

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462129

研究課題名(和文)新規末梢循環癌細胞検出法を応用した膵癌幹細胞の治療抵抗性機序解明とその打破

研究課題名(英文)The detection of viable human circulating tumor cells in resectable pancreatic cancer

研究代表者

種村 匡弘 (TANEMURA, Masahiro)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：30379250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：局所進行膵癌に強度変調放射線治療を用いた術前化学放射線療法(NACRT)を行った。TelomeScan F35を用い血中遊離癌細胞(v-CTCs)検出を行いその意義を解析した。対象は男：女=4：11、計15例。NACRT有効性：切除不能1例を除く14例でR0手術ができ、CA19-9値では治療前に比し治療後の数値が50%以上低下した症例は9例。v-CTC推移：5例がNACRT前より陽性で、5例中1例はNACRT後に陰性化、残り4例でv-CTC値はNACRT後急上昇し、術直後も陽性で術後約1年で陰性化した。v-CTC上昇4例中2例で術後早期に肝再発した。v-CTC値は良好なバイオマーカーである。

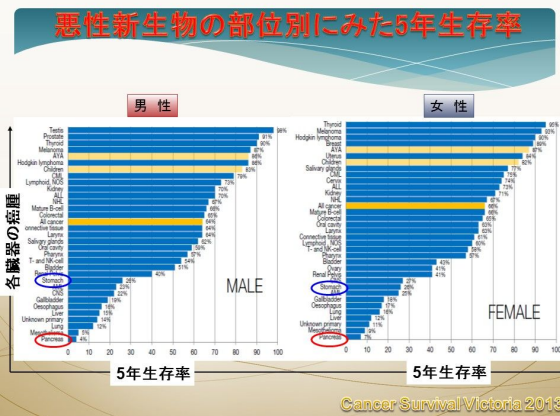
研究成果の概要(英文)：The detection of increase in the number of circulating tumor cells (CTCs) during a patient's clinical course may be a harbinger of forthcoming overt metastasis. To detect live CTCs (l-CTCs) in blood samples of patients (pts), we employed a genetically modified telomerase-specific replication-selective adenovirus, expressing GFP (TelomeScanF35). We assessed the l-CTCs burden in pts treated with NACRT. 15 pts aged 44-78 years (4 males, 11 females) were enrolled. 5 of 15 enrolled pts had l-CTCs detected before NACRT. An increase in CTCs was seen in 4 of 5 pts after NACRT, but no detectable l-CTCs were observed in only 1 pt after NACRT. These 4 CTC-positive pts continuously had CTCs detected after surgery. 2 of 4 CTC-positive pts early developed liver metastasis and died, despite R0 resection. We may consider surgery first for the CTC-positive pts before NACRT. The capture of l-CTCs may be useful biomarker for prognosis assessment or stratification.

研究分野：医歯薬学、消化器外科学

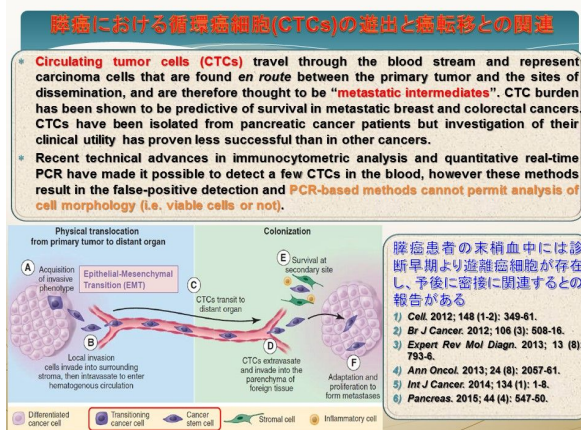
キーワード：膵癌 循環癌細胞 癌幹細胞 糖鎖 創薬 テロメスキャン

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、本邦において癌死第5位の原因疾患である。根治療法の第1選択は外科切除であり、近年の手術技術向上により膵癌術後の予後は改善されつつあるが、5年生存率は治療切除例でも13~20%に過ぎず、多くの患者は転移・再発をきたし癌死を余儀なくされている。また、膵癌患者の大多数は診断時、すでに遠隔転移、動脈浸潤などを伴う切除不能進行膵癌として発見され、放射線や化学療法を駆使した集学的治療が行われているが、満足いく治療成績は得られていない(下図)。



