

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17676

研究課題名(和文) 癌幹細胞マーカーを用いた消化器癌末梢血循環癌幹細胞の同定と臨床的有用性の検討

研究課題名(英文) Identification of circulating tumor stem cells in the peripheral blood of gastrointestinal cancers using cancer stem cell markers and their clinical utility.

研究代表者

渡辺 徹 (Watanabe, Toru)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：50779486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌患者より手術加療前後および化学療法前後に末梢血6mlを採取し血球分離溶液を用いて単核球層を分離採取した。フローサイトメトリーを用いてEpCAM、CD44を用いた2重染色により分離された細胞を末梢血循環癌幹細胞(Circulating Tumor Stem Cells：CTSC)として検出しそのカウント数を切除症例において測定、解析を進めた。胃癌26症例につきCTSC検出個数と切除標本における壁深達度・静脈侵襲に有意な相関を認めた。対象を消化器癌に広げ、抗癌剤によるCTSCの変化を実臨床における抗腫瘍効果と比較評価し治療効果のある症例においてCTSCの減少を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器癌症例の末梢血を6ml採取し、2種類の細胞表面マーカー(CD44とEpCAM)を用いて染色された細胞を検出した。これを末梢血循環癌幹細胞(CTSC)と定義し、この細胞数の変化を担癌患者の治療前後で測定比較した。実際に抗癌剤治療を行った胃癌・膵癌患者においてCTSCの数が減少していることが捕らえられ、よってこのCTSCは治療効果判定のツールとしての利用価値があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Six ml of peripheral blood was collected from gastrointestinal cancer patients before and after surgery and chemotherapy, and the mononuclear cell layer was separated using a blood cell separation solution. The cells isolated by flow cytometry using double staining with EpCAM and CD44 were detected as Circulating Tumour Stem Cells (CTSCs) in the peripheral blood, and their counts were measured and analysed in the resected cases. A significant correlation was found between the number of CTSCs detected in 26 gastric cancer cases and wall depth and venous invasion in resected specimens. The study was extended to gastrointestinal cancers, and the changes in CTSCs induced by anti-cancer drugs were evaluated in comparison with the anti-tumour effect in clinical practice, and a decrease in CTSCs was confirmed in patients who had responded to treatment.

研究分野：消化器外科

キーワード：CTSC CTC CD44 EpCAM

1. 研究開始当初の背景

癌の存在診断や予後予測、治療効果判定に関して低侵襲性の観点から liquid biopsy として末梢血循環癌細胞 (Circulating tumor cell: CTC) が注目されている。腫瘍幹細胞 (cancer stem cell: CSC) 固形腫瘍の癌細胞のすべてが同様に腫瘍形成能を有するとは限らないという事実から、腫瘍内には癌幹細胞 (cancer stem cell: CSC) が存在しこれらは新しく腫瘍を形成するための自己複製能と増殖能を有し、癌の転移に関与するという CSC 仮説が提唱されている (Reya T. Nature 2001.)。腫瘍内に少数存在する腫瘍幹細胞は自己修復能をもち転移浸潤や治療の抵抗性に関与していることから重要な治療標的であると考えられており、これまで胃癌において CD44 が幹細胞マーカーとなることが示されている (Takaishi S, Okumura T, Stem cells 2009)。末梢血循環癌細胞 (CTC) および末梢血循環癌細胞 (CTSC) 近年の報告では CTC の一部も CSC の特徴を有することが明らかとなり、これらは血液循環癌幹細胞 (Circulating tumor stem cell: CTSC) と呼ばれている (P.K.Grover, A.G. Ann Oncol. 2014.)。癌細胞理論に基づき、CTC の中でさらに少数の腫瘍幹細胞 CTSC は上皮間葉転換を起こした原発巣の癌幹細胞が血中へ遊離したものでありより深く悪性度と関わっていると考えられるが、その CTSC を実際に単離検出し培養系へ生着させ機能解析した報告はない。また、CTSC が実際に癌の診断および治療のマーカーとして実用性があるかについては分かっていない。これまで我々は、胃癌において EpCAM+/CD44+末梢血循環細胞がその臨床病理学的因子のなかでも壁深達度および静脈侵襲と相関しており胃癌の診断マーカーとして有用であることを報告してきた (Watanabe T, Okumura T, Tsukada K, Oncology Letters. 2017.)。また同様に食道癌においては EpCAM+/p75+末梢血循環癌細胞が臨床病理学的因子のなかで静脈侵襲の悪性度と相関している事を報告している (Yamaguchi T, Okumura T, Watanabe T, World journal of surgical Oncology. 2016)。これまでの我々の研究にて消化器癌、乳癌を含め各種癌症例において癌腫毎の末梢血循環癌幹細胞を検出しその多寡により診断マーカーとしての意義を検討してきた。フローサイトメトリーを用いた CTSC の解析 動物モデルにおいて末梢血液からフローサイトメトリーおよびセルソーターを用いて少数分画細胞を検出・分離し分子生物学的解析を行っている既報 (Okumura T. Cancer Res 2010) をもとに申請者らは健康人末梢血に仮想 CTC とすべく主に消化器癌の cell line を混合させた後に単核球層を分離しフローサイトメトリーによる CTC および CTSC 検出を行い viable な細胞の回収を確認した。続いてインフォームド・コンセントのもと、これまでに乳癌、胃癌、膵癌、食道癌患者末梢血より EpCAM、CD44 を用いた CTSC 検出を行いその臨床病理学的因子や治療効果との比較につき有用性を評価し発表してきた (渡辺ら. 日本外科学会 2014, 2015, 2016)。特に胃癌症例において健康人に比し担癌患者で末梢血 EpCAM+/CD44+細胞数が優位に多い事実を確認しており (図 1)、胃癌症例術前 26 症例につき末梢血液 6ml を採取し解析したところ検出個数と切除標本における壁深達度・静脈侵襲に有意な相関を認め、手術加療および抗癌剤導入による治療前後比較にて有意に減少している事実を確認した (渡辺ら. 日本癌学会 2015. /Watanabe T. Oncol Lett. 2017) (表 1)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CTSC が胃癌を含めた消化器癌において同定可能であるか、また臨床的に診断・治療マーカーとして有用であるかを評価することを目的とする。本研究においては末梢血有核細胞のうち EpCAM+/CD44+を末梢血循環癌幹細胞 (CTSC) と定義しそれらをセルソーターにて実際に生細胞のまま捕捉し機能解析につなげるところに特色があり、これまでの研究の中で蓄積した血液からの標的細胞分離法や癌幹細胞分離法および分子生物学的特性解析法などの技術を、ヒト血液検体に用いて消化器外科癌診断治療に応用することに学術的独自性を有する。末梢血採取という比較的侵襲的な検体採取から解析した末梢血循環癌幹細胞を同定するという診断方法の確立、および同細胞をターゲットとした新規治療法の開発により消化器癌診療・治療におけるさらなる個別化医療の推進に寄与できると考える。

3. 研究の方法

消化器癌症例における末梢血検体より細胞表面マーカーを用いて癌幹細胞を検出し臨床病理学的因子の相関から診断マーカーとしての有用性を検証する。患者末梢血 6ml を採取し赤血球除去後に単核球層を分離し、EpCAM 陽性細胞をセルソーターにて分離回収する。まずは末梢血循環細胞中の CTC を捕捉し、診断マーカーとして臨床応用する際に、陽性と判断する cut off 値を設定する。また実際の消化器癌治療前後においてその症例毎の癌幹細胞の多寡を測定し治療効果判定や効果予測因子としての臨床的な有用性を検証する。

4. 研究成果

消化器癌症例における末梢血検体より細胞表面マーカーを用いて癌幹細胞を検出し臨床病 理学的因子の相関から診断マーカーとしての有用性を検証した。患者末梢血 6ml を採取し赤 血球除去後に単核球層を分離し、EpCAM 陽性細胞をセルソーターにて分離回収。実際の消化器癌患者において治療前後に CTSC の多寡を測定し治療効果判定や効果予測因子としての臨床的有用性を検証した。

(1) single cell sorting による CTSC 直接解析

胃癌症例から採取した末梢血より CTSC を生細胞のまま単離し生体内に近い状態で機能解析を行った。時系列にて繰り返し解析比較することで臨床的に抗癌剤治療抵抗性が出現するかも含め比較評価した。PTX 投与中の胃癌患者において CTSC は漸減傾向を示し、実臨床での治療効果が奏功している状況と相関していた。(図 2 および表 2)

(2) 胃癌患者における CTSC 数の治療効果比較

胃癌患者 4 名につき IC の後に治療介入前後での CTSC 数の比較を行った。化学療法及び根治手術を行った症例では末梢血 EpCAM+/CD44+細胞は治療後に減少し、バイパス術を行った症例では微増した(表 3 および図 3)。化学療法を施行した 2 症例では末梢血 EpCAM + /CD44 + 細胞は休薬中に再増加し 2 コース開始後に漸減した(図 4 および図 5)。

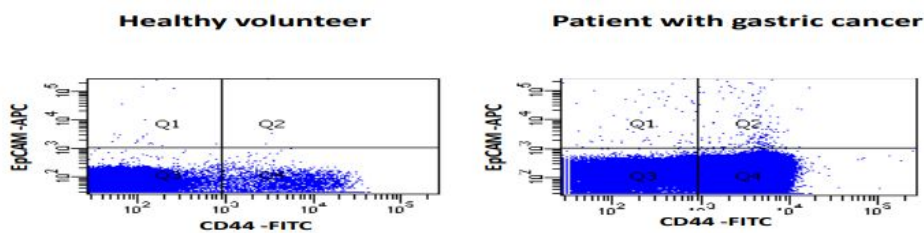


図 1：健康人と胃癌患者末梢血中のEpCAM+/CD44+細胞数の比較

Mean EpCAM+CD44+ and EpCAM+CD44- CTC counts in the peripheral blood for each clinicopathological factor.

Characteristic	n	EpCAM+/CD44+ CTC count	p value	EpCAM+/CD44- CTC count	p value
Male/Female	8/17	59.1/89.8	0.2001	68.2/41.1	0.3316
Age <75/>75 years old	12/13	63.4/74.9	0.5995	67.8/50.6	0.6338
pStage I/II-IV	6/19	43.2/77.1	*0.0423	32.1/68.2	0.0846
pT 1/2-4	7/18	44.1/78.6	*0.0314	30.7/70.8	0.0682
pN -/+	14/11	68.9/69.0	0.4974	47.5/74.9	0.2445
ly -/+	6/19	79.3/65.6	0.6708	37.8/62.6	0.1314
v -/+	8/17	43.1/81.1	*0.0184	28.8/74.0	0.0538
Her2 -/+	10/9	54.2/61.8	0.3667	35.6/104.0	0.088
CEA -/+	20/5	74.0/48.6	0.9517	39.5/139.8	0.1392
CA19-9 -/+	22/3	65.4/97.3	0.1624	51.5/118.3	0.223

*p<0.05

ly-, lymphatic invasion; v, venous invasion; Her2, human epidermal growth factor receptor type 2

Cut-off of CEA is 3.4 ng/mL and CA19-9 is 37 U/mL respectively

表1:胃癌患者末梢血中末梢血EpCAM+/CD44+細胞数と臨床病理性因子の検討

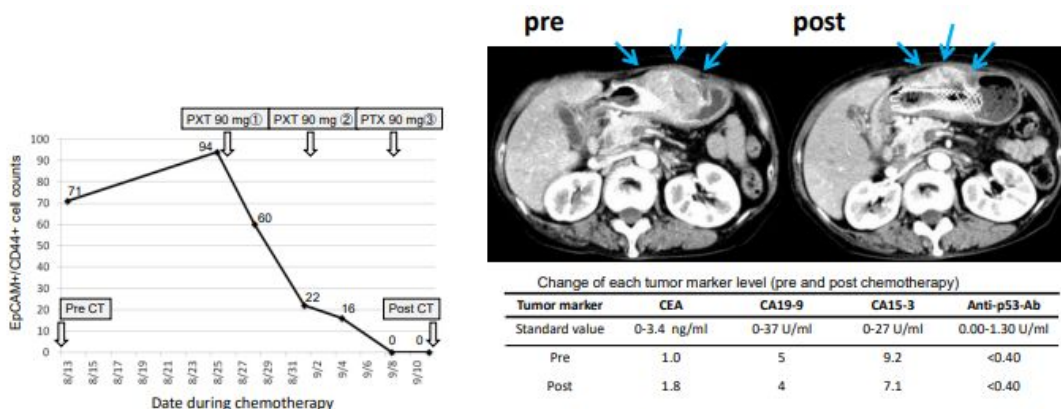


図 2 および表 2: 胃癌化学療法患者中 CTSC の経時的評価と治療介入後の臨床評価

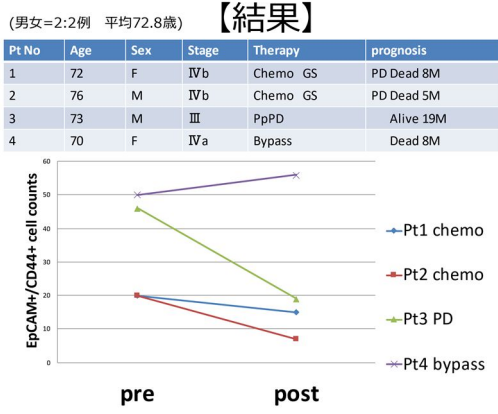


表 3 および図 3: 膵癌患者における治療介入と CTSC 数の前後比較

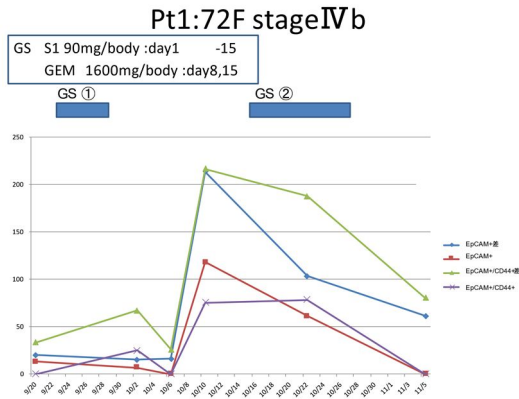


図 4: 化学療法導入後の CTSC を含めた細胞数の推移 (症例 1)

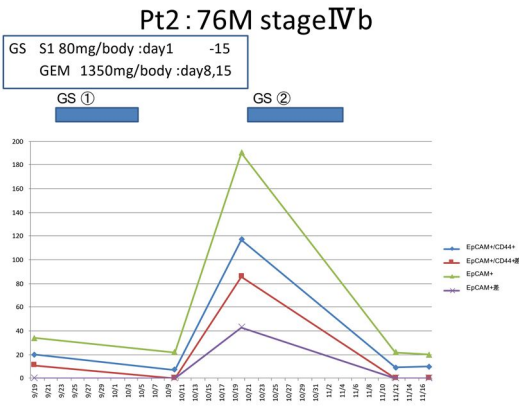


図 5: 化学療法導入後の CTSC を含めた細胞数の推移 (症例 2)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------