

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462032

研究課題名(和文) 消化器癌における腹膜播種機構の解析と微小癌細胞における抗癌剤感受性検査法の確立

研究課題名(英文) Analysis of the peritoneal dissemination mechanism and minimal cancer cells in gastrointestinal cancer and establishment of the anticancer agent sensitivity laboratory procedure

研究代表者

上之園 芳一 (Uenosono, Yoshikazu)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：60398279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：進行胃癌の腹膜播種(P)は主要な転移、再発形式であるが、画像診断では十分に診断できない。非侵襲的なPおよび腹腔内遊離癌細胞(CY)を検出する目的で、NOGマウスの腹腔内に胃癌細胞株を投与し、継時的に腹腔洗浄細胞診(CY)、および腹腔洗浄液のRT-PCR、末梢血中循環癌細胞(CTC)検出を行った。更に進行胃癌患者30例においてCY、腹腔洗浄液RT-PCR、末梢血CTC検出を行い評価した。マウス実験では、投与24時間後より癌細胞は血中に移行を認めCTCとして確認され、継時的増加した。臨床検体でも、P、CY陽性全例でCTCが検出された。CTC診断により非侵襲的な腹膜播種予測ができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dissemination is one of the major metastatic patterns in patients with advanced gastric cancer. However, it is difficult to diagnose peritoneal tumor dissemination in the clinical management. The purpose of this study is to establish non-invasive diagnosis of free tumor cells in peritoneal cavity. Gastric cancer cell lines were injected into peritoneal cavity of NOG mouse, and we evaluated peritoneal washes by cytology and RT-PCR. Furthermore, peripheral blood was evaluated for detecting circulating tumor cells (CTC). In 30 advanced gastric cancer patients, we performed similar detection. CTC were found 24 hours after the dosage in mice. On the other hands, all of advanced gastric cancer patients with peritoneal dissemination and/ or cytology positive had CTCs. A non-invasive prediction of peritoneal dissemination may be possible by CTC diagnosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：循環癌細胞 腹膜播種 個別化治療 NOGマウス

## 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、腹膜播種や血行性転移がしばしば認められ重要な予後因子となっている。多量の腹水や明らかな結節を形成した腹膜播種の診断は画像診断でも可能ではあるが、早期の腹膜播種患者の診断は容易ではなく PET を含む画像診断では予測困難である。末梢血中の CA19-9 や CA125 測定により予測診断が可能とする報告もあるが、十分なものとは言えない。

一方、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。

これまで申請者は、消化器癌におけるリンパ節の微小転移と血液中および腹水中の微小癌細胞の検出を免疫組織学的および分子生物学的手法を用いて行い、臨床病理学的因子や予後への影響についての報告を行ってきた。

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) を用いて消化器癌を対象に検出を行い臨床的データの蓄積を行い再発、予後への影響を明らかにしてきた。

CellSearch System による胃癌における CTC 検出では、CTC の有無により予後に有意な差があり、独立した再発予測因子となることを確認した。また、切除不能・再発症例においても予後に有意な差があり、化学療法による奏効により CTC の増減があることも確認された。それら CTC 陽性例での再発、切除不能因子の解析を行ったところ、血行性転移を有しない CTC 陽性例では腹膜播種を高頻度に伴う事に着目した。胃癌切除 146 例において CTC 陽性は 16 例 (11.0%) で検出

されたが、その 75% で腹膜播種再発をきたしていること、胃癌切除不能・再発症例 89 例において CTC 陽性は 53 例 (60.0%) であったが、その切除不能・再発因子からみて腹膜播種を有する症例の 64.7% が CTC 陽性であることがその根拠である。この臨床結果から予測される仮説は、腹腔内に遊離された DTC は、早期より腹膜から血管内へ移行し CTC として検出されるものと考えられる。

また、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。理想的には個々の症例における癌の特性ならびに CTC、DTC に応じた診断治療体系の確立が必要とされる。

## 2. 研究の目的

本研究は、消化器癌における腹腔内への遊離癌細胞 (Disseminated Tumor Cell: DTC) の検出と循環癌細胞 (Circulating Tumor Cells = CTC) との関係から腹膜播種機構を明らかにし、非侵襲的診断法の確立を行う。また、DTC および CTC を効率的に回収し異種間移植を行い、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

腹膜播種機構と CTC の関連を明らかにするため免疫不全マウス NOD/Shi-scid, IL-2R null (NOG) マウスを用いてモデル実験を行った。胃癌細胞株 (Kato、NUGC4、NCL-N87) を用いて、マウスの腹腔内に癌細胞を投与し、1、3、7 日目で腹腔内観察および腹腔洗浄水の細胞診、RT-PCR 診断を行い、更に血液中での CTC 診断を行った。

