

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591965

研究課題名(和文) TRC法を用いた血中遊離大腸癌細胞の検出とその抗癌剤感受性マーカーとしての意義

研究課題名(英文) The significance of transcription-reverse transcription concerted reaction method for detecting circulating tumor cells in patients with colorectal cancer and for anticancer drug sensitivity marker.

研究代表者

辛島 龍一 (KARASHIMA, Ryuichi)

熊本大学・医学部附属病院・診療助手

研究者番号：60594471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：切除不能進行再発大腸癌患者におけるCEA-mRNAを標的としたTRC法によるCTCs検出は、安価であり、CellSearch systemによるCTCs検出と同様に予後を予測することが可能であった。本研究により、TRC法によるCTCsの検出が実臨床においてCellSearch systemによるCTCs検出の代替となりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：The TRC method seems to be a useful alternative to the CellSearch system for clinically detecting CTCs in patients with metastatic CRC.

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：TRC CTC(血中遊離癌細胞) CellSearch System 大腸癌 化学療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 血中遊離癌細胞(CTC)検出の意義

1869年 Thomas Ashworth により、癌細胞が固形癌患者の血液中に存在することが顕微鏡で確認されたのが循環腫瘍細胞(circulating tumor cell: CTC)の最初の報告であるが、それ以来、微量な CTC を検出する方法や CTC の臨床的意義についての研究がなされるようになった。CTC 検出には、免疫学的手法や Flow cytometry、PCR など様々な手法が用いられてきた。近年、磁気微粒子を特定の抗体と結合させ磁気的分離をさせて最終的に癌細胞を同定し得る FDA 認可機器である CellSearch system が市販され、その臨床的有用性について様々な癌腫でなされている。消化器癌においては Hiraiwa らの報告(Hiraiwa et al. Ann Surg Oncol 15 2008)を筆頭に、大腸癌においても Cohen ら(Cohen et al. J Clin Oncology 26 2008)がその臨床上の有用性を示唆した。

(2) 臨床使用における CellSearch system の問題点

その有用性についての報告はあるものの、CellSearch system を用いた CTC 検出は一般に広く普及するに至っていない。その原因として以下のようなことがあげられる。

- ・一検体当たりのコストが高額である
- ・臨床上の測定の手がかりが確立していない

特に転移・再発大腸癌症例においては、近年の化学療法に進歩に伴い癌の進展状況をより real time に的確に評価することが、さらなる効果的な治療戦略の選択に不可欠となってきた。CTC の検出が、既存のマーカーを凌ぐより効果的な検査となる可能性を秘めているが、上記の理由から CellSearch system を日常診療で汎用することは難しい。

(3) Transcription-Reverse Transcription Concerted Method (TRC) を用いた micrometastasis 検出

TRC は、RT-PCR の手法を用いた機器の一つである。その特徴は、標的 RNA の増幅および検出を一定温度で、迅速に、1本のチューブ内で行えることである。TRC を用いた micrometastasis の検出の報告(消化器癌における骨盤腔内播種や乳癌のセンチネルリンパ節)では、その有用性が報告されている(Ishi et al. Ann Surg Oncol 11 2004, Ohasi et al. Anticancer Res 27 2007, Hayama et al. Oncol Rep 18 2007, Ishikawa et al. Eur J Surg Oncol 33 2007)。また、当科でも食道癌切除例における微小リンパ節転移診断における TRC の有用性を報告した(Imamura et al. J Surg Oncol 2010)。我々は、CellSearch system の代替機器としての TRC

の可能性に注目し、切除不能進行・再発大腸癌患者における TRC を用いた CTC 検出の可能性について検討した。

(4) TRC を用いた CTC 検出の可能性

癌細胞株を用いた癌細胞検出能: TRC を用いて癌細胞 1 個の検出が可能であった。

臨床検体での CTC 検出能: 臨床検体において、TRC を用いた CTC 検出は CellSearch system と同等であった。

TRC method と CellSearch system の使用上の相違点: TRC は、より迅速に、より安価に、そして客観的に CTC 検出が可能である(表 1)。

表 1. CTCs 検出における TRC 法と CellSearch system の比較

	最終判定	1検体当たりの費用	検査時間
TRC	自動判定	約3,000円	90分以内
CellSearch	肉眼で判定	約7~80,000円	数時間

以上の結果から、切除不能転移・再発大腸癌症例での CTC 検出において、TRC は臨床使用という点で有用である可能性が示唆された。しかし、実際の使用にあたっては更なる解析が必要である。

2. 研究の目的

血中遊離癌細胞(CTC)の検出が予後や治療効果の予測因子であることはさまざまな癌腫で報告されておりその臨床的意義は大きい。現在、CellSearch system が市販され、それをを用いた CTC 検出の有用性が多く報告されている。しかし、日常診療へ導入には課題が多い。我々は Transcription-Reverse Transcription Concerted Method(TRC)を用いて CEA mRNA を標的にした CTC 検出の有用性について検討を行っている。我々の基礎研究において、TRC は CellSearch system と同程度の検出能で安価に CTC 検出を行うことができ、さらにその結果で予後を予測し得ることが明らかにした。

本研究では、TRC を用いた CTC 検出の臨床(大腸癌化学療法患者)への効果的な導入法を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

当科で化学療法を導入する切除不能進行・再発大腸癌症例を対象に、治療導入前から導入後一定期間に採血ポイントを設定し血液サンプル採取を行う。

TRC による CTC 検出結果と症例の臨床経過・採血データ(腫瘍マーカー等)・画像変化等を比較検討し、TRC を用いた CTC 検出法の

予後予測方法を明らかにし、さらに至適使用方法を確立する。あわせて、全血から抽出された total RNA を用いたアレイと臨床情報を比較することで、CTC の分子生物学的特徴を明らかにするとともに、より鋭敏で有用な検出対象となる分子の検索も行う。

(1) 患者登録からのサンプル採集

治療を開始する切除不能進行・再発大腸癌症例の登録を進める。登録した症例の情報は、基本情報・大腸癌関連情報・再発転移情報・治療効果の評価などを前向きに収集していく。サンプルは、決められた採血ポイントで収集し、ライセートの状態で-80 で保存する。手技のプレを極力排除するために、RNA 抽出から TRC での CTC 検出までの行程はある程度のサンプルが集まってから行う。

TRC 法による CTC 検出は、Palliative therapy での早期レジメン変更や Conventional therapy として転移巣切除の可能性を見極める指標として期待されるものである。採血ポイントは、治療開始前から治療開始後 2 カ月までの 4 点を定義した。

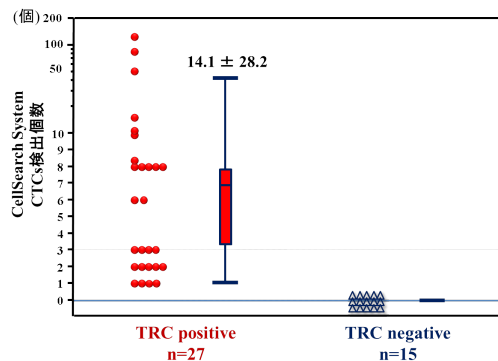
(2) CTC 検出結果と臨床情報の解析

TRC 法での CTC 検出結果と臨床情報（転移再発情報や治療効果評価）について統計学的解析を行い、その意義を解析する。とくに、予後の情報と照らし合わせることで採血ポイント毎の CTC 検出結果の意義を明らかにすることができ、推奨される採血ポイントを確立させ、臨床上的 CTC 検出の特性と意味合いを明確にすることができる。

4. 研究成果

我々の施設で治療を受けた大腸癌患者のうち、化学療法を開始したのちに根治的手術を受けていない切除不能進行再発大腸癌患者 42 例を対象とし、化学療法導入前の CTCs 検出結果と予後との相関について生存解析を行った。その結果、42 検体中 TRC 反応陽性は 27 検体であった (64.3%、図 1)。

図 1. TRC 法と CellSearch system を用いた CTCs 検出結果



CellSearch system で癌細胞が 1 個以上検

出されたとき CTC positive とした場合、CTC positive となったのは 27 検体であった。TRC 法で CTC positive となった症例は、全例が CellSearch system でも CTC positive であった (表 1)。転移性大腸癌患者における CellSearch system を用いた CTC 検出の検討では、CTC 3 個以上の検出と 3 個未満の検出の 2 群に分けた場合、CTC 3 個以上の群が有意に予後不良であることが過去に報告されているが、本研究において、CTC 3 個以上が検出した場合を CTC positive とした場合、CTC positive となったのは 18 検体であり、TRC 法の結果と有意 ($p < 0.0001$) な相関を認めた (表 2)。

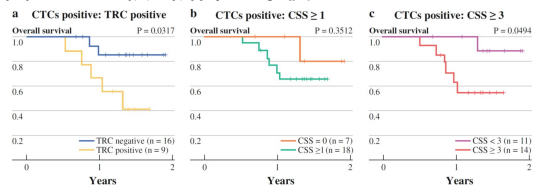
表 2. TRC 法と CellSearch system における CTC 検出結果

	TRC method		P-value	
	Positive (n=27)	Negative (n=15)		
CellSearch system	CTCs ≥ 1 (n=27)	27	0	$p < 0.0001$
	CTCs = 0 (n=15)	0	15	
	CTCs ≥ 3 (n=18)	18	0	$p < 0.0001$
	CTCs < 3 (n=24)	9	15	

また、根治切除を受けることなく経過した切除不能進行再発大腸癌患者 25 人の TRC および CellSearch system による CTC 検出結果と予後 (全生存率) を解析した (図 2)。化学療法導入前に TRC 法で CTC positive (TRC 反応陽性) であったのは 9 名で、有意に予後不良であった ($p = 0.0317$ 、図 2-(a))。

CellSearch system で 1 個以上の CTCs が検出されたものを CTC positive とした場合、CTC positive と診断されたのは 18 名であり、CTC 検出結果と予後に優位な差は認めなかった (図 2-(b))。CellSearch system で 3 個以上の CTCs が検出されたものを CTC positive とした場合、CTC positive と診断されたのは 14 名であり、その予後は有意に不良であった ($p = 0.0494$ 、図 2-(c))。

図 2. CTC 検出結果と予後



以上から、切除不能進行再発大腸癌患者における CEA-mRNA を標的とした TRC 法による CTCs 検出は、安価であり、CellSearch system による CTCs 検出と同様に予後を予測することができることが示された。TRC 法臨床上有用な検査方法であり、今後、実臨床において CellSearch system による CTCs 検出の代替となりうると考えられる。

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2件)

Sato N, Hayashi N, Imamura Y, Tanaka Y, Kinoshita K, Kurashige J, Saito S, Karashima R, Hirashima K, Nagai Y, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Baba Y, Watanabe M, Baba H. Usefulness of transcription-reverse transcription concerted reaction method for detecting circulating tumor cells in patients with colorectal cancer. Ann Surg Oncol. 2012 Jun;19(6):2060-5. 査読有

DOI: 10.1245/s10434-011-1889-7.

岩槻政晃、林尚子、渡邊雅之、石本崇胤、馬場祥史、宮本裕士、馬場秀夫「大腸癌のリンパ節中微量癌細胞検出の意義2 ~MASA法~」大腸癌 FRONTIER. 2012; 5: 41-44. 査読無

URL:http://med.m-review.co.jp/magazine/detail1/J46_5_1_41-44.html

〔学会発表〕(計5件)

宮本 裕士、「高齢者(75才以上)切除不能大腸癌に対する全身化学療法」第68回日本大腸肛門病学会学術集会、2013年11月15日、京王プラザホテル(東京都)

宮本 裕士、「Chemotheapy for elderly patients with unresectable colorectal cancer.」第11回日本臨床腫瘍学会、2013年8月31日、東北大学百周年記念会館川内萩ホール(宮城県)

宮本 裕士、「高齢者大腸癌における化学療法の検討」第77回大腸癌研究会、2012年7月6日、ホテル日航(東京都)

佐藤 伸隆、「大腸癌におけるC5a受容体発現の臨床的意義」第111回日本外科学会定期学術集会、2011年5月26日(紙上発表)

林 尚子、「切除不能進行再発大腸癌に対する治療戦略 conversion therapy を適切に施行するための指標とは?」第111回日本外科学会定期学術集会、2011年5月26日(紙上発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

辛島 龍一(KARASHIMA, Ryuich)
熊本大学・医学部附属病院・診療助手
研究者番号：60594471

(2)研究分担者

渡邊 雅之(WATANABE, Masayuki)
公益財団法人がん研究会・がん研有明病院・食道担当部長
研究者番号：80254639

林 尚子(HAYASHI, Naoko)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：20452899

馬場 祥史(BABA, Yoshifumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：20599708

岩槻 政晃(IWATSUKI, Masaaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・非常勤講師
研究者番号：50452777