

平成 30 年 8 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10096

研究課題名(和文) がん手術がもたらす腹腔内遊離癌細胞の癌転移能獲得機序の解明とその治療法の開発

研究課題名(英文) The mechanism of acquisition of cancer metastatic capacity in peritoneal free cancer cells disseminated by cancer surgery and development of treatment for these cancer cells

研究代表者

村田 聡 (Murata, Satoshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90239525

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)：胃癌治療手術後も高頻度に発症する腹膜再発の形成機序を解明し、術後再発させない治療法開発を研究の目的とした。腹膜再発の原因となるviable癌細胞は、癌浸潤漿膜面やリンパ管内、血管内の他、胃切除後の残胃内腔にも存在した。これらの癌細胞はCD44を発現する癌幹細胞様細胞を含み、術中の腹腔内洗浄液中にがん細胞が培養検出された症例にのみ癌再発が発生した。術中散布癌細胞をターゲットとした術中腹腔内温熱化学療法(HIPEC)は、有意に術後再発を抑制した。胃癌手術が癌幹細胞を含む癌細胞を腹腔内へ散布させ、これら散布癌細胞が癌再発の源となっていた。この転移の源をHIPECにより有効に治療できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to elucidate the mechanism of peritoneal recurrences after curative gastric cancer (GC) surgery, and also to develop an effective therapy for source of cancer recurrence. Viable cancer cells that could cause peritoneal recurrence existed in the invasive serosa surface, lymphatic or blood vessels, and also in the residual gastric lumen after gastrectomy. These cancer cells contained cancer stem-like cells expressing CD44, and cancer recurrence occurred only in cases where cancer cells were detected in the intraperitoneal lavage fluid during GC surgery. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) targeting intraoperatively spilled cancer cells significantly inhibited postoperative recurrence. GC surgery disseminated cancer cells including cancer stem-like cells into the peritoneal cavity, and these spilled cancer cells have been the source of cancer recurrence. We found that this source of cancer recurrence can be effectively treated by HIPEC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：腹膜転移 腹腔内遊離癌細胞 癌幹細胞 腹腔内治療

## 1. 研究開始当初の背景

進行胃癌では、治癒手術ができて約半数に腹膜再発をきたす。腹腔内洗浄細胞診で検出できないレベルの癌細胞がすでに潜在し、術後に腹膜転移を形成すると考えられてきた。しかし、開腹時の腹腔内に RT-PCR による癌関連遺伝子(CEA や CK20)の増幅が検出されない症例でも、腹膜再発が多発している事実から、申請者らは癌の手術操作によっても新たに腹膜転移が誘導されているのではないかとこの着想に至り研究を行ってきた。結果、手術開始時の腹腔内洗浄液は、細胞診陰性、癌関連遺伝子増幅陰性であっても、胃癌手術終了時の腹腔内洗浄液中には、Ki-67 陽性の増殖能のある癌細胞を高頻度に検出できた。この胃癌手術時の腹腔内散布癌細胞の存在と術後腹膜再発との有意な相関が初めて明らかとなった (Takebayashi-K, Murata-S, et al. *Ann Surg Oncol*, 2014)。さらに、腹腔内散布癌細胞を NOD/scid マウス腹腔内へ注入すると、ヒト胃癌原発巣と同じ組織型の腹膜転移が形成されることを示すことにも成功した (*Ann Surg Oncol*, 2014)。

ここで、この術中腹腔内散布癌細胞が、腹膜腫瘍を形成する機序を解明することは重要である。1) 手術中に散布される癌細胞はどこに由来し、どんな操作で腹腔内散布されるのかよくわかっていない。先行研究から原発巣の深達度が深い症例や、リンパ節転移がある症例、リンパ管侵襲や静脈侵襲のある症例に腹腔内散布癌細胞の検出率が有意に高かったことから、原発巣の漿膜浸潤の物理的刺戟やリンパ節郭清時のリンパ液漏出や出血により癌細胞が腹腔内へ散布されていると推察された。しかし、他の原因も解明し癌細胞の流出が生じない手術手技の開発に努めなければならない。2) 散布癌細胞の多くは、よく分化した癌細胞であると考えられ、これら分化癌細胞がそのまま腹膜腫瘍を形成するとは考えにくい。生体で腫瘍形成でき

