

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293301

研究課題名(和文)非小細胞肺癌の外科治療戦略の新たな展開：血中遊離癌細胞を基軸とした探索

研究課題名(英文)New surgical strategy for lung cancer based on circulating tumor cells

研究代表者

澤端 章好 (Sawabata, Noriyoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50403184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌手術症例における遊離癌細胞の臨床における重要性を、縮小肺切除断端における遊離癌細胞や、新規同定法を用いた摘出肺肺静脈血液中や循環末梢血中遊離癌細胞を用いて証明した。さらに、遊離癌細胞の肉眼的形態が肺癌原発病巣の間質反応のグレードと関連することを示し、上皮間葉移行などの癌細胞の変化が術後再発と極めて関連が深い可能性を示唆した。加えて、肺癌手術操作による循環癌細胞惹起を確認し、多施設共同研究でも同様の結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Clinical implication of isolated tumor cells (ITC) in surgical cases of lung cancer were demonstrated using samples of extracted tumor cells at the surgical margin, circulating tumor cells in the blood drained pulmonary vein of the resected lung lobe and peripheral arterial blood. In detail, it is revealed that the morphology of ITC was associated with severity of stromal reaction which is a surrogate marker of epithelial-mesenchymal transition and the degree of tumor malignancy. In addition, cancer cell dislodgement by surgical manipulation is demonstrate and this phenomenon is confirmed in a multicenter prospective study.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 循環癌細胞 手術 再発 多施設共同研究

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌に対する肺癌集学的治療は、局所療法と全身療法の組み合わせである。現在は、TNM 分類による病期により進行度を細分化し治療方略を構築しているが、病理病期-IA の期肺癌手術症例においても5年生存率は87%であり、遠隔転移は全病理病期 IA 症例中の約15%に見られ、病理病期-III A では5年生存率は41% (手術単独症例群、30%) で、遠隔転移は全病理病期 III-A 症例中43%に見られる[1]。一方、補助化学療法は病理病期 I 期患者には負の延命効果を示すこともあり[2]、病理病期-III A 期の手術単独で長期生存する患者にはむしろ逆効果の可能性もある。これは、解剖学的進展度のみで決める TNM 分類の限界を示す。限局病変は多発しても局所療法のみで治療できる可能性があるが、全身病変は全身治療が必要であるので、手術適応に関する新たな分類が必要とされる

癌患者の末梢血には癌細胞が循環しており(circulating tumor cell, CTC), 非小細胞肺癌においてもその個数が予後因子であり、限局性病変を峻別するためのターゲットとして期待される[3]。今までは細胞表面抗原の一つである EpCAM をマーカーとした回収法が臨床では主流であったため、上皮間葉移行(epithelial to mesenchymal transition, EMT)や癌幹細胞(cancer stem cell, CSC)の要素を持った癌細胞を見逃していた可能性があった。

我々は、すべての特徴を持つ癌細胞を血液中から回収できる方法(比重法)を用いて末梢血循環癌細胞の起源である肺動脈血で検討し、EMT/CSC の要素を持つ可能性のある癌細胞即ち集塊形成型(clustered)癌細胞群を提示する手術症例の予後がきわめて不良であることを示し、血液中の肺癌細胞を探索することにより予後予測、限局病変/全身病変の峻別や肺癌細胞の腫瘍学的特徴が探索できる可能性を示した[4]。さらに近年、わずかな生きた細胞も回収可能な高感度回収法が開発され[5]、末梢血からの末梢血循環癌細胞同定に加え、さらに精度の高い腫瘍学的な探索が可能となり、限局病変/全身病変の峻別や補助治療戦略構築に役でることが出来るようになった。

2. 研究の目的

末梢血循環遊離癌細胞の臨床および病態学的意義を、1)末梢血循環遊離癌細胞同定がTNM による病期との補完性が認められるか、2)末梢血循環遊離癌細胞同定が独立した予後因子として臨床的意義を見出すことが出来るか、3)末梢血循環遊離癌細胞の腫瘍学的な特徴が再発部位や様式と関連があるか、4)末梢血循環遊離癌細胞が転移の腫原として治療の対象になりうるかどうか、さらに治

