 術前末梢血中 CTC と肺静脈血中 CTC の値に有意な相関関係を認めなかった (下図)。



(5) 短期フォローアップ (中央値 13 ヶ月) での再発例が 7 例存在し、うち局所再発のみの 2 例を除く 5 例につき、術前末梢血中 CTC 値および肺静脈血中 CTC 値との相関を解析したが、有意な相関関係を認めなかった (下表)。

Clinical Outcomes	PeriCTC Count (No. of Patients and Percentage)		p Value	PvCTC Count (No. of Patients and Percentage)		p Value
	Negative	Positive		Lower	Higher	
Recurrence			1.000			1.000
Recurrence (-)	19	4		11	12	
Recurrence (+)	6 (24.0%)	1 (20.0%)		4 (26.7%)	3 (20.0%)	
Local only	2	0		2	0	
Distant only	2	1		1	2	
Local and distant	2	0		1	1	
Survival			1.000			1.000
Alive	3	5		13	14	
Dead	3 (12.0%)	0		2 (13.3%)	1 (6.7%)	
Lung cancer	2	0		1	1	
Other diseases	1	0		1	0	
Total (n = 30)	25	5		15	15	

以上の結果から、肺癌手術においてほぼ全例で腫瘍細胞が循環血液中に放出されていることが明らかになった。このことは今後の手術術式（肺動脈処理より肺静脈処理を優先させる、など）に大きなインパクトを与えることになる。現在、術前末梢血中 CTC および肺静脈血中 CTC 値と中長期フォローアップ中の再発の有無につき検討中である。

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 7 件）

- ① Hasegawa S、A pilot study of mRNA expressions of 5-fluorouracil pathway genes in peripheral blood mononuclear cells and tumor tissues in patients with lung adenocarcinoma, Lung cancer, 査読有, 2011, 199-204
- ② Tanaka F, Hasegawa S、Circulating tumor cells (CTCs) in lung cancer, Lung Cancer Targets and Ther, 1 巻、査読有、2010、77-84
- ③ Hasegawa S、Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium, Mod pathol, 査読有, 23 巻, 2010, 1458-66
- ④ Hasegawa S、Diagnosis of synchronous primary lung adenocarcinomas based on epidermal growth factor (EGFR) gene status; A case report, Lung cancer 2010, 査読有, 2010, 498-500
- ⑤ Okumura Y, Tanaka F, 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
- ⑥ Tanaka F, Okumura Y, Hasegawa S、Tumor cells in the pulmonary vein, Ann Thorac Surg, 査読有、88 巻、2009、2071
- ⑦ Tanaka F, Okumura Y, Hasegawa S、Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer, Clin Cancer Res, 査読有、15 巻、2009、6980-6986

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① Hasegawa S、Circulating endothelial cells (CTCs) in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma (MPM). The 10th International Conference of the International mesothelioma Interest Group (IMIG2010), 2010 年 9 月 2 日、京都市

- ② Tanaka F, Okumura Y, Hasegawa S、Circulating tumor cells (CTCs) and endothelial cells (CECs) in the diagnosis of malignant mesothelioma (MPM). 11th international lung cancer congress 2010 年 7 月 8 日 ロサンゼルス市 (米国)
- ③ Tanaka F, Hasegawa S、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, Okumura Y, Hasegawa S、Circulating tumor cells (CTCs) and endothelial cells (CECs) in primary lung cancer. American Society of Clinical Oncology 45th Annual Meeting (ASCO2009), 2009 年 5 月 30 日、オーランド市 (米国)
- ⑤ Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S、Circulating tumor cell in peripheral blood (CTC) and pulmonary venous blood of patients With resected primary lung cancer. 45th Annual Meeting of the Society of Thoracic Surgeons 2009 年 1 月 26 日 サンフランシスコ市 (米国)
- ⑥ Tanaka F, Hasegawa S、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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 誠紀 (HASEGAWA SEIKI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10252438
(H22)

研究代表者

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

(2) 研究分担者

田中 文啓 (TANAKA FUMIHIRO)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10283673
(H22.11.30 まで兵庫医科大学・医学部・
准教授として在籍)