# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：３２６２２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2013
課題番号：２３６５９３０８

研究課題名（和文）血液検体による簡便で効率的な胃癌モニタリングシステムの確立

研究課題名（英文）Establishment of simple methodology on clinical monitoring for gastric cancer

研究代表者
伊藤　寛晃（ITO, HIROAKI）

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：７０４４３４４７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　2,900,000円、（間接経費）　870,000円

研究成果の概要（和文）：研究にご協力いただいた胃癌手術患者さん65名から、手術前に腕から採血を行い、血液中の生きて流れている癌細胞（循環癌細胞）を検出しました。検出された循環癌細胞数と手術後の予後が有意に相関することが確認されました。また、循環癌細胞を細胞の大きさで分類すると、さらに高精度に予後予測が行えることが分かりました。
また、採取した循環癌細胞のゲノムDNAを増幅抽出することに成功し、次世代シークエンサーを用いて、元々の胃癌組織のゲノムDNAと比較したところ、DNAの配列は異なっていました。

研究成果の概要（英文）：Methods: We obtained peripheral blood samples from 65 patients with gastric cancer. After infection of OBP-401, GFP-positive (GFP+) cells were counted and measured. The relationship between the number of GFP+ cells and surgical outcome was analyzed.
Results: The median follow-up period of the surviving patients was 36 months. A significant difference in overall survival was found between patients with 0-5 and patients with 6 or more large-sized GFP+ cells (L-GFP+ cells). No clear relationship was established between the number of small-sized GFP+ cells and patients' prognosis.
Conclusions: The number of L-GFP+ cells was significantly related to overall survival in patients with gastric cancer. The detection of L-GFP+ cells using OBP-401 may be a useful prognostic marker in gastric cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：腫瘍検査学　循環癌細胞　胃癌

１．研究開始当初の背景

胃癌はわが国で死因の多くを占める重要な疾患である。全国がん（成人病）センター協議会の資料によれば、加盟施設の 1997 年から 2000 年初回入院胃癌患者の 5 年相対生存率は、胃癌取扱い規約臨床病期Ⅰ99.1%、Ⅱ72.6%、Ⅲ45.9%、Ⅳ7.2%である。臨床病期Ⅱ、Ⅲ、Ⅳの生存率はいまだ満足できる水準ではなく、集学的治療が必要である。

病期Ⅱ、Ⅲの胃癌患者を対象とした Adjuvant Chemotherapy Trial of TS-1 for Gastric Cancer （ACTS-GC）の結果が公表され、胃癌標準手術後化学療法の有用性が示された。手術単独群と TS-1 投与群の比較は 3 年生存率が 70.1%に対して 81.9%、3 年無再発生存率が 60.1%に対して 72.2%と、ともに有意差を持って約 10%の向上がみられた。この結果を受け、胃癌治療ガイドラインで病期Ⅱ、Ⅲの患者への術後補助化学療法が標準治療とされたが、病期Ⅱ以上の患者群から真に術後追加治療が必要な群と不要な群を選択、区別することができれば、より効果的な治療が実現でき、医療費適正配分の観点からも極めて有用である。よって、病理学的診断を上回る精度の新たな予後因子の探索が行われている。

申請者らがこれまで明らかにしてきたように、癌患者における血液中循環癌細胞(CTC)の存在は、予後不良因子と考えられている。しかし、CTC が検出されながら転移が生じない例も相当数存在し、CTC と転移、再発の関係は必ずしも明らかではない。その理由に検出精度の問題が挙げられる。これまでの主な CTC 検出法は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）や抗 EpCAM（上皮細胞接着分子）抗体を利用した技術を用いているが、一定の疑陽性が存在することが知られている。つまり、現在の検査法では浸潤能・転移能を有する癌細胞と転移能をもたない不活化した癌細胞を区別せず、さらには癌以外の上皮系細胞まで含めて、全て「癌細胞」として検出している可能性があり、したがって予後を明確に反映しないのではないかと推測される。

２．研究の目的

癌患者血液中循環癌細胞（Circulating Tumor Cells、以下 CTC）の中で、真に重要な病的意義を持つのは浸潤能・転移能を有する活性化した癌細胞である。

本研究の主要な目的は、テロメラーゼ活性が高い細胞を選択的に検出することにより、浸潤能・転移能を有する可能性の高い癌細胞を特異的に検出することである。その結果、より正確な癌の進行度診断と予後予測が可能になると考えられる。また、適切な治療選択が可能になると期待される。

３．研究の方法

テロメラーゼ特異的ウイルス製剤を用いて検出した CTC の、胃癌予後因子、ならびに胃癌治療前診断としての有用性を評価する。

対象：前治療のない胃癌手術患者 65 例。

検体：末梢静脈血 7.5ml。

測定方法：採血血液にテロメラーゼ特異的ウイルス製剤を体外で感染させ、蛍光標識された細胞数を測定する。

解析方法：臨床病理学的因子、臨床経過との検討から、CTC 測定値の予後因子としての有用性を評価する。

４．研究成果

1)前治療のない胃癌患者 65 例において、高テロメラーゼ活性 CTC を検出することに成功した（図 1)。

2) 高テロメラーゼ活性 CTC 個数と予後が有意に相関することを示した。高テロメラーゼ活性 CTC の検出は癌患者の予後推定に有用と考えられた（図 2)。

3)早期癌患者血液中の CTC 陽性率は比較的低く、癌の超早期診断を目的とした場合、高テロメラーゼ活性 CTC 個数のみ評価することは不十分であると考えられた。

図 1

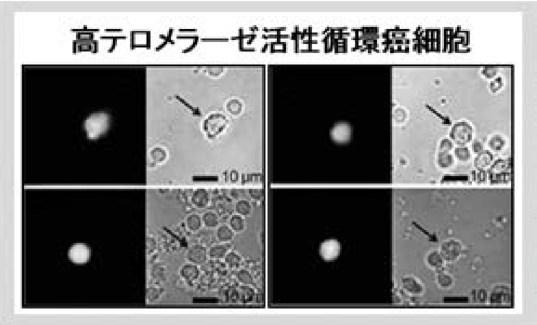
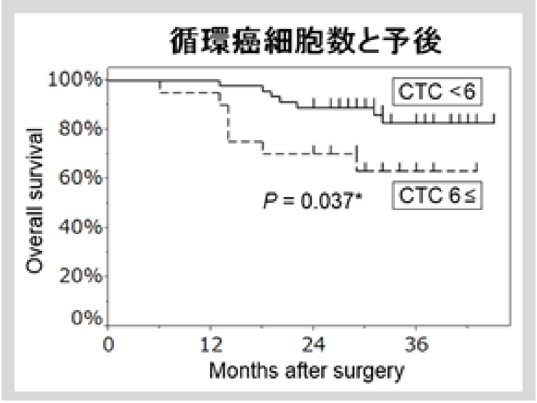



図 2



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）

① Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Norimasa Sando, Satoshi Kimura, Keigo Gohda, Jun Sato, Katsuhiro Murakami, Shun Ito, Noriko Odaka, Hitoshi Satodate and Shin-ei Kudo. Prognostic impact of detecting viable circulating tumour cells in gastric cancer patients using a telomerase-specific viral agent: a prospective study. BMC Cancer（査読有）. 2012; 12:346. DOI:10.1186/1471-2407-12-34622873704 (published: 9 August 2012).

② Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Satoshi Kimura, Tohru Ohmori, Fumihiro Ishikawa, Keigo Gohda and Jun Sato. Prognostic impact of the number of viable circulating cells with high telomerase activity in gastric cancer patients: A prospective study. Internatonal Journal of Oncology（査読有）. 2014;45: 227-234. DOI: 10.3892/ijo.2014.2409 (published online on: Tuesday, April 29, 2014).

〔学会発表〕（計 13 件（招待講演を含む））

① Combination of minimal invasive therapy and advanced molecular biological technique. Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue and Shin-ei Kudo. The 1st. China-Japan Symposium on Cancer Research（Shenzhen, China）2011.5.18-20

② Combination of advanced technique of endoscopic diagnosis, minimally invasive therapy and novel molecular biology for diseases of digestive tract. Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Norimasa Sando, Satoshi Kimura, Tohru Ohmori, Hideyuki Saya, and Shin-ei Kudo. 2012 中国普外科焦点论坛（兼 The 3rd. Lanzhou International Conference on Surgery）（Lanzhou, China）2012.5.27-28

③ Clinical application of circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies. Hiroaki Ito. 3rd. Annual Meeting World CTC USA (Boston, USA) 2012.11.13-15

④ 消化器癌における循環癌細胞検出の意義と臨床応用．伊藤寛晃，井上晴洋，工藤進英．
第 7 回 沖縄消化管病理研究会（沖縄県医師会館，那覇市） 2013.2.22

⑤ Circulating tumor cells on gastrointestinal malignancies. Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Satoshi Kimura, Manabu Onimaru, Haruo Ikeda, and Shin-ei Kudo.
5th Annual International Forum: Regional & Targeting Therapies Cancer (RTTC 2013), Session 12: Circulating Tumor Cells and Cancer Stem Cells from Research to Clinic (Shanghai, China) 2013.11.15-18

⑥ 胃癌における末梢血中高テロメラーゼ活性循環癌細胞検出の試み．伊藤寛晃，井上晴洋，工藤進英．
第 8 回　日本消化器外科学会大会 (JDDW2010)(横浜),外 SF2-10, 2010.10.15 (JDDW 2010.10.13-16）.

