

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293306

研究課題名(和文) 消化器癌の微量癌細胞の着床・増殖機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Investigation and clinical application of mechanism for growth of minimal cancer cells in gastrointestinal cancer

研究代表者

夏越 祥次(Natsugoe, Shoji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70237577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌89例の原発巣と511個の転移リンパ節を用いてE-cadherin, N-cadherin, Snailの免疫染色を行った。これらの発現は胃癌の進行度や予後予測に重要な因子である。術前化学放射線治療を施行された食道癌症例で、組織学的にComplete response (Grade 3)の中で約30%に微量残存癌細胞がみられた。消化器癌の中でも特に予後不良である食道扁平上皮癌90例を対象とし、CellSearch systemを用いて、CTCは25例(28%)に検出された。CTC陽性例は有意に予後不良であった。治療後にCTCが陰性化した症例は、治療前CTC陰性例と同等の予後改善が認められた。

研究成果の概要(英文)：A total of 89 gastric cancer and 511 nodal metastasis were immunohistochemically examined by E-cadherin, N-cadherin and Snail. N-cadherin and Snail were important markers to predict tumor stage and prognosis in gastric cancer. In esophageal cancer cases which were complete response by preoperative chemo-radiation therapy, 30% of patients had a minimal residual disease by cytokeratin staining. At baseline analysis, CTCs were detected in 25 patients (27.8%). Overall survival was significantly shorter in patients with than without CTCs. Patients with a change in CTC status from positive to negative had a good prognosis as well as patients without baseline CTCs.

研究分野：消化器外科

キーワード：微量癌細胞 消化器癌 リンパ節 血中遊離癌細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで一貫して消化器癌のリンパ節転移および血行性転移に関連する遺伝子の検索、原発巣の悪性度評価とリンパ節および血行性転移との関連、あるいは微量癌細胞の検出法とその臨床的意義について研究を行ってきた。そして、リンパ節微小転移例は食道癌や胃癌では予後不良因子であることや原発巣の接着因子の低下やリンパ管新生因子の発現が微小転移と関連があることを報告してきた。また、RT-PCR法により血中遊離癌細胞が食道癌、胃癌、膵臓癌で高頻度に検出され、予後と密接な関係にあることを報告してきた。

臨床的に手術によるリンパ節郭清などにより根治切除が行われた数年後に再発する症例、化学療法や放射線治療でcomplete responseが得られたが、経過観察中に再燃する症例が認められる。これらの症例ではリンパ節や血中などに残存する微量癌細胞の関与が考えられる。「どのような微量癌細胞が生き残り着床していくのか?」という疑問に対して、申請者らは消化器癌の再発に微量癌細胞が関与する場合、①微量癌細胞が上皮間葉転換 (EMT) を起こす細胞の可能性、②微量癌細胞が癌幹細胞の性質をもっている可能性があるという仮説をたてた。また着床・増殖するためには転移先臓器での炎症および周囲間質における免疫応答との関与も重要であると考えている。次いで微量癌細胞の特質を明らかにすることは、転移、再発を踏まえた分子標的治療など今後の治療指針に重要であるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は消化器癌のリンパ節および血中の微量癌細胞の分子生物学的・遺伝子解析を行い、微量癌細胞の特質を明らかにし、着床・増殖機序を解明する。さらに微量癌細胞に関する臨床的意義の確立と治療への応用を目的とする。

近年の分子生物・遺伝子学的方法の発達により、リンパ節や血中の微量癌細胞の存在が明らかとなった。しかし、これらの細胞の着床・増殖機序に関しては不明な部分が多い。微量癌細胞がどのようにして着床・増殖し、転移や再発に関連するのか、あるいは死滅していくのかを明らかにすることは临床上、極めて重要な課題と考えられる。

3. 研究の方法

- ① リンパ節・血中微量癌細胞の特質を明らかにする：微量癌細胞について、幹細胞の関与を免疫染色、RT-PCR法を用いて検討する。
- ② 微量癌細胞の着床・増殖機序を明らかにす

る：細胞株および臨床検体から得られた癌細胞から微量癌細胞モデルを作成する。

③ 化学療法あるいは化学放射線治療耐性の微量癌細胞の特性を明らかにする：あるいは癌幹細胞の性質について免疫染色法で検討する。

④ 血中微量癌細胞の分子標的治療への応用：を用い、微量癌細胞の遺伝子発現をみることにより治療への応用について検討する。

4. 研究成果

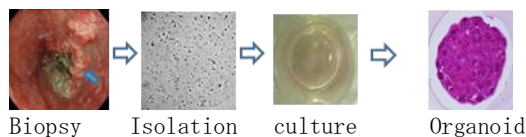
① リンパ節・血中微量癌細胞の特質を明らかにする。

胃癌で 89 例の原発巣と 511 個の転移リンパ節を用いて E-cadherin, N-cadherin, Snail の免疫染色を行った。N-cadherin の発現がリンパ節転移やリンパ管侵襲と相関し、予後が不良であった。リンパ節で Snail の強発現は進行胃癌で見られ、リンパ節転移と相関した。

