

胃癌における癌幹細胞マーカーCD44を
発現した血液循環癌細胞の検出
(Circulating tumor cells expressing a cancer stem
cell marker CD44 as a diagnostic biomarker in
patients with gastric cancer)

2015年3月

富山大学大学院 医学薬学教育部
博士課程 生命・臨床医学 専攻

渡辺 徹

<目次>

胃癌における癌幹細胞マーカーCD44 を発現した血液循環癌細胞の検出
(Circulating tumor cells expressing a cancer stem cell marker CD44
as a diagnostic biomarker in patients with gastric cancer)

要旨	3
緒論	5
材料・実験方法	7
結果	10
考察	20
結語	23
謝辞	24
参考文献	25

要旨

〔目的〕

胃癌症例において末梢血中より CD44 発現を有する CTC を FACS を用いて検出し診断および治療に関するバイオマーカーとしての有用性を評価する

〔方法並びに成績〕

〔方法〕 2014/4~12 月に当科にて加療した胃癌 26 症例を対象とした。男性 17 名：女性 9 名、平均 72.69 歳であり、UICC-TNM 第 7 版の分類で各々 stage IA:7、IIA:5、IIB:1、IIIA:3、IIIB:2、IIIC:3、IV:5 名であった。内 25 例に胃切除術（幽門側胃切除：15 例、胃全摘：8 例、胃局所切除：1 例、残胃全摘：1 例）を、1 例に化学療法（2nd line：weekly PTX 80mg/body）を施行した。また健常人 12 例（26-81 歳）を陰性コントロールとした。患者および健常人より末梢血 3ml×2 本をそれぞれ EDTA 入り 5ml 採血管にて採取し同量の 2%FBS 入り PBS にて希釈後、4ml の Lymphoprep 溶液を加え 800g×20min で遠心分離し赤血球除去を行った。洗浄後に EpCAM-APC/CD44-FITC, mouseIgG-APC/FITC 抗体を 200 μ L 加え 15 分間静置し再度洗浄施行、精製検体を FACS Canto II™ にて解析し EpCAM+/CD44+ 群、EpCAM+/CD44- 群の細胞数について解析した。

また、内 1 症例について FACS Aria™ にて末梢血中より EpCAM+/CD44+ 細胞を sorting し実体蛍光/透過光顕微鏡にて生細胞の状態を観察評価した。

さらに加療した胃癌症例に関して胃切除群においては治療前後、化学療法施行例においては治療前と治療中の合計 7 回末梢血中 EpCAM+/CD44+ 細胞数を測定しその推移と臨床治療効果とを比較した。化学療法の効果判定に関しては治療前後に胸腹部 CT 検査を行い RECISTv1.1 に基づいて評価した。

また、原発巣切除し得た 25 例全例について組織標本中の EpCAM 及び CD44 発現の有無を免疫組織化学染色にて判定評価した。

〔成績〕 ①末梢血中 EpCAM+/CD44- 細胞数（平均±SD）は全例検出され健常人では 9.83 ± 9.91 個、胃癌症例では 59.1 ± 88.0 個であった（ $p=0.0313$ ）。一方で末梢血中 EpCAM+/CD44+ 細胞は健常人で 3 例（25.0%）のみに検出され 0.91 ± 2.10 個、胃癌症例では全例（100.0%）検出され 69.9 ± 52.0 個であった（ $P=0.0001$ ）。胃癌診断における EpCAM+/CD44- 細胞数の感度は 76.9%、特異度は 83.3%、EpCAM+/CD44+ 細胞数の感度は 92.3%、特異度は 100%であった。

②EpCAM+/CD44- 細胞群ではいずれの病理学的因子とも相関が認められなかったのに対し EpCAM+/CD44+ 細胞群では pStage、pT、v 因子において進行例でその平均値が高く相関を認めた（ $p=0.0423$ 、 0.0314 、 0.0184 ）。

- ③末梢血中 EpCAM+/CD44+ 陽性細胞を実際に sorting 後に蛍光/透過光観察したところ EpCAM-APC/CD44-FITC 強陽性である直径 20 μ m 以上の N/C 比の高い異型細胞が観察された。
- ④原発巣の免疫組織化学染色では全 25 症例の癌部につき EpCAM/CD44 発現は全症例において認められた。
- ⑤胃切除症例において前後の EpCAM+/CD44+ 細胞数の平均値は 74.2 ± 10.8 個から 19.2 ± 7.48 個へ減少した。
- ⑥化学療法施行症例においては治療介入後漸減し 1 コース終了時点で検出感度以下となった。胸腹部 CT 検査による RECISTv1.1 の評価では原発巣は 30%の腫瘍縮小を認め、臨床的な治療効果と相関していた。