非侵襲的抗癌剤感受性について、CTC による移植モデル作成が困難であり、内視鏡生検検体での移植モデルを作成した。進行胃癌患者の生検検体を細切し、マトリゲルと混和し免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下へ移植した。進行膵癌および進行胃癌の臨床症例において腹腔内観察および腹腔洗浄水の細胞診、RT-PCR 診断を行い、更に末梢血液中での CTC 診断を CellSearch システムを用いて行った。

## 4. 研究成果

肉眼的播種形成は Kato、NUGC4 において 2~4 週で確認されたが、NCL-N87 (HER2 陽性株) では確認ができなかった。投与 24 時間後より癌細胞は血中に移行を認め CTC として確認が可能であり、継時的増加傾向にあることが確認された。

臨床検体では、良性疾患 8 例と進行胃癌患者 30 例において腹腔鏡下に腹腔洗浄細胞水を

採取し、病理診断による細胞診診断と CEA、Cytokeratin19をプライマーとした RT-PCR法による診断、および血中での CTC 検出を行った。腹膜播種陽性例 7 例中全例で CTC が検出され、RT-PCR にて 5 例 (71.4%) が陽性であった。腹腔洗浄細胞診陽性であった 7 例中 RT-PCR 陽性は 6 例 (85.7%) で、CTC は全例で陽性であった。腹膜播種、腹腔洗浄細胞診ともに陰性であった 22 例中 RT-PCR 陽性 1 例、CTC 陽性 3 例であった。

進行胃癌患者の生検検体を細切し、マトリゲルと混和し免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下へ移植した 5 例中 1 例 (10%) で移植後 9 週に腫瘍形成が確認された。一方で細切した後に、3 時間培地にてインキュベートした後にマトリゲルと混和し NOG マウスの皮下へ移植した 4 例中 3 例 (75%) で平均 10 週で腫瘍形成を認めた。腹腔洗浄水の臨床検体では、良性疾患 8 例と進行臓器癌患者 88 例において病理診断による細胞診診断と CEA、Cytokeratin19をプライマーとした RT-PCR法による診断、および血中での CTC 検出を行った。腹膜播種症例 9 例、腹腔洗浄細胞診陽性 11 例を含む対象であり、腹膜播種症例の 8 例 (88.9%)、腹腔洗浄細胞診陽性の 9 例 (81.8%) で RT-PCR 陽性であり、高感度に検出可能であることが確認された。進行胃癌 30 例においては、血中での CTC 検出と併せて行った。腹膜播種陽性例 7 例中全例で CTC が検出され、RT-PCR にて 5 例 (71.4%) が陽性であった。腹腔洗浄細胞診陽性であった 7 例中 RT-PCR 陽性は 6 例 (85.7%) で、CTC は全例で陽性であった。腹膜播種、腹腔洗浄細胞診ともに陰性であった 22 例中 RT-PCR 陽性 1 例、CTC 陽性 3 例であった。CTC 診断により非侵襲的な腹膜播種予測ができる可能性がある。

#### 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 5 件)

1. Yanagita S, Uenosono Y, Arigami T, Matsushita D, Okubo K, Kijima T, Arima H, Haraguchi N, Hagihara T, Nishizono Y, Ishigami S, Natsugoe S, The clinical usefulness of the intraoperative detection of sentinel lymph node metastases by a rapid RT-PCR system in patients with gastric cancer. *Cancer*. 2016 Feb 1;122(3):386-92. (査読有り)
2. Matsushita D, Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S, Nishizono Y, Hagihara T, Hirata M, Haraguchi N, Arima H, Kijima Y, Kurahara H, Maemura K, Okumura H, Ishigami S, Natsugoe S, Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Esophageal Squamous Cell

Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2015 Oct;22(11):3674-80. (査読有り)

3. Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, Matsushita D, Hirahara T, Yanagita S, Okumura H, Uchikado Y, Nakajo A, Kijima Y, Natsugoe S, Decreased density of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes during gastric cancer progression. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(7):1435-41. (査読あり)
4. Ishigami S, Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S, Okumura H, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, Kijima Y, Nakajo A, Maemura K, Natsugoe S, Clinical utility of perioperative staging laparoscopy for advanced gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2014 Nov 18;12:350. (査読あり)
5. Uenosono Y, Arigami T, Kozono T., Yanagita S., Hagihara T., Haraguchi N., Matsushita D., Hirata M., Arima H., Funasako Y., Kijima Y., Nakajo A., Okumura H., Ishigami S., Hokita S., Ueno S., Natsugoe S.: Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer. *Cancer*. 119(22):2398-2991. 2013 (査読あり)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 上之園芳一, 有上貴明, 大久保啓史, 柳田茂寛, 貴島孝, 石神純也, 奥村浩, 夏越祥次: 胃癌腹膜播種に対するパクリタキセル腹腔内併用化学療法の有用性 (ワークショップ). 第 77 回日本臨床外科学会総会, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市), 11 月 26 日, 2015
2. 上之園芳一, 有上貴明, 大久保啓史, 柳田茂寛, 貴島孝, 石神純也, 夏越祥次: 腹膜播種および腹腔洗浄細胞診陽性の進行胃癌に対する S-1+パクリタキセル経静脈・腹腔内併用化学療法の胃切除例に関する検討 (優秀演題). 第 45 回胃外科・術後障害研究会, ヒルトン名古屋 (愛知県名古屋市), 11 月 6 日, 2015
3. 上之園芳一, 有上貴明, 柳田茂寛, 大久保啓史, 貴島孝, 松下大輔, 奥村浩, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 切除不能・再発胃癌患者の血中循環癌細胞における HER2 発現を指標とした治療の可能性 (ワークショップ). 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 10 月 29 日, 2015
4. Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S., Matsushita D., Okubo K., Kijima T., Okumura H., Ishigami S., Hokita S., Natsugoe S.: Evaluation of HER2 expression on Primary Tumor and Circulating Tumor Cells in Patients

- with Gastric Cancer, 11th International Gastric Cancer Congress, Sao Paulo Brasil, 6月4日, 2015
5. 上之園芳一, 有上貴明, 柳田茂寛, 大久保啓史, 貴島孝, 松下大輔, 有馬豪男, 奥村浩, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 高度進行胃癌の化学療法における血中循環癌細胞の数と HER2 発現の変化. 第 115 回日本外科学会定期学術集会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 4月18日, 2015
  6. 上之園芳一, 有上貴明, 柳田茂寛, 大久保啓史, 貴島孝, 松下大輔, 有馬豪男, 奥村浩, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 高度進行胃癌の化学療法における血中循環癌細胞の数と HER2 発現の変化. 第 87 回日本胃癌学会総会、リーガロイヤルホテル広島(広島県広島市) 3月6日、2015
  7. 上之園芳一, 石神浩徳, 藤原義之, 富田寿彦, 今本治彦, 今野元博, 梨本篤, 藪崎裕, 福島亮治, 小寺泰弘, 今村和広, 上田修吾, 山下裕玄, 山口博紀, 北山文二: 腹膜播種を伴う胃癌に対する S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法(ワークショップ) 第 87 回日本胃癌学会総会、リーガロイヤルホテル広島(広島県広島市) 3月6日、2015
  8. 上之園芳一, 柳田茂寛, 有上貴明, 松下大輔, 平原徹志, 大久保啓史, 有馬豪男, 平田宗嗣, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 切除不能胃癌における生検組織と血中遊離癌細胞における HER2 発現の検討. 第 52 回日本癌治療学会学術集会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 8月29日, 2014
  9. 上之園芳一, 柳田茂寛, 有上貴明, 松下大輔, 平原徹志, 大久保啓史, 有馬豪男, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 胃癌における血中遊離癌細胞の検出による術前化学療法適応決定への可能性. (ワークショップ) 第 69 回日本消化器外科学会総会, 郡山市民文化センター(福島県郡山市), 7月18日, 2014
  10. 上之園芳一, 柳田茂寛, 有上貴明, 松下大輔, 平原徹志, 大久保啓史, 有馬豪男, 石神純也, 夏越祥次: 胃癌における血中遊離癌細胞検出による再発予測の可能性. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会, 金沢市文化ホール(石川県金沢市), 7月10日, 2014
  11. 上之園芳一, 有上貴明, 柳田茂寛, 松下大輔, 原口尚士, 有馬豪男, 平原徹志, 大久保啓史, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 胃癌における血中遊離癌細胞の検出と HER2 発現に基づく臨床応用への可能性. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 4月5日, 2014
  12. Uenosono Y., Arigami T., Yanagita S., Matsushita D., Hagihara T., Haraguchi N., Kozono T, Nishizono Y, Ishigami S., Natsugoe S.: Clinical Significance and HER2 Expression of Circulating Tumor Cells in Patients with Gastric Cancer, The 67th Annual SSO Annual Cancer Symposium, Phoenix USA, 3月15日, 2014
  13. 上之園芳一, 有上貴明, 柳田茂寛, 有馬豪男, 萩原貴彦, 原口尚士, 松下大輔, 平原徹志, 石神純也, 帆北修一, 夏越祥次: 胃癌における血中遊離癌細胞の検出と HER2 発現に基づく臨床応用への可能性. 第 51 回日本癌治療学会学術集会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 10月24日, 2013
  14. Uenosono Y., Arigami T., Yanagita S., Matsushita D., Hirahara S., Ishigami S., Natsugoe S.: Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood from Patients with Gastric Cancer, 9th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Paris France, 9月26日, 2013
  15. Uenosono Y., Arigami T., Yanagita S., Matsushita D., Hirahara S., Ishigami S., Natsugoe S.: Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood from Patients with Gastric Cancer, 10th International Gastric Cancer Congress, Verona Italy, 6月21日, 2013
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・特例准教授
    - 研究者番号: 60398279
  - (2) 研究分担者
    - 有上 貴明 (ARIGAMI TAKAAKI)
    - 鹿児島大学・医歯学域医学部・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・医歯学域医学系・教授
    - 研究者番号: 70237577