

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462043

研究課題名(和文)胃癌腹腔洗浄液および末梢血中癌細胞の検出と遺伝子解析を用いた術前化学療法薬剤選択

研究課題名(英文) Detection of free intraperitoneal/circulating tumor cells and possible selection of chemosensitive patients for neoadjuvant chemotherapy using gene expression analysis for gastric cancer.

研究代表者

伊藤 誠二 (ITO, Seiji)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍病理学部・研究員

研究者番号：50393129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌患者血中癌細胞(CTC)などの高感度検出法の開発により、腫瘍の悪性度診断、術前化学療法の抗癌剤感受性予測法を確立、臨床応用を目指した。フィルター型CTC分離デバイスを試作、また担がんCTCマウスモデル系を開発した。これらを用いて抗癌剤(パクリタキセル)治療を行った担がんマウスからの血中CTCの測定をしたところ、M期arrestが観察され、腫瘍の薬剤感受性をCTCの形態から評価できる可能性を明らかにした。また臨床研究では本CTC分離デバイスは従来の方法に比べ、より高感度に消化器がん患者の血中CTCを検出できることを明らかにしつつあり、血液による遺伝子解析、薬剤感受性評価の可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed the development of high sensitive detection method for CTC/micrometastases and its preclinical and clinical application to evaluate tumor malignancy and chemosensitivity for the neoadjuvant chemotherapy. We newly developed a filtration-based, sensitive CTC isolation device and mouse CTC model. Using this system, we demonstrated M stage-arrested CTC in mouse blood after Paclitaxel treatment, indicating the possibility for successful evaluation of chemosensitivity at an early stage after therapy. We also revealed that our CTC isolation device allows more sensitive CTC detection and more rapid genetic analysis of patient's blood samples than the conventional device. These results suggest that this CTC isolation device would be an useful tool to evaluate tumor malignancy and chemosensitivity as a liquid biopsy.

研究分野：消化器外科学

キーワード：CTC フィルター型デバイス開発 転移 CTCマウス 分子標的治療 Liquid biopsy 腹腔洗浄液中がん細胞(PTC)

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌の死亡者数は年間5万人にのぼり、我が国における癌死亡の第2位を占めている。胃癌死亡の殆どは腹膜や遠隔転移・再発によるものであり、我々はこれまで、定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いた腹膜微小転移の検出法の確立を行い、一定の成果を上げてきた。しかしながら、この治療戦略に基づき、腹膜微小転移陽性胃癌に対して、経口抗癌剤である S-1 による補助化学療法の前臨床試験を行ってきたが、全国規模の補助療法の臨床試験 (ACTS-GC) の結果から、ある程度進行した胃癌症例に対しては S-1 による補助化学療法が標準治療となっているにもかかわらず、微小転移陽性胃癌症例に対する S-1 補助化学療法の効果は十分とはいえなかった (World J Surg, 2010)。

近年、前述した ACTS-GC の結果から、胃癌の治療開発は手術に抗癌剤を組み合わせた集学的治療が主流となってきたが、その一方で、胃癌の手術後には、胃切除に伴う経口摂取の障害、脱水等により、十分な強度の多剤併用化学療法を行うことは困難が伴い、更なる治療強度の増強のために、術前化学療法に注目が集まっている。術前化学療法には、1) 術前に化学療法を行うことにより、治療の compliance を保つことができる、2) 手術による切除範囲外に存在する微小転移に対して、最も早期からの治療が可能、3) 切除の対象とならない、潜在的な遠隔転移症例かつ化学療法無効例を選択することにより、無駄な手術を避けることができる、などの利点が存在するが、反面、正確な病理診断や、切除標本を用いた腫瘍の遺伝子解析が困難であることが問題である。また、現在、術前化学療法としては3剤併用の化学療法が行われるようになってきている (Jpn J Clin Oncol, 2012) が、有害事象管理の面から、これ以上の多剤併用療法は実現性が薄く、今後は、腫瘍の特性、抗癌剤感受性に合わせた、個別化治療の開発が急務となる。

切除標本を用いた抗癌剤感受性試験には、これまでも長い歴史があるが、未だに広く一般的に用いられるには至っていない。その理由として、感受性試験の手技が煩雑であることや、感受性試験の正確度が、なお臨床に広く応用されるには充分ではないことが挙げられ、特に、近年、がん幹細胞に関する研究から、転移・再発の原因となるのは、ごく少数のがん幹細胞であり、また、一部のがん幹細胞は、薬剤耐性を獲得しているものがあることも指摘されていることから、大多数の分化したがん細胞を標的としたこれまでの感受性試験の限界も指摘されている。

そこで、転移能を有し、がん幹細胞を含むと考えられる腹腔洗浄液中がん細胞ならびに血液中循環がん細胞を濃縮、単離し、一個あるいは少数個のがん細胞の遺伝子解析を行うことにより、治療開始前に、がん幹細胞も含めた腫瘍の存在診断、遺伝子解析と、各種

抗癌剤に対する感受性予測を簡便な方法で行うことができれば、腹腔洗浄液中ならびに末梢血中の癌細胞の存在や、個々の腫瘍の悪性度、抗癌剤感受性に応じた個別化医療の確立により、胃癌の治療成績の大幅な向上が得られると考えるに至った。

### 2. 研究の目的

これまで腹腔洗浄液や血液中の微小残存癌変に対する遺伝子診断は検体中に多数の白血球や中皮細胞などの非がん細胞の混在下で行っていたため、がんの存在診断以上の情報は得られていなかった。近年、CellSearch システムなどにより血液中の少数のがん細胞の単離が可能となってきたが、迅速性に欠け、高コストなためその利用は研究目的に限られている。本研究では、胃癌患者腹腔洗浄液中がん細胞 (PTC) や血液中循環がん細胞 (CTC) を簡便迅速、低コストに濃縮、単離する装置を開発し、それを用いて一個あるいは少数個のがん細胞の遺伝子解析を行うことにより、胃癌患者の微小転移の検出、微小転移の悪性度診断、術前化学療法の薬剤決定のための抗癌剤感受性予測法を確立、これを用いた、個別化術前化学療法の臨床応用を図ることを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 末梢血中循環がん細胞 (CTC) および腹腔洗浄液中がん細胞 (PTC) の検出

サイズ依存性を利用したフィルター型デバイスとして細胞毒性の低い金属パラジウム (Pd) に用いた 3D 型 Pd 電鍍フィルターデバイス (図 1) を試作した。本デバイスを用いることにより患者血液 5ml 中の CTC を 2 時間以内に分離、蛍光染色し、検出が可能であった (図 2)。

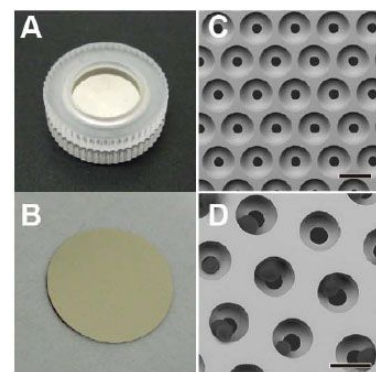


図1 3D型Pd電鍍フィルターデバイス フィルターカートリッジ(A)とフィルター(B)、3D-Pd filter とトラップされた腫瘍細胞の走査型電子顕微鏡写真

しかし、サイズの大きな中皮細胞を含む腹腔洗浄液中のがん細胞 (PTC) の検出は本デバイスのみでは困難で、接着性の違いなどを利用した中皮細胞を除くための前処理が必要であったが、依然として CTC に比べて PTC の検出感度は低く、今後さらなる改良が必要で

ある。

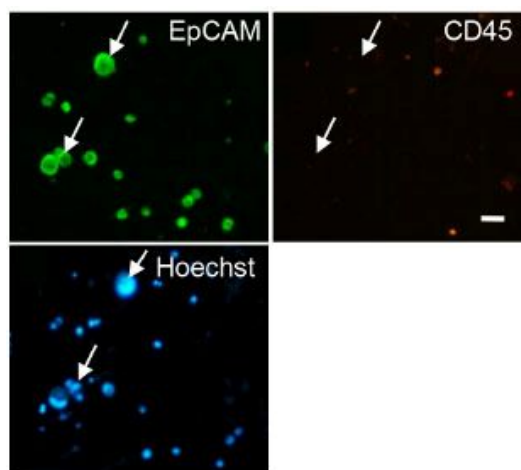


図2 フィルターデバイスにより回収された腫瘍細胞 (EpCAM+/CD45-/Hoechst33342+)

## (2) マウス CTC モデルを用いた CTC の抗癌剤、分子標的薬感受性の検討

GFP を発現する転移性胃癌、大腸癌細胞 (GCIY-EGFP, COLM5-EGFP) の皮下接種により、マウス CTC モデルを作成した。本 CTC マウスモデルは肺転移の進行とともに、血液中に CTC が再現性よく検出されるようになる優れたモデルであることを確認した (図3)。また Trastuzumab 感受性評価の可能な HER2 高度遺伝子増幅胃癌細胞株 (GLM-1) CTC マウスモデルの作成にも成功した。

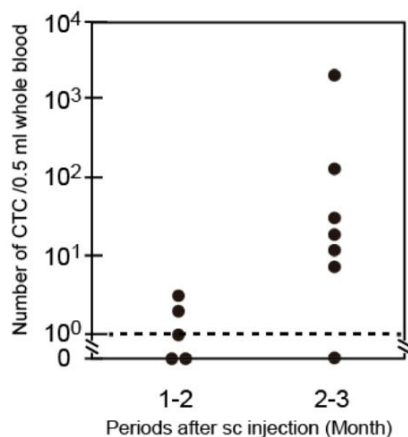


図3 腫瘍細胞接種後期間による CTC 数の変化

これらのモデルを用いた検討から、CTC 数は転移の進展よく相関することが判明し、CTC 検出が転移の早期診断に有用である可能性を明らかにした。

次に上記、胃癌細胞株 GCIY-EGFP を接種したマウス CTC モデルに微小管を安定化させ、細胞分裂を阻害する Paclitaxel 治療を行い、このマウスから採取した血液を上記のデバイスにアプライし、CTC を検出、その感受性を検討した。その結果、Paclitaxel 治療後早期に、原発巣と類似した形態学的に M 期 arrest を起こしたと思われる腫瘍細胞が血液中に多数観察された。このことから、血中

CTC の形態から原発腫瘍のパクリタキセル感受性を評価することが可能である可能性が明らかとなった。

## (3) 一細胞遺伝子解析

上記デバイスを用いた 1(稀少)細胞遺伝子解析法の予備的検討として、Ovation picoRNA 増幅法を用いて 1~数個の細胞から RNA を抽出、RT-PCR 法により遺伝子発現解析を行うとともに、GenomePlex Single Cell WGA Kit を用いて全ゲノム DNA を抽出し、この 1~数個の細胞から遺伝子変異を解析した。HER2 陽性ヒト胃癌 CTC マウスモデルを用いてマウス血液中の CTC 検出および回収した CTC の IHC による HER2 発現を検討した。続いて、このデバイスを用いて、実際の胃癌患者血液からの CTC 検出についても、予備的に検討した。

Ovation picoRNA 増幅法を用いた RNA 抽出、RT-PCR 法による遺伝子発現解析により、5 種類程度の遺伝子発現解析が可能であった。GenomePlex Single Cell WGA Kit を用いた全ゲノム DNA 抽出、遺伝子変異解析の結果、KRAS 変異などの解析が可能であった。HER2 陽性ヒト胃癌 CTC マウスモデルを用いた検討でも、マウス血液中の CTC 検出および回収した CTC の IHC による HER2 発現検出が可能であった。

## 4. 研究成果

実際の胃癌患者血液の検討では、EpCAM+/CD34-/Hoechst+を示す CTC 様細胞を検出できたが、EpCAM+/CD34+と判定される細胞も見られ、また細胞形態の保存も必ずしも良好とはいえず、CTC の判定に課題が残る結果であった。CTC の診断精度を今後向上させるには蛍光所見だけではなく、光学顕微鏡を用いた細胞診などの手法も加えた総合的な診断基準を作成してゆく必要があるものと思われる。

## 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 14 件)

Saito T, Nakanishi H, Mochizuki Y, Ito S, Ito Y, Misawa K, Yatabe Y, Yamamichi K, Kondo E., Preferential HER2 expression in liver metastases and EGFR expression in peritoneal metastases in patients with advanced gastric cancer., *Gastric Cancer*, 査読有、18巻、2015、711-719  
DOI: 10.1007/s10120-014-0417-4.

Ito S, Ito Y, Misawa K, Shimizu Y, Kinoshita T., Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery in gastric cancer patients with extensive lymph node metastasis., *World Journal of Clinical Oncology*, 査読有、6巻、2015、291-294  
DOI: 10.5306/wjco.v6.i6.291

Tsutsuyama M, Ito S, Ito Y, Misawa K, Kawakami J, Natsume S, Uemura N, Kinoshita T, Kimura K, Senda Y, Abe T, Komori K, Yatabe Y, Niwa Y, Shimizu Y, Kinoshita T. A Case of Gastric Cancer with Residual Tumor Only in the Para-Aortic Lymph Nodes after Systemic Chemotherapy followed by Conversion Surgery. Case Reports in Oncology, 査読有、8巻、2015、312-322  
DOI: 10.1159/000438698.

伊藤 友一、倉橋 真太郎、伊藤 誠二、三澤 一成、丹羽 康正、谷田部 恭、清水 泰博. S-1 / CDDP 療法により組織学的CR が得られた腹膜転移を伴う高度進行胃癌の1例、癌と化学療法、査読有、42巻、2015、355-358

Kobayashi Y, Fukui T, Ito S, Shitara K, Ito S, Hatooka S, Mitsudomi T. Pulmonary metastasectomy for gastric cancer: a 13-year single-institution experience. Surgery Today, 査読有、43巻、2013、1382-1389  
DOI: 10.1007/s00595-012-0432-1

Misawa K, Mochizuki Y, Ohashi N, Matsui T, Nakayama H, Tsuboi K, Sakai M, Ito S, Morita S, Koder Y. A randomized phase III trial exploring the prognostic value of extensive intraoperative peritoneal lavage in addition to standard treatment for resectable advanced gastric cancer. JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 査読有、44巻、2014、101-103  
DOI: 10.1093/jjco/hyt157

Yusa A, Toneri M, Masuda T, Ito S, Yamamoto S, Okochi M, Kondo N, Iwata H, Yatabe Y, Ichinosawa Y, Kinuta S, Kondo E, Honda H, Arai F, Nakanishi H. Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) Using 3D Palladium Filter and Its Application for Genetic Analysis. PLOS ONE, 査読有、9巻、2014、1-11  
DOI: 10.1371/journal.pone.0088821

Takahari D, Hamaguchi T, Yoshimura K, Katai H, Ito S, Fuse N, Konishi M, Yasui H, Terashima M, Goto M, Tanigawa N, Shirao K, Sano T, Sasako M. Survival analysis of adjuvant chemotherapy with S-1 plus cisplatin for stage III gastric cancer. Gastric Cancer, 査読有、17巻、2014、383-386  
DOI: 10.1007/s10120-013-0264-8

Shitara K, Yatabe Y, Matsuo K, Sugano M, Kondo C, Takahari D, Ura T, Tajika M, Ito S, Muro K. Prognosis of patients with advanced gastric cancer by HER2 status and trastuzumab treatment. Gastric Cancer, 査読有、16巻、2013、261-267  
DOI: 10.1007/s10120-012-0179-9

Mochizuki Y, Ohashi N, Kojima H, Ishigure K, Kinoshita T, Eguchi T, Fujitake S, Ito S, Fujiwara M, Koder Y.

CPT-11 as a second-line treatment for patients with advanced/metastatic gastric cancer who failed S-1 (CCOG0702). Cancer Chemother Pharmacol, 査読有、72巻、2013、629-635

DOI: 10.1007/s00280-013-2235-5

Murakami H, Ito S, Tanaka H, Kondo E, Koder Y, Nakanishi H. Establishment of new intraperitoneal paclitaxel-resistant gastric cancer cell lines and comprehensive gene expression analysis. Anticancer Research, 査読有、33巻、2013、4299-4307

<http://ar.iiarjournals.org/content/33/10/4299.full.pdf+html>

伊藤 誠二、伊藤 友一、三澤 一成、清水 泰博、木下 平、胃がんの集学的治療の近未来、癌の臨床、査読無、59巻、2013、307-313

中西 速夫、舎人 誠、村上 弘城、伊藤 友一、三澤 一成、伊藤 誠二、胃癌腹腔内微小転移のメカニズムとその検出、臨床外科、査読無、68巻、2013、636-640

伊藤 友一、三澤 一成、伊藤 誠二、【切徐可能なStage IV胃癌に対する外科治療】手術の適応と成績 腹腔洗浄細胞診陽性例 CY1胃癌に対する集学的治療、臨床外科、査読無、68巻、2013、1446-1449