療方略の予測に役立つかを明らかにする。

3. 研究の方法

非小細胞肺癌に対し標準手術を行なった症例を対象とし、血液中遊離癌細胞の非小細胞肺癌に対し標準手術を行なった症例を対象とし、血液中遊離癌細胞の1)細胞診、2)標的遺伝子変異、3)腫瘍増殖能(1)細胞死抵抗能(抗アノキス性)、(2)生体外腫瘍増殖能(おもに足場依存性)、(3)生体内腫瘍形成能の探索を行ない、TNM 分類との関連を探索し補完的な因子になりうるかを調べた。全例同様に術後経過観察を行い、予後や再発形式の観点から手術成績の予測因子になりうるかを探索し、TNM 因子の補完因子または予後因子になりうる候補の因子が見つければ、多施設共同観察研究を行い検証する。

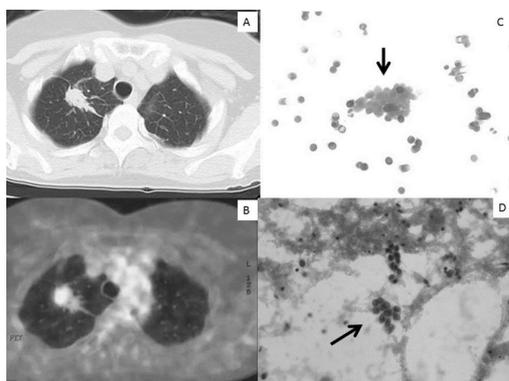
4. 研究成果

肺癌手術症例における遊離癌細胞の臨床における重要性を、縮小肺切除断端における遊離癌細胞や、新規同定法を用いた摘出肺肺静脈血液中や循環末梢血中遊離癌細胞を用いて証明した。さらに、遊離癌細胞の肉眼的形態が肺癌原発病巣の間質反応のグレードと関連することを示し、上皮間葉移行などの癌細胞の変化が術後再発と極めて関連が深い可能性を示唆した。

縮小肺切除では断端の遺残遊離細胞は再発の予測因子であることをふまえ、予後を調査したところ断端遊離癌細胞陽性症例は有意差を持って陰性症例に比べ予後不良である(5年生存率:79.2%, 38.5%, p=0.01)ことが明らかになり、断端の遊離癌細胞は癌微小環境における癌細胞の動態を探索する良いモデルになりうることを示した。

さらに、我々は術操作による血液中への癌細胞散布を、我々が新たに用いた CD45 を標的としたネガティブセレクション比重法で摘出肺肺静脈血から形態学的特徴を保持して癌細胞を回収すれば、73%の陽性率であり、形成学的分類が再発の予測因子であり、cluster 形成が強く術後再発と関連していることを証明した。さらにこの形態学的分類は原発巣の間質反応と関連した因子である血液中 CEA 濃度、腫瘍内血管への浸潤、病理病期が相関し、中でも腫瘍内血管への浸潤が cluster 形成の予測因子であった。また、cluster 形成遊離癌細胞はサイトケラチン陰性細胞が含まれており今後の上皮間葉移行の面から更なる検討が必要である事が示唆された。さらに、CD45 ネガティブセレクション法よりも高感度であるマイクロポアセレクション法を用いた肺動脈血、末梢動脈血を対象とした validation 研究で、形態学的相

似性を証明した。



A.腫瘍 CT 像、B.FDG-PET 陽性、C.末梢血の遊離癌細胞、D.腫瘍捺印細胞診

これを下に、肺癌手術における術操作の循環癌細胞惹起に掛かる多施設前向き研究を計画し、術後のみに循環癌細胞が同定できる症例があることを証明し、さらに、多施設前向き研究でも同様の結果が得られた。

