

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04285

研究課題名(和文) 上部消化器癌の微量癌細胞解析を用いた治療選択への応用

研究課題名(英文) Treatment strategy by the analysis of minimal cancer cells in upper gastrointestinal tract

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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は上部消化器癌のリンパ節および血中の微量癌細胞(minimal residual tumor cells :MRTC)を用いてMRCTの特質を明らかにすることを目的とした。リンパ節および血中の微量癌細胞の存在は予後予測に有用であった。リンパ節での転移形成の過程で、癌細胞の上皮間葉転換が組織学的に起こっている事象が確認できた。血中MRTCの検出はHER2発現など分子標的治療の有用なマーカーになりえることが示唆された。食道癌組織より様々な形態を有するオルガノイドの形成が観察された。術前治療に奏功しなかった症例のオルガノイドでは、がん幹細胞性の性格を有していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の診断や治療に際しては、画像で診断される明らかな転移のみならず、まだ画像診断でとらえられてない微量癌細胞に対しても診断や治療を考慮する必要がある。リンパ節や血中の微量癌細胞は予後に関連している。また微量癌細胞の本質を調べることにより、分子標的治療に応用可能なマーカーが見つかった。また癌細胞の三次元培養により作成されたオルガノイドは治療感受性や抵抗性を調べることに有用となる。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this research was to clarify the characteristics of minimal residual tumor cells (MRTC) in the lymph node and blood by biological and molecular method. The presence of MRCT in the lymph node and blood was useful for predicting the prognosis in esophageal or gastric cancer patients. In the process of metastatic formation in the lymph node, epithelial-mesenchymal transition was histologically confirmed. MRTC in blood was suggested to be a new biomarker in the biological targeting therapy by using HER2 expression. We established the various organoids derived from esophageal cancer tissues. The organoid with resistance against preoperative chemo- and/or radiotherapy was suggested to have the property of cancer stem cell.

研究分野：消化器外科

キーワード：上部消化器癌 リンパ節 微小転移 血中遊離癌細胞 食道癌 胃癌 HER2

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

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。また, 最近 liquid biopsy の一つである CellSearch system を用いた血中遊離癌細胞を検出することにより, 食道癌や胃癌で臨床病理学的因子や予後との検討を行ってきた。上部消化器癌で根治切除後に再発する症例, 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。これらの再発症例の予知に, リンパ節や血中などに存在する微量癌細胞のバイオマーカーとしての応用を考案した。「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, 微量癌細胞が上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) を起こす細胞の可能性, 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。さらに原発巣の生物学的特性を検討する目的で, 生検組織の3次元培養よりオルガノイドを作成し, 癌の特性と血中遊離癌細胞の関係を明らかにすること, オルガノイドを用いた化学療法や分子標的治療などの感受性を調べることは, 今後の治療指針に重要な情報を提供するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は上部消化器癌の生検組織, リンパ節および血中の微量癌細胞を用いて, 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。さらに微量癌細胞を用いた抗癌剤や分子標的剤感受性に関する治療選択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。また生検組織を用いた個々の癌の生物学的悪性度の解析が可能となってきた。これらの微量癌細胞を用いて, 着床・増殖, 転移や再発との関連を検討する。さらに生検組織よりオルガノイドを作成し, 腫瘍の悪性度解析, 薬剤感受性への応用を目指す。

3. 研究の方法

リンパ節・血中微量癌細胞の特質を明らかにする。

微量癌細胞の中に着床能力持っている細胞はEMTの性質を有する細胞, または癌幹細胞あるいはそれに近い性質を有しているという仮説のもとに, EMTあるは癌幹細胞マーカーを用いて解析を行い, 微量癌細胞の特性を明らかにする。微量癌細胞がみられた症例について, 原発巣とリンパ節転移巣に関してEMT 関連マーカー (snail, slug, Zeb1, Zeb2 など) あるいは癌幹細胞マーカー (CD133, CD44, ALDH など) を用いて免疫組織学的およびRT-PCR 法で解析をする。血中微量癌細胞に関しては, CellSearch System を用いて検出された微量癌細胞のcharacter 解析を行う。特にEMT および癌幹細胞に着目し, 臓器ごとに各マーカーを用いて, 血中微量癌細胞との関係を解析する。

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。

化学療法あるいは化学放射線治療の奏効例と非奏効例では, 微小転移巣に関しても抗癌剤, 放射線の感受性および耐性の関与があることを報告した。術前治療で残存したリンパ節や血中の癌細胞は抗癌剤や放射線耐性細胞と考えられ, EMTあるいは癌幹細胞の性質を持つと考えられる。化学あるいは放射線耐性の残存微量癌細胞の特質を明らかにする。

