

## 17-15 「胃癌および大腸癌の骨髄・末梢血・リンパ節中における転移形成能を有する遊離癌細胞 (Isolated Tumor Cell, ITC) の検出とその臨床応用について」に関する研究

九州大学生体防御医学研究所 細胞機能制御学部門 分子腫瘍学分野 森 正樹

**研究成果の要旨** 消化器癌患者の末梢血中 (PB) あるいは骨髄中 (BM) の遊離がん細胞 (isolated tumor cell: ITC) の存在は、従来の病理学的因子を凌駕する予後・悪性度の新たな予測因子として期待されている。われわれは胃癌 910 症例における PB および BM 中の ITC 検出が臨床病期または病理学的因子と相関しないことを明らかにした。すなわち、胃癌では単なる存在診断ではなく、真の転移能力を有する癌細胞の検出が重要である。

ごく最近、自己複製能と多分化能を併せ持つ癌幹細胞が癌転移において重要であることが報告されたが、われわれは消化器癌における癌幹細胞様細胞 (SP 分画) を同定した。また、担癌患者の BM には高い増殖性を示す癌細胞が存在し、その増殖能は予後と相関することが報告されたが、われわれは胃癌症例の BM において癌細胞の同定・培養に成功した。さらに、転移陽性症例の BM における特異的な発現遺伝子 profile を明らかにした。最後に、転移陽性症例の原発巣特異的に発現する遺伝子 profile を明らかにして、転移の際に重要な遺伝子を明らかにする準備を進めている。

### 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
森 正 樹	九州大学生体防御医学研究所教授	研究の統括・遊離癌細胞の分子生物学的解析
笹子三津留	国立がんセンター中央病院副院長	胃癌における遊離癌細胞の同定
飯 沼 久 恵	帝京大学医学部外科 講師	転移の成立を予測しうるマーカーを用いた、大腸癌の末梢血液中の遊離癌細胞の検出
中 西 速 夫	愛知県がんセンター研究所 腫瘍病理学部 室長	胃癌 (腹膜転移、リンパ節転移) における ITC の予後を規定する因子の解析と新たなマーカーの探索
赤司浩一	九州大学病院 遺伝子細胞療法部 教授	癌幹細胞の分離と機能解析
山本聖一郎	国立がんセンター中央病院 大腸外科 医員	大腸癌における骨髄・末梢血液中の ITC の同定
富 永 春 海	国立病院機構 呉医療センター	大腸癌リンパ節転移の検討

## 研究報告

### 1 研究目的

消化器癌・乳癌患者の末梢血中あるいは骨髄中の遊離がん細胞(isolated tumor cell: ITC)の存在は、従来の病理学的因子を凌駕する予後・悪性度の新たな予測因子として期待されている。われわれは平成13年より4年間大規模症例検討による解明のため『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』班を笹子三津留班長の許実施し、分子生物学的手法(RT-PCR法)を用いて胃癌910例について末梢血中および骨髄中の遊離がん細胞を検索した。十分に informed consent をいただいた胆石症や腹壁癒痕ヘルニア症例など29例を陰性コントロールとして設定し、陰性値を確認した上で、胃癌症例を解析した結果、骨髄液および末梢血液における遊離癌細胞の存在自体は両者間に相関を認められたものの、骨髄および末梢血液いずれにおいても、胃癌の病期とは無関係に癌細胞が検出されることを明らかにした。

以上の結果は、胃癌では単に循環血中の癌細胞を検出したのみで、転移能を有する癌細胞を検出し得てない可能性を示しているのではないかと考えられる。このような考えを抱きはじめてきた時期に、gliomaでは増殖能および転移形性能の強い癌幹細胞が存在することが報告された。癌幹細胞は非常に強い転移能を有すると考えられているため(Kondo et al. PNAS 2004)、消化器癌では循環血液中の癌細胞をRT-PCR法で同定するよりも、真に転移能を有する癌細胞を同定する方法の確立が重要と考えられる。

