

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861086

研究課題名(和文)膵癌患者における腹腔内血中循環癌細胞を介した肝転移巣形成機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the relevance between cyclic tumor cell in hepatopetal blood flow and liver metastases in patients with pancreas cancer

研究代表者

足立 智彦 (ADACHI, Tomohiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：60437879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：CTCの有無に関し、膵頭部癌8例において末梢血からは1例もCTCは検出されず。一方腫瘍摘出前の門脈/動脈血では2/8例(25%)に、腫瘍切除後の門脈血から2/8例(25%)(1例重複)が検出される。それら検出あり3/8例(37%)の予後に関し、検出なしと比しても、平均生存期間は共に37ヶ月と予後に差異無し。初発の再発部位が肝臓の症例は1例のみだが、これは腫瘍切除前後ともに門脈内にCTCが検出された唯一の症例。CTCにおける糖鎖抗原発現の検討あるいは、マウスへのCTC移植実験は、CTC検出症例における実検出細胞数が全て1個/7.5ml血中と非常に少なく、CTC確保が困難であり検討不能であった。

研究成果の概要(英文)：In regarding to the presence of CTC, CTC was not detected at all in peripheral blood in patients with pancreas cancer. On the other hand, before tumor resection, CTC was detected in portal vein or hepatic arterial blood flow in 2 of 8 patients, and CTC was also detected in 2 of 8 patients after tumor removal. In one case, CTC was detected both of pre and post tumor resection. In regarding to the prognosis, there was no significant differences between with or without CTC in patients with pancreas cancer (Median survival time in both groups was 37 months). Interestingly, in one case whose CTC was detected in both of pre and post tumor resection, liver recurrence has occurred only in these cases. Other study such as the evaluation of carbohydrate antigen of CTC or in vivo CTC transplant experiment was not able to be conducted due to lack of sufficient CTC, because even in detected cases, all detected cell number was only one in 7.5ml blood.

研究分野：肝胆膵外科、移植外科

キーワード：膵癌 血中循環癌細胞 肝転移

1. 研究開始当初の背景

(1)【研究の学術的背景/着想に至った経緯】

膵癌は消化器癌の中でも特に予後不良として知られる。治療の基本は開腹切除および術後の補助化学療法であるが、予後不良である一因は肝臓転移が根治術後にも高率に生じることにある。これまで我々は、膵発癌機構の基礎検討を行ってきた(Adachi T et al, J Surg Res. 2006;136:106-11.)。一方で、臨床的には肝転移の抑制も極めて重要であり、肝転移制御に向けた根本的解明が必要と考えられるようになった。

膵臓からの血流は、経門脈性あるいは動脈性に肝臓へ流入するが、肝転移の原因として、これらの血流を介し膵癌細胞が肝内へ根治術前に流入している可能性を考えている。両血流中の癌細胞の有無を判定できれば、術後補助化学療法における至適抗癌剤投与経路(門脈か動脈か)の同定が可能となり、新たな治療体系が確立されることによって、肝転移抑制・予後延長が期待できる。

近年、血中循環癌細胞:Circulating tumor cell(以下 CTC)の概念が確立し、その検出が可能となった。CTC とは原発腫瘍組織から遊離し血中へ浸潤移行した細胞と定義され、他部位への転移能を有するとされる。その検出は、ナノ鉄粒子に上皮細胞接着分子(EpCAM)に対する抗体を結合した磁性粒子により、血液中の多くの細胞から特異的に癌上皮細胞を分離・抽出することで可能となった(J Clin Oncol. 2009; 27: 6160-5.)。特に乳癌・前立腺癌・大腸癌などで、CTC は臨床予後あるいは転移巣形成との相関に有用とされ、FDA 承認のもと皮膚末梢血を用いての臨床応用が開始された。しかしながら、現時点では、膵癌において皮膚末梢血から CTC が検出されていない。最大の予後不良因子である肝転移巣形成において、肝流入血内に CTC が存在するか、存在する場合、門脈と肝動脈のどちらに優位か? その CTC は肝転移巣形成

能を有するか、としたら、マウスへの皮下移植にて腫瘍形成能を有するか、を解明することは喫緊の課題である。これらの検討により膵癌において CTC を介した肝転移巣形成の機構を解明することで、抗がん剤投与経路の選択や転移高リスク例の選別を行うことにより肝転移巣形成抑制・予後延長に寄与できると考える。

2. 研究の目的

1)腹腔内の肝流入血(門脈および肝動脈)、ならびに皮膚末梢血から採血し各々の CTC 数を測定、膵癌における血流別の CTC の多寡を検討する。これにより肝転移抑制に向けた抗がん剤投与至適ルートの開発等が期待される。

2)検出 CTC における転移巣生着能を、CTC の細胞膜糖鎖抗原発現の有無にて検討する。

3)CTC の腫瘍形成能に関して、採取 CTC をマウスへ皮下移植することで腫瘍形成の有無を確認する。CTC 自体が実際に腫瘍転移の原因となっているかを確認することが可能となる。

3. 研究の方法

CTC 測定

(1)腹腔内の肝流入血(門脈および肝動脈)、ならびに皮膚末梢血における CTC 数の測定
膵癌における血流別の CTC の多寡を検討
膵癌にて開腹予定患者のうち、本研究に対する承諾を得られた症例を対象とし、術中開腹後、肝動脈血・門脈血および末梢血を各々 15ml 採取し、CTC の有無を測定する。

測定は抗 EpCAM 抗体を結合した磁性粒子により血液中の上皮細胞を抽出し、分離した上皮細胞に蛍光標識クレアチンキナーゼ(CK)モノクローナル抗体を作用させて核染色し、蛍光染色像、蛍光発色状況により CTC を同定し、その数を測定する。

CTC 転移生着能の検討

(2) 膵癌由来 CTC 糖鎖抗原発現の検討

膵癌由来 CTC による転移巣形成の可否の鍵を握る組織定着能について、CTC の細胞表面に発現している糖鎖によって解析する。CTC は、フィルターにより血球系細胞をろ過し、CTC を選択的にキャプチャする ISET 法にて検出採取する (Br J Cancer. 2012;106:508-16)。検出された CTC における糖鎖抗原を ELISA 法ならびに免疫染色法により同定する。解析対象とする糖鎖抗原は、これまでに CTC が血管内皮細胞に接着する際、重要な機能を担っていると考えられている sialyl-Le, MMP-2, Span-1 を予定している。

(3) in vivo における CTC の腫瘍形成能の解析

膵癌由来 CTC の腫瘍形成能について、マウス皮下への CTC 移植によって検討する。

ISET 法にて集積した CTC を、移植前に FBS 添加 DMEM 培地中で培養増殖を行い、 1×10^6 個の培養細胞にて移植を行う。雄性 6 週齢 SCID マウス背部皮下に培養した CTC を移植し、腫瘍形成の有無を確認する。観察期間 6 週にて腫瘍形成の有無を肉眼的に確認する。形成された腫瘍を採取後、ホルマリン固定にて組織学的解析を行い、膵癌との組織学的同一性を解析する。肉眼的に明らかな腫瘍を認めない場合も、同様に移植部位を組織学的に解析する。これによって CTC の腫瘍形成能を判定する。

4. 研究成果

1) CTC の有無に関して、膵頭部癌 8 例において CTC 採血を施行、末梢血からは 1 例も検出されなかったが、腫瘍摘出前の門脈/動脈血では 2/8 例(25%)に、腫瘍切除後の門脈血からも 2/8 例(25%)(前後重複 1 例)が検出された。一方、それら検出あり 3/8 例(37%)の予後に関し、検出なしと比しても、平均生存

期間は共に 37 ヶ月と予後に差異は無し。実際に初発の再発部位が肝臓だった症例は 1 例のみだが、これは腫瘍切除前後ともに門脈内に CTC が検出されている唯一の症例である。現存症例のさらなる経過観察を行ったうえで論文化の予定である。

【CTC 検出数】

Case	動脈切除前	門脈切除前	末梢切除前	門脈切除後
1	0	0	0	0
2	-	0	0	1
3	0	0	0	0
4	1	1	0	0
5	0	1	0	1
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0

2)3) CTC における糖鎖抗原発現の検討あるいは、マウスへの CTC 移植実験を企画していたが、CTC 検出症例における実検出細胞数が全て 1 個/7.5ml 血中と非常に少なく、これは他部位の腫瘍での他家報告と反するものであった。これら検討のための CTC 確保が困難であることがわかった。よって膵癌における CTC 糖鎖抗原発現の検討あるいは CTC 移植実験は施行し得なかった。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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

足立 智彦 (ADACHI, Tomohiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

客員研究員

研究者番号：60437879

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：