微量癌細胞の着床・増殖機序を明らかにする。

生検検体から得られた癌細胞の3次元培養を行い, オルガノイドを作成する。後述するように食道癌の生検標本からオルガノイドの作成に成功している。オルガノイドの生物学的悪性度を解析し, 血中遊離癌細胞との関連や, 化学あるいは放射線耐性の残存微量癌細胞の特質を比較する。前立腺, 膵臓, 大腸, 胃癌ではオルガノイド作成成功例の報告がみられるが, 食道扁平上皮癌ではまだ見られていない。オルガノイドを用いて腫瘍の生物学特性を解析し, 血中遊離癌細胞や治療後残存癌細胞との比較を行う。生検標本からオルガノイドの作成ができるため, 化学±放射線治療を行う症例にも応用可能である。様々な形態を有するオルガノイドが観察され, 生物学的特性も個々の癌で異なると考えられる。これらの原発巣のオルガノイドを用い, 血中遊離癌細胞や治療後残存微小癌細胞の特質を, EMT や癌幹細胞の観点から解析する。

微量癌細胞の化学療法や分子標的治療へ応用を試みる。

CellSearch Systemを用い, 微量癌細胞の遺伝子発現をみることにより, 分子標的治療の選別について調べる。血中微量癌細胞のEGFRやHer2/neuなど分子標的治療の遺伝子発現を解析し, 原発巣と対比する。オルガノイドを用い, 化学療法や分子標的治療などの感受性を調べる。微量癌細胞の分子標的治療への応用として, 胃癌症例でCellSearch System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。上述したようにEGFR やHer2/neu の発現は確かめられており, 症例を追加して検討を進める。原発巣と血中遊離癌細胞でのEGFR やHer2/neu の発現の差異を解析する。オルガノイドを用いた研究に関しては, 予備実験として, すでにKi67 やp53 の発現を調べることにより, オルガノイドを用いた評価が可能であることは検証済である。さらに生検組織標本から作成したオルガノイドを用い, 分子マ

カー（EGFR やHer2/neu，EMT, cancer stem cellなど）の発現を調べ，臨床応用の可能性について検討する．

4．研究成果

胸部食道扁平上皮癌のリンパ節微小転移に対する術前化学放射線療法の影響について術前化学放射線療法(nCRT)は微小転移を制御することにより予後を改善すると想像されるが，食道扁平上皮癌のリンパ節微小転移に対する nCRT の影響とその意義に関する報告はほとんどない．食道扁平上皮癌患者において nCRT のリンパ節微小転移におよぼす影響と臨床的意義について検討した．

対象は 1997 年から 2001 年に当科で前向きに無作為に割り付けられた進行食道扁平上皮癌患者 41 例（手術単独群：21 例，nCRT 群：20 例）．摘出したすべてのリンパ節に対し，通常行われる病理組織学検索に加え，抗サイトケラチン抗体により免疫組織学的に微小転移の検索を行い評価した．リンパ節微小転移を，周囲間質反応を伴い cluster を形成する微小転移（MM, Micrometastasis）と，周囲間質反応を伴わない single cell の微小転移（TCM, Tumor cell microenvironment）のいずれかに分類し評価した．nCRT は低用量 CF 療法（CDDP 7mg/body, 5-FU 350mg/body）を同時併用し 40Gy 行った．

手術単独群では nCRT 群に比べ有意に MM ± TCM と TCM の検出率が高かった．41 例の検討で，リンパ節転移陽性かつリンパ節微小転移陽性の症例は，そうでない症例に比べ有意に予後不良であった．nCRT 群においても同様に，リンパ節転移陽性かつリンパ節微小転移陽性の症例は，そうでない症例に比べ有意に予後不良であった．進行食道扁平上皮癌において nCRT はリンパ節微小転移の制御に有用であった．病理組織学リンパ節転移とリンパ節微小転移を同時に評価することは予後予測に有用であった．

胃癌の原発巣と転移リンパ節での上皮間葉転換(Epithelial Mesenchymal Transition:EMT)と間葉上皮転換 (Mesenchymal-Epithelial transition: MET)について解析し，リンパ節転移との関連および臨床病理学的な意義を検討した．胃切除術とリンパ節郭清が施行された 196 例中，リンパ節転移を認めた 89 例を対象とした．全例の原発巣とすべての転移リンパ節 511 個の E-cadherin，N-cadherin，および EMT 誘導因子 Snail の発現を免疫染色により評価した．