EMT 関連遺伝子である N-cadherin や snail の発現は胃癌の進行度や予後予測に重要な因子であった。(Gastric Cancer. 2017 Feb 28)

② 細胞株および臨床検体から得られた癌細胞から微量癌細胞モデルを作成

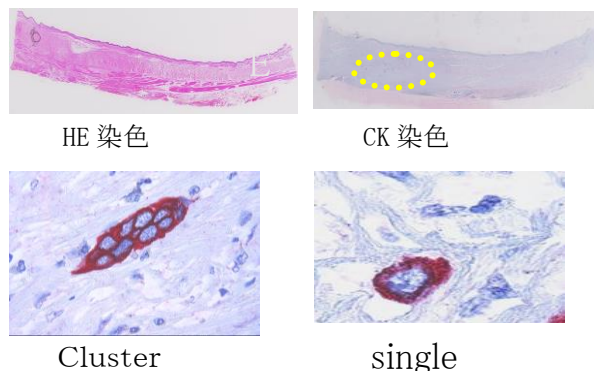
食道癌の生検標本から癌細胞を取り出し、成長因子等を含んだ培養系で3次元培養を行うと→約2週間後にはオルガノイドが作成可能となる。申請者らはすでに3次元培養の手法を確立した。



今後、Organoidを用いて生物学的特性や化学療法、放射線療法の感受性について検討していく予定である。

③化学療法あるいは化学放射線治療耐性の微量癌細胞の特性を明らかにする

組織学的に Complete response (Grade 3) と診断された症例に対し微量癌細胞の有無を検討すると、微量残存癌細胞がみられる。



これらの所見は約 30%にみられ現在症例集

積中である。

④血中微量癌細胞の分子標的治療への応用を用い、微量癌細胞の遺伝子発現をみることにより治療への応用について検討する。

消化器癌の中でも特に予後不良である食道扁平上皮癌を対象とし、CTCを検出後、その臨床的意義を検証した。次のような結果が得られた。

1) CellSearch systemを用いて、食道癌細胞株および臨床検体でCTCの評価が可能であった。

2) 治療前のCTC発現と臨床的遠隔転移(cM)、臨床的病期(cStage)との間に相関が認められた。

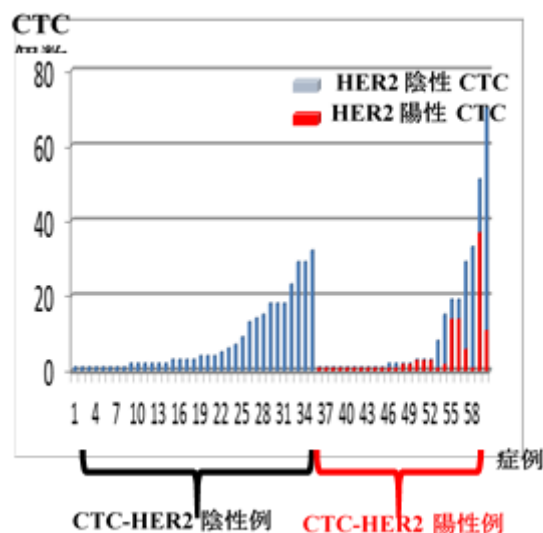
3) 治療前のCTC陽性例は全生存期間において有意に予後が不良であった。

4) 単変量および多変量解析でも治療前のCTCは独立予後因子であった。

5) 治療後のCTC評価と治療効果判定には有意な相関関係が認められた。

6) 治療後にCTCが陰性化した症例は、治療前CTC陰性例と同等の予後改善が認められた。

現在、血中微量癌細胞の特性を徐々に明らかにしてきている。治療と直接関係する胃癌の血中微量癌細胞のHer2/neuの発現を確認している。下記の図のように、1個の癌細胞でも発現がみられるものや、多数でも発現がないものがあり、治療の選択に有用と考えられる。



今後、血中遊離癌細胞のHER2発現を調べることにより、分子標的薬の選択に応用できる可能性がある。いわゆるLiquid biopsyとして臨床応用が期待できる。

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8件)

①Okubo K, Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S, Matsushita D, Kijima T, Amatatsu M, Uchikado Y, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S, et al. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition in metastatic lymph nodes of gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2017 Feb 28. 査読有り

②Okubo K, Uenosono Y, Arigami T, Mataka Y, Matsushita D, Yanagita S, Kurahara H, Sakoda M, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S. Clinical impact of circulating tumor cells and therapy response in pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2017 Feb 12. 査読有り

