

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591703

研究課題名（和文） 胃癌播種性骨髄癌の病態解明と治療薬の開発

研究課題名（英文） Determination of pathogenesis and therapeutic agents in gastric cancer patient with disseminated carcinomatosis of bone marrow

研究代表者

林 尚子（HAYASHI NAOKO）

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：20452899

研究成果の概要（和文）：

胃癌播種性骨髄癌 5 症例から CellSearch™ を用い血中遊離癌細胞 (CTCs) を単離し、gene tip を用いて遺伝子発現の profiling を行い、本症の病態に関与していると思われる候補遺伝子を同定した。胃癌播種性骨髄癌のうち 2 例の CTCs が HER2 を強発現していることが判明し、抗 HER2 モノクローナル抗体薬である trastuzumab を用いた治療を施行し、良好な治療効果を得た。また、CellSearch™ で分離・回収されたヒト胃癌細胞を免疫不全マウスに接種し、2 症例において生着が確認された。

研究成果の概要（英文）：

We isolated circulating tumor cells (CTCs) using CellSearch™ in five cases of gastric cancer patients with disseminated carcinomatosis of bone marrow. Then, we could identify several candidate genes involved in pathogenesis of this disease, based on the result of gene expression profiling of collected CTCs. As CTCs in two patients remarkably increased and most of CTCs highly expressed HER2, we used ‘trastuzumab’, the monoclonal antibody against HER2, combined with the chemotherapy, against these two patients. They had remission of DIC and long-term survival. Moreover, we could establish mouse xenograft model using CTCs obtained from two gastric cancer patients with disseminated carcinomatosis of bone marrow.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学・胃十二指腸外科学・胃癌骨転移

キーワード：癌幹細胞、胃癌骨髄癌腫症、遊離癌細胞（ITC）

1. 研究開始当初の背景

日本では胃癌の発生頻度が高いために、早期発見・早期治療を目標にした治療が浸透し、化学療法を含めた集学的治療が普及し、治療

成績は向上してきた。しかしながら、骨転移をきたした胃癌の予後は不良で、中でも骨髄へびまん性に転移をきたした場合の予後は極めて不良である。

固型癌が骨髄へびまん性に浸潤転移し、

DIC(disseminated intravascular coagulation) や MAHA(microangiopathic hemolytic anemia)などの血液学的異常を示す予後不良な病態は“播種性骨髄癌症(disseminated carcinomatosis of the bone marrow)”という1つの疾患概念として扱われている。本症は、貧血、腰背部痛、出血傾向を3主徴とし、原発の多くは胃癌(90%)である。印環細胞癌や低分化腺癌、粘液癌などの浸潤性性格の高い未分化癌に多く、DICやMAHAを発症し、診断後平均約3ヶ月で死に至る予後不良な疾患である。このような病態が引き起こされるメカニズムは全く解明されておらず、治療法も確立していない。

我々は以前より各種癌の血液やリンパ節中に存在するITC(遊離癌細胞)を分子生物学的手法で検出し、ITCの臨床的意義について考察してきた(Hayashi N et al. Lancet 345 1995, Hayashi N et al. Surgery 125 1999)。上皮マーカーを指標としたRT-PCR法で検出される細胞をITCとすることにコンセンサスが得られつつあったが、大規模な臨床研究の結果から、癌腫によりITCの臨床的意義が異なる可能性が判明した。

我々は、「ITCの中に真の転移能を有する癌幹細胞が存在する」という仮説を立て、消化器癌患者の血中遊離癌細胞の中から癌幹細胞を同定し機能解析を行うプロジェクト(平成19年度科学研究費補助金(特別研究促進費)「血中遊離癌細胞中のcancer stem cellの同定と機能解析」)をスタートさせた。この研究の一環として胃癌播種性骨髄癌症でDICを呈した患者の解析を行ったところ、①末梢血中に多数(10^3 個以上/血液7.5ml)のITCが存在すること、②この患者のITCは受容体型チロシンキナーゼの1つHER2を高率に(90%以上)しかも強く発現していること、が判明した。

つまり、胃癌播種性骨髄癌症患者のITCをより詳細に解析することで、この癌細胞の性質が明らかになり、病態の解明、治療薬の開発の一助となるものと考えられる。

2. 研究の目的

・胃癌播種性骨髄癌症患者の末梢血液中から癌細胞を単離し、遺伝子発現のprofileを明らかにする。骨髄に転移し易く、DICやMAHAなどをきたし易い理由を遺伝子発現パターンの解析から考察する。また、治療の標的となりうるマーカーを検索する。

