

13 - 21 がんにおける微小転移(マイクロメタスタシス)の診断及び治療適応に関する研究

主任研究者 国立がんセンター中央病院 笹子 充

研究成果の要旨

胃がん患者の末梢血・骨髄中の遊離がん細胞(ITC)をRT-PCR法を用いて検出し、ステージ別の出現頻度を評価したところ、最も早いステージ1aからステージ4まで、どのステージでも末梢血では約50%、骨髄では約30%の症例でがん細胞が検出された。大腸がん還流静脈中・末梢血中のITCを上記と同じ方法で検出した。大腸がんでは、血中ITCは予後に有意に関与した。但し、予後に差を認められたのは、DukesC症例のみで、DukesB症例に限るとITCの存在は予後に影響しなかった。大腸がんリンパ節内ITCについて306症例のDukesB大腸がん症例で評価し、ITCが予後に全く関与しないことが判明した。前向きに高度先進医療として進めている胃がん患者症例の腹腔内ITCの検出では、ITCの有無による予後の差が明確になってきている。ITCは必ずしも転移再発に直結するものではなく、転移能が高い細胞がITCとして存在するときに初めて再発につながることを示唆された。今後はこれらの細胞の特定、検出法の確立が必要である。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
笹子 充	国立がんセンター中央病院 部長	胃がんにおける微小転移の診断基準確立と治療学的意義に関する研究
愛甲 孝	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授	胃がんにおける微小転移の診断基準確立と治療学的意義に関する研究
江上 寛	熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授	大腸がんにおける微小転移の診断基準確立と治療学的意義に関する研究
飯沼 久恵	帝京大学医学部外科 講師	大腸がんにおける微小転移の診断基準確立と治療学的意義に関する研究
中西 速夫	愛知県がんセンター研究所 室長	胃がんの腹膜微小転移の診断及び治療適応に関する研究
三森 功士	九州大学生体防御医学研究所 助手	胃がんと大腸がんにおける微小転移の診断基準確立と治療学的意義に関する研究
大野 真司	独立行政法人国立病院機構九州がんセンター 医長	乳癌微小転移診断(センチネルリンパ節・骨髄)と治療への応用

総括研究報告

1 研究目的

胃がん患者における末梢血及び骨髄中の遊離がん細胞

(Isolated Tumor Cells: ITC)、大腸がん患者における還流静脈血及び末梢血中のITC、胃がん患者における腹腔内ITC、胃がん・大腸がん患者におけるリンパ節中の

ITC、これらの ITC を分子生物学的手法あるいは免疫細胞学的方法により検出し、臨床・腫瘍因子との関係、予後との関係の評価し、これらのがん細胞の臨床的意義を検討すること。なお、胃がんのリンパ節に関する研究は昨年終了し、本年度の研究対象ではない。

研究対象及び方法

対象：

胃がん末梢血及び骨髄 ITC：国立がんセンター胃外科において 2002 年 10 月 15 日より 2004 年 12 月日までの期間に本研究への協力の同意が得られた 1030 例の胃がん手術患者。

大腸がん患者の血中 ITC：熊本大学第二外科、九州大学生体防御医学研究所外科及び帝京大学外科において、手術を受けた大腸がん患者で、本研究への協力の同意が得られた 450 例。

胃がん腹腔内 ITC：愛知県がんセンターで 2000 年から 2002 年（厚生労働省認可の高度先進医療）までに収集した腹膜転移陰性症例 103 例のうち根治手術が可能であった 86 例。

大腸がんリンパ節内 ITC：帝京大学外科、九州大学生体防御医学研究所外科、九州がんセンター外科、熊本大学第二外科の 4 施設において、1984 年から 1994 年の期間に根治切除を受け、組織学的に DukesB (pN0) と診断された大腸がん 219 例、及び国立がんセンター中央病院で 1988 年から 1990 年に根治手術を受け組織学的に DukesB と診断された 98 例。合計 317 例。

方法：

血中及び骨髄 ITC 検出用検体の採取法：大腸がんでは全身麻酔下で、切除操作前の還流静脈血及び周術期（術前・術中・術後）の末梢血を採取した。末梢血では皮膚組織の混入を防ぐべく留置針を入れ、はじめの 1ml を廃棄し、その後の 1ml を検体とした。還流静脈血では留置針より採血した。これらの検体は ISOGENE-LS 4ml に混和し、激しく浸透混和した。その後は -80 度で凍結保管し、凍結標本を帝京大学外科に送付し解析を行った。胃がんでは全身麻酔導入直後、執刀直前に胸骨骨髄及び末梢血を採取した。骨髄採取時も皮膚組織混入を防ぐため、最初の 1ml を廃棄し、その後の 1ml を検体とした。同時に末梢血を採取した。検体の扱い、保管は前記大腸がん症例の血液と同じで、凍結標本は九州大学生体防御医学研究所へ送付し解析を行った。

胃がん腹腔内 ITC 検出用検体の採取法：胃がん手術時にダグラス窩及び左横隔膜下を生理食塩水約 100ml で洗浄し、これを腹腔内洗浄液として回収した。洗浄液を遠

心して得られた沈渣（細胞）のうち半分は通常の papanicolaou 染色による洗浄細胞診を行い、残り半分から CEA を指標とする定量的リアルタイム RT-PCR 法を施行した。

リンパ節 ITC 検索方法：パラフィン包埋されたリンパ節ブロックから厚さ 4µm の連続切片を 4 枚作製し、HE 染色、免疫染色に用いた。免疫染色は、抗サイトケラチン(CK)抗体 AE1/3(Signet Laboratories, MA, USA)を一次抗体とし、酵素抗体間接法(SAB:Streptavidin-Biotin 法)にて行った。研究参加施設でスクリーニングし、国立がんセンター中央病院病理、下田医師がダブルチェックした。

RT-PCR 法による微量がん細胞の検出法：検体より RNA を抽出し、逆転写反応を施行し cDNA を作製した。検出は Hybridization 法によるリアルタイム RT-PCR 法を 2 回実施した。標準遺伝子は GAPDH、標的遺伝子は大腸がん血中 ITC 研究では CEA 及び CK20 を、胃がん血中・骨髄中 ITC 検出では CEA, CK7, CK19 の 3 つの遺伝子を用いた。胃がん腹腔内 ITC 検出では CEA を用いた。腫瘍細胞値は標的遺伝子のコピー数と GAPDH のコピー数の比で求めた。陰性コントロール症例群としては、胃がんの血中 ITC 研究では 29 例の非癌患者（胆石症、腹壁癒痕ヘルニア症例等）に同意を得て検体を採取した。これらにおける遺伝子の増幅を測定し、cut off 値を決定した。大腸がん血中 ITC 研究では、健常人 25 例の末梢血の CEA 及び CK20 と GAPDH との比(CEA/GAPDH 及び CK20/GAPDH)を求め cut off 値と設定した。

2 研究成果

1) 胃がんにおける末梢血及び骨髄 ITC について

29 例の非癌患者（胆石症、腹壁癒痕ヘルニア症例等）の末梢血液及び骨髄液で、それぞれにつき各 2 回、リアルタイム RT-PCR 法を施行したが、いずれにおいても標的遺伝子の増幅はみられなかった。1030 症例から採取された末梢血と骨髄のうち、末梢血で 41 例分、骨髄で 27 例分に関しては、検体移送中に温度上昇が生じ、検体不良で測定不能であった。残りの末梢血 989 例分、骨髄 1003 例分に関して CEA, CK7, CK19 の 3 つの遺伝子増幅を測定した。CEA 値 0.0001 (1.0.E-04) を cut-off 値とした場合検出率は骨髄で 19%、末梢血で 18%、0.00001 では骨髄で 26%、末梢血で 21% となり、これ以上微量にしても検出頻度の上昇はわずかであることから、1.0.E-05 を cut-off 値とした。3 つの遺伝子の内一つでも陽性の場合を腫瘍細胞有りとした。総合ステージ別の腫瘍の陽性率は、末

梢血では全症例中 51.6%で陽性、骨髄では 32.4%で陽性であった。ステージ別では、下記の表のようであった。

末梢血中のがん細胞

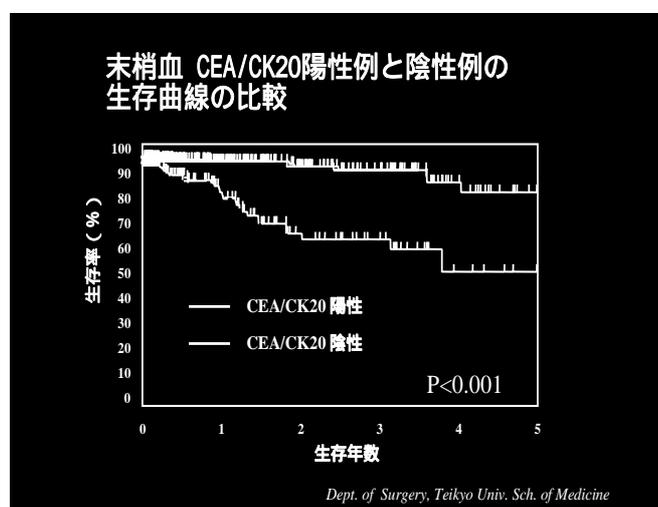
ステージ	1a	1 b	2	3a	3b	4	全体
陰性	48.3	47.3	43.7	48.4	46.9	53.9	48.4
陽性	51.7	52.7	56.3	51.6	53.1	46.1	51.6

骨髄中のがん細胞

ステージ	1a	1 b	2	3a	3b	4	全体
陰性	69.4	66.9	67.7	69.6	65.6	62.9	67.6
陽性	30.6	33.1	32.3	30.4	34.4	37.1	32.4

2) 大腸がん血中 ITC について

平成 16 年 12 月までに 450 例の症例から検体を収集し、410 例分については解析を終了した。末梢血における PCR 陽性率は、術前 9.5%、術中 37.1%、術後 26.8%であった。腫瘍還流血での PCR 陽性率は 31.7%であった。末梢血、腫瘍還流血の両者における PCR 陽性に関係する臨床病理学的因子は、腫瘍深達度、リンパ節転移、静脈侵襲、同時性肝転移であった。末梢血中、あるいは腫瘍還流血中の PCR 陽性患者の予後は陰性例に比して有意に不良であった（ともに $p < 0.001$ ）。また、これらの差は DukesB 症例では認めず（ $p = 0.59$ ）、DukesC でのみ認めた（ $p = 0.0007$ ）。このことは、大腸がん細胞が血中に存在する状況だけでは予後不良にならず、DukesC 症例のがん細胞には DukesB 症例のがん細胞に認めない転移形成能力が備わっている可能性が高い。



3) 胃がん腹腔内 ITC について

PCR 陰性例 66 例では 2 例（3%）しか腹膜再発は認めなかったのに対し、陽性例では 20 例中 11 例（55%）で腹膜再発が認められ、予後は生存率でも無腹膜再発率でも陽性例が陰性例に比べ有意に不良（ $p = 0.024$, $p = 0.0028$ ）であった（投稿中）。

4) 大腸がんリンパ節内 ITC について

免疫染色にてリンパ節 ITC を評価した 317 症例の内、生存に関する追跡情報が無い 11 例を除いた 306 例に関して、リンパ節 ITC の有無により生存曲線を比較した。ITC 陽性例は 91 症例、陰性例は 215 例であった。生存曲線はほぼ重複し、10 年生存率で ITC 陰性群は 71.2%、陽性群 70.1%であり、両群間にほとんど差がなかった（ $p = 0.355$ ）。リンパ節内の ITC は予後に影響することが殆どないことが判明し、この結果は胃がんにおける結果と同様であった。

考察

リンパ節内 ITC は胃がん同様、大腸がんでも予後に影響しないことが判明した。この事実は、今後の消化管におけるセンチネルリンパ節生検を応用した術式の開発に於いても、考慮すべき重要なポイントである。

胃がん患者の末梢血あるいは骨髄内に比較的早いステージの症例でも ITC を認めるという報告はあったが、今回検出した頻度は予想を遙かに上回る高頻度であった。さらに PCR 陽性例をステージにかかわらず、同じ程度の高頻度に認めることから考えると、予後に影響する可能性はきわめて低いと考えられる。今後厳重な経過観察を 10 年程度の長期に渡って行い、実際の予後で確認する必要がある。

この結果解釈に対して、血中 PCR 陽性が血中に生きたがん細胞が存在することを必ずしも意味しないという反論はあり得る。しかし、全く同じ方法により PCR 検出している大腸がん症例では、PCR 陽性例の予後が有意に不良であり、さらに昨年既に報告したように陽性例では免疫細胞診で破壊されていないがん細胞を検出できることから、本法で検出している mRNA 自体ががん細胞そのものを捕らえている可能性は高い。

さらに興味深いことに、大腸がん症例でも DukesC では予後に大きな差があるのに反して、DukesB 症例では予後に差が無く、がん細胞の存在自体が再発や予後に影響するわけではなく、転移能を持った細胞の存在が予後に結びつくという可能性が示唆された。すなわち、DukesB 症例の血中がん細胞は転移形成能が低く、一方 DukesC 症例では転移形成能が高い、と考えられる。

今後、胃がん症例に於いても今回用いた方法による陽性例で免疫細胞診を施行し、形態学的にがん細胞を確認する作業は必要と思われる。また、最近、自己複製能と同時に分化能を有するがん幹細胞が、脳腫瘍の転移成立において重要であるとの報告がなされた(Kato et al., PNAS 2004)。胃がん・大腸がんをはじめとする消化器がんでも同様な細胞が存在し、その様な場合のみ転移が成立するという可能性もあり、これらの幹細胞を同定し、その検出のための分子マーカーを明らかにしたい。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Mori, K., Sasako, M., et al., Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, 313: 931-937, 2004.
2. Ushijima, T., Sasako, M., Focus on gastric cancer. *Cancer Cell*, 5: 121-125, 2004.
3. Sayegh, M.E., Sasako, M., et al., TNM and Japanese staging systems for gastric cancer: how do they coexist? *Gastric Cancer*, 7: 140-148, 2004.
4. Nakano, S., Aikou, T., et al., Lymph nodes mapping for detection of sentinel nodes in patients with papillary thyroid cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, 31: 801-804, 2004.
5. Ishigami, S., Aikou, T., et al., CD3 zeta expression of regional lymph node and peripheral blood lymphocytes in gastric cancer. *Anticancer Res.*, 24: 2123-2126, 2004.
6. Mataka, Y., Aikou, T., et al., Carcinoembryonic antigen messenger RNA expression using nested reverse transcription-PCR in the peripheral blood during follow-up period of patients who underwent curative surgery for biliary-pancreatic cancer: longitudinal analyses. *Clin Cancer Res.*, 10: 3807-3814, 2004.
7. Higashi, H., Aikou, T., et al., Particle size of tin and phytate colloid in sentinel node identification. *J Surg Res.*, 121: 1-4, 2004.
8. Natsugoe, A., Aikou, T., et al., Initial metastatic, including micrometastatic, sites of lymph nodes in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*, 1:89(1): 6-11, 2005.
9. Nakanishi, H., et al., Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein-tagged tumor models in mice: Chemosensitivity for Methods in Molecular Medicine, Blumenthal, R.D., ed., Humana Press, Totowa, NJ., 111: 351-362, 2004.
10. Nakanishi, H., et al., Molecular method to quantitatively detect micrometastases and its clinical significance: *Advances in Clinical Chemistry*, Makowski, G., ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 38: 87-103, 2004.
11. Masuda, T., Ohno, S., et al., Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients. *Int. J. Oncol.*, 26: 721-730, 2005.

日本語論文

1. 夏越祥次、愛甲 孝、他、微小転移の臨床的意義 食道癌のリンパ節微小転移、外科、66: 507-512, 2004.
2. 上之園芳一、愛甲 孝、他、胃癌におけるSentinel Node Navigation Surgeryの適応と限界、日本外科系連合学会誌、29: 470、2004.
3. 有馬豪男、愛甲 孝、他、Sentinel Nodeの癌細胞占有率に関する検討、日本外科系連合学会誌、29: 554、2004.
4. 金田篤志、中西速夫、他、胃癌 ここまで分かるようになった消化管遺伝子診断、Mebio、21: 28-33, 2004.
5. 中西速夫、他、分子生物学的手法を用いた微小転移の検出とその臨床的意義、病理と臨床、22: 215-220, 2004.
6. 三森功士、他、微量癌細胞検出の臨床的意義、外科、66: 497-501、2004.
7. 井上 裕、三森功士、他、転移癌、Mebio、21: 56-64、2004.
8. 三森功士、乳癌微量癌細胞検出の現状と実用化への課題：乳癌診断のコツと落とし穴、霞 富士雄、編、中山書店、東京、pp.232、2004.