

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791190

研究課題名 (和文) 頭頸部扁平上皮癌患者の循環血液中の腫瘍細胞の定量

研究課題名 (英文) Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

研究代表者

富山 要一郎 (TOMIYAMA YOUICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20437320

研究成果の概要 (和文) : 頭頸部扁平上皮癌の予後向上のためには遠隔転移を生じやすい高危険群を同定する必要がある。今回、患者の循環血液中の腫瘍細胞の定量により高危険群を同定する手法の確立を試みた。頭頸部扁平上皮癌培養細胞を用いて実験条件の最適化を行ったのち、頭頸部扁平上皮癌未治療新鮮例 20 例において治療直前と直後の循環血液中の腫瘍細胞の定量を行った。しかし、循環血液中の腫瘍細胞を検出できなかった。今後さらに検討を加える予定である。

研究成果の概要 (英文) : Discrimination of high risk patients with head and neck squamous cell carcinoma who result in having distant metastasis is essential for the improvement of their prognosis. We therefore tried to establish a new method to distinguish such high risk patients from the others using quantitative analysis of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with head and neck squamous cell carcinoma. Preliminary examination using established head and neck squamous cell carcinoma cells diluted with normal blood revealed that it is possible to quantify the tumor cells. We analyzed the circulating tumor cells in peripheral blood of patients with head and neck squamous cell carcinoma who underwent the first line treatment in our institution, just before and after the treatment. Unfortunately, however, tumor cells were not detected as expected. Further investigation will be needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：(1)頭頸部扁平上皮癌 (2)循環腫瘍細胞 (3)サイトケラチン (4) SCC 抗原

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌の治療における最大の目標は臓器温存と予後の向上である。近年、化学放射線同時併用療法や機能温存手術が導入され臓器温存率は向上してきているが、その一方で生存率については大きな改善は見られていない。遠隔転移による死亡が原病死の多くを占めるため、生存率の改善を図るためには遠隔転移を生じる可能性が高い高危険群を同定する手法を確立し、高危険群に対して手術や化学放射線同時併用療法に追加して全身化学療法を adjuvant therapy として施行し、遠隔転移の発現を抑制することが望まれる。悪性腫瘍患者では循環血液中に腫瘍細胞が認められ、この腫瘍細胞が多いほど高率に遠隔転移を生じると考えられている。すなわち、遠隔転移の高危険群とは循環血液中に多くの腫瘍細胞が認められる一群である。

頭頸部扁平上皮癌患者の循環血液中の腫瘍細胞の同定を試みた報告は以前よりわずかに散見されるが、いずれも小規模な検討である。また、重度の遠隔転移があるにも関わらず腫瘍細胞を循環血液中に同定できない、すなわち鋭敏度が低いという問題があり、循環血液中の腫瘍細胞と遠隔転移や予後との相関について一定の結論が出るには至っていない。したがって、鋭敏度・特異度に優れた手法で頭頸部扁平上皮癌患者の循環血液中の腫瘍細胞を定量し、転移や予後との相関について解析する大規模研究が求められている。

## 2. 研究の目的

多数例の頭頸部扁平上皮癌患者の循環血液中の腫瘍細胞を定量して経過観察を行い、腫瘍細胞数と遠隔転移、予後との相関性を前向きに解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

①生検により組織学的に頭頸部扁平上皮癌であることが証明された未治療新鮮例で、他に活動性の悪性疾患がなく、文書により同意が得られた 20 症例。

②予備実験として 4 種類の頭頸部扁平上皮癌培養細胞 (SCC-4, -9, -15, CAL 27; いずれも ATCC より購入)。培養細胞は 10%ウシ胎児血清と 1%抗生物質を添加した DMEM 培地で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。培養細胞の回収には Trypsin-EDTA を用いた。

### (2) 腫瘍細胞の純化

①検体の確保：肘静脈より 10ml の末梢血を EDTA を添加したチューブに採取した。採血は一次治療直前、一次治療終了直後に行った。一次治療終了直後の採血は、手術治療の場合は病巣摘出の直後に、化学放射線同時併用療法の場合は予定総線量の照射終了直後に行った。なお、採血の際に皮膚の扁平上皮細胞の混入による偽陽性を回避するため、吸引し始めの 5ml は破棄してその後新しいシリンジで検体を確保した。また、予備実験に関しては健常者から同様に採血を行い 10ml の末梢血を確保して培養細胞と混和した。その際、 $1 \times 10^6$  個/ml から  $1 \times 10^0$  個/ml まで 10 倍ごとに段階希釈した。

②単核細胞分画の抽出：血液検体 10ml を PBS バッファーで 35ml に希釈し、15ml の Ficoll-Paque (密度 1.077) を入れたチューブに慎重に重層した。4°C、400g で 30 分間遠心し、中間層を回収した。これを、PBS バッファーで希釈し、4°C、400g で 10 分間遠心し、上清を取り除いたのち、1ml の PBS バッファーで再懸濁して細胞数をカウントした。そして、 $10^7$  cell/ml の濃度で次に述べる磁気ビーズによる操作のための PBS1 バッファーに再懸濁した (DYNAL 社製)。

③白血球分画の除去： $10^7$  cell/ml の濃度で PBS1 バッファーに再懸濁したのち、PBS1 バッファーで 1ml に調整した。このサンプルに汎白血球抗原である CD45 に対する抗体に磁気ビーズを結合させた Dynabeads CD45 を 250  $\mu$ l 添加して、4°C で 30 分間穏やかに攪拌しながら反応させた。次にこれを 10 分間磁場処理を行い、上清を確保して 4°C、600g で 15 分間遠心した。上清を破棄したのち再度 PBS1 バッファーで  $10^7$  cell/ml の濃度に再懸濁した。

④上皮細胞の精製：次に、上皮細胞特異的な膜抗原である Ber-EP4 抗原に磁気ビーズを結合させた Dynabeads Epithelial Enrich (DYNAL 社製) を用いて、上皮細胞すなわち腫瘍細胞を精製した。手法は上記③と同様に行ったが、磁気抗体は 25  $\mu$ l を  $10^7$  cell/ml のサンプルに対して使用した。

### (3) 腫瘍細胞の同定と定量

①塗抹標本の作製：精製された上皮細胞すなわち腫瘍細胞を 400  $\mu$ l の PBS に懸濁し、サイトスピン (SHANDON) にセットしたのち、1000rpm で 6 分間遠心し、シングルサイトスライド (バックサークル、コートタイプ) に細胞を塗抹した。塗抹標本は一晩かけて常温

で乾燥させ、-20°Cで保存した。

②抗サイトケラチン抗体および抗 SCC 抗体による免疫染色：塗抹標本を固定（冷却したアセトン：メタノール溶液 9:1、20 分間）し、抗サイトケラチン抗体 AE1/AE3 モノクローナル抗体（DAKO 社製）を 200 倍希釈で、抗 SCCA1 モノクローナル抗体（Santa Cruz 社製）を 500 倍希釈で、一晩かけて 4°C で反応させた。次に、peroxidase labeled polymer（ENVISION™, DAKO 社製）を室温で 1 時間反応させ、0.04%DAB にて 1 分間発色させ、ヘマトキシリンにて核染色後、脱水、透徹、封入し、光学顕微鏡にて検鏡した。染色された腫瘍細胞の数は 2 名の研究者が独立で検鏡し、1 標本あたり 4 か所の部位を 200 倍視野で観察し合計して評価した。

(4) 循環血液中の腫瘍細胞数と臨床像との相関についての解析

循環血液中の腫瘍細胞数と下記の臨床像との間に相関がないかどうかを解析する。

- ①原発部位（口腔、喉頭、上咽頭、中咽頭、下咽頭）
- ②原発腫瘍の状態（T 分類）
- ③頸部リンパ節転移の状態（N 分類）
- ④臨床病期
- ⑤治療法（手術、化学放射線同時併用療法）

#### 4. 研究成果

##### (1) 予備実験結果

(表 1) サンプル血液中の培養腫瘍細胞濃度と抗サイトケラチン抗体で測定された腫瘍細胞数

	SCC-4	SCC-9	SCC-15	CAL 27
a	0	0	0	0
b	0	0	0	0
c	0	0	0	0
d	3 ±0.8	4.8 ±1.7	8.5 ±3.41	6 ±3.74
e	19.5 ±2.7	25 ±6.2	29 ±10.64	15 ±2.58
f	93 ±14.7	117 ±19.4	123.25 ±33.24	79.25 ±12.26
g	757.5 ±62.0	898 ±97.2	913 ±215.42	489.5 ±83.06

(a:10<sup>0</sup>/ml, b:10<sup>1</sup>/ml, c:10<sup>2</sup>/ml, d:10<sup>3</sup>/ml  
e:10<sup>4</sup>/ml, f:10<sup>5</sup>/ml, g:10<sup>6</sup>/ml)  
(数値は平均値±標準偏差)

4 種類の頭頸部扁平上皮癌培養細胞（SCC-4, -9, -15, CAL 27）において、今回の実験系が成り立つかどうかをまず評価した。

(表 1) に抗サイトケラチン抗体で免疫染色を行った場合の結果を示した。これらの測定値は 2 回の実験結果を 2 人の研究者で測定した数値の平均値と標準偏差を表している。

(表 1) に示したように、4 種類の頭頸部扁平上皮癌培養細胞（SCC-4, -9, -15, CAL 27）のいずれにおいても、測定可能な腫瘍細胞数はサンプル血液中の腫瘍細胞濃度依存性であった。また、サンプルが 1x10<sup>2</sup>/ml 以下の細胞濃度の場合には測定不可能であった。

一方、抗 SCC 抗体で免疫染色を行った場合の結果も抗サイトケラチン抗体を使用した場合の結果とほぼ同様のものではなかった（data not shown）が、抗サイトケラチン抗体を使用した場合よりやや感度が低い結果であった。

以上の結果より、抗サイトケラチン抗体を用いることにより今回の実験系が成立すること、すなわち（循環）血液中の頭頸部扁平上皮癌細胞の定量が可能であることを確認した。なお、今回の予備実験の結果より、血液 1ml あたり 10<sup>4</sup> 個の腫瘍細胞のオーダーが妥当であると考えられた。

##### (2) 頭頸部扁平上皮癌対象患者の臨床像

今回、検討を行った頭頸部扁平上皮癌の 20 症例の臨床像は以下のようであった。

- ①原発部位（口腔 4 例、喉頭 2 例、上咽頭 2 例、中咽頭 4 例、下咽頭 8 例）
- ②T 分類（T1:2 例、T2:10 例、T3:6 例、T4:2 例）
- ③N 分類（N1:3 例、N2a:4 例、N2b:9 例、N2c:4 例）
- ④臨床病期（III 期:3 例、IV 期:17 例）
- ⑤治療法（手術 5 例、化学放射線同時併用療法 15 例）

なお、いずれの症例においても一次治療開始時において遠隔転移を認めなかった。また、一次治療終了後、現在に至るまで原発巣、頸部および遠隔転移再発を認めていない。

##### (3)

頭頸部扁平上皮癌患者の循環血液中の腫瘍細胞の定量の結果

頭頸部扁平上皮癌患者の一次治療直前と一次治療直後の血液を採取して循環血液中の腫瘍細胞の定量を行った。しかし、今回検討した 20 例すなわち 40 検体においては、予想に反し、いずれの血液中からも腫瘍細胞は検出されなかった。今回の結果は、原発部

位・T 分類・N 分類・臨床病期・治療法に全く左右されなかった。

この理由としては、以下のことが考えられる。

①今回血液採取を行った 20 例はいずれも第 III 病期と第 IV 病期の進行癌であるが、遠隔転移をきたす可能性の低い症例であった。

②採取した血液検体に含まれる循環腫瘍細胞が検出閾値以下であった、すなわち今回の予備実験の結果より判断すると、 $1 \times 10^3/\text{ml}$  以下の細胞濃度であった。

①に関しては、今後の治療後経過を観察していかなければ正しいかどうかの判断ができない。もし②の場合は、今回の予備実験で確立された鋭敏度が低すぎることになる。今後、さらに鋭敏度を改善した定量方法を確立するため、実験条件の変更など検討を重ねていく予定である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富山 要一郎 (TOMIYAMA YOUICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20437320

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：