

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月7日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19841

研究課題名(和文) EMTに注目した胃癌における循環・骨髄腫瘍細胞の臨床的意義の検討

研究課題名(英文) Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with gastric cancer: epithelial mesenchymal transition and perioperative kinetics

研究代表者

柴崎 晋 (Shibasaki, Susumu)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：60711877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：循環腫瘍細胞(CTC)のヘテロ性が近年注目されてきている。本研究の目的は上皮系マーカーだけに頼らずEMTマーカーにも注目し、周術期におけるCTCの予後予測マーカーとしての臨床的意義を検討することである。胃癌患者54人の抹消血を術前、術後1週間、1か月、6か月に採取し、MACS法、蛍光顕微鏡を用いサイトケラチンやNカドヘリンを発現する細胞をCTCと定義した。術前にCTCを認め、術後1週間あるいは1か月目のCTC個数が術前以上に認めた症例は、術後にCTC個数が減少する場合や術前にCTCを認めない場合に比べ再発率が高かった。周術期のCTCを測定することは再発を予測するマーカーとなり得る。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) have been shown to be heterogeneous. This study aimed to identify the prognostic significance of CTCs in patients with gastric cancer, focusing on epithelial mesenchymal transition and perioperative kinetics. Peripheral blood was taken from patients (n=54) before curative resection, and at 7 days, 1 and 6 months postoperatively. CTCs were enriched using density gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting (negative selection). Cell suspensions were characterized by multi-immunofluorescence staining against cytokeratin (CK) and N-cadherin, and by DAPI staining. CTCs were defined as nucleated cells expressing CK or N-cadherin. After 2 years, postoperative recurrence was detected in five patients, all of whom had N-cadherin+/CK-/CD45- CTCs preoperatively. The recurrence rates were high in the preoperative 1 CTC or more, and increased postoperatively. Perioperative measurement of CTCs may be a useful surrogate marker for recurrence risk.

研究分野：消化器外科

キーワード：循環腫瘍細胞 上皮間葉転換 胃癌

1. 研究開始当初の背景

消化器癌・乳癌をはじめとする固形癌症例では根治術後の早期再発や、5年目以降の晩期再発が認められる。これは、根治可能と考えられる担癌患者においてさえ、臨床的には同定できない程度の微量な腫瘍細胞がすでに遠隔臓器に存在することを示している。遠隔転移が成立する過程において、血管内に流入した腫瘍細胞を循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells: CTC)、臨床的に微量な癌細胞を同定する意義は、(1) 血行性転移の再発や予後を予測、(2) 再発の早期発見、(3) CTC、の表現形質 (phenotype) を把握することで個別治療に応用、(4) 化学療法後などの治療効果モニタリングとして活用できることである。最近では、転移性乳癌において CTC 数が5個以上の症例と5個未満の症例では予後に有意な差が認められるとの報告 (Cristofanilli M et al. N Engl J Med 2005) があり、消化器癌においては2個以上と2個未満では全生存率に有意な差があるとの報告 (Hiraiwa K et al. Ann Surg Oncol 2008) もある。さらには、乳癌、大腸癌、前立腺癌において治療開始前および初回治療後の CTC 個数が無増悪生存期間および全生存期間で強い相関を示すことが報告されている。今日まで、癌細胞を単離する際は、サイトケラチンや上皮細胞接着分子 (epithelial cell adhesion molecule; EpCAM) といった上皮性マーカーに着目し、抗原抗体反応により癌細胞を検出することが主流であった。2002年に CTC を選択的に分離・計数する装置 Cell Search システム (Veridex) が発表され、現在では転移性乳癌、転移性大腸癌、転移性前立腺癌に対しアメリカ食品医薬品局 (FDA) で承認されている唯一の装置となった。その装置を使用し CTC の数と患者の予後不良との間に相関があることが報告 (Cristofanilli M et al. N Engl J Med 2004) されて以降、Cell Search システムを用いて世界各地で実用化に向けた臨床研究が盛んにされるようになった。しかし、癌は本来、発生元である上皮細胞の特徴を有しているが、浸潤能を獲得した悪性度の高い癌ではしばしば EMT が生じ、上皮系細胞の性質が失われ間葉系細胞の性質が促進される。CTC は非常に高い異質性をもつとも報告されている (Yu M et al. Science 2013)。Cell Search システムは、細胞の上皮細胞接着分子 (EpCAM) に対する抗体を用いて検出する装置である。そのため、EMT を起こした CTC は EpCAM のみを標的とした Cell Search システムでは感度が決して高くはないと報告され (Van de Stolpe A et al. Cancer Res 2011)、上皮性マーカーによる検出法では検出されない CTC を見逃している可能性が示唆される。今後、それら見逃されている癌細胞に対し、新たな検出法の開発や分子学的な解明が課題である。2008年から当科において抗原抗体法である磁気ビーズ細胞分離法 (Magnetic cell sorting system; MACS)

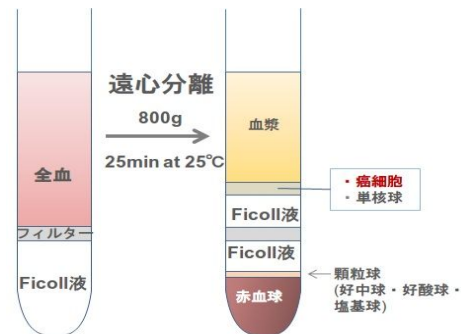
を使用し、大腸癌、肝癌において CTC を同定し病理組織学的因子や予後との関連を調べてきた。MACS はポリメラーゼ法 (PCR 法) とは違い、細胞の形態を維持したまま検出できる利点がある。そこで、今回は胃癌においても磁気ビーズ細胞分離法を用いて、細胞表面に存在する N カドヘリンを含めた間葉系マーカーも追加した細胞単離をおこなうことで、CTC の検出感度を向上させ、原発巣の病勢をより正確に反映する診断法の確立を目指す。

2. 研究の目的

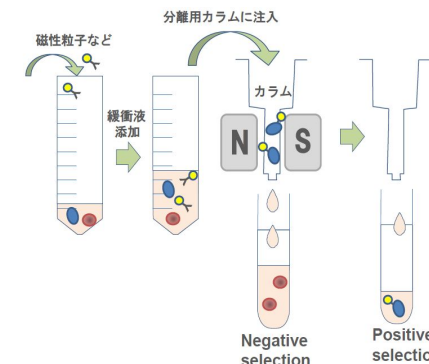
胃癌患者の周術期において間葉系マーカーの評価も加えた CTC の検出法を確立し、検出された CTC の性質と臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

2014年12月～2016年12月に当科で胃癌の R0 切除を施行した 54 例 (男:女 = 36:18) を対象とした。観察期間の中央値は 18.5 ヶ月。Stage 毎の症例数は、Ⅰ : Ⅱ : Ⅲ : Ⅳ = 31:13:10:0 である。術直前、術後 1 週間、1 ヶ月、6 ヶ月に末梢血 7.5ml を採取し、濃度勾配遠心分離 (図 1) や MACS を用いて CD45 陰性細胞を negative selection した (図 2)。免疫細胞染色法にて上皮系の Cytokeratin (CK)、間葉系の N-cadherin、DAPI の多重染色を行い、CK あるいは N-cadherin を発現する細胞を CTC と定義した。なお、健康人 10 名の抹消血を Negative control とした。



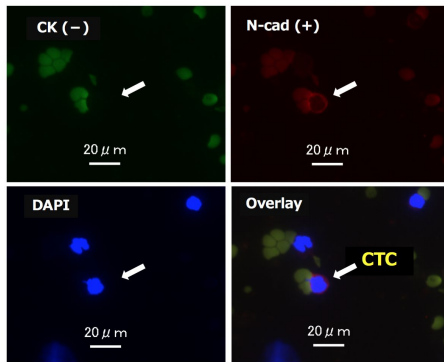
(図 1) 濃度勾配遠心分離



(図 2) MACS (negative selection を採用)

4. 研究成果

(1)CK(+)-N-cadherin(-)症例は認めなかった。CK(-)-N-cadherin(+)症例は 38.9%(21/54)、CK(+)-N-cadherin(+)症例は 3.7%(2/54)(図3)であった。



(図3) CK(-)-N-cadherin(+)