る能力を持つ癌細胞は、癌幹細胞様の、かなり未分化な細胞であると考えられている。すなわち、腹腔内散布癌細胞には、癌幹細胞様の性質を持つ癌細胞が含まれている可能性が示唆される。しかし、腹腔内散布癌細胞のがん幹細胞性を見た研究はまだない。3) 腹腔内へがん細胞散布された症例は、実際にどの程度の頻度で癌再発するのか、一方、散布されなかった症例の癌再発はどうか、詳しく解明する必要がある。さらに、手術中の腹腔内がん細胞検出が再発を推定するバイオマーカーとなり得るかどうかの検討も重要である。

申請者らは、腹腔内癌細胞の腹膜転移形成を予防する目的で、進行胃癌手術中に腹腔内温熱化学療法 (HIPEC) (胃癌切除後に腹腔内に生理食塩水5ℓと抗癌剤3種類を添加し、42℃に加熱維持しながら腹腔内を30分間還流する治療法)を施行してきた。HIPECを施行した漿膜浸潤陽性進行胃癌50例の腹膜再発は2例(5%)のみで、温熱非施行群の40%に比べ良好に腹膜再発が予防できている(2013 ASCO Annual Meeting)。HIPECは胃癌腹膜再発に有効だが、術中腹腔内がん細胞散布症例との関係はどうか、解明が必要である。

興味深いことに、上記の進行胃癌に対し治癒切除 + HIPEC を施行した50例に、肝再発を認めていない。また、進行膵体部癌で治癒切除を受け、HIPECを施行した7例(術後1年-4年経過)も、肝再発を認めていない(2014年日本癌治療学会発表)。これまで考慮されなかったHIPECによる腹膜再発以外の再発抑制効果を、術中のがん細胞散布との観点から詳しく調べる必要がある。

## 2. 研究の目的

消化器癌手術による、腹膜転移形成機序の解明、およびその治療法を開発を今回の研究の目的とした。

手術中の腹膜転移発症機序の解明として、

1. 腹膜再発の原因となる癌細胞の由来
2. 胃癌再発とがん幹細胞様細胞との関係
3. 胃癌手術による腹腔内散布癌細胞の腹膜転移形成能を検討した。

また、

術中散布癌細胞が、実際術後再発形式と関連するかを調べた。

さらに

術中散布癌細胞をターゲットとした術中腹腔内治療は再発予防に役立つのかどうかを調べた。

### 3. 研究の方法

手術中の腹膜転移発症機序の解明

- 1) 胃癌に対する幽門側胃切除術中に、残胃内がん細胞の存在の証明

残胃内を生食 50ml で洗浄し回収後、細胞診により癌細胞の証明

癌細胞の増殖能を見るために Ki67 染色を施行

残胃内癌細胞中のがん幹細胞様細胞の存在を見るために、抗 CD44 抗体にて細胞染色した。

- 2) 胃癌再発とがん幹細胞様細胞との関係

胃癌最深部 ITF における CD44 陽性がん幹細胞様細胞の存在を免疫組織染色で同定。ITF における CD44 陽性細胞と腹膜播種性再発や再発予後との相関をロジステック解析法や Cox ハザードモデル法を用いて、多変量解析した。

- 3) 胃癌手術による腹腔内散布癌細胞の腹膜転移形成能

胃癌治療手術の前後でそれぞれ採取した腹腔内洗浄液を細胞培養し、癌細胞が増殖してくるかを観察した。

腹腔内がん細胞培養 (CCC) 陽性と陰性症例と術後腹膜再発との関係を調べた。

術後 CCC 陽性患者の原発巣 ITF やリンパ節転移巣における CD44 陽性 CSC 様細胞の存在を免疫染色にて調べた。

さらに、術後腹膜再発患者の癌性腹水中に

おける CD44 陽性 CSC 様細胞の存在を免疫細胞染色にて調べた。

術中散布癌細胞と術後再発形式との関連

手術前には腹腔洗浄液中の細胞培養 (CCC) で癌細胞陰性で、胃癌治療手術 (R0) 後の CCC で癌細胞検出の有無と臨床病理学的な違い、および術後再発との相関を調べた。

