

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、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 は予後に有意に影響した。しかし、予後に差を認めたのは、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。胃がんリンパ節内 ITC の意義を評価するために、pT2pN0/1 症例 402 例で検討し、ITC の有無は予後に全く関係しないことがわかった。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。胃がん患者症例の腹腔内 ITC の検出では、3 施設の保存検体 379 症例分で検出、評価を行い、ITC 陽性・細胞診陰性群が細胞診陰性・ITC 陰性群と細胞診陽性群の中間の予後を示すことが判明した。前向きに高度先進医療として進めている胃がん腹腔内 ITC 検出例では、ITC の有無による予後の差が明確になってきた。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
遠藤 和也	*1国立病院九州がんセンター 医師	早期胃癌におけるリンパ節微小転移の検討

*1:平成15年4月1日~平成16年3月31日

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。

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、鹿児島大学第一外科、帝京大学外科で1995年から2000年までに手術を受けた胃がん患者で研究利用に同意していた379例。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Dukes B（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。胃がんリンパ節内 ITC：国立がんセンター中央病院、愛知県がんセンター、帝京大学外科、鹿児島大学第一外科の4施設で1984年から1990年の期間に根治手術を受けたpT2pN0/1症例402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。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。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より腹腔内洗浄液を採取、遠心して得られた沈渣（細胞）について通常のpapanicolaou染色による細胞診と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4 μ m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。

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

1030症例から採取された末梢血と骨髄のうち、検体不良例を除いた末梢血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。1.0.E-05をcut-off値として判定し、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。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。ステージ別の差はほとんど見られなかった。

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でのみ認められた（ $p = 0.0007$ ）。

3) 胃がん腹腔内 ITC について

3施設の保存検体379症例分の検討では、ITC陽性・

細胞診陰性群が細胞診陰性・ITC 陰性群と細胞診陽性群の中間の予後を示すことが判明した。前向き評価でも、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、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。

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、両群間にほとんど差がなかった（ $p=0.355$ ）。

5) 胃がんリンパ節内 ITC について

免疫染色でリンパ節内 ITC を評価した 402 症例で、pT2pN0 では 37%、pT2pN1 で 59%に ITC を認めた。ITC の有無による予後の差は、これら全例では $p=0.53$ 、pN0 症例で $p=0.94$ 、と差が無く、pN1 症例ではむしろ ITC について陽性例の予後が陰性例を上回った（ $p=0.05$ ）。予後因子の多変量解析を行うと有意な独立因子は組織型（ $p=0.001$ ）、pN0/pN1（ $p=0.003$ ）の 2 因子だけで、ITC は $p=0.349$ と予後に影響しなかった。

考察

リンパ節内 ITC は胃がんでも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髓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。