

令和元年6月18日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10509

研究課題名(和文) 消化器癌の遊離微小癌細胞解析による治療分子標的の選択法の確立

研究課題名(英文) Evakuation of molecular target on circulating tumor cells in gastrointestinal cancer patients

研究代表者

上之園 芳一 (UENOSONO, YOSHIKAZU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60398279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：次世代CTC濃縮システムであるIsoFlux Systemを用いたCTC回収を目指したが、従来から用いているCellSearch systemに比した有用性を見いだせなかった。胃癌患者においてCTCのHER2発現が確認される患者において分子標的治療薬である Trastuzumabが有効であることが確認できた。またPDL-1について胃癌患者の血液を用いRT-PCR法によりmRNAの評価を行い、早期例に比較して進行例で有意に高く、mRNA発現が高い症例は、低い症例と比較して有意に予後不良であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌治療における血中の循環癌細胞の蛋白発現および血液中のmRNAを評価することにより、効率的な分子標的薬剤の適応を非侵襲的にCTCによる判別する方法を確立するために有益な知見が得られたものと考えられ、効果的な治療対象となる患者の選択が可能となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We compared Isoflux system with CellSearch system, but was not able to prove the usefulness of Isoflux system. Trastuzumab which was a molecular target drug was effective in the patient with HER2 expression of Circulating tumor cells was confirmed in gastric cancer patients. Furthermore, we evaluated the mRNA by the RT-PCR method with the blood of gastric cancer patients about PDL-1. Expression of PDL-1 was significantly high in the advanced cancer patients in comparison with early cancer patient. In addition, in the patients whom mRNA expression of PDL-1 was high in, the thing that had a poor prognosis was confirmed in intentionality in comparison with a low patient.

研究分野：消化器外科

キーワード：CTC 消化器癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化器癌では初発で発見されても遠隔転移を有する症例も少なくなく、手術可能と判断されても術後再発をきたす症例が一定の頻度で認められる。これらの一因として循環癌細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) の存在が指摘され、古くから議論されてきた。RT-PCR 法やフローサイトメトリー法による検出が試みられ予後や再発との関連が報告されてきた。

これまで申請者らは、CellSearch システムを用いた末梢血の CTC の検出を行い、胃癌、食道癌および膵臓癌での臨床的意義を明らかにし報告してきた。このシステムでは、EpCAM 抗体を標的として磁気ビーズにより CTC を分離し、Pancycokeratin および DAPI、CD45 による自動蛍光染色で癌細胞を識別する。胃癌の手術症例においては CTC が 20% に検出され、CTC の有無が再発予測の独立予後因子であることが確認され、切除不能胃癌においても CTC は 60% に検出され、CTC の有無で予後に有意な差があることを確認した (Uenosono Y et al. Cancer 2013)。食道癌では、切除可能症例での検出率は低い一方、切除不能例での検出率は 60% で検出され、化学放射線療法前後での CTC 数の変化が治療効果と相関することを確認した (Matsushita D et al. Ann Surg Oncol. 2015)。膵臓癌でも食道癌と同様な傾向があり、切除可能例での検出率は低く、切除不能膵臓癌で 60% で検出され化学放射線療法前後での CTC 数の変化が治療効果と相関することを確認している。

CTC が消化器癌患者における進行状況や化学療法における治療効果を反映しているのは明らかとなったが、一方で治療法の選択を行ううえで Liquid biopsy としての分子病理学的解析の対象としても応用の可能性がある。分子標的治療は、次々と新薬開発が行われ消化器癌においても適応となってきている。

胃癌では HER2 や VEGFR-2 (ヒト血管内皮増殖因子受容体-2) を標的とした分子標的治療薬である Trastuzumab や Ramucirumab が使用可能となっている。また、PD-L1 発現のある胃癌患者において抗 PD-1 抗体 pembrolizumab の有効性が示され保険適応が待たれている状況である。膵臓癌でも PD-L1 を標的とした pembrolizumab が使用可能である。しかし、実際の組織学的な HER2 陽性率は 10~20% であり、PD-L1 でも 10% 程度と報告されている。