⑦ Prognostic impact of detecting circulating tumor cells using OBP-401 in gastric cancer patients. Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Norimasa Sando, Satoshi Kimura, Keigo Gohda, Shun Ito, Jun-ichi Tanaka, Shin-ei Kudo. The 8th. International Symposium on Minimal Residual Cancer (Osaka, Japan), September 21-23, 2011

⑧ 循環癌細胞と臨床応用．伊藤寛晃，井上晴洋，山洞典正，木村聡，合田圭吾，佐藤淳，村上克洋，伊藤俊，前田知世，里舘均，小鷹紀子，池田晴夫，工藤進英．
第 272 回 新潟外科集談会（新潟）, 2011.12.03

⑨ 癌細胞検出技術と臨床応用：胃癌循環癌細胞前向き試験の途中成績と次世代技術．伊藤寛晃，井上晴洋，山洞典正，木村聡，合田圭吾，佐藤淳，村上克洋，伊藤俊，前田知世，小鷹紀子，里舘均，池田晴夫，Nikolas Eleftheriadis, Roberta Maselli, 鬼丸学，吉田亮，細谷寿久，須藤晃佑，工藤進英．
第 41 回 神奈川胃癌治療研究会（横浜）, 2011.12.17

⑩ OBP-401 を用いた胃癌患者末梢血中循環癌細胞検出と予後との相関．伊藤寛晃，井上晴洋，山洞典正，木村聡，合田圭吾，伊藤俊，里舘均，小鷹紀子，池田晴夫，工

藤進英.
第 84 回 日本胃癌学会（大阪），ワークショップ 3 微小転移の臨床的意義と臨床応用の可能性, 2012.2.9

⑪ Advanced Diagnostic Techniques of Ultra-High Magnification Endoscopy and Identification of Circulating Tumor Cells. Hiroaki Ito, Norimasa Sando, Satoshi Kimura, Yasuo Urata, Nobuyoshi Katagiri, Hideyuki Saya, Haruhiro Inoue and Shin-ei Kudo. The 4th. World CTC Summit (poster presentation) April 24-26, 2012, Berlin, Germany

⑫ Advanced diagnostic techniques of endoscopy and molecular biology for diseases of digestive tract. Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Norimasa Sando, Satoshi Kimura, Yasuo Urata, Nobuyoshi Katagiri, Hideyuki Saya, Masumi Abe, Ryoko Araki and Shin-ei Kudo. The 2nd. Japan-China Symposium on Cancer research (poster presentation) May 9-11, 2012, Chiba, Japan

⑬ 循環癌細胞の個別採取と増幅抽出ゲノム DNA の次世代シークエンサーによる網羅的遺伝子解析. 伊藤寛晃, 井上晴洋, 山洞典正, 木村聡, 大森亨, 小鷹紀子, 里舘均, 鈴木道隆, 木田裕之, 工藤進英. 第 113 回 日本外科学会総会（福岡），ポスターセッション(375) 新規治療法開発 遺伝子解析, 2013.4.12

〔図書〕（計 1 件）
① 伊藤寛晃、循環腫瘍細胞（CTC）検査 －測定意義と今後の課題－、MEDICAL TECHNOLOGY（医歯薬出版株式会社，東京），第 42 巻，第 1 号，p88-91（2014 年 1 月 15 日）.

〔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
昭和大学 江東豊洲病院 消化器センター_先端的研究
（http://www10.showa-u.ac.jp/~ddc-kt/Page_03_02_research.html）

６．研究組織
(1)研究代表者
伊藤　寛晃（ITO, Hiroaki）
昭和大学・医学部・講師
研究者番号：70443447

(2)研究分担者
木村　聡（KIMURA, Satoshi）
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号： 30255765

研究分担者
工藤　進英（KUDO, Shin-ei）
昭和大学・医学部・教授
研究者番号： 70161643

研究分担者
井上　晴洋（INOUE, Haruhiro）
昭和大学・医学部・教授
研究者番号： 90280966

研究分担者
山洞　典正（SANDO, Norimasa）
昭和大学・医学部・兼任講師
研究者番号： 50602116

(3)連携研究者
なし