術中散布癌細胞をターゲットとした術中腹腔内治療による再発予防

術中腹腔内洗浄液中に癌細胞が陽性となった、CCC 陽性症例 (癌細胞の術中腹腔内散布症例) において、術中腹腔内温熱化学療法 (HIPEC) 施行症例と非施行症例とで、術後再発を比較し、HIPEC の胃癌再発予防効果を検証した。

### 4. 研究成果

手術中の腹膜転移発症機序の解明

- 1) 腹膜再発の原因となる癌細胞の由来

胃癌手術中に、漿膜面やリンパ管からのリンパ液、胃流出静脈からの出血により、癌細胞が腹腔内に散布され、腹膜播種性再発の原因となっていることがわかったが、それ以外の腹膜播種性再発の原因を探るため、幽門側胃切除をして残った残胃内腔に癌細胞が存在し、消化管再建中に残胃内から癌細胞が腹腔内に流出する可能性はないかどうかを調べた。その結果、胃癌幽門側切除症例中約 20% に残胃内癌細胞を認めた。残胃内癌細胞は増殖能を伴う viable な癌細胞で、cluster を形成していた。また、転移と強く相関するとされるがん幹細胞様細胞のマーカーである CD44 を発現している癌細胞を認めた。また、進行胃癌のみでなく早期胃癌にも残胃内癌細胞を認め、早期胃癌では、開腹手術よりも腹腔鏡下手術の方が残胃内癌細胞の頻度が有意に高かった。消化管再建時の残胃内容液の腹腔内への流出は、腹膜播種性再発の原因となりうると結論付けた。(J Surg Oncol,

2016)

## 2) 胃癌再発とがん幹細胞様細胞との関係

胃癌浸潤最深部 (ITF) における胃がん幹細胞様マーカーCD44のvariant発現と再発予後との関係を調べると、ITFにCD44陽性癌幹細胞(CSC)様細胞が存在する症例は陰性例に比べ、術後腹膜再発が有意に多く(43.4% vs. 5.8%,  $P < 0.001$ ) 有意に予後不良だった( $P < 0.0001$ )。ITFにおけるがん幹細胞様細胞の発現は他の臨床病理学的因子とは無関係に独立した腹膜再発危険因子であり、独立した腹膜再発予後不良因子であった。(Brit J Cancer, 2017)

## 3) 胃癌手術による腹腔内散布癌細胞の腹膜転移形成能の検討

胃癌治癒切除(R0)手術後の腹腔洗浄液を採取しがん細胞培養を行ったところ、腹腔内がん細胞培養(CCC)陽性症例[47/93 (50.5%)]のみが術後腹膜再発[18/47 (38.3%)]し、CCC中にはCD44陽性CSC様細胞が存在した。一方、術後CCC陽性患者の原発巣ITFやリンパ節転移巣にはCD44陽性CSC様細胞が存在した。さらに、術後腹膜再発患者の癌性腹水中にはCD44陽性CSC様細胞を認めた。よって、CD44陽性CSC様細胞は、胃癌浸潤最深部およびリンパ節転移に由来し、手術中に腹腔内散布し、術後腹膜転移の原因となると推察できた。

### 術中散布癌細胞と術後再発形式との関連

CCC陽性症例と陰性症例の間には、臨床病理学的な背景の違いはなかった。ところが、R0手術後のCCC陽性症例のみが腹膜再発のみならず、肝再発や遠隔リンパ節再発を発症した。一方、CCC陰性症例には、術後再発は認めなかった。

### 術中散布癌細胞をターゲットとした術中

## 腹腔内治療による再発予防

R0手術後のCCC陽性症例に対して、術中腹腔内温熱化学療法(HIPEC)を施行した症例と非施行症例(NO HIPEC)の無再発生存を比較すると、両群間で臨床病理学的背景に差は無かったが、術中HIPEC施行例は、腹膜再発、肝再発、リンパ節再発を有意に抑制し、無再発生存率が有意に良好であった。術中散布癌細胞をターゲットとした術中腹腔内治療により胃がん再発予防効果が期待できると考えられた。

## 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5件)

Viable Cancer Cells in the Remnant Stomach are a Potential Source of Peritoneal Metastasis after Curative Distal Gastrectomy for Gastric Cancer.

Murata S, Yamamoto H, Yamaguchi T, Kaida S, Ishida M, Kodama H, Takebayashi K, Shimizu T, Miyake T, Tani T, Kushima R, Tani M.

*Ann Surg Oncol*. 23(9): 2920-7. 2016.

Prognostic impact of CD44-positive cancer stem cells at the invasive front of gastric cancer.

Kodama H, Murata S, Ishida M, Yamamoto H, Yamaguchi T, Kaida S, Miyake T, Takebayashi K, Kushima R, Tani M.

*Brit J Cancer*. 116(2): 186-194. 2017.

Feasibility and safety of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy using 5-fluorouracil combined with cisplatin and mitomycin C in patients undergoing gastrectomy for advanced gastric cancer.

Satoshi Murata, Hiroshi Yamamoto, Hiroyuki Naitoh, Tsuyoshi Yamaguchi, Sachiko Kaida, Tomoharu Shimizu, Hisanori Shiomi, Shigeyuki Naka, Tohru Tani, Masaji Tani.

*J Surg Oncol*. 2017 Dec;116(8):1159-1165.

5-fluorouracil combined with cisplatin and mitomycin C as an optimized regimen for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in gastric cancer.

Murata S, Yamamoto H, Shimizu T, Naitoh H, Yamaguchi T, Kaida S, Takebayashi K, Miyake T, Tani T, Tani M.

腹腔内遊離癌細胞の検出

村田 聡, 谷 眞至

外科 79, 10, 907-914 (2017)

〔学会発表〕(計 10 件)

胃癌手術時の消化管再建における腹腔内癌細胞散布の危険性について

村田 聡, 山本 寛, 山口 剛, 貝田佐知子, 石田光明, 竹林克士, 塩見尚礼, 仲 成幸, 清水智治, 園田寛道, 太田裕之, 目片英治, 九嶋亮治, 谷 徹, 谷 眞至

第 53 回日本癌治療学会学術集会  
2015 年 京都

消化器癌治療手術後の再発メカニズムと再発予防に関する研究

村田 聡, 山本 寛, 山口 剛, 貝田佐知子, 仲 成幸, 赤堀浩也, 村上耕一郎, 北村直美, 三宅 亨, 児玉泰一, 油木純一, 新田信人, 清水智治, 園田寛道, 太田裕之, 植木智之, 梅田朋子, 森 毅, 河合由紀, 竹林克士, 谷 眞至

第 116 回日本外科学会定期学術集会  
2016 年大阪

A propensity-matched analysis comparing hepatic recurrence after curative gastrectomy followed by adjuvant HIPEC to surgery alone for advanced gastric cancer. Satoshi Murata, Sachiko Kaida, Hirokazu Kodama, Hiroshi Yamamoto, Tsuyoshi Yamaguchi, Reiko Ohtake, Masaji Tani  
ASCO Annual Meeting, 2016. Chicago.

Adjuvant Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) Prevents Hepatic Recurrence after Curative Gastrectomy for Advanced Gastric Cancer

Satoshi Murata, Tsuyoshi Yamaguchi, Sachiko Kaida, Katsushi Takebayashi, Hiroya Akabori, Hiroya Iida, Hiromichi Sonoda, Toru Miyake, Tomoharu Shimizu, Hiroshi Yamamoto, Masaji Tani

40<sup>th</sup> World Congress of the International College of Surgeons. 2016. Kyoto.

