

## 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25年6月3日現在

機関番号：17701  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22501032  
 研究課題名(和文) 微小癌細胞のNOGマウスによる生着モデルと抗癌剤感受性試験への手技の確立  
 研究課題名(英文) Detection of Circulating Tumor Cells in peripheral blood and evaluation of xenograft model using NOG mouse  
 研究代表者  
 上之園 芳一(UENOSONO YOSHIKAZU)  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任准教授  
 研究者番号：60398279

## 研究成果の概要(和文)：

癌患者の血液中に存在する循環癌細胞(CTC)を検出し、その動態および臨床的意義を明らかにし、NOGマウスによる検証とCTCからの生着モデルの作製を試みた。CellSearchシステムを用いて切除不能胃癌患者60%、切除不能食道癌患者27%、切除不能膵臓癌患者20%でCTCの検出および画像化に成功した。特に胃癌患者では腹膜播種患者のCTC陽性率が高いことからNOGマウスを用いて腹腔内投与した癌細胞が、早期に腹膜を経由し血中に移行することを確認した。

## 研究成果の概要(英文)：

We detected circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of patient with cancer and clarified the change and clinical significance and tried the inspection with the NOG mouse and the manufacture of the survival model from CTCs. I succeeded in the detection of CTCs and imaging in 60% of unresectable gastric cancer patients, 27% of unresectable esophageal cancer patients, 20% of unresectable pancreatic cancer patients using CellSearch system. I confirmed in particular that the cancer cells which I gave in the abdominal cavity of the NOG mouse moved into blood via peritoneum early because a positive percentage of CTC of the patient with the peritoneum dissemination was high in stomach cancer patients.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2012年度 | 400,000   | 120,000   | 520,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：微小癌細胞、NOGマウス、抗癌剤感受性試験

1. 研究開始当初の背景  
 消化器癌における転移形式ではリンパ節転移が最も多いのは周知の事実であるが、リン

パ節郭清を伴う根治術後の再発形式では、血行性転移がしばしば認められ重要な予後因子の一つとなっている。例えば早期胃癌でも

肝転移などの血行性転移が生じることも報告されており、進行癌では腹膜再発が最も多いが、肝、肺、骨などへの血行性転移の頻度も25~54%と比較的多い。血行性転移の診断は、CT、体外エコー、MRI、PETなどによる画像検査により診断されるが、画像以前に末梢血中の腫瘍マーカー（CEA, CA19-9, SCC, AFP等）やアルカリフォスファターゼなどの上昇により血行性転移が疑われることも少なくない。しかし、これら従来の診断による異常所見が出現する前に、末梢血中のCTCを検出する試みが行われており、術中、術後のCTCの存在診断は血行性転移再発の予測法として有用性が期待されている。

CTCの存在については古くから議論されてきた研究テーマであり、血液を遠心分離することにより腫瘍細胞を従来のHE染色、Giemsa染色などにより直接鏡検し存在診断を行っていた時代があったが、あまりにも労力を要したため、臨床応用には至らなかった。近年、リンパ節や循環血液中の微小癌細胞を検出する手法として、免疫組織化学的手法や分子生物学的手法が検討されている。前者には、抗サイトケラチン抗体などを用いた免疫組織染色が汎用され、主にリンパ節の微小転移の検索に用いられている。後者の分子生物学的手法としては、ゲノムDNAの変異を検索する方法と、CEAなど組織特異的遺伝子のmRNA発現を検索するreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法があるが、近年になって自動的にCTCを検出するシステムが開発され研究および臨床応用の可能性から脚光を浴びるようになった。CellSearch System(ベリデックス社)やフローサイトメーターの一種であるセルソーター(ベックマン・コールター社)などが代表的なものである。全体的構想の究極の目的は、これら検出された微小癌細胞を癌の適正な治療法の選択に臨床応用可能とすることにある。これまで行われてきた微小癌細胞の診断的検出では、存在診断に止まり治療法の選択には至っていない。新規抗癌剤や分子標的治療薬の登場により治療法の選択肢は広がったものの、術後補助療法の必要性の判断や治療薬選択に関しては個々の症例ではなくガイドラインに基づき用いられているのが現状といえる。試験開腹や切除標本による抗癌剤感受性試験は一部の癌腫において行われているものの、組織採取を目的に侵襲的である点や術前化学療法などへは応用が難しい点が問題と言える。理想的には個々の症例における癌の特性ならびに循環がん細胞の存在に応じた診断治療体系の確立が必要とされる。

本研究は、癌治療の個別化を目指したCTCの自動診断法の確立とその動物実験モデルにおける培養、感受性試験法を確立し、その臨

床的意義をふまえて総合的治療戦略を構築するものである。

重度免疫不全モデルであるNOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$  null (NOG)マウスはT cell, B cell, NK細胞が欠損しており補体活性の減退、マクロファージ、樹状細胞の機能不全があり重度免疫不全モデルとして有用性が高く、Scidマウスでみられる老化に伴うT cell, B cellの出現も認めず胸腺腫発生も伴わない理想的な実験モデルと考えられる。臨床検体よりCTCを分離培養し、抗癌剤感受性試験も含め検討する。血中および腹水中、リンパ節から分離可能なCTCは量的に少ないことが問題であり、このCTCを分離培養する技術が最重要課題といえる。この問題の解決手段として重度免疫不全モデルであるNOGマウスを用いた微小癌細胞レベルでの移植手技を確立し、抗癌剤感受性試験等への臨床応用を目指す。

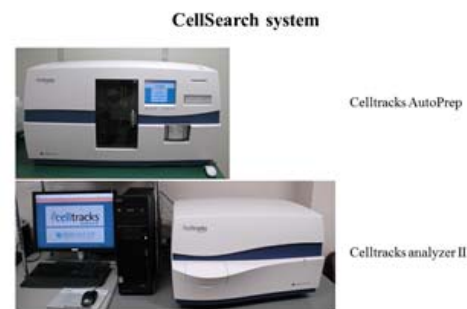
## 2. 研究の目的

本研究は、消化器癌における血液中の**循環癌細胞 (Circulating Tumor Cells = CTC)**や腹水中の微小癌細胞、リンパ節における微小転移巣を分離し、**重度免疫不全モデル ; NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$  null (NOG)マウス**に異種間移植を行い、抗癌剤感受性試験および生物学的悪性度や特性を明らかにし、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

### 1) Cell Search Systemによる循環血液中のCTC検出

EpCAM抗体を標的として磁気ビーズによりCTCを分離し、PancytokeratinおよびEPCAM, CD45による自動蛍光染色で癌細胞を識別するCellSearch system (Veridex社製)を用いてCTC検出を行う。



システムの精度の検証を、胃癌由来細胞株を用いて検証し、抗癌剤感受性時の検出能の評価を行う。検出される細胞のViabilityの評価は重要であり、コンピューター画像による形態学的評価を行い、評価基準の確立に努める。

また、CTC プロファイルキットを用いた細胞分離により細胞培養および動物実験による生着能の検証を計画している。臨床検体においては胃癌および食道癌症例における末梢血および手術時に採取可能な門脈血において検出される CTC の評価を行い、予後、再発の因果関係を明らかにする。化学療法および放射線療法症例ではその効果との相関をみることにより CTC 評価の妥当性および有用性を検討する。また、切除不能・再発胃癌における腹水中の floating cancer cell の検出法の開発を、同 System を用いて行う。腹水からの検出においては中皮細胞の混入により現時点では困難であることが現在までの実験により確認できており、これらの問題の解決を行う。

#### 4. 研究成果

まず、癌治療の個別化を目的として CellSearch システムを用いた循環癌細胞 (CTC) の検出を行い、胃癌において検出可能であることを確認した。胃癌細胞株 KATO III を用いた希釈系列による検討では、直線性は保たれており、効率かつ定量的に検出が可能であることが確認された。

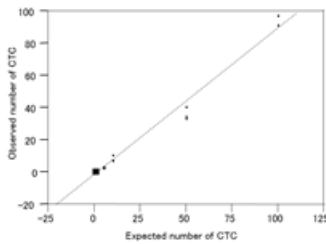


Figure 3

また、胃癌患者の臨床検体血液において、CTC が定量的に識別できることも確認した。

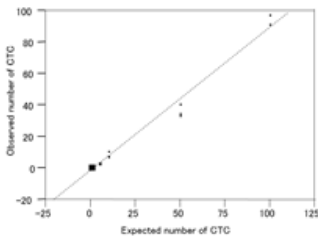
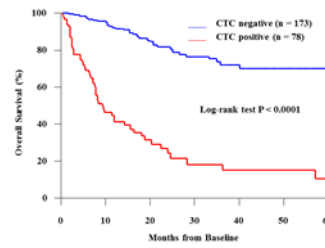


Figure 3

これらの結果から CTC は、予後との相関を認め、切除例においては、無再発生存期間にも有意に影響することが確認された。多変量解析による結果では CTC が独立した予後予測因子として抽出されることから、CTC 測定の重

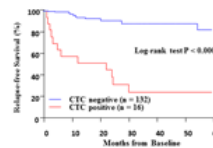
要性が示唆された。

#### 全251例CTC診断による全生存期間

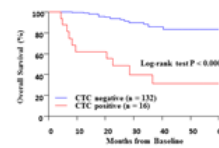


#### 切除例における末梢血CTCの検出

##### 無再発生存期間



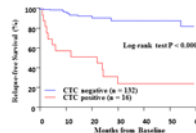
##### 5年生存率



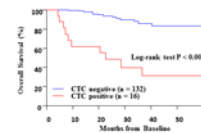
CTC 検出により胃癌切除症例の再発予測および予後予測が可能であることを確認した。また切除不能胃癌においても CTC の有無により予後に有意差を持って差があることが確認され、抗癌剤による効果と CTC の増減に関連があることを確認した。

#### 切除例における末梢血CTCの検出

##### 無再発生存期間



##### 5年生存率

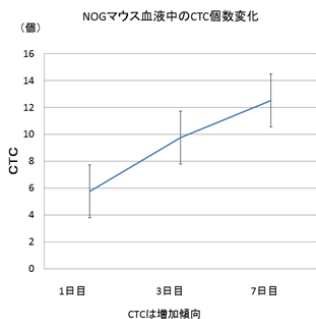


これら再発および切除不能となる因子を解析すると、CTC の存在は腹膜播種と関連があることが予測された。

#### 切除不能・再発例における非切除因子

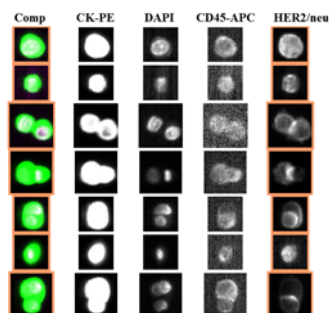
| 切除不能・再発因子 | CTC      |          | CTC陽性率 |
|-----------|----------|----------|--------|
|           | Positive | Negative |        |
| 腹膜播種      | 34       | 22       | 64.7%  |
| 肝転移       | 2        | 3        | 40.0%  |
| 肺転移       | 0        | 1        | 0.0%   |
| 骨転移       | 1        | 0        | 100%   |
| 脳転移       | 1        | 0        | 100%   |
| リンパ節転移    | 5        | 4        | 55.6%  |

NOG マウスにおいて胃癌細胞株 MKN45 を用いて腹腔内へ遊離した癌細胞が血中へ移行することの動物実験を行った。これにより肉眼的腹膜播種形成よりも早期に腹腔内へ遊離した癌細胞は経腹膜的に血中へ移行していることが確認された。



また、腹腔洗浄液による細胞診と CEA および CK19 をプライマーとした RT-PCR による評価との比較を行ったが、腹膜播種における感度は CTC による検出の方が優れていることが確認されている。

併せて CTC については、検出された癌細胞における HER2 タンパク発現についての評価も行った。患者の生検検体における HER2 発現と CTC での発現には相違があることを確認し、切除不能胃癌患者の約 25% に発現することが確認された。



分子標的治療薬における個別化治療への応用も期待され、発現強度および発現細胞量の客観的評価も可能であることから、CTC における HER2 発現を指標としたトラスズマブの効果安全性に関する観察研究を開始した。CTC の評価は食道癌、膵臓癌でも開始しており、切除不能食道癌で 27%、切除不能膵臓癌で 20% の検出が認められた。これらの生物学的特性を明らかにすることにより、治療の個別化への応用が期待される。

#### 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 7 件)

1. Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajo A, Ishigami S, Okumura H, Kijima Y, Ueno S, Natsugoe S. : Clinical Significance of Lymph Node Micrometastasis in Gastric Cancer, Ann Surg Oncol. 2012 May 1 doi: 10.1245/s10434-012-2355-x. 査読有
2. Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, Hagihara T, Haraguchi N, Matsushita D, Yanagita S, Nakajo A, Okumura H, Hokita S, Natsugoe S. : Expression of stanniocalcin 1 as a potential biomarker of gastric cancer, Oncology. 2012;83(3): 158-64 doi: 10.1159/000341390. 査読有
3. Aoki M, Ishigami S, Uenosono Y, Arigami T, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, Matsumoto M, Ueno S, Natsugoe S. : Expression of BMP-7 in human gastric cancer and its clinical significance. Br J Cancer. 104:714-718, 2011 doi: 10.1038/sj.bjc.6606075. 査読有
4. Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, Yanagita S, Ishigami S, Natsugoe S. : B7-H3 expression in gastric cancer: A novel molecular blood marker for detecting tumor cells. Cancer Sci. 102(1019-1024) 2011 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01877.x. 査読有
5. Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S, Kozono T., Arima H., Hirata M., Kita Y., Uchikado Y., Okumura H., Matsumoto M., Natsugoe S. : Sentinel node navigation surgery is acceptable for clinical T1 and N0 esophageal cancer. Ann Surg Oncol. 18(7):2003-9. 2011 doi: 10.1245/s10434-011-1711-6. 査読有
6. Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, Hagihara T, Yanagita S, Ishigami S, Natsugoe S. : Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis. J Surg Oncol. 748-752, 2010 doi: 10.1002/jso.21722. 査読有
7. 上之園芳一, 愛甲 孝, 有上貴明, 柳田茂寛, 有馬豪男, 石神純也, 夏越祥次 : 消化器癌における微小転移を含めたリンパ節転移の評価. 病理と臨床, 28 巻 6 号, 648-653-67, 2010 査読無

[学会発表] (計 15 件)

1. 上之園芳一 胃癌における CTCs の存在意義と HER2 発現解析による臨床応用への

展望. 第 50 回日本癌治療学会学術集会  
(ランチョンセミナー), 横浜市, 10 月  
25 日, 2012

2. Uenosono Y., Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastric cancer, 5<sup>th</sup> World Circulating Tumor Cell Summit, Asia, Singapore, 8 月 29 日, 2012
3. 上之園芳一, 有上貴明, 柳田茂寛, 小園勉, 有馬豪男, 萩原貴彦, 原口尚士, 松下大輔, 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検出および Her2 発現の検討. (サージカルフォーラム) 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 千葉市, 4 月 13 日, 2012
4. Uenosono Y., Arigami T., Yanagita S., Kozono T., Hagihara T., Haraguchi N., Ishigami S., Hokita S., Natsugoe S.: Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in blood from Patients with Gastric Cancer, 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Osaka Japan, 9 月 22 日, 2011
5. Uenosono Y., Arigami T., Yanagita S., Arima H., Hirata M., Hagihara T., Ishigami S., Natsugoe S.: Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastric cancer, International Surgical Week 2011, Yokohama Japan, 9 月 1 日, 2011
6. 上之園芳一, 有上貴明, 柳田茂寛, 萩原貴彦, 原口尚士, 小園勉, 平田宗嗣, 有馬豪男, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 胃癌患者における血中循環癌細胞と予後に関する検討. 第 83 回日本胃癌学会総会, 三沢市, 3 月 4 日, 2011
7. 上之園芳一, 有上貴明, 平田宗嗣, 小園勉, 萩原貴彦, 柳田茂寛, 石神純也, 帆北修一, 愛甲 孝, 夏越祥次: 胃癌における CellSearch system を用いた血中循環癌細胞の検出 第 65 回日本消化器外科学会定期学術総会, 下関市, 7 月 15 日, 2010
8. 上之園芳一, 有上貴明, 平田宗嗣, 萩原貴彦, 柳田茂寛, 有馬豪男, 小園 勉, 石神純也, 帆北修一, 愛甲 孝, 夏越祥次: 胃癌患者における血中循環癌細胞の検出の意義. 第 110 回日本外科学会定期学術集会, 名古屋市, 4 月 8 日, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 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・  
特任准教授

研究者番号: 60398279

### (2) 研究分担者

柳田茂寛 (YANAGITA SHIGEHIRO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
特任助教  
研究者番号: 20444903

有上貴明 (ARIGAMI TAKAAKI)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
助教  
研究者番号: 40527058

夏越祥次 (NATSUGOE SHOJI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・  
教授  
研究者番号: 70237577