

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15510

研究課題名（和文）リキッド・バイオプシーを用いた早期胃癌の術前リンパ節転移診断能向上への挑戦

研究課題名（英文）A challenge to improve preoperative diagnosis of lymph node metastasis in early gastric cancers using the liquid biopsy.

研究代表者

松下 大輔 (Daisuke, Matsushita)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：10724205

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：早期胃癌の術前リンパ節診断は困難であるが診断能を改善できればテーラーメイドの低侵襲手術が可能となる。リキッドバイオプシーとして末梢血での術前リンパ節転移予測を目的に、センチネルリンパ節を用いてPCR-arrayからリンパ節転移と関連する遺伝子を抽出し、末梢血中の発現を調べることでリンパ節転移予測となると仮説した。実際には保管していたセンチネルリンパ節の経時的変化のためPCR-arrayの結果を得ることができなかった。代わりに末梢血から循環癌細胞等を捕獲できるCTC-chipを導入し、機器の調整・確認作業を行ったうえで実際に健常者末梢血に混注した癌細胞株を抽出することができることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期胃癌の治療は予防的リンパ節郭清を伴う定型的胃切除が推奨されるが、内視鏡治療の適応を外れた早期胃癌であれば実際のリンパ節転移頻度は1割もなく、9割の症例に過度の手術侵襲を加えている結果と言える。しかし、画像検査による術前リンパ節転移診断は非常に難しく、そのためにリンパ節転移を予測するバイオマーカーの開発が必要であり、検査自体も低侵襲な採血から行えるリキッドバイオプシーによる評価が可能となれば、多くの症例にリンパ節郭清を個別化できる低侵襲手術が行えるようになる。さらに手術の低侵襲化は術後合併症の軽減にも寄与する可能性があり、手術における入院期間の短縮による医療経済への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：Improving preoperative diagnosis of lymph node metastasis in early gastric cancers is an important issue to develop less invasive tailor-made surgery. We tried to obtain new biomarkers to predict pre-operative lymph node metastasis using liquid biopsy. At the preparatory experiments, we used sentinel lymph nodes of gastric cancer which reserved in our institute. Sentinel lymph node is the lymph node which received lymphatic flow directory from cancer site, and we hypothesized that predictive candidates of lymph node metastasis will be extracted from PCR-array comparing between SN and non-SN. The PCR-array, unfortunately, didn't work to evaluate candidate because of the degradation over time of samples. Therefore, we introduced "CTC-chip" which be able to capture cancer cells from peripheral blood, directory. Now, we have started the calibration of this device and already obtain cancer cell lines spiking into normal peripheral blood as a circulating cancer cell.

研究分野：Digestive cancer

キーワード：Liquid biopsy gastric cancer less invasive surgery lymph node metastasis

1. 研究開始当初の背景

胃癌を含めたさまざまな癌種において治療効果や生命予後の予測、早期診断を目的としたバイオマーカーの探求が多種多様な技法を用いて行われており、末梢血等の体液検体を用いたリキッドバイオプシーの分野では血中循環癌細胞 (CTC: circulating tumor cell) をはじめ、核酸増幅法 (PCR: polymerase chain reaction) を基本とした分子生物学的手法を用いた癌関連遺伝子の研究などが広く行われているが未だ決定的なバイオマーカーの発見には至っていないのが現状である。

胃癌の日常診療においては消化管内視鏡検査の普及と検査機器の進歩により胃癌の早期発見の機会が増えてきている。臨床的にリンパ節転移を伴わない早期胃癌に対する根治的治療としては内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD: endoscopic submucosal dissection) が広く行われているが、リンパ節転移のリスクを有する粘膜下層浸潤を伴う早期胃癌や ESD 後の最終病理診断でリンパ節転移のリスクが高いと判断される症例に対しては予防的リンパ節郭清を伴う定型的胃切除術が行われている。しかし実際には胃切除術後の病理組織診断で実際にリンパ節転移を認める症例は 1 割程度と決して多くはなく、過侵襲治療となっている可能性がある。そのため、症例に応じた縮小手術を行うテーラーメイド治療の確立が望まれている。

癌の原発巣から最初にリンパ流を受けるリンパ節を見張りリンパ節 (センチネルリンパ節: SN (sentinel node)) と定義され、この SN に転移がなければそれ以外の周囲のリンパ節には転移はきたしていないというセンチネル理論がある。この SN 理論に基づき悪性黒色腫や乳癌、子宮癌においてはすでに SN 生検で転移陰性を確認してリンパ節郭清の縮小・省略を行う手術 (SNNS: sentinel node navigation surgery) が実臨床で行われている。早期胃癌においても先進医療 B として SNNS の臨床試験が行われ、現在はその試験結果を待ち実臨床への応用が待たれるところである。一方で胃癌手術中の SN 同定・サンプリング摘出から迅速病理診断の結果確認までは早くても 2 時間程度を要するため、手術前にリンパ節転移を予測する有力なバイオマーカーが同定されれば SNNS の手順を省き始めから縮小手術を行うことで手術時間の短縮も図ることができるものとする。そのためには術前のリンパ節転移リスクを評価できるバイオマーカー探索が急務と考える。さらにできるだけ低侵襲での検査が可能であることが臨床応用への重要なポイントであると考え、その手法としては日常診療で通常に行われている採血で得られる末梢血液を用いたリキッドバイオプシーが最適と考える。非転移 SN においては癌からのリンパ流を最初に受けた段階・またはその以前にリンパ節転移の準備段階としての癌関連遺伝子の発現の変化が非 SN 非転移リンパ節と比較して認められると考えられる。この遺伝子群の中で転移リンパ節と共通の発現変化を認めるものがリンパ節転移予測マーカーとなるものとする。

2. 研究の目的

テーラーメイドなリンパ節郭清を行う低侵襲な胃癌手術のために、リンパ節転移予測マーカー候補を探索し、末梢血を用いたリキッドバイオプシーによる術前リンパ節転移診断を可能とする予測マーカー X を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

当教室で保管している SN 転移を有する胃癌症例の転移 SN と非転移 SN、非 SN 非転移リンパ節から RNA を抽出する。cDNA を作成し市販の RT2 Profiler PCR Array を用いてがん抑制遺伝子/癌遺伝子の網羅的発現解析を行い、各リンパ節での発現強度の程度を比較することでリンパ節転移予測マーカー X (複数) となりうる癌関連遺伝子の同定を行う。本 PCR array の最大の利点は当教室も保有している一般的な 96 列の PCR 機器を用いる点であり、次世代シーケンサーや digital PCR などの高価で特殊な検査機器の導入は不要である点である。

次に当教室で保存してある胃癌切除症例のペア末梢血から抽出した RNA を用いて先に同定したリンパ節転移予測マーカー候補 (複数) の発現を PCR で確認し、実際に病理組織学的リンパ節転移の有無の結果と相関を示す真のマーカー X を抽出する。

4. 研究成果

当教室で保有している胃癌細胞株と胃癌切除検体のリンパ節から抽出した RNA を用いて PCR-array キットに添付されている実験プロトコール通りに cDNA を作成し PCR-array を行ったが何度行っても正確な PCR 結果を得ることが出来なかった。胃癌細胞株を用いて確認実験を繰り返す中で、当教室の RNA 抽出プロトコールで使用している DEPC-water が当 PCR array の核酸増幅反応を阻害していることが判明した。同理由から当教室で保有している検体では当 PCR-array で結果を得ることが不可であることが判明した。

一方で、並行してリキッドバイオプシーの研究用に CTC 補足可能な CTC-Chip (Fig.1) を購入し動作確認実験を行った。まず、CTC-Chip 上に癌細胞表面に発現している細胞接着因子の一種である抗 Ep-CAM 抗体を流し Chip 全体をコーティングする。次に専用のシリンジポンプを使用

してゆっくり一定流量で末梢血液を chip に流すことで血液中から上皮細胞を chip 上に採取する。血液中の上皮細胞は基本的には上皮由来の腫瘍細胞であるが一部の白血球もトラップされてしまうため、chip 上で多重蛍光免疫染色を行い癌細胞の同定・算出を行う。蛍光免疫染色ではサイトケラチン複合抗体を用いて上皮細胞の細胞質を染色し、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を用いて細胞核を染色し生きた細胞であることを確認する。さらに白血球を除外するために白血球共通抗原である CD45 を用いて染色を行う。染色後に蛍光顕微鏡を用いて直接 chip 上に捕獲された細胞を観察し、その中からサイトケラチン・DAPI 陽性で CD45 陰性の癌細胞を確認・算出する。

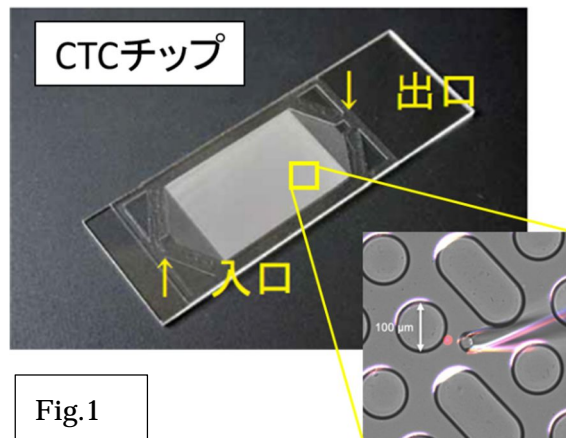
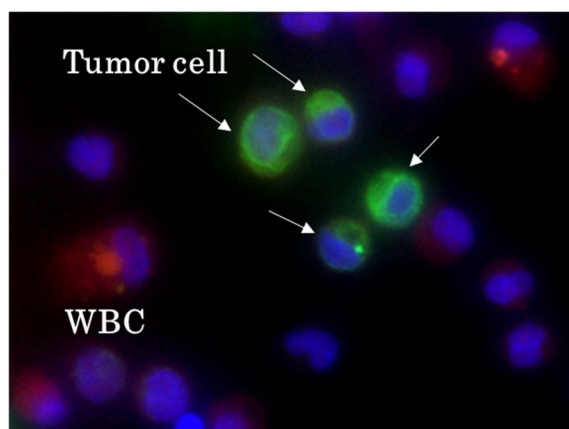


Fig.1

実際に健常者血液中に胃癌細胞株 (MKN45) を混和したサンプルを用いて実証実験を行った。Chip 上に抗 IgG 抗体 (goat, 1:20) を over night で結合させ、ついで抗 Ep-CAM 抗体を既報の 1:100 希釈で使用し抗 IgG 抗体と結合・標識させた、この CTC-Chip に胃癌細胞株を混和した末梢血 1ml を専用ポンプを用いて 0.5ml/h で流した。Chip 上で上記の蛍光免疫染色を行い chip 上に癌細胞株が捕捉され、白血球と鑑別可能であることを確認した (Fig.2)。

今後は DEPC free water を用いて胃癌細胞株から RNA を抽出し PCR array の条件セッティングを行い実験手技の確立を目指す。

さらに CTC-Chip 上に捕捉した癌細胞から DEPC free water を用いて RNA を抽出し当初の PCR-array での癌関連遺伝子の発現解析ができるか再検討を予定する。検討可能であればプロスペクティブに症例を積み重ね共通する遺伝子の発現パターンの解析を行う。同時にプロスペクティブに胃癌切除検体のリンパ節を用いて RAN 抽出から PCR array を行い転移の有無での遺伝子発現パターンの発現の差異を探求し、同時に末梢血 CTC との差異を比較検討することで末梢血 CTC を用いたリンパ節転移予測マーカーの探求を行うことを予定する。



青：核染色 (DAPI)
 緑：サイトケラチン (AE1+AE3)
 赤：CD45 (白血球抗原)

Fig.2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daisuke Matsushita	4. 巻 87(6)
2. 論文標題 Clinical significance of circulating tumor cells in the response to trastuzumab for HER2-negative metastatic gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol .	6. 最初と最後の頁 789-797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-021-04251-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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
---------	---------