〔総括〕

末梢血循環癌細胞 (Circulating tumor cell:CTC) は主に上皮細胞接着因子: EpCAM を用いて検出され、診断・予後・治療効果判定のバイオマーカーとして乳癌・前立腺癌・消化器癌で有用であると報告されている。近年ではそのなかでも特に cancer stem cell の性質を有する (Circulating tumor stem cell:CTSC) がより再発や治療効果に対してのバイオマーカーとして有用であると報告されてきている。

我々はこれまで胃癌幹細胞マーカーとして CD44 が有用であることを報告してきており、今回胃癌症例について EpCAM に CD44 を加えた CTC 検出を試みその臨床病理学的な背景と比較した。その結果末梢血中 EpCAM+/CD44- よりも EpCAM+/CD44+ 細胞が健常人よりも胃癌症例で優位に検出されること、胃癌手術症例において末梢血中 EpCAM+/CD44+ 細胞数がより壁深達度及び静脈侵襲と相関し EpCAM+/CD44- 細胞数よりもより臨床病理学的進行度と相関していたことなどから、EpCAM+/CD44- よりも EpCAM+/CD44+ がより有用な診断マーカーである可能性が示唆された。また、EpCAM+/CD44+ 細胞数は原発切除にて減少、および化学療法にて漸減を示し治療効果と相関していたことから治療効果のマーカーとしての有用性も示唆された。今後は再発・予後の診断マーカーとして有用であるか長期予後との比較を行い評価すること、またこの末梢血中 EpCAM+/CD44+ 細胞が CTSC の性質を有するか否かについてその生細胞を効率よく sorting し培養ならびに腫瘍増殖能の有無を検索する系の確立、検証が必要と考える。

緒論

胃癌は世界の癌による死亡原因の第2位である⁽¹⁾。近年の治療の進歩により胃癌患者における予後は改善してきているものの⁽²⁻⁵⁾、進行胃癌に関しては転移再発率が高いため、その予後は依然不良である。胃癌死亡率を減少させる為には早期診断や癌の存在診断、再発の有無を検出することが可能な簡便でかつ感度・特異度の高い診断方法の確立が必要と考えられる。

近年、癌の存在診断や予後予測、治療効果判定に関して血液循環癌細胞 (Circulating tumor cell:以下 CTC) が注目されている⁽⁶⁾。最も多く研究されている CTC 検出方法としては上皮細胞接着因子 (Epithelial cell adhesion molecule: 以下 EpCAM) やサイトケラチン (cytokeratin: 以下 CK) などに対する免疫学的な抗体反応を利用したものがある^(7,8)。EpCAM は細胞同士の接着に関わりほとんどの上皮系細胞に発現する細胞表面分子である⁽⁸⁾。CK は上皮系細胞の中間系フィラメントであり上皮系悪性細胞の特異的マーカーとして使用される^(9,10)。大腸癌⁽¹¹⁾、乳癌⁽¹²⁾、前立腺癌⁽¹³⁾ などでは前向き試験にてこれらの方法を用いて定量化された CTC が独立した予後因子であるとの研究報告がなされている。さらに近年では、固形腫瘍の癌細胞のすべてが同様に腫瘍形成能を有するとは限らないという事実から、腫瘍内には癌幹細胞 (cancer stem cell: 以下 CSC) が存在しこれらは新しく腫瘍を形成するための自己複製能と増殖能を有し、癌の転移に関与するという CSC 仮説が提唱されている⁽¹⁴⁾。

近年の報告では CTC の一部も CSC の特徴を有することが明らかとなり、これらは血液循環癌幹細胞 (Circulating tumor stem cell: 以下 CTSC) と呼ばれている⁽¹⁵⁾。癌の増殖は CSC に依存しており、CSC は一般的には化学療法に抵抗性を示す

ことから、CTC に比して CTSC がより正確な予後因子となりうる可能性がある⁽¹⁶⁾。

胃癌細胞株において、CD44+細胞集団が CD44-細胞集団に比してより強いコロニー形成能、腫瘍増殖能、抗癌剤抵抗性、放射線抵抗性を有することから CD44 は有用な CSC マーカーであると報告されている⁽¹⁷⁾。加えて、原発巣における CD44 発現はリンパ節転移、静脈侵襲と相関しているとするメタアナリシスが報告されており⁽¹⁸⁾、特に CD44 exon6, 8-10 が血行性転移と相関するとされている^(19,20)。

本研究の目的は胃癌症例においてその末梢血より CD44 発現を有する CTC を検出し、その診断および治療バイオマーカーとしての臨床的な有用性を評価することである。