しかし、実際の治療のうえで恩恵を受ける対象は一部であり、組織学的な分子標的の選別を行っても治療効果が均一では無いのも事実である。消化器癌は heterogeneity が強く、切除不能例における組織採取のための生検では腫瘍全体の状況を十分に反映していない事が要因として考えられる。消化管癌では表面に比べて腫瘍先進部となる深部において生物学的悪性度が高いと考えられ、その組織採取は困難である。CTC は、その深部より循環血液中に浸潤した細胞と考えられ、また免疫環境の高いはずである循環血液中においても viability を維持している細胞であるならば、CTCこそが治療すべき標的分子解析の対象であると想定される。既に CTC における HER2 タンパクの発現解析および CTC の FISH 法による解析をすすめているところであるが、胃癌において生検組織と CTC で約 35% が一致していないことも確認できている。更に、現在まで CTC の解析に用いてきた CellSearch では EpCAM 発現による細胞分離を行っているが、癌細胞の EpCAM 発現の程度により CTC 分離率に差があることが報告されている。また上皮間葉移行 (EMT) をきたした癌細胞は回収されていない可能性も示唆されている。分子標的の解析を行ううえでは、Liquid biopsy という観点からしても CTC の分離回収能力が高いことが必要とされ、癌腫や症例によっては EMT 細胞が多くを占める可能性もある。

2. 研究の目的

本研究は、消化器癌における **循環癌細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC)** の標的分子発現解析と **分子標的治療薬** の効果予測および効率的かつ正確な適応患者の選択法の確立を行い外科治療および化学療法を中心とした **癌治療の個別化** を図ることである。

3. 研究の方法

IsoFlux System (米国 Fluxion Biosciences 社) は、次世代 CTC 濃縮システムであり、細胞表面にビーズを結合させ、マイクロ流路の中で均一なフローを形成し、強力なマグネットで、均一なサンプル濃縮をしている。血液サンプルから CTC など希少細胞 (陽性率 0.001% 以下) をダメージレスな状態で容易に回収することが可能であることが利点とされている。

本研究では胃癌および食道癌、膵臓癌を中心として細胞株による Isoflux システムによる検出系の確立および従来の CellSearch による検出系との比較を行った。更に分子標的治療の対象となる HER2、PDL-1 をはじめとする CTC での分子発現をタンパクおよび遺伝子レベルで発現を評価する手法を確立し、それと併せて患者末梢血臨床検体を用いた CTC の標的分子発現解析と分子標的治療薬の効果の評価を予測および効率的かつ正確な適応患者の選択法の確立を行った。

4. 研究成果

CTC の検出実験を Isoflux System と CellSearch を比較する事で研究を開始した。Isoflux System での CTC の分離作業は、従来より用いてきた CellSearch システムと比べて、自動の画像化ができず、工程が非常に煩雑であり、再現性に乏しいことから手技の安定化に至らなかった。その結果 Isoflux System による CTC 検出の優越性は確認できなかった。

HER2 の CTC での発現については、CellSearch で得られる結果を元に CTC における HER2 発現による分子標的治療薬の効果の評価を行った。その結果、組織学的に HER2 陰性である胃癌患者

において CTC の HER2 発現が確認される患者において分子標的治療薬である Trastuzumab が有効であることが確認できた。CellSearch で得られる結果を元に HER2 発現については引き続き検証をすすめている。CTC の FISH での評価についても、安定的な評価が可能となり、タンパク発現の評価と相関があることを確認できた。

PDL-1 について胃癌症例における血液を用い RT-PCR 法により mRNA の評価を行ったところ、早期例に比較して進行例で有意に高く、また深達度、遠隔転移、病期と相関を認めた。PDL-1 の mRNA 発現が高い症例は、低い症例と比較して有意に予後不良であった。多変量解析にて血中 PDL-1 の mRNA 発現は独立した予後予測因子となることが確認された。CTC における PDL-1 発現の評価が、免疫チェックポイント阻害剤の効果予測および適応の選別に有用な可能性があることを確認した。

当初予定していた抗癌剤感受性試験に関する実験には至らなかったが、この研究の最終目的であった効率的な分子標的薬剤の適応を非侵襲的に CTC による判別する方法を確立するために有益な知見が得られたものと考えられ、効果的な治療対象となる患者の選択が可能となるかもしれない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. The association of human endogenous retrovirus-H long terminal repeat-associating protein 2 (HHLA2) expression with gastric cancer prognosis. Shimonosono M, Arigami T, Yanagita S, Matsushita D, Uchikado Y, Kijima Y, Kurahara H, Kita Y, Mori S, Sasaki K, Omoto I, Maemura K, Uenosono Y, Ishigami S, Natsugoe S. *Oncotarget*. 2018 Apr 24;9(31):22069-22078. doi: 10.18632/oncotarget.25179. 査読有
2. Programmed death-ligand 1 is a promising blood marker for predicting tumor progression and prognosis in patients with gastric cancer. Amatatsu M, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Uchikado Y, Kijima Y, Kurahara H, Kita Y, Mori S, Sasaki K, Omoto I, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S. *Cancer Sci*. 2018 Mar;109(3):814-820. doi: 10.1111/cas.13508. 査読有
3. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastric cancer. Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Okubo K, Kijima T, Matsushita D, Amatatsu M, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. *Ann Gastroenterol Surg*. 2017 Apr 25;1(1):60-68. doi: 10.1002/ags3.12005. 査読有
4. Clinical significance of altering epithelial-mesenchymal transition in metastatic lymph nodes of gastric cancer. Okubo K, Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S, Matsushita D, Kijima T, Amatatsu M, Uchikado Y, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S. *Gastric Cancer*. 2017 Sep;20(5):802-810. doi: 10.1007/s10120-017-0705-x. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Uenosono Y., Arigami T., Okubo K., Yanagita S., Kijima T., Amatatsu M, Matsushita D., Okumura H, Ishigami S, Natsugoe S. : Utility of intraperitoneal paclitaxel chemotherapy for gastric cancer with peritoneal dissemination, 47th World Congress of Surgery 2017, Basel Switzerland, 8月15日, 2017
2. 上之園芳一, 有上貴明, 大久保啓史, 貴島孝, 柳田茂寛, 松下大輔, 小園勉, 川越浩輔, 奥村浩, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 胃癌における血中循環癌細胞の検出と臨床応用の可能性(シンポジウム). 第26回日本がん転移学会学術集会・総会, 大阪市, 7月27日, 2017
3. 上之園芳一, 有上貴明, 大久保啓史, 貴島孝, 柳田茂寛, 天辰仁彦, 川越浩輔, 松下大輔, 奥村浩, 石神純也, 夏越祥次: 切除不能・再発胃癌における化学療法による HER2 陽性の血中循環癌細胞の変化に関する検討. 第117回日本外科学会定期学術集会, 横浜市, 4月27日, 2017
4. 上之園芳一, 有上貴明, 大久保啓史, 貴島孝, 柳田茂寛, 松下大輔, 小園勉, 天辰仁彦, 川越浩輔, 奥村浩, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 胃癌における末梢血および門脈血中

- の循環癌細胞の臨床的意義の検討、第 89 回日本胃癌学会総会、広島市、3 月 10 日、2017
5. 上之園芳一，有上貴明，夏越祥次: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 (パネルディスカッション) .第 24 回日本消化器関連学会週間 (JDDW) ，神戸市，11 月 5 日，2016
 6. 上之園芳一，有上貴明，柳田茂寛，大久保啓史，貴島孝，松下大輔，奥村浩，石神純也，帆北修一，夏越祥次 : 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，大阪市，4 月 15 日，2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：有上 貴明

ローマ字氏名：TAKA AKI ARIGAMI

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：特任准教授

研究者番号 (8 桁) : 40527058

研究分担者氏名：夏越 祥次

ローマ字氏名：SHOJI NATSUGOE

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教諭

研究者番号 (8 桁) : 70237577

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。