・末梢血液中から単離した癌細胞を免疫不全マウスに移植し、胃癌播種性骨髄癌症モデルマウスを作製する。この過程で腫瘍再現能、自己複製能が確認されれば、患者末梢血から得られた癌細胞中に癌幹細胞が存在したこ

との証明になる。もし、癌幹細胞が存在した場合は、癌幹細胞の表面マーカー、骨髄中の局在つまりニッチの同定及びニッチの構成細胞と癌幹細胞の機能制御についても研究を進展させ、胃癌播種性骨髄癌症の治療の糸口をつかみたい。

3. 研究の方法

(1)血中ITCの検出とITCの遺伝子発現解析
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。

本研究では、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細胞(=癌細胞)を検出し、回収する。回収した細胞からRNAを抽出し、gene tipを用いて遺伝子発現のprofilingを行い、骨髄に転移し易く、DICやMAHAなどをきたし易い理由を遺伝子発現パターンの解析から考察する。

(2)原発巣、転移巣における癌細胞の性質

1)で得られた結果から、主な遺伝子をpick upし、原発巣、転移巣、末梢血液に存在する癌細胞で発現のパターンが変化しているかどうか、免疫組織染色、Western blotting、RT-PCRなどで確認する。免疫染色は過去のサンプルについても行い、普遍的に強発現あるいは発現が低下している分子を同定し、治療の標的となりうる分子を検索する。

(3)xenograftの作製

動物モデルを用いた異種移植の系では免疫不全マウス(NOD/SCIDマウス)が標準的に用いられている。1)で述べたように、CellSearchで分離・回収されたヒト胃癌細胞(ITC)を免疫不全マウスに接種(皮下など)し、xenograftを作製する。

胃癌播種性骨髄癌症モデルマウスが作製できれば、このマウスの原発巣、転移巣、末梢血液中に存在する癌細胞が2)で示した性質を維持しているかどうか確認する。

(4)癌幹細胞の同定

Xenograftの作製過程で腫瘍再現能が確認され、さらに二次移植で自己複製能が確認されれば、患者末梢血から得られた癌細胞中に癌幹細胞が存在したことが強く示唆される。もし、癌幹細胞が存在した場合は、癌幹細胞

の表面マーカーを flow cytometry を用いて同定する。また、骨髄中の癌幹細胞の局在いわゆるニッチを同定し、ニッチの構成細胞を明らかにしたい。ニッチ構成細胞と癌幹細胞の interaction、機能制御についても研究を進展させる予定である。これにより、治療の糸口がさらに広がると考えている。

(5)治療への応用—分子標的治療の可能性

上記の実験から得られたデータをもとに、治療の標的となりうる分子をいくつか絞りこみ、inhibitor や siRNA を用いて、本当に治療の標的になりうるかどうか検討する。

4. 研究成果

(1)血中遊離癌細胞(ITC)の検出と ITC の遺伝子発現解析

血液中の循環癌細胞を直接測定・解析するシステムである CellSearch™ を用い、胃癌播種性骨髄癌症 5 症例の血液から癌細胞を回収した。回収した細胞から RNA を抽出し、gene tip を用いて遺伝子発現の profiling を行った。これらの ITC で普遍的に強発現あるいは発現が低下しており、本症の病態に関与していると思われる候補遺伝子を同定した。

(2)原発巣、転移巣における癌細胞の性質

1)で得られた候補遺伝子について、原発巣、転移巣、末梢血液に存在する癌細胞で発現のパターンが変化しているのかどうか、免疫組織染色でスクリーニングしたが、劇的にパターンが変化する分子の同定には至らず、解析を続けている。

(3)xenograft の作製

CellSearch で分離・回収されたヒト胃癌細胞(ITC)を免疫不全マウスに接種し、2 症例において胃癌播種性骨髄癌症モデルマウスが作製された。

(4)癌幹細胞の同定

1 症例において、Xenograft の作製過程で腫瘍再現能が確認され、二次移植で自己複製能が確認されたことにより、患者末梢血から得られた癌細胞中に癌幹細胞が存在したことが示唆され、解析を進めたが、この腫瘍は本来の胃癌とは異なり、virus により発生した腫瘍であることが判明した。現在、実験を継続中である。

(5)治療への応用

胃癌播種性骨髄癌症のうち 2 例の ITC が HER2 を強発現していることが判明し、抗 HER2 モノクローナル抗体薬である trastuzumab を用いた治療を施行し、良好な治療効果を得た (論文投稿中)。

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 8 件)

1. Sato N, Hayashi N, Imamura Y, Tanaka Y, Kinoshita K, Kurashige J, Saito S, Karashima R, Hirashima K, Nagai Y, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Baba Y, Watanabe M, Baba H: Usefulness of Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction Method for Detecting Circulating Tumor Cells in Patients With Colorectal Cancer. Ann Surg Oncol: (in press), 査読有, 2012
2. Sawayama H, Hayashi N, Watanabe M, Takamori H, Beppu T, Baba H: The central vein access port and catheter in outpatient chemotherapy for colorectal cancer: a retrospective study of 101 patients. Surg Today(in press), 査読有, 2012
3. Inuma H, Watanabe T, Mimori K, Adachi M, Hayashi N, Tamura J, Matsuda K, Fukushima R, Okinaga K, Sasako M, Mori M: Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. J Clin Oncol 29: 1547-1555, 2011, 査読有
4. Nagai Y, Watanabe M, Ishikawa S, Karashima R, Kurashige J, Iwagami S, Iwatsuki M, Baba Y, Imamura Y, Hayashi N, Baba H: Clinical significance of Wnt-induced secreted protein-1 (WISP-1/CCN4) in esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Res 31: 991-997, 2011, 査読有
5. Baba H, Hayashi N, Emi Y, Kakeji Y, Egashira A, Oki E, Shirabe K, Toyama T, Ohga T, Yamamoto M, Hasegawa H, Kohakura F, Higashi H, Niwa K, Fujita F, Ogata Y, Kohnoe S, Inomata M, Samura H, Tokunaga S, Maehara Y; Kyushu Study Group of Clinical Cancer (KSCC): A multicenter phase II clinical study of oxaliplatin, folinic acid, and 5-fluorouracil combination chemotherapy as first-line treatment for advanced colorectal cancer: a Japanese experience. Surg Today 41: 1610-1616, 2011, 査読有
6. Mima K, Beppu T, Chikamoto A, Ishiko T, Horino K, Hayashi N, Watanabe M,

Takamori H, Okabe K, Yamanaka T, Baba H: Laparoscopy assisted resection of an undiagnosed liver tumor and ascending colon cancer via mini median laparotomy: report of a case. Surg Today 41: 1633-1638, 2011, 査読有

7. Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, Adachi M, Hayashi N, Tamura J, Nozawa K, Ishihara S, Matsuda K, Fukushima R, Okinaga K, Sasako M, Mori M: Reply to B. Faltas et al. J Clin Oncol 29: 2947-2948, 2011, 査読有
8. Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, Tamura J, Adachi M, Hayashi N, Nozawa K, Ishihara S, Matsuda K, Baba H, Fukushima R, Okinaga K, Sasako M, Mori M: Reply to F. Crea et al. J Clin Oncol 29: 3488-3490, 2011, 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 岩槻政晃、渡邊雅之、石本崇胤、岩上志朗、馬場祥史、林 尚子、豊島功正、林 哲、大田義一、馬場秀夫：消化器癌における微量癌細胞の検出とHER2陽性微量癌細胞を標的とした個別化治療への応用。第112回日本外科学会総会 2012年4月12日～14日 千葉 幕張メッセ
2. 林 尚子、宮本裕士、齋藤誠哉、田中洋平、蔵重淳二、木下浩一、辛島龍一、平島浩太郎、長井洋平、岩上志朗、岩槻政晃、馬場祥史、渡邊雅之、馬場秀夫：大腸癌イレウスに対する治療法の工夫—経肛門的イレウス管減圧後一期的腹腔鏡下手術の有用性—。第66回日本消化器外科学会総会 2011年7月13日～15日 名古屋 名古屋国際会議場
3. 林 尚子、佐藤伸隆、増田捻郎、齋藤誠哉、岩上志朗、宮本裕士、岩槻政晃、馬場祥史、近本 亮、渡邊雅之、石河隆敏、別府 透、馬場秀夫：切除不能進行再発大腸癌に対する治療戦略—conversion therapyを適切に施行するための指標とは？—。第111回日本外科学会総会 2011年5月 紙上発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 尚子 (HAYASHI NAOKO)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：20452899

(2) 研究分担者

蒲原 英伸 (KAMOHARA HIDENOBU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：90398222