材料・実験方法

【対象】

2014年4月から12月までの間、本学附属病院第二外科に入院し加療した26症例を対象とした。男性は17名、女性は9名であり平均年齢は72.69歳（48–87歳）であった。UICC分類第7版にて分類し、stage I Aが7例、stage II Aが5例、stage II Bが1例、stage III Aが3例、stage III Bが2例、stage III Cが3例、stage IVが5例であった。内1例に化学療法が施行され、25例に胃切除術（幽門側胃切除術：15例、胃全摘術：8例、局所切除術：1例、残胃全摘術：1例）が行われた。化学療法の治療効果判定はRECISTv1.1にて評価した。また、12例の健康人（26–81歳）を陰性コントロールとした。全症例に本研究に関するインフォームド・コンセントを行い、院内IRBを遵守した。

【検体の採取】

各症例より末梢血6mlを採取しEDTA入り採血管に3mlずつ注入した。採血部位は、胃切除症例においては正中静脈もしくは全身麻酔中の動脈圧ラインより採取した。化学療法を施行した症例はすべて正中静脈より採取した。各サンプルは検体採取後可及的速やかに精製し評価した。

【検体からの赤血球除去】

EDTA入り採血管にて採取された各々の検体3mlに等量の2%FBS(fetal bovine serum)入り(phosphate buffered saline) PBSを加え、次いで15ml遠沈管に移した後に4mlのLymphoprepTM (Cosmo Bio Co, Tokyo, Japan)を加えた。室温にて800×g、20分で遠心分離しパスツールピペットにて単核球層を分離採取した。採取

した細胞層は 2%FBS 入り PBS 2ml にて希釈し 250×g、5 分にて洗浄した。

【FACS による検体測定】

抗体染色には抗ヒトモノクローナル抗体の EpCAM-APC (clone: HEA125, MACS Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) と CD44-FITC (clone: IM7.8.1, MACS Miltenyi Biotec) を使用した。陰性コントロールとしてマウス IgG1-APC、FITC (clone: IS5-21F5, MACS Miltenyi Biotec) アイソタイプコントロール抗体を使用した。すべての抗体は 2%FBS 入り PBS 200 μ L に対して 1:100 の濃度となるよう量を使用した。染色後 15 分間 2%FBS 入り PBS で洗浄し 250×g、5 分で遠心分離した。各検体は FACScanto™ II flow analyzer (BD Biosciences, New Jersey, USA)にて解析した。また、sorting の際は FACS Aria™ II flow sorter (BD Biosciences)を使用した。

【Sorting にて回収した細胞の評価】

Sorting した EpCAM+/CD44+細胞は 2%FBS 入り PBS200 μ L にて 2 回洗浄し 200 μ L で希釈した。この検体を cyospin chamber (Stat Spin, Beckman Coulter, Tokyo, Japan) にて 250×g、5 分で遠心しスライドガラスに目的細胞を吸着させた。次に蛍光/透過光顕微鏡 (BX61/DP70, Olympus, Tokyo, Japan) にて細胞形態と内部構造を観察評価した。この sorting した細胞の細胞径、N/C 比、核小体のサイズを含めた形態学的評価に関して、院内の細胞診断士に依頼した。

【原発巣の免疫組織化学染色評価】

胃切除術を施行した全 25 症例について、免疫組織化学染色にて評価した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片をキシレン処理し再水和させ Buffer KN9

(Code:KN-09001, Pathology Institute, Toyama, Japan) にて 95°C、40 分間温和した後
に室温で 20 分冷却し蒸留水にて洗浄を施行した。次いでスライドガラスは 3%
過酸化溶液にてブロッキングし、蒸留水洗浄後に KN buffer (Code:KN-09002,
Pathology Institute, Toyama, Japan) にて 5 分間ブロッキングした。次いでスライド
ガラスに EpCAM (VU1D9, Cell Signaling Technology Japan, Tokyo, Japan) マウス
モノクローナル抗体を用い 1:500 の希釈倍率にて反応させ、CD44 マウスモノク
ローナル抗体 (156-3C11, 希釈倍率 1:400, Bio SB, Shiga, Japan) 、CK-Oscar マウ
スヒトモノクローナル抗体 (BSB6181, 希釈倍率 1:200, Bio SB, Shiga, Japan) 、を
それぞれ 30 分ずつ反応させた。CK-Oscar とは cytokeratin 7,8,18,19 を含み非上皮
性組織から上皮性悪性腫瘍を区別する際に使用されるカクテル抗体である。
Peroxidase-conjugated Envision technique (Envision plus Dual Link HRP, DAKO,
Glostrup, Denmark) を用いてスライドガラスを比較し、CK-Oscar 陽性の中にな
おかつ EpCAM ないし CD44 が染色されるものを陽性と定義した。

【統計分析】

各群間の比較には対応のある t 検定ないし対応のない t 検定を用い、p 値<0.05
以下を統計学的に優位であるとした。すべてのデータは平均値±標準偏差で表
示した。また、EpCAM+/CD44+細胞数や