引用文献

1. Sawabata N, Miyaoka E, Asamura H, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Nomori H, Fujii Y, Okumura M, Yokoi K; Japanese Joint Committee for Lung Cancer Registration. Japanese lung cancer registry study of 11,663 surgical cases in 2004: demographic and prognosis changes over decade. *J Thorac Oncol*. 2011;6:1229-1235.
2. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, Dunant A, Torri V, Rosell R, Seymour L, Spiro SG, Rolland E, Fossati R, Aubert D, Ding K, Waller D, Le Chevalier T; LACE Collaborative Group. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* 2008;26:3552-3559
3. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, Ward TH, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C, Blackhall FH. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:1556-63.
4. Funaki S, Sawabata N, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Kadota Y, Minami M, Okumura M. Novel approach for detection of isolated tumor cells in pulmonary vein using negative selection method: morphological classification and clinical implications. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011;40:322-327.
5. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA,

Kuang Y, Yanagita M, Wang L, Berkowitz JA, Distel RJ, Cayre YE. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res*. 2011;31:427-441

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1: Sawabata N, Funaki S, Hyakutake T, Shintani Y, Fujiwara A, Okumura M. Perioperative circulating tumor cells in surgical patients with non-small cell lung cancer: does surgical manipulation dislodge cancer cells thus allowing them to pass into the peripheral blood? *Surg Today*. 査読有 2016 Mar 7. [Epub ahead of print]
- 2: Sawabata N. Tumor Size, Margin Distance Rate, and Margin Cytologic Results Influence Recurrence and Survival After Wedge Resection for Lung Cancer. *Ann Thorac Surg*. 査読有 2016 Mar;101(3):1241-2. doi: 10.1016/j.athoracsur.2015.08.020.
- 3: Sawabata N, Funaki S, Shintani Y, Okumura M. Lung excision of non-small-cell lung cancer leaves cancer cells in residual lobe: cytological detection using pulmonary vein blood. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 査読有 2016 Feb;22(2):131-5.doi:10.1093/icvts/ivv301.
- 4: Sawabata N, Hyakutake T, Maruyama H. [Additional Lobectomy after Pulmonary Excision for Non-invasive Lung Adenocarcinoma due to Malignant Positive Cytology at the Residual Lobe]. *Kyobu Geka*. 査読有 2015 Nov;68(12):970-3.
- 5: Nojiri T, Inoue M, Takeuchi Y, Maeda H, Shintani Y, Sawabata N, Hamasaki T, Okumura M. Impact of cardiopulmonary complications of lung cancer surgery on long-term outcomes. *Surg Today*. 査読有 2015 Jun;45(6):740-5. doi:10.1007/s00595-014-1032-z.
- 6: Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, Kishimoto I, Shintani Y, Inoue M, Kimura T, Sawabata N, Minami M, Nakagiri T, Funaki S, Takeuchi Y, Maeda H, Kidoya H, Kiyonari H, Shioi G, Arai Y, Hasegawa T, Takakura N, Hori M, Ohno Y, Miyazato M, Mochizuki N, Okumura M, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 2015 Mar 31;112(13):4086-91. doi:

10.1073/pnas.1417273112.

〔学会発表〕(計 1件)

澤端章好、百武威 CirculatingTumorCell ;
CTC の臨床的意義：P stage I NSCLC 手術症
例での検討 第 56 回日本肺癌学会学術集会
2015 年 11 月 27 日 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤端 章好 (Sawabata Noriyoshi)

大阪大学医学系研究科 教授

研究者番号：50403084

(2)研究分担者

井上匡美 (INOUE Masayoshi)

京都府立医科大学医学系研究科 教授

研究者番号：10379232

奥村明之進 (OKUMURA Meinoshin)

大阪大学医学系研究科 教授

研究者番号：40252647

舟木壮一郎 (FUNAKI S0uichirou)

大阪大学医学系研究科 講師

研究者番号：50465241

新谷 康史 (SHINTANI Yasushi)

大阪大学医学系研究科 准教授

研究者番号：90572983