膵癌患者の末梢循環血液中には上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) または癌幹細胞様性質をもった遊離癌細胞が存在し転移・再発に密接に関連することが報告されている。2012年6月に米国、Lake Tahoeで開催されたAACR膵癌研究分科会でも、膵癌の末梢循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC) の研究が注目され、膵癌では早期よりCTCが出現し、その66%にWntシグナルが過剰発現しストローマと共存、そこにEMTが起こると癌転移をきたすとの報告や、CTC検出が早期診断の新しいバイオマーカーであり、膵癌根治に向けた治療標的でもあると報告された(下図)。



したがって、膵癌切除患者および非切除患者両者にとって予後改善に向けた新しい角度からの治療法開発が急務であり、転移・再発の真のメカニズムを解明し、それを打破することが新規治療法開発につながると考えられる。

また、Vogelsteinらは、膵癌の原発巣と転移巣におけるクローンを解析したところ、遠隔転移クローン集団は原発巣内にすべて認められ、この転移集団は元の非転移性の親クローンから遺伝的に進化したものであることを示した (Nature. 2010; 467(7319):1114-7)。したがって、原発巣から転移再発をきたす際に、転移癌細胞は何らかのゲノムレベルでの変異を獲得する、あるいは転移再発をきたすクローン集団にのみ検出される変異が存在することが予測される。

2. 研究の目的

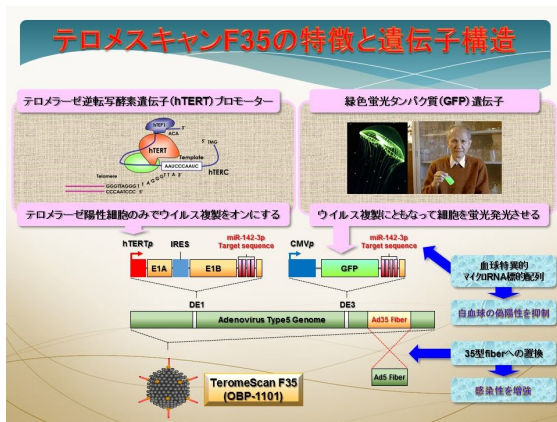
本研究では、手術症例、術後転移再発症例、切除不能症例を含めた膵癌患者の膵癌原発巣-リンパ節などの転移巣-CTCにおける癌細胞のゲノム解析を行い、遺伝子のみならず非コードRNAおよび非コードDNA領域を包括解析し、転移再発機構を明らかにし、新規治療法の開発を目的とした。

さらに、本研究では膵癌患者の血液よりテロメスキャンシステムを用いて viable CTC を分離した後、培養増殖可能な癌細胞に発現している分子マーカーの糖鎖構造に 1,3GT を用いて  $\square$ -gal エピトープを生合成し、anti-Gal 自然抗体との抗原抗体反応を用いて CTC の標的分子の網羅解析を行い、治療抵抗性 CTC の targeting を可能にする分子標的薬の創薬を行うことも目的とした。

3. 研究の方法

1. 生きた CTCs 検出のための F35 TelomeScan の開発

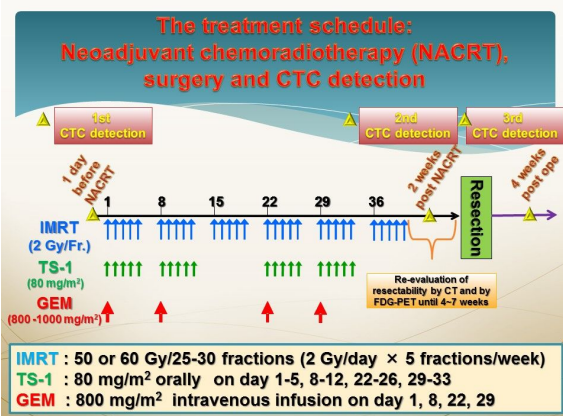
CTCs 検出方法は、アメリカの FDA にも認可されている CellSearch システムを用いるが従来方法である。本研究では、生きた癌細胞のみ特異的に検出するために、癌細胞の無限増殖能に必須なテロメラーゼ活性を持った癌細胞を特異的に検出できるアデノウイルスを開発した。また、癌細胞への特異性を高めるために白血球特異的マイクロRNA配列を含み、さらにアデノウイルスの感染性を高めるため 35 型 fiber の遺伝子配列を搭載した F35 TelomeScan (OBP-1101) を開発した(下図)。