Intraoperative adjuvant HIPEC prevents hepatic recurrence as well as peritoneal recurrence after curative gastrectomy for an advanced gastric cancer.

Satoshi Murata, Sachiko Kaida, Hirokazu Kodama, Tsuyoshi Yamaguchi, Katsushi Takebayashi, Reiko Ohtake, Hiroshi Yamamoto, Masaji Tani.

The 10th International Congress on Peritoneal Surface Malignancies.  
2016. Washington, DC.

胃癌浸潤最深部における CD44 陽性癌幹細胞の存在と臨床的意義

児玉泰一, 村田 聡, 石田光明, Pham Minh Ngoc, 三宅 亨, 梅田朋子, 北村直美, 河合由紀, 山口剛, 貝田佐知子, 大竹玲子, 山本寛, 谷 眞至

第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 横浜

Pathophysiology and therapeutic strategies for peritoneal recurrence after gastric cancer surgery

Satoshi Murata, Katsushi Takebayashi, Hiroshi Yamamoto, Tsuyoshi Yamaguchi, Sachiko Kaida, Hirokazu Kodama, Reiko Ohtake, Tomoharu Shimizu, Tsuyoshi Mori, Yuki Kawai, Naomi Kitamura, Toru Miyake, Hiroya Akabori, Hiroya Iida, Tomoyuki Ueki, Hiromichi Sonoda, Haruki Mori, Nobuhito Nitta, Shigeyuki Naka, Masaji Tani.

ASCO Annual Meeting, 2017. Chicago.

Peritoneal liquid biopsy used to predict cancer recurrence after gastrointestinal cancer surgery.

Satoshi Murata, Katsushi Takebayashi, Tsuyoshi Yamaguchi, Sachiko Kaida, Hirokazu Kodama, Hiroya Akabori, Hiroya Iida, Naomi Kitamura, Hiromitsu Maehira, Haruki Mori, Toru Miyake, Yuki Kawai, Tsuyoshi Mori, Tomoyuki Ueki, Hiromichi Sonoda, Soichiro Tani, Yoshitaka Terada, Tomoharu Shimizu, Yataro Daigo, Masaji Tani

ASCO Annual Meeting, 2018. Chicago.

胃癌切除後腹腔内がん細胞検出による再発リスク予測と、術中腹腔内治療による再発予防

村田 聡, 竹林克士, 山口 剛, 貝田佐知子, 児玉泰一, 山本 寛, 河合由紀<sup>1</sup>, 森 毅, 飯田洋也, 北村直美, 前平博充, 三宅 亨, 植木智之, 清水智治, 谷 眞至

第 55 回日本癌治療学会学術集会  
2017 年 横浜

A source of cancer stem-like cells that cause peritoneal metastasis after gastric cancer surgery

村田 聡, 竹林克士, 児玉泰一, 山口剛, 貝田佐知子, 石田光明, 三宅 亨, 北村直美, 植木智之, 飯田洋也, 前平博充, 園田寛道, 生田大二, 清水智治, 九嶋亮治, 谷 眞至

第 90 回日本癌学会総会 2018 年 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：胃癌患者の予後の検査方法  
発明者：村田 聡、谷 眞至  
権利者：村田 聡、谷 眞至  
種類：特許、  
番号：特願 2016-234200  
出願年：2016年  
国内外の別：国内

取得状況（計 0件）

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

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田 聡 (MURATA Satoshi)  
滋賀医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90239525

(2)研究分担者

山本 寛 (YAMAMOTO Hiroshi)  
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：00283557

山口 剛 (YAMAGUCHI Tsuyoshi)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10510290

谷 眞至 (TANI Masaji)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60236677

清水 智治 (SHIMIZU Tomoharu)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70402708

三宅 亨 (MIYAKE Toru)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70581924

(3)研究協力者

児玉泰一 (KODAMA Hirokazu)  
竹林克士 (TAKEBAYASHI Katsushi)  
有川依久子 (ARIKAWA Ikuko)  
山元美穂 (YAMAMOTO Miho)