そこでわれわれは、新たに班を組織して、申請期間内に真の転移能を有する癌細胞の同定およびマーカーを決定したい。この目的のため以下の4項目について研究を進めたいと考えている。すなわち、A. 癌幹細胞の同定に関する研究。B. 骨髄中癌細胞の培養への試み。C. 転移陽性症例および陰性症例間における(癌細胞由来の発現に固執せず)宿主の発現 profile の違いに着目する。D. 転移陽性症例の原発巣特異的に発現する遺伝子 profile の特徴。以上の研究について途中経過報告を行う。

### 2 研究方法と研究成果

#### A. 癌幹細胞の同定

背景) 最近、自己複製能と同時に分化能を有する癌幹細胞が、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)。しかし胃癌・

大腸癌をはじめとする消化器癌における幹細胞の存在を示し、さらに転移能との関連を調べた報告はない。そこで本研究では、消化器癌の幹細胞を同定し、その検出のための分子マーカーを明らかにし、さらにその幹細胞の転移形成能を明らかにしたい。これにより骨髄・末梢血・リンパ節で検出される遊離癌細胞の中で、癌幹細胞を検出することが転移予測には最も重要であることが示せると期待している。

研究方法) **細胞培養** ; ヒト消化器癌細胞株の中から、食道癌 (TE1、TE2、TE13)、胃癌 (NUGC3、MKN1、MKN7、MKN28)、大腸癌 (WiDr、SW480、HSC15、CCK81)、膵臓癌 (PK9、PK45H) と肝臓癌 (HuH7、Hep3B、HepG2) の細胞株を使用した。CCK81はMEM (Invitrogen, Carlsbad) で、Hep3BはGIT (Nihon Pharmaceutical, Tokyo) で、そして残りの細胞株はRPMI 1640 (Invitrogen) で培養した。各々の培養液には、10%のFBS (Equitech-Bio, Kerrville)、100U/mlのペニシリンGと100μg/mlストربتマイシン (Gibco, Grand Island) を添加し、37°Cの5%CO<sub>2</sub> incubatorで培養した。NUGC3、MKN1、MKN7、MKN28、WiDr、SW480、HSC15とCCK81はResearch Bioresources Cell Bank (Tokyo, Japan) から、残りの細胞系はCell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer (Tohoku University, Sendai, Japan) から供与いただいた。

**フローサイトメトリー** ; SPとnon-SP集団を分離・確認ために、各々の細胞株の培養皿からトリプシンとEDTAを用いて細胞を剥離した。遠心分離後、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄し、2% FBSと1mM HEPESを含んだ37°C DMEMの中に再懸濁した。TE2、TE13、MKN7、MKN28、PK9とPK45Hは5μg/ml、TE1、NUGC3、MKN1、WiDr、CCK81、HuH7、Hep3BとHepG2は10μg/mlのヘキスト33342 (Molecular Probes, Invitrogen) でラベル化した。ヘキスト33342でラベル化した細胞は、50μMベラパミル (Sigma-Aldrich, Saint Louis) 添加群と無添加群に分けて、それぞれ37°Cで70~90分間培養した。それぞれの細胞群は40μmのメッシュ・フィルタを通した後、2% FBSと1mM HEPESを添加したHBSS (Invitrogen) に浮遊させ、フローサイトメトリー分析まで4°Cに維持した。死細胞除去のため、1μg/ml propidium iodideで染色した。その後、1×10<sup>6</sup>の生細胞に分けてEPICS ALTRA (Beckman Coulter, Fullerton) によってSP細胞とnon-SP細胞の分離・同定を行った。ヘキスト33342は350nm励起であり、450DF10

(450/20 nm band pass filter) と 675LP (675 nm long pass edge filter) 光学フィルタを使用して測定した。前方と側方散乱のゲーティングは細胞断片除去のために使用した。

研究成果) 消化器癌細胞株中の SP 細胞の存在； 検索した細胞株に SP 細胞が含まれるかどうか、ABC トランスポーターによって輸送される色素であるヘキスト 33342 で染色した。フローサイトメトリーによって解析した代表的な結果を示す(図 1)。食道癌細胞株は、0.3-1.4%、胃癌細胞株は 0.6-2.2%、大腸癌細胞株は 0.3-0.5%、肝臓癌細胞株は 0-1.8%、そして、膵臓癌細胞株は 0.3-1.3%の SP 細胞を含んでいた(表 1)。それぞれにおいて、SP 細胞の数は、ベラパミル処理によって著しく減少した(図 1)。肝臓癌細胞株のひとつである HepG2 では SP 細胞を同定できなかったが、大部分の消化器癌細胞株(15/16 株)は、癌 SP 細胞を含んでいることが明らかとなった。

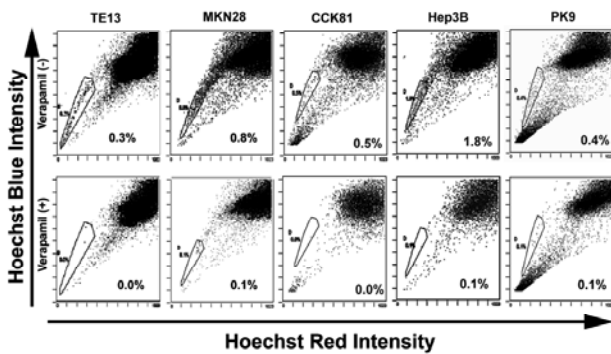


図 1. 消化器癌における SP 細胞の解析

さまざまなヒト消化器癌細胞株からの SP 細胞の分離の代表例を示す。食道癌 (TE13)、胃癌 (MKN28)、大腸癌 (CCK81)、肝臓癌 (Hep3B) と膵臓癌 (PK9) において、ヘキスト 33342 でのラベル化を行いフローサイトメトリーによって解析した。上段はヘキスト 33342 で標識したもの、下段はこれにさらに 50 μM ベラパミルを加えたものである。ベラパミル存在下で消える細胞集団が SP 細胞であり、各図の左下の線で囲んだ領域にあたる。各図の右下の数字は全細胞に対する SP 細胞の割合を記している。

表 1. 消化器癌細胞株における SP 細胞の割合

Origin of human cell lines	% of SP fraction
Esophageal cancer	(0.67±0.64%)
TE1	1.4 %
TE2	0.3 %
TE13*	0.3 %
Gastric cancer	(1.45±0.84%)
NUGC3	2.1 %
MKN1	2.2 %
MKN7	0.6 %
MKN28*	0.8 %
Colorectal cancer	(0.43±0.07%)
WiDr	0.3 %
CCK81*	0.5 %
Colo201	0.3 %
Colo205	0.5 %
SW480**	0.7%
HSC15	0.3%
Liver cancer	(0.90±0.90%)
HuH7**	0.9 %
Hep3B*	1.8 %
HepG2	0.0 %
Pancreatic cancer	(0.85±0.64%)
PK9*	0.4 %
PK45H	1.3 %

B. 骨髄中に存在する癌細胞培養増殖の試み

背景) Pantel らは担癌患者における骨髄液を一定条件下で培養し、pan-CK で染色される癌細胞が増殖されること、すなわち骨髄液中に存在する癌細胞を培養増殖可能な症例が存在することを明らかにした。われわれは Pantel らの方法と同様に、骨髄液より癌細胞を単離培養し、増殖能を調べてマーカーを同定したいと考えている。

研究方法) 1) 担癌患者の手術時。全麻下、腸骨・胸骨より骨髄液を採取。2) 遠心分離行い単核球 (MNC) のみを採取。3) cytospin し A45-B/B3 (CK8/18・8/19) 抗体にて免染、CK を判定。4) RPMI 培地にて培養。EGF・bFGF を添加する。5) 3-5 週間後、培養した細胞を cytospin し、CK 陽性細胞数をカウント。6) 増殖した細胞を DNA microarray、flowcytometry、MTT assay、invasion assay にて評価

研究成果) 大腸癌 6 例、胃癌 7 例、乳癌 6 例について、骨髄培養を実施した。その結果、表 2 のように培養にて増殖しうる癌細胞を骨髄中に有する症例が存在した。

		Stage	培養前	培養後
208	大腸癌	0	0	0
221		I	0	0
220		III B	0	4
212		IV	0	391
215		IV A	0	279
217		再発	0	0

214	胃癌	I A	0	1257
210		I B	0	0
222		III B	0	0
209		IV	0	0
218		IV	44	65
211		IV	0	10
213		IV	442	X

207	乳癌	I	0	0
219		I	0	47
205		III A	0	0
223		III A	0	0
224		III A	0	0
216		再発	0	2

### C. 転移陽性症例と陰性症例間における末梢血液中癌細胞

背景) 臨床病期が同一であるにもかかわらず、非転移症例に比べ転移陽性症例の骨髄中あるいは末梢血液中において特異的に発現する遺伝子 profile を明らかにし、特に転移のマーカーとなりうる遺伝子を同定しようという試みである。この場合、転移を規定しうる特異的な発現変異を示す遺伝子群は癌細胞由来である必要はなく、宿主のリンパ球等の background 由来と考えている。

研究方法) 臨床病期を揃えた胃癌転移陽性 5 症例と非転移 5 症例における骨髄、末梢血液より total RNA を抽出。Nano-drop にて RNA の質を確認。以後の解析に使用

しうる症例のみを選定し、cDNA microarray を型どおり施行。

研究成果) total RNA の質をチェックした結果、転移陽性 2 症例と非転移 2 症例が選定され、マイクロアレイを実施した。その結果、いくつかの興味深い遺伝子の特異的発現が明らかになった。現在、それらの遺伝子の転移における意義の解明に取り組んでいる。

### D. 転移陽性症例の原発巣特異的に発現する遺伝子 profile の特徴

背景) 真に転移能を規定する ITC は、骨髄中において高い細胞増殖能を有する細胞集団であると考えられる。それらの癌細胞における発現遺伝子 profile を検討するための間接的な方法として、転移を来した症例の原発巣癌細胞における発現を調べる。

研究方法) 胃癌並びに大腸癌患者 100 例を対象として、術前に末梢血液および骨髄液を採取して、免疫細胞診および RT-PCR 法で遊離癌細胞の検出を行う。骨髄における細胞診はドイツハンブルグ大学パンテル教授との共同研究で行われる。また、胃癌および大腸癌の原発巣の切片を病理部でティッシュテックで保存し、凍結切片組織を九州大学生体防御医学研究所外科(以後 生医研)へ送付する。生医研では原発巣の癌細胞から RNA を抽出する。

骨髄中あるいは末梢血液中遊離癌細胞陽性症例と陰性症例間で、microarray を実施し、骨髄中または末梢血液中の劣悪な環境下でも apoptosis を来さず、viable である癌細胞を有する症例を特定し、それらの原発巣癌細胞のみに発現する遺伝子プロファイルを明らかにする。

胃癌および大腸癌に関して、切除術を予定している患者で、術前深達度診断が T2-4 の患者を対象とする。対象者には説明文書を用いて研究の説明を行い、文書による同意を取得する。

研究成果) 現在国立がんセンターおよび九州大学における倫理委員会より研究の承認をいただいた。

### 3 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、H12/5 (H13/3 改訂) の「厚生科学審議会先端医療技術評価部会」による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に基づき、「遺伝子解析等に関する標本採取に関する同意書」を当研究所倫理委員会より承諾を

受けた(H12/6/1)。現在(H18/3月現在)まで、その同意書に同意を得られた症例から試料を採取し保管している。

#### 4 研究成果の刊行発表

##### 外国語論文

1 Mimori K, Mori M et al. FHIT is up-regulated by inflammatory stimuli and inhibits prostaglandin E2-mediated cancer progression. *Cancer Res* 2006 66: 2683-90.

2 Haraguchi N, Mori M et al. Characterization of a Side Population of Cancer Cells from Human Gastrointestinal System. *Stem Cells*. 2006 24: 506-13

3 Ishii H, Mori M et al. Frag1, a homolog of alternative replication factor C subunits, links replication stress surveillance with apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 ;102:9655-60

4 Mandelker DL, Mori M et al. PGP9.5 promoter methylation is an independent prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2005 65:4963-8

5 Masuda T, Mori M 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* 2005 26:721-30.

6 Nishida K, Mori M et al. Global analysis of altered gene expressions during the process of esophageal squamous cell carcinogenesis in the rat: a study combined with a laser microdissection and a cDNA microarray. *Cancer Res* 2005 65: 401-9.

7 Etoh T, Sasako M et al. Treatment of early gastric cancer in the elderly patient: Results of EMR and gastrectomy at a national referral center in Japan. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2005 62: 868-871.

8 Hartgrink HH, Sasako M et al. Extend Lymph Node Dissection for Gastric Cancer: Who May Benefit? Final Results of the Randomized Dutch Gastric Cancer Group Trial. *J Clin Oncol*, 2004 22: 2069-2077

9 Sasako M et al. Focus on gastric cancer. *Cancer Cell* 2004 5: 121-125

10 Etoh T, Sasako M et al. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 313: 931-7.

11 Ushijima T, Sasako M et al. Increased DNA Methyltransferase 1(DNMT1) Protein Expression Correlates Significantly with Poorer Tumor Differentiation and Frequent DNA Hypermethylation of Multiple CpG Islands in Gastric Cancers. *Am J Pathol*, 2004 164: 689-699.

12 Mori K, Sasako M et al. Principles of surgical treatment for curable gastric cancer. *J Clin Oncol* 2003 21: 274s-275s,.

13 IInuma H et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol* 2006 28:297-306.

14 IInuma H et al. Superior protective and therapeutic effects of interleuin-12 and Interleukin-18 gene transduced dendritic neuroblastoma fusion cells on liver metastasis of murine neuroblastoma. *J Immunology* 2006 176

15 Yokoyama H, Nakanishi H et al. Biological significance of isolated tumor cells and micrometastasis in lymph nodes evaluated using a green fluorescent protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. *Clin. Cancer Res* 2006 12:361-8.

16 Nakanishi H et al. Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis. *Clin Exp Metastasis*

2005 22:137-147

17 Wang J, Akashi K et al. Conditional MLL-CBP targets granulocyte/macrophage progenitors and models therapy-related myeloproliferative disease. *EMBO J* 2005; 24: 368-381.

18 Arinobu Y, Akashi K et al. Developmental checkpoints in the mast cell/basophil lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005

19 Opferman JT, Akashi K et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 2005; 307: 1101-1104.

20 Okuno Y, Akashi K et al. Autoregulation of the transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol* 2005 25, 2832-2845, .

21 Iwasaki H, Akashi K et al. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med* 2005 201, 1891-1897

22 Rosenbauer F, Akashi K et al. Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. *Nat Genet* 2005 (Epub ahead of print)

23 Mohi MG, Akashi K et al. Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (PTPN11) mutations. *Cancer Cell* 2005 7: 179-191.

24 Matsushita H, Yamamoto S et al. A new method for isolating colonocytes from naturally evacuated feces and its clinical application to colorectal cancer diagnosis. *Gastroenterology* 2005 129:1918-27

#### 日本語論文

1 阪 眞、笹子三津留 特集：臨床腫瘍学の現状と展望 V. がん薬物療法の実際 4. 消化器癌 2) 胃癌 b) 進行胃癌のアジュバント療法. *Progress in Medicine*, 25(8): 2073-2078, 2005.

2 中西速夫 “腹膜播種に対する洗浄細胞診への術中迅速遺伝子診断の応用” 胃癌・大腸癌II—悪性度診断—、病理と臨床、23巻 9号、949-953、2005.

3 中西速夫 ““微小遠隔転移の病理と診断”、外科、67巻、8号、875-884、2005.

4 中西速夫 “癌転移巣からの原発巣の病理学的追求”、日本医事新報、印刷中、2006.

5 飯沼久恵 腫瘍細胞と樹状細胞の融合細胞を用いた療法. *Bio Clinica* . 21 (2) : 47-52, 2006

6 飯沼久恵 樹状細胞と腫瘍の融合細胞ワクチンを用いた癌免疫療法. *外科治療* 94 (2) :196-198, 2006