(2)CTCのROC解析では、2年以内の再発をoutcomeとするとAUCが0.893(95%信頼区間;0.80~0.98)であり、cut-off値が1であった。CTC=0を陰性、CTC 1を陽性としたときの早期癌、進行癌でのCTC陽性率は24%(7/29)、56%(14/25)($P<0.05$)であった。静脈侵襲があるとCTC陽性となる傾向があったが($p=0.052$)、他の病理組織学的因子の相関はなかった(図4)。

Relationship between clinicopathological features and CTCs			
	CTC count ≥ 1		P-value *
	+(n=21)	-(n=33)	
T1:T2-4	7:14	22:11	0.025
N0:N1-3	12:9	24:9	0.255
M0:M1	21:0	33:0	1
Stage I:II-III	10:11	21:12	0.273
ly0:1-3	11:10	21:12	0.571
v0:1-3	8:13	22:11	0.052
pap, tub:por, sig, muc	14:7	16:17	0.263

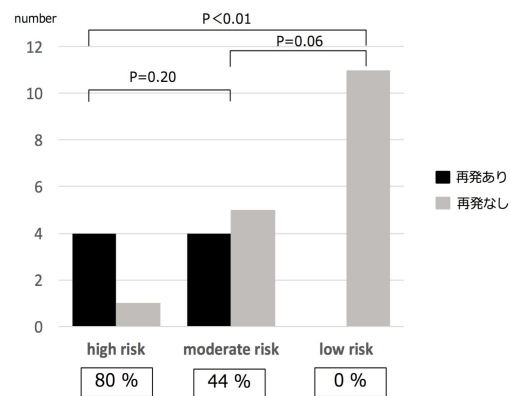
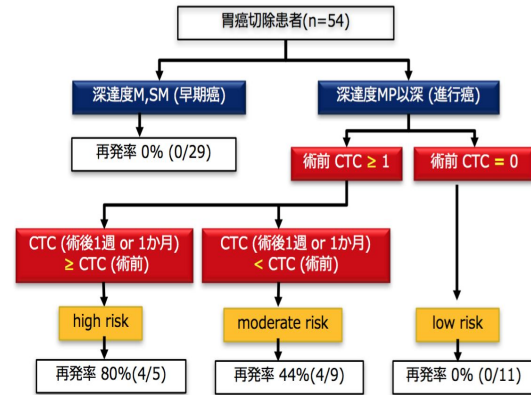
* Fisher's exact test

(図4)

(3)現在まで8例に再発を認めており、いずれも進行癌で術前にCK(-)-N-cadherin(+)のCTCを認めた症例であった。また、進行癌の周術期CTC(術前、術後1週間、術後1ヶ月)の推移に注目し、以下の3群に分けた(A. CTCが術前陽性でかつ術後に増加した群をhigh risk群、B. CTCが術前陽性でかつ術後に減少した群をmoderate risk群、C. 術前CTC陰性群をlow risk群)。それぞれ2年以内の再発率は、80%(4/5)、44%(4/9)、0%(0/11)であった(図5)。

本研究の臨床的応用として、周術期CTCの推移に基づいたリスクの層別化をすることで、リスクのある患者に対しては、術後adjuvantとして強力な薬剤を選択したり、術後surveillanceの間隔を短くするなどのテーラーメイド治療につなげる可能性があること

考える。



(図5) 層別化による再発率

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 2 件)

1) Nakauchi M, Suda K, Shibasaki S, Kadoya S, Inaba K, Ishida Y, Uyama I. Comparison of the long-term outcomes of robotic radical gastrectomy for gastric cancer and conventional laparoscopic approach: a single institutional retrospective cohort study. Surg Endosc. 2017 Oct;31(10):4283-4297. 査読有り、DOI:10.1007/s00464-016-4904-z

2) Nakauchi M, Suda K, Nakamura K, Shibasaki S, Kikuchi K, Nakamura T, Kadoya S, Ishida Y, Inaba K, Taniguchi K, Uyama I. Laparoscopic subtotal gastrectomy for advanced gastric cancer: technical aspects and surgical, nutritional and oncological outcomes. Surg Endosc. 2017 Nov;31(11):4631-4640. 査読有り、doi:

10.1007/s00464-017-5526-9.

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴崎 晋 (SHIBASAKI Susumu)
北海道大学・大学院医学研究院・客員研究員
研究者番号：60711877

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし