

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591638

研究課題名（和文）胆道系悪性腫瘍の新たなバイオマーカーの探索

研究課題名（英文） Research of new biomarker for biliary tract neoplasia.

研究代表者

太田 岳洋 (OTA TAKEHIRO)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70203792

研究成果の概要（和文）：

担癌患者より採取した末梢血をサンプルとし CTC 検出を試みた。分離採取した CTC および同患者の原発巣から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて転移関連遺伝子の発現測定を行った。結果、これらの遺伝子発現は、転移癌細胞の性質としてはこれまでに知られている遺伝子の機能としては矛盾のない結果であった。今回の手法により臨床サンプルにおいて CTC の検出及びその遺伝子発現測定を行う手法を確立する事ができた。

研究成果の概要（英文）：

We made a protocol for detecting circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood from cancer patient. The RNA from the CTC and from its primary tumor were isolated, and real-time PCR were performed to compare genes expression related to metastasis. The results of these genes expression were consistent as the previous reports that mentioned about the genes functions. Our methods established were useful to detect the CTC and to measure the gene expression in CTC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：がん研究分野

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：末梢血浮遊癌細胞

1. 研究開始当初の背景

消化器癌に対する重要な治療戦略の一つは転移のメカニズムを解明し、いかに制御す

るかということである。近年、乳癌や消化器癌領域において担癌患者の末梢血中を浮遊する癌細胞(circulating tumor cells, CTC)

が高頻度に認められることが明らかになった。また詳細な病理学的検索により従来まで検出できなかったような微小転移が様々な癌腫で見いだされるようになり、病理学的悪性度や予後との関係が次々に報告されている。

胆嚢癌や胆管癌のような胆道系悪性腫瘍の診断は1980年代から1990年代にかけてのUS, CT, MRI, EUSなどの画像診断技術の改良により大きく進歩したが、この10年ほどは画像診断による診断精度の向上は頭打ちになりつつある。最近では胆汁細胞診や胆汁に遊離したペプチドや核酸の解析による良悪性の鑑別診断の試みが世界中から報告されているが、いまだ診断精度は画像診断にも劣るため、更なる診断精度の向上のためには、別の新しいアプローチが必要と思われる。

2. 研究の目的

本研究では、微小転移の担い手であるかもしれないCTCに着目し、末梢血や骨髓液から採取されるCTCの存在診断だけでなく、CTCからの遺伝子解析が技術的に可能であるかどうかを追求し、その臨床的意義についても検討したい。われわれは2002年よりCTCの研究に着手し、食道癌のpilot studyでは骨髓中のCTCが癌の悪性度や予後と関連することを確認したが、世界的に見ても胆道系悪性腫瘍の臨床データとの相関や、原発/転移病変での遺伝子異常に関しては多くの報告があるものの、CTC自体にどのような遺伝子が発現し、どのような細胞学的特性を発現しているのかを検討した報告はほとんどない。手術症例における原発巣とCTCとの遺伝子発現プロファイルの比較検討を行うことにより、原発巣における遺伝子発現パターンの予測が可能となれば、切除不能胆道癌患者の化学

療法等の治療戦略に少なからず恩恵をもたらす技術となりうるとも考える。胆道系悪性腫瘍症例のCTC採取方法および遺伝子解析技術を確立させ、臨床の場の諸問題を克服していきたい。

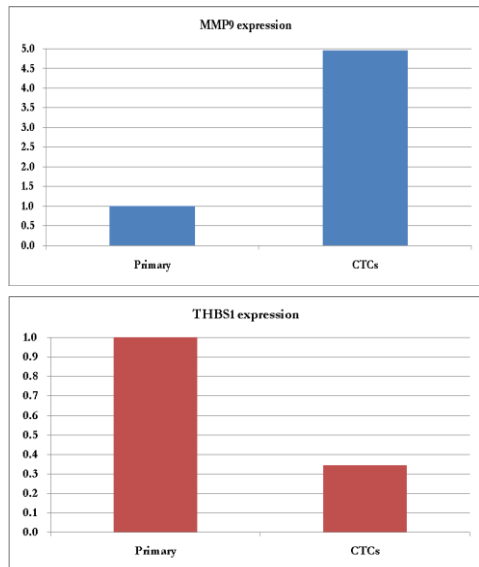
3. 研究の方法

胆管癌患者においてCTCの検出およびその遺伝子発現測定を行うことにより、転移癌細胞の性質や特徴を解明することを目標とした。はじめに、本計画に特化したCTC検出のためのプロトコルを作製するために、上皮系培養細胞(大腸癌培養細胞)を用いて予備実験を行った。具体的な方法としては、健常人の末梢血を採取し、その一部を大腸癌細胞株と混和した後、白血球の表面抗原と赤血球を架橋化させる試薬を加え、Ficoll液を混ぜた後に遠心し単核球分画を分離採取。冷メタノールで固定した後、スライドガラスに塗布、乾燥させ、抗サイトケラチン抗体にて免疫細胞染色を行った。陽性細胞を癌細胞と判定した。

4. 研究成果

実際の胆癌患者(胃癌患者)より採取した5mLの末梢血をサンプルとし、同プロトコルに従いCTC検出を試みた。陽性細胞をLaser Captured Microdissectionを使用し分離採取した。それよりtotal RNAを抽出、cDNAを合成後、リアルタイムPCR法にてMatrix metalloproteinase 9 (MMP9)、Thrombospondin 1 (THBS1)の測定を行った。同患者の原発巣の手術標本から腫瘍組織を採取、同様に遺伝子の発現量を測定した。MMP9は原発巣と比較してCTCにおいて4.96倍の発現上昇を認めた。また、THBS1は原発巣と比較してCTCにおいて0.35倍の発現低下を認めた。MMPは癌

細胞が基底膜を分解して血管内へ侵入する際に重要な因子であると考えられ、CTCにおけるその発現上昇を確認することができた。また、転移癌細胞の増殖能は一般に活性化されており、THBS1のような細胞増殖抑制因子は全体に抑制を受けているものと思われた。今回の手法により実際に臨床サンプルにおいてCTCの検出及びその遺伝子発現測定を行う手法を確立する事ができた。



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9件)

- ① 太田 岳洋 (他2名, 2番目), 肝外胆管切除(+尾状葉切除)(特集 肝門部胆管癌に対する術式の工夫), 手術, 64巻3号, 291-296, 2010年, 査読無
- ② 太田 岳洋 (他2名, 1番目), 胆道癌に対する門脈枝塞栓術の適応(特集 一般外科医が知っておくべき胆道癌外科治療の現状), 外科治療, 102巻3号, 245-250, 2010年, 査読無
- ③ 太田 岳洋 (他9名, 3番目), 肝切除後の腹腔内孤立性リンパ節再発に対し2回の摘出術を施行し得た肝細胞癌の1例, 日本外科系連合学会誌, 34巻1号, 105-111, 2009年, 査読有
- ④ 太田 岳洋 (他2名, 3番目), 進行胆嚢癌に対する膵頭十二指腸切除(PD)の適応と有効性(特集 胆嚢癌根治手術をめぐる諸問題), 臨床外科, 64巻8号, 1093-1099, 2009年, 査読無

- ⑤ 太田 岳洋 (他2名, 2番目), 胆管癌の手術方針(特集 胆道癌診療ガイドラインを学ぶ--最新のエビデンスとコンセンサス), 外科, 71巻1号, 34-41, 2009年, 査読無
- ⑥ 太田 岳洋 (他7名, 2番目), 完全型膵管非癒合を併存した膵・胆管合流異常, 先天性胆道拡張症の1切除例, 胆道, 22巻2号, 186-190, 2008年, 査読有
- ⑦ 太田 岳洋 (他2名, 1番目), 経十二指腸的乳頭切除術(特集 十二指腸病変に対する外科的アプローチ), 臨床外科, 63巻12号, 1525-1529, 2008年, 査読無
- ⑧ 太田 岳洋 (他2名, 1番目), 経十二指腸的乳頭切除術, 臨床外科, 63巻, 1525-1529, 2008年, 査読無
- ⑨ Kuramochi H, Hayashi K (他6名, 1番目, 2番目), High intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA levels in pancreatic cancer associated with a high rate of response to S-1, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 63, 85-89, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計13件)

- ① 太田 岳洋 (他9名, 2番目), 胆道癌術後異時性肝転移切除例の検討(胆管癌治療-2, 一般口演, 第110回日本外科学会定期学術集会) 2010.03.05, 名古屋
- ② 太田 岳洋 (他9名, 5番目), 当科におけるマイクロサージャリー技術を応用した消化器外科手術の検討, 胆道, 一般ビデオ, 第110回日本外科学会定期学術集会, 2010.03.05, 名古屋
- ③ 太田 岳洋 (他9名, 2番目), 胆嚢癌, 肝門部胆管癌手術における術前術後の合併症対策と発症時の対応, 術後合併症・DVT 肝胆膵, 一般演題(ポスター), 第64回日本消化器外科学会総会, 2009.07.01, 大阪
- ④ 太田 岳洋 (他9名, 1番目), 肝門部胆管癌に対する外科切除を中心とした集学的治療の成績, 第64回日本消化器外科学会総会, 2009.07.01, 大阪
- ⑤ 太田 岳洋 (他9名, 1番目), 胆管癌における肝外胆道切除例の検討(要望演題 9-3 palliative surgery3), 第64回日本消化器外科学会総会, 2009.07.01, 大阪
- ⑥ 太田 岳洋 (他9名, 2番目), 膵・胆管合流異常における手術適応と再建術式(ワークショップ 8 膵管胆管合流異常症における手術適応と再建術式), 第64回日本消化器外科学会総会, 2009.07.01, 大阪
- ⑦ 太田 岳洋 (他8名, 2番目), 胆道癌に対する肝右葉以上の肝切除例の手術直

- 接成績の検討, 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009.02.25, 福岡
- ⑧ 太田 岳洋 (他 8 名, 3 番目), 漿膜下浸潤(pT2)胆嚢癌における糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素 V(GnT-V) 発現とその臨床的意義(胆嚢(悪性疾患), サージカルフォーラム), 第 109 回日本外科学会定期学術集会), 2009.02.25, 福岡
 - ⑨ 太田 岳洋 (他 9 名, 1 番目), 肝門部腸管癌の治療戦略, 第 63 回日本消化器外科学会総会, 2008.07.01, 札幌
 - ⑩ 太田 岳洋 (他 9 名, 2 番目), 胆管内乳頭状腫瘍の臨床病理学的検討(胆・膵 IPMN, 一般演題(口演), 第 63 回日本消化器外科学会総会, 2008.07.01, 札幌
 - ⑪ 太田 岳洋 (他 9 名, 2 番目), 十二指腸乳頭腫瘍に対する縮小手術とその適応(要望演題 22-2 十二指腸乳頭部癌に対する縮小手術とその適応 2, 第 63 回日本消化器外科学会総会, 2008.07.01, 札幌
 - ⑫ 太田 岳洋 (他 8 名, 1 番目), 肝門部胆管癌の治療における諸問題と対策, 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 2008.04.25, 長崎
 - ⑬ 太田 岳洋 (他 9 名, 2 番目), 術後 5 年以上生存例からみた進行胆嚢癌治療の再評価, 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 2008.04.25, 長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 岳洋 (OTA TAKEHIRO)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：70203792

(2) 研究分担者

林 和彦 (HAYASHI KAZUHIKO)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：10208613

中村 努 (NAKAMURA TSUTOMU)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：30198220

倉持 英和 (KURAMOCHI HIDEKAZU)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30287362