原発巣で E-cadherin の発現低下例では，有意に転移個数が多くみられた(P=0.027)．また，転移リンパ節での E-cadherin 発現低下例では，有意にリンパ節転移個数が多かった(P=0.003)．転移リンパ節の N-cadherin 発現の高い症例は，転移個数が多く(P=0.004)，脈管侵襲の陽性率が有意に高く，Stage も相関していた(P=0.015)．原発巣，転移リンパ節ともに N-cadherin の発現は，高発現例で有意に予後不良であった．Snail のリンパ節転移巣で発現は，低発現例で転移リンパ節個数は多く(P=0.002)，Stage も進行していた (P=0.048)．転移リンパ節個数の多い症例では，Snail 発現が原発巣で高く，転移リンパ節では低下していた(Snail switch)．Snail switch は 19 例(21.3%)で認められ，リンパ節転移が多く(P=0.0009)，Stage も進行しており(P=0.038)，有意に予後不良であった(P=0.0002)．本研究の結果から，リンパ節での転移形成と新たなリンパ節転移の過程で，癌細胞の EMT および MET が組織学的に起こっている事象が確認できた．

血中遊離癌細胞(circulating tumor cell: CTC)に関して，CellSearch System を用いて，HER2 の発現とトラスツズマブを用いた治療効果について検討した．治癒切除不能進行・再発胃癌 105 例中，CTC 陽性 61 例を対象とした．組織と CTC の HER2 発現を調べ次の各群に分類した．A 群（組織 HER2 陽性：27 例），B 群（組織 HER2 陰性,CTC-HER2 陽性：17 例），C 群（組織 HER2 陰性，CTC-HER2 陰性 17 例）であった．A，B，C 群の病勢制御率は各々 69.6%，76.5%，52.9% であった．生存期間の中央値は，A，B，C 群で各々 587 日，778 日，496 日であり，A 群と C 群 (P=0.041)，B 群と C 群(P=0.029)で有意差が認められた．また無増悪生存期間は，A，B，C 群で各々 295 日，400 日，303 日であり，B 群と C 群で有意差が認められた(P=0.049)．CTC の検出は予後予測に有用であることばかりではなく，HER2 発現など分子標的治療を行う際に有用なマーカーになりえることが示唆された．また非侵襲的であり，頻回なモニタリングも可能である利点もあると考えられた．