〔学会発表〕(計8件)

齊藤 卓也、中西 速夫、望月 能成、伊藤 誠二、三澤 一成、伊藤 友一. 胃癌の原発巣ならびに転移巣(肝転移および腹膜転移)におけるHER2とEGFRの差異的発現について、第87回日本胃癌学会総会、2015年03月05日、広島県立総合体育館 武道場(広島市)

Ito S, Sano T, Katayama H, Mizusawa J, Takahari D, Sasako M, Katai H, Tanaka Y, Kinoshita T, Terashima M, Nashimoto A, Yamaue H, Fukushima N, Yamada M, Fujiwara Y, Kimura Y, Azuma T, Yoshimura T. A phase II study of systemic chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 (DCS) followed by gastrectomy with D2 plus para-aortic lymph node (PAN) dissection for gastric cancer with extensive lymph node metastasis (ELM): Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1002. 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium, 2015年01月15日、San Francisco(USA)

齊藤 卓也、中西 速夫、谷田部 恭、伊藤 誠二、山道 啓吾、近藤 英作、肝および腹膜転移性胃癌の原発巣ならびに転移巣におけるHER2/EGFR発現の検討、第73回日本癌学会学術総会、2014年09月26日、パシフィコ横浜(横浜市)

中西 速夫、寺澤 佳世子、益田 泰輔、山本 修平、岩田 広治、近藤 直人、伊藤 誠二、新井 史人、本多 裕之、遊佐 亜希子、新規CTC分離デバイスを用いた担がんマウスモデルにおけるCTCの動態解析、第73回日本癌学会学術

総会、2014年09月26日、パシフィコ横浜(横浜市)

伊藤 誠二、中西 速夫、伊藤 友一、三澤 一成、川合 亮佑、植村 則久、木下 敬史、木村 賢哉、千田 嘉毅、安部 哲也、小森 康司、佐野 力、清水 泰博、木下 平、小寺 泰弘、S-1 補助化学療法施行例におけるCEA mRNAによる胃癌腹膜微小転移検出の意義、第115回日本外科学会定期学術集会、2014年04月04日、名古屋国際会議場(名古屋市)

吉川 貴己、田邊 和照、西川 和宏、伊藤 誠二、松井 隆則、木村 豊、円谷 彰、森田 智視、宮下 由美、坂本 純一、進行胃癌に対する術前補助化学療法の至適なコース数の探索 COMPASS早期解析結果、第51回日本癌治療学会学術集会、2013年10月24日、国立京都国際会館(京都市)

中西速夫、遊佐亜希子、舎人誠、益田泰輔、山本修平、新見京、大河内美奈、伊藤誠二、馬場嘉信、本田裕之、近藤英作、新井史人、新規血中循環がん細胞(CTC)単離デバイスを用いたマウスモデルにおけるCTCの動態に関する研究、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月03日、パシフィコ横浜(横浜市)

遊佐亜希子、舎人誠、益田泰輔、山本修平、大河内美奈、伊藤誠二、岩田広治、近藤英作、馬場嘉信、本田裕之、新井史人、中西速夫、新規血中循環がん細胞(CTC)迅速単離装置の開発と1細胞遺伝子解析、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月03日、パシフィコ横浜(横浜市)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス、及び末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法

発明者：中西速夫、伊藤誠二

権利者：中西速夫、伊藤誠二

種類：特許

番号：PCT/JP2014/69469

出願年月日：2014年07月23日

国内外の別：外国

名称：微粒子分離用マイクロ流路チップ、核チップを用いた微粒子分離用システム及び微粒子分離方法(血中循環がん細胞の分離)

発明者：中西速夫、伊藤誠二

権利者：中西速夫、伊藤誠二

種類：特許

番号：特願 2014-542131(移行日:2015年3月31日)

出願年月日：2013年10月15日(PCT)

国内外の別：国内

名称：微粒子分離用マイクロ流路チップ、移流集積ユニット、微粒子分離用システム及び微粒子分離方法

発明者：中西速夫、伊藤誠二

権利者：中西速夫、伊藤誠二

種類：特許

番号：特願 2013-106824

出願年月日：2013年05月21日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤誠二(ITO, Seiji)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍病理学部・研究員

研究者番号：50393129

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者