## 2. 実験デザイン ( 膵癌集学的治療に伴う CTC 検出の臨床的意義の解析 )

2013 年 1 月から呉医療センターでは、局所進行膵癌に対し IMRT60Gy+GEM (800mg/m<sup>2</sup>) + S-1(80mg/m<sup>2</sup>) による NACRT を実施した ( 下図にスケジュールを記載 )。v-CTC の検出は NACRT の前・後、さらに膵癌根治術後の 3 点で CTC 値を測定した (N 群)。また同時期の膵癌に対し手術先行治療を行った PK surgery first 症例においても手術前・後に v-CTC 値を測定した (S 群)。

### 4. 研究成果



### (結果)

#### [NACRT 群]

男 : 女 = 4 : 11、計 15 例、年齢中央値は 67 歳 (44 ~ 77) であった ( 下表 )。

### Clinical Characteristics of Twelve Patients who Received NACRT at Baseline

| Characteristics                            | No. of Patients         |
|--|-------------------------|
| No. of Patients (IMRT dose; 50 Gy / 60 Gy) | 15 (50 Gy: 6 / 60Gy: 9) |
| Age, years (median, range)                 | 66.5, 44-77             |
| Gender (Male : Female)                     | 5 / 11                  |
| PS (0 / 1)                                 | 15 / 0                  |
| Tumor location (Head / Body / Tail)        | 7 / 8 / 0               |
| Clinical-T (TNM, 1 / 2 / 3 / 4)            | 1 / 0 / 13 / 1          |
| Stage (TNM, I / IIA / IIB / III / IV)      | 1 / 10 / 3 / 1 / 0      |
| Tumor size, mm (median, range)             | 21.0, 15-39             |
| CA19-9, U/l (median, range)                | 300.5, 2 - 2803         |
| CEA, ng/ml (median, range)                 | 2.8, 1.2 - 6.4          |

#### [NACRT の有効性]

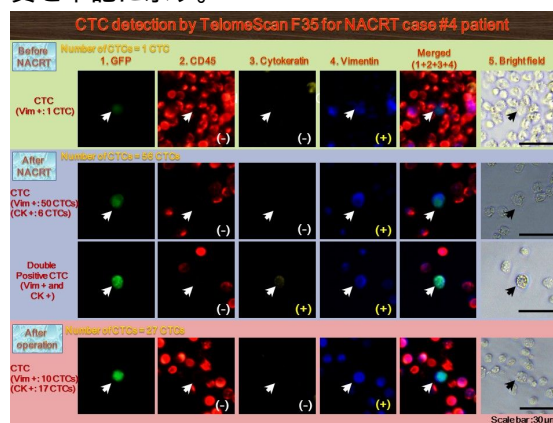
切除不能 1 例を除く 14 例で切除ができ (TP:PD:DP=3:6:5)、CA19-9 値、

PDG-PET (SUV-Max で評価) では治療前に比し治療後の数値が 50% 以上低下した症例は各々 9 例、7 例で、切除標本の組織学的効果でも全例 Evans 分類 IIa 以上の効果を認めた (IIa: 4 例、IIb: 9 例、III: 1 例)。

#### [v-CTC 推移]

5 例 (30%) が NACRT 前より v-CTC が陽性 (1~2 cells) で、5 例中 1 例は NACRT 後に v-CTC は陰性化した。残り 4 例で v-CTC 値は NACRT 後に急上昇し (2~56 cells)、術後 1 カ月でも v-CTC 陽性を維持し (1~27 cells)、補助療法を追加した 1 例は術後半年で陰性化した。補助療法を行わなかった 1 例は術後 1 年でも v-CTC は 7 cells 陽性を維持していた。残り 2 例は術後 4~8 カ月目の早期に肝転移にて死亡した。

実際の TelomeScan で検出した CTCs の写真を下記に示す。



#### [Surgery First 群]

男 : 女 = 9 : 7、計 16 例、年齢中央値 70 歳 (53~85) であった ( 下表 )。

### Clinical Characteristics of Sixteen Patients who were treated with Surgery First at Baseline

| Characteristics                       | No. of Patients   |
|---------------------------------------|-------------------|
| No. of Patients                       | 16                |
| Age, years (median, range)            | 70, 53 - 85       |
| Gender (Male : Female)                | 9 / 7             |
| PS (0 / 1)                            | 16 / 0            |
| Tumor location (Head / Body / Tail)   | 12 / 4 / 0        |
| Clinical-T (TNM, 1 / 2 / 3 / 4)       | 0 / 0 / 15 / 1    |
| Stage (TNM, I / IIA / IIB / III / IV) | 0 / 7 / 8 / 1 / 0 |
| Tumor size, mm (median, range)        | 35.0, 18-65       |
| CA19-9, U/l (median, range)           | 122, 2 - 13453    |
| CEA, ng/ml (median, range)            | 5.5, 1.0 - 10.2   |

16 例全例切除できた (TP:PD:DP=3:9:4)。術前・後共に v-CTC が 0 であった症例は 5 例で、術前より v-CTC 陽性 (1~4 cells) は 8 例 (50%) で 6 例は術後陰性化した。この 6 例中 2 例で術後早期に肝転移を認めた。全 16 例中術後陰性化しなかった 4 例移中 3 例で肝又はリンパ節再発を認めた。

#### (考察)

NACRT を施行した原発膵癌症例において組織学的に pCR を得た症例が存在する。しかし、ごくまれに術後遠隔期に再発し死亡する症例経験する。この原因は、進行膵癌ですらで癌の広がりには潜在的 systemic disease で

あるとの考え方が主流と思われる。  
今回の研究による v-CTC 値解析により、NACRT による術前治療が原発膵癌細胞に上皮 - 間葉転換 (EMT) を誘発し v-CTC 遊出を誘導、さらには遊出した CTCs が EMT と逆の現象である間葉 - 上皮転換 (MET) を起こし転移再発巣を形成する EMT CTC MET の連続的な移行を臨床的に証明できた。すなわち、NACRT 治療前の v-CTC が陽性の症例では、原発膵癌細胞は既に、EMT を起こす高いポテンシャルを持っており、NACRT により EMT から v-CTC 遊出を促進してしまい予後改善につながらない症例が存在することを意味する。したがって、「NACRT の罪」も踏まえた治療戦略が必要で、治療開始時より v-CTC 陽性の膵癌患者では Surgery first を治療選択すべきと考えられた。また、手術先行群では術後も v-CTC 陽性例があり補助療法追加にても陰性化できない症例は再発ハイリスク症例と考えられた。

#### 【結語】

v-CTC 値は良好な膵癌バイオマーカーである。今後、本研究を積極的に進展させ癌治療の新しいブレイクスルーとなるよう努力したい。

#### 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 10 件)

Tei M, Wakasugi M, Kishi K, Tanemura M, Akamatsu H., Incidence and risk factors of postoperative delirium in elderly patients who underwent laparoscopic surgery for colorectal cancer., *Int J Colorectal Dis.*, 査読有、31(1)、2016、67-73

Wakasugi M, Tei M, Omori T, Anno K, Mikami T, Tsukada R, Koh M, Gakuhara A, Furukawa K, Suzuki Y, Masuzawa T, Kishi K, Tanemura M, Akamatsu H. , Single-incision laparoscopic surgery as a teaching procedure: a single-center experience of more than 2100 precedures., 査読有、2016、Epub

Mukai Y, Wada H, Eguchi H, Yamada D, Asaoka T, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Hori Y, Morii E, Doki Y, Mori M., Intrahepatic cholangiocarcinoma in a patient with Wilson's disease: a case report., *Surg Case Rep.*, 査読有、2(1)、2016、29

Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H,

Tanemura M, Tanida T, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Serada S, Naka T, Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano H. , Clinico-Pathological Significance of Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients with Pancreatin Cancer., *Pancreas*, 査読有、44(1)、2015、93-98

Tanida T, Tanemura M, Miyoshi E, nagano H, Furukawa K, Nonaka Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi K, Eguchi H, Mori M, Doki Y. , Pancreatic cancer immunotherapy using a tumor lysate vaccine, engineered to express -gal epitopes, targets pancreatic cancer stem cells., *Int J Oncol.*, 査読有、46(1)、2015、78-90

Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Taniyama K, Mori M, Doki Y. , Discovery of -gal epitope/natural anti-Gal antibody reaction and its clinical relevance to immunotherapy for pancreatic cancer., *E-Book*, 査読有、2015、In press

Wakasugi M, Tanemura M, Mikami T, Furukawa K, Tsujimoto M, Akamatsu H. , Liver hilar tuberculous lymphadenitis diagnosed by laparoscopic lymph node biopsy., *Int J Surg Case Rep.*, 査読有、10、2015、191-194

Wakasugi M, Tanemura M, Furukawa K, Murata M, Miyazaki M, Oshita M, Yoshida K, Yasuoka H, Akamatsu H., Signet ring cell carcinoma of the ampulla of vater: Report of a case and a review of the literature., *Int J Surg Case Rep.*, 査読有、12、2015、108-111

Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Eguchi H, Matsunami K, Yamashita Y, Taniyama K, Hatanaka N, Akamatsu H, Mori M, Doki Y. , Cancer immunotherapy for pancreatic cancer utilizing the -gal epitope/natural anti-Gal antibody reaction. , *World Journal of Gastroenterology.*, 査読有、21(40)、2015、11396-11410

Wakasugi M, Tei M, Anno K, Mikami T,

Tsukada R, Koh M, Furukawa K, Suzuki Y, Masuzawa T, Kishi K, Tanemura M, Akamatsu H.、Single-incision totally extraperitoneal inguinal hernia repair as a teaching procedure: one center's experience of more than 300 procedures.、Surg Today.、査読有、2015、Epub

〔学会発表〕(計6件)

種村匡弘(筆頭演者)、脂肪由来幹細胞(ADSC)を応用した次世代型膵島移植療法の開発 - 生着改善に向けた膵島移植のブレイクスルー -、日本臨床外科学会総会、2015年11月26日、博多

種村匡弘(筆頭演者)、Significant cross-reactive responses to pancreatic cancer cells induced by tumor lysate vaccine remodeled to express -gal epitopes and their implications for a universal cancer vaccine、日本癌学会総会、2015年10月10日、名古屋

種村匡弘(筆頭演者)、The detection of viable human circulating tumor cells in resectable pancreatic cancer、日本消化器外科学会総会、2015年7月15日、浜松

種村匡弘(筆頭演者)、糖鎖モデリングによる多様性癌抗原に対応したユニバーサル膵癌ワクチン療法確立への可能性、日本肝胆膵外科学会総会、2015年6月12日、東京

種村匡弘(筆頭演者)、Viable Circulating Tumor Cells 測定(v-CTC 値)から見た局所進行膵癌に対する術前化学放射線療(NACRT)の功罪 - NACRT により v-CTCs 遊出を誘導する -、日本外科学会定期学術集会、2015年4月16日、名古屋

M Tanemura, T Irei, M Inoue, S Yamashita, K Furukawa, M Wakasugi, K Kishi, H Nagano, H Akamatsu, Y Urata, N Hatanaka, M Mori and Y Doki、The detection of viable human circulating tumor cells (v-hCTCs) in resectable pancreatic cancer induced by neoadjuvant chemoradiotherapy (NACRT) using gemcitabine, S-1 and intensity-modulated radiotherapy (IMRT): Methods of detection and its clinical implications.、アメリカ癌学会総会 (AACR Annual Meeting) 2014年4月20日、America (Philadelphia)

〔図書〕(計1件)

種村匡弘、診断と治療社、膵島の再生医療 - 膵細胞の発生と再生をめぐる新展開 - 脂肪組織由来幹細胞を応用した次世代型膵島移植の確率、2015、123-129

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

種村 匡弘 (TANEMURA Masahiro)  
国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター・院外研究員  
研究者番号：30379250

(2) 研究分担者

三善英知 (MIYOSHI Eiji)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20322183

(2) 研究分担者

江口英利 (EGUCHI Hidetoshi)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90542118