食道扁平上皮癌組織より，約 2 週間後にオルガノイドが作成可能となった．まず作成法に関して 3 次元培養の手技を確立した．様々な形態を有するオルガノイドが形成され，組織学的分化度が異なる多様性が観察された．また Ki67 や p53 の発現は各オルガノイドで異なっており，腫瘍の特性を示していることが明らかとなった．また 21 症例のうち 15 例からオルガノイドを作成し，これらのオルガノイドを用いて 5-fluorouracil の治療効果を検討した．術前に化学療法あるいは化学放射線療法に奏功しなかった症例から得られたオルガノイドでは 5-fluorouracil の効果が不良であった．これらの 5-fluorouracil 抵抗性のオルガノイドでは，CD44 の発現が増強していることからがん幹細胞性の性格を有していると考えられた．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okubo K, Uenosono Y, Arigami T, Matsushita D, Yanagita S, Kijima T, Amatatsu M, Ishigami S, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Quantitative assessment of fluorescence intensity of ICG in sentinel nodes in early gastric cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 776-781
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-018-0816-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higo N, Okumura H, Uchikado Y, Omoto I, Sasaki K, Kita Y, Ryosuke D, Noda M, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S.	4. 巻 32
2. 論文標題 Expression of SOX9 Is Related to Prognosis in Patients with Oesophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 835-838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.11316.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kijima T, Nakagawa H, Shimonosono M, Chandramouleeswaran PM, Hara T, Sahu V, Kasagi Y, Kikuchi O, Tanaka K, Giroux V, Muir AB, Whelan KA, Ohashi S, Naganuma S, Klein-Szanto AJ, Shinden Y, Sasaki K, Omoto I, Kita Y, Muto M, Bass AJ, Diehl JA, Ginsberg GG, Doki Y, Rustgi AK, Natsugoe S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Three-Dimensional Organoids Reveal Therapy Resistance of Esophageal and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 73-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-01500-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Noda M, Okumura H, Uchikado Y, Omoto I, Sasaki K, Kita Y, Mori S, Owaki T, Arigami T, Uenosono Y, Nakajo A, Kijima Y, Ishigami S, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Correlation Between Biomarker Candidate Proteins with the Effect of Neoadjuvant Chemoradiation Therapy on Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 449-455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-017-6271-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki K, Uchikado Y, Omoto I, Arigami T, Osako Y, Noda M, Okumura H, Maemura K, Higashi R, Yoshiura T, Natsugoe S.	4. 巻 83
2. 論文標題 Neoadjuvant chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil (DCF-RT) for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol	6. 最初と最後の頁 581-587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-018-03764-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagi M, Sasaki K, Uchikado Y, Omoto I, Arigami T, Kurahara H, Uenosono Y, Sakoda M, Maemura K, Natsugoe S.	4. 巻 38
2. 論文標題 Effect of Neoadjuvant Chemoradiotherapy on Lymph Node Micrometastases in Thoracic Esophageal Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Reserch	6. 最初と最後の頁 893-900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.12299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 109
2. 論文標題 Programmed death-ligand 1 is a promising blood marker for predicting tumor progression and prognosis in patients with gastric cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 814-820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 夏越祥次
2. 発表標題 Surgical parts in the 15th Edition of Japanese Classification of Gastric Carcinoma.
3. 学会等名 日本胃癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Natsugoe S, Sasaki K, Uchikado Y, Okumura H, Omoto I, Osako Y, Owaki T
2. 発表標題 Feasibility of Docetaxel, Cisplatin, and 5-Fluorouracil (DCF) versus Radiotherapy with DCF (DCF-RT) as Preoperative Therapy for Locally Advanced Esophageal Cancer
3. 学会等名 The International Society for Diseases of the Esophagus (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Natsugoe S, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S
2. 発表標題 From basic research to clinical application of sentinel node concept in gastric cancer.
3. 学会等名 International Sentinel Node Society Biennial Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木健、内門泰斗、尾本至、浦田正和、喜多芳昭、奥村浩、大脇哲洋、前村公成、夏越祥次
2. 発表標題 胸部食道扁平上皮癌のリンパ節微小転移に対する術前化学放射線療法の影響とその意義
3. 学会等名 第26回日本 がん転移学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木健、内門泰斗、尾本 至、浦田正和、有上貴明、上之園芳一、前村公成、夏越祥次
2. 発表標題 食道癌に対する術前 化学放射線療法の臨床的奏効度は組織学的奏効度を反映するか
3. 学会等名 第79回日本臨床外 科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木健, 内門泰斗, 尾本 至, 浦田正和, 喜多芳昭, 有上貴明, 上之園芳一, 前村公成, 夏越祥次
2. 発表標題 胸部食道 扁平上皮癌のリンパ節微小転移に対する術前化学放射線療法の影響とその意義
3. 学会等名 第28回日本消化器 癌発生学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takaaki Arigami, Yoshikazu Uenosono, Keishi Okubo, Takashi Kijima, Masahiko Amatatsu, Kousuke Kawagoe, Shigehiro Yanagita, Sumiya Ishigami, MD, Shoji Natsugoe
2. 発表標題 Clinical Application and Long-term Outcomes of Sentinel Node Navigation Surgery in Patients with Early Gastric Cancer
3. 学会等名 12th International Gastric Cancer Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shoji Natsugoe, Yoshikazu Uenosono, Takaaki Arigami, Shigehiro Yanagita, Daisuke Matsushita, Yasuto Uchikado, Shinichiro Mori.
2. 発表標題 Less invasive gastrectomy with sentinel node dissection for early gastric cancer.
3. 学会等名 47th World Congress of Surgery 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	佐々木 健 (sasaki ken) (00418849)	鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	盛 真一郎 (mori shinichiro) (00620519)	鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教 (17701)	
研究分担者	新田 吉陽 (shinden yoshiaki) (20725733)	鹿児島大学・附属病院・医員 (17701)	
研究分担者	前村 公成 (maemura kosei) (30398292)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	内門 泰斗 (uchikado yasuto) (30464465)	鹿児島大学・附属病院・特任准教授 (17701)	
研究分担者	喜多 芳昭 (kita yoshiaki) (30570692)	鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教 (17701)	
研究分担者	有上 貴明 (arigami takaaki) (40527058)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (17701)	
研究分担者	貴島 孝 (kijima takashi) (50791555)	鹿児島大学・附属病院・医員 (17701)	
研究分担者	上之園 芳一 (uenosono yoshikazu) (60398279)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	