③Tanabe K, Shinsato Y, Furukawa T, Kita Y, Hatanaka K, Minami K, Kawahara K, Yamamoto M, Baba K, Mori S, Uchikado Y, Maemura K, Tanimoto A, Natsugoe S. Filamin C promotes lymphatic invasion and lymphatic metastasis and increases cell motility by regulating Rho GTPase in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Jan 24;8(4):6353-6363. 査読有り

④Kurahara H, Maemura K, Mataka Y, Sakoda M, Shinchi H, Natsugoe S. Impact of p53 and PDGFR- β Expression on Metastasis and Prognosis of Patients with Pancreatic Cancer. *World J Surg*. 2016 Aug;40(8):1977-84. 査読有り

⑤Yanagita S, Uenosono Y, Arigami T, Daisuke M, Okubo K, Kijima T, Arima H, Hirata M, Haraguchi N, Hagihara T, Nishizono Y, Ishigami S, Natsugoe S. The clinical usefulness of the intraoperative detection of sentinel lymph node metastases by a rapid RT-PCR system in patients with gastric cancer. *Cancer*. 2016 Feb 1;122(3):386-92. 査読有り

⑥Matsushita D, Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S, Nishizono Y, Hagihara T, Hirata M, Haraguchi N, Arima H, Kijima Y, Kurahara H, Maemura K, Okumura H, Ishigami S, Natsugoe S. Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2015 Oct;22(11):3674-80 査読有り

⑦Arigami T, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Uenosono Y, Kita Y, Owaki T, Mori S, Kurahara H, Kijima Y, Ishigami S, Natsugoe S. Analysis of the Fibrinogen and Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Esophageal

Squamous Cell Carcinoma: A Promising Blood Marker of Tumor Progression and Prognosis. Medicine (Baltimore). 2015 Oct;94(42): 査読有り

⑧ Ishigami S, Arigami T, Okumura H, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, Maemura K Kijima Y, Ishihara Y, Sasaki K, Uenosono Y, Natsugoe S. Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-F expression in gastric cancer. Anticancer Res. 2015 Apr;35(4): 2279-85. 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

①上之園芳一, 切除不能・再発胃癌患者における血中循環癌細胞の HER2 発現からみた化学療法効果予測, 第 24 回日本消化器関連学会週間, 2016 年 11 月 5 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

② Shoji Natsugoe, Laparoscopic and endoscopic cooperative surgery (LECS) with sentinel node dissection for early gastric cancer. Korea International Gastric Cancer Week 2016. 2016 年 4 月 22 日, ソウル (韓国)

③ 夏越祥次, Overview of multimodal treatment for esophageal cancer. 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年 4 月 14 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

④上之園芳一, 切除不能・再発胃癌における化学療法中の血中循環癌細胞の変化と HER2 発現に関する検討, 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年 4 月 14 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

⑤夏越祥次, 消化器外科領域の臨床研究-微小転移診断と臨床応用-, 第 15 回日本外科学会臨床研究セミナー, 2015 年 11 月 28 日, 福岡サンパレス (福岡県福岡市)

⑥夏越祥次, 食道癌の治療, 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 2015 年 10 月 29 日, 京都国際会議場 (京都府京都市)

⑦夏越祥次, 上部消化管のリンパ節微小転移, 第 24 回がん転移学会学術集会, 2015 年 7 月 23 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

⑧ Natsugoe S, Sentinel node Navigation Surgery is Clinically Useful in Early Gastric Cancer. 11th International Gastric Cancer Congress, 2015 年 6 月 3 日, サンパウロ (ブラジル).

⑨ Natsugoe S, Various treatment of EGJ cancer, 第 20 回中日消化器外科会議, 2015 年 5 月 30 日, 上海 (中国)

⑩ Natsugoe S, Sentinel node navigation surgery, 14th World Congress of the International Society of the Esophagus, 2014 年 9 月 22 日, バンクーバー (カナダ)

⑪ Natsugoe S, Sentinel node navigation surgery in esophageal cancer, 14th World Congress of the International Society of the Esophagus, 2014 年 9 月 22 日, バンクーバー (カナダ)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

夏越祥次 (NATSUGOE SHOJI)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号: 70237577

(2) 研究分担者

盛真一郎 (MORI SHINICHIRO)
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教
研究者番号: 00620519

奥村浩 (OKUMURA HIROSHI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号: 10398282

中条哲浩 (NAKAJO AKIHIRO)
鹿児島大学・医歯学附属病院・助教
研究者番号: 20404486

内門泰斗 (UCHIKADO YASUTO)
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教
研究者番号: 30464465

喜島祐子 (KIJIMA YUKO)
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教
研究者番号: 60381175

上之園芳一 (UENOSONO YOSHIKAZU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授
研究者番号：60398279

石神純也 (ISHIGAMI SUMIYA)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：90325803