

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390388

研究課題名（和文） 遊離癌細胞をターゲットとした新たな肺癌治療戦略の開発

研究課題名（英文） Development of a new lung cancer treatment strategies that target isolated cancer cells

研究代表者

澤端 章好 (Noriyoshi Sawabata)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50403184

研究成果の概要（和文）：

肺癌手術症例における遊離癌細胞の臨床における重要性を、縮小肺切除断端における遊離癌細胞や、新規同定法（CD45 ネガティブセレクション法）を用いた摘出肺肺静脈血液中遊離癌細胞を用いて証明した。また、遊離癌細胞の肉眼的形態（細胞集塊形成）が肺癌原発病巣の間質反応のグレードや予後と強く関連することを示し、上皮間葉移行などの癌細胞の変化が術後再発と極めて関連が深く関連していることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We revealed the importance of isolated tumor cells (ITCs) in surgical patients with lung cancer using ITCs at the surgical margin of limited lung resection and in the blood of the pulmonary vein of the resected lung. In addition the morphological appearance of the ITCs is associated with the degree of stromal reaction in the original lesion and with relapse free survival rate.

According to a finding that ITCs at the surgical margin is a predictor of margin recurrence father examination regarding survival was carried out to reveal that the ITC at the surgical margin was a prognostic indicator. This is because ITCs at the surgical margin seems an ideal model to investigate the behavior of cancer cells in a microenvironment.

In addition, scattering of ITCs into the blood by the surgical manipulation was shown, by way of the CD45 negative selection method using the pulmonary vein blood which provided the native morphology of ITCs, to be the positive ratio of presenting ITC was 73% and the morphology was a predictor of recurrence- cluster was deeply associated with relapse. Furthermore, this feature was related to serum CEA level, tumor vessel invasion (TVI) and stage of the tumor, of them TVI was the most reliable predictor of a presence of cluster cells in the PV-blood. Besides, late relapse case often revealed cytokeratin negative ITCs which may be a milestone to father investigation with respect to epithelial mesenchymal transition (EMT).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000円	2,070,000円	8,970,000円
2010年度	3,300,000円	990,000円	4,290,000円
2011年度	3,400,000円	1,020,000円	4,420,000円
年度			
年度			
総計	13,600,000円	4,080,000円	17,680,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学、肺癌、遊離癌細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで遺残細胞のない肺切除術を目指して臨床研究を行ってきた。血行性遠隔転移の制御を念頭に置いた、術操作による血液中遊離癌細胞の同定の研究や縮小手術の切除断端における遊離細胞の同定である。術操作による血液中への癌細胞散布を、我々はマイクロビーズ抗体を用いたポジティブセレクション法を用いて検出し、I 期肺癌であっても約 20%に術直後末梢血に癌細胞が同定されることを証明した。血液中に癌細胞が遊離されることは転移の第一歩であるので血液中の癌細胞が多いほど予後不良と考えられる。このことは乳癌や前立腺癌で明らかで、新たな病期分類の因子の候補となっている。また、非小細胞肺癌手術症例においては、末梢血や肺静脈血の遊離癌細胞を同定し予後因子であるとの観察研究が複数みられる。これらの報告における細胞同定法はほとんどが量的 (quantitative) 存在診断法な方法であり、質的(quantitative)診断法では末梢血中癌細胞の EGFR 遺伝子 T790M の変異が予後因子であると証明されているにすぎない。しかし、この方法は単細胞でしか同定ができず、転移増殖能が高い cluster 状の癌細胞の回収は不可能である。

また、我々は肺葉切除未満の切除すなわち縮小切除において病理診断による完全切除判定に加えて細胞診により遊離癌細胞の同定を行うべきであることを主張し、世界で始めて切除肺実質断端細胞診の有用性を報告した。断端細胞診が陽性であっても組織診断では陰性であることが約 20%にみられ組織診断だけでは不十分である。また、断端細胞診は局所再発の予測因子で断端陽性の約 50%に断端再発が起り、断端の遺残遊離細胞は予後不良因子であることを示した。これらの知見は他の臨床研究において追認されている。

2. 研究の目的

肺癌手術症例における遊離癌細胞の意義解明および転移抑制のターゲットとして重要かを探索する

3. 研究の方法

肺縮小手術における断端遊離癌細胞や肺切除例の血液中遊離癌細胞を病理・形態学的に探索した

(1) 外科的切除断端・胸膜腔内の遊離癌細胞の回収：従来より我々が用いている方法、すなわち肺実質切除に用いた器械 (自動縫合器) 洗浄生理食塩水または切除断端よりスパチュラにて採取したデブリス入り生理食塩水を対象とし遊離癌細胞の回収を行った。

(2) 血液中遊離癌細胞の回収：血液中遊離癌細胞の回収：血液中遊離癌細胞の回収は新たな方法を確立する。In vitro の実験で単細胞の状態のみならず cluster 細胞群でも回収が可能であることを確認した抗体カクテル比重法を modify した方法 (同方法は肺静脈血を用いたパイロット研究においても cluster 細胞群での回収がみられた) や、感度特異度ともに認容されているが cluster 細胞群の回収は不可能であるマイクロビーズ抗体ポジティブセレクション法を用いて検証し血液中遊離癌細胞の回収同定を行い認容性の検証する。(2) - 2 : 手術操作誘発遊離癌細胞の検証を念頭において、摘出肺静脈血のから遊離癌細胞を回収同定し周術期の血液中遊離癌細胞の存在のプリバレンスを調べた。

4. 研究成果

縮小肺切除では断端の遺残遊離細胞は再発の予測因子であることをふまえ、予後を調査したところ断端遊離癌細胞陽性症例は有意差を持って陰性症例に比べ予後不良であることが明らかになり、断端の遊離癌細胞は癌微小環境における癌細胞の動態を探索する良いモデルになりうることを示した。

さらに、術操作による血液中への癌細胞散布を、CD45 を標的としたネガティブセレクシ

ヨン比重法で摘出肺肺静脈血から形態学的特徴を保って癌細胞を回収すれば、73%の陽性率であり、形成学的分類が再発の予測因子であり、cluster 形成が強く術後再発と関連していることを証明した。さらにこの形態学的分類は原発巣の間質反応と関連した因子である血液中 CEA 濃度、腫瘍内血管への浸潤、病理病期が関連し、中でも腫瘍内血管への浸潤が cluster 形成の予測因子であった。一方、単発遊離癌細胞は術後 2 年以降に再発を認めるものが多くサイトケラチン陰性細胞が含まれており今後の上皮間葉移行の面から更なる検討が必要である事が示唆された。

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 5 件)

① Sawabata N, Maeda H, Ohta M, Okumura M Clinical implications of margin cytology findings and margin tumor size ratio in patients who underwent pulmonary excision for peripheral non-small lung cancer Surgery Today 42; 238-244 2012, 査読有

② Funakoshi Y, Sawabata N, Takeuchi Y, Kusumoto H, Kimura T, Maeda H Clinical implication of pulmonary excision for undiagnosed peripheral lung cancer Interact Cardiovasc Thorac Surg 13;485-489 2011, 査読有

③ Nakagiri T, Sawabata N, Funaki S, Inoue M, Kadota Y, Shintani Y, Okumura M. Validation of pN2 sub-classifications in patients with pathological stage IIIA N2 non-small cell lung cancer. Interact Cardiovasc Thorac Surg 12;733-738 2011, 査読有

④ Funaki S, Sawabata N, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Kadota Y, Minami M, Okumura M. Novel approach for detection of isolated tumor cells in pulmonary vein using negative selection method: morphological classification and clinical implications. Eur J Cardiothorac Surg 40;322-327 2011, 査読有

⑤ Okumura M. Optimal sampling methods for margin cytology examination following lung excision Interact Cardiovasc Thorac Surg 9;434-439 2010, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① Funaki S, Sawabata N, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M Tumor Vessel Invasion Assures Isolated Tumor Cells in the Pulmonary Vein of Non-Small Cell Lung Cancer 48th Society of Thoracic Surgeons us, 2012 /1/16, FL US

② 舟木壮一郎、澤端章好、中桐 伴行、新谷康、井上 匡美、南 正人、奥村 明之進 原発性非小細胞肺癌における、臨床的背景と病理像ならびに肺静脈血遊離癌細胞 第 64 回日本胸部外科学会 2011/10/11 名古屋

③ Utsumi T, Sawabata N, Inoue M, O 癌周術期の末梢血中遊離癌細胞：5 年以上の追跡結果ら見た臨床上的有用性の検討 第 64 回日本胸部外科学会 2011/10/10 名古屋

④ Funaki S, Sawabata N, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Kadota Y, Minami M, Okumura M Novel approach for detection of isolated tumor cells in the pulmonary vein by a negative selection method: morphological classification and its clinical implication 24th European Association of Cardio-Thoracic Surgery 2011/10/5 Genève Switzerland

⑤ Funaki S, Sawabata N, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M Clinical and pathological analyses of isolated tumor cells in non-small cell lung cancer 8th International symposium of minimally residual cancer 2011/9/21, Osaka Japan

⑥ Sawabata N, Funaki S, Inoue M, Shintani Y, Nakagiri T, Minami M, Okumura M Clinical implication of isolated tumor cells at the surgical margin of lung excision for non-small cell lung cancer. 8th International symposium of minimally residual cancer 2011 /9/20, Osaka Japan

⑦ Funaki S, Sawabata N, Abulamity A, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Kadota Y, Minami M, Okumura M Clinical and

pathological analyses of isolated tumor cells in non small cell lung cancer -Clinicopathological parameters affecting isolated tumor cell morphology in non small cell lung cancer 14th World Congress of Lung Cancer 2011/8/17, Amsterdam Nederland

⑧新谷 康，中桐 伴行，門田 嘉久，井上 匡美，澤端 章好，南 正人，奥村 明之進 癌周囲微小環境を標的とした肺癌治療(IS-10 国際シンポジウム(10)Treatment of lung cancer in the 21st century : From bench to bedside, further to the OR,第 111 回日本外科学会定期学術集会) 2011-05-25 東京

⑨中桐 伴行，澤端 章好，内海 朝喜，舟木 壮一郎，南 正人，井上 匡美，門田 嘉久，須崎 剛志，奥村 明之進 リンパ節転移様式を基にした病期 IIIA N2 非小細胞肺癌(NSCLC)に対する外科治療の検討 : 今後の TNM 分類を見据えて(肺 外科治療-2, 一般口演, 第 110 回日本外科学会定期学術集会) 2010-03-05 仙台

⑩内海 朝喜，澤端 章好，南 正人，井上 匡美，門田 嘉久，重村 周文，前田 元，竹内 幸康，船越 康信，松村 晃秀，奥村 明之進 肺部分切除+断端細胞診の実際 : 切離マージン確認の方法と長期成績肺癌に対する sublobar resection の適応と評価, ビデオワークショップ, 第 109 回日本外科学会定期学術集会 2009-2-25 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤端 章好 (Noriyoshi Sawabata)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 50403184

(2) 研究分担者

奥村 明之進 (Meinoshin Okumura)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 40252647

井上 匡美 (Masayoshi Inoue)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号 : 10379232

中桐 伴行 (Tomoyuki Nakagiri)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 70528710

須崎 剛行 (Yoshiyuki Susaki)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号 : 10528649

舟木 壮一郎 (Soichirou Funaki)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 50464251

門田 嘉久 (Yoshihisa Kadota)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 50464243

※平成 23 年度より他施設に異動とな
ったため、平成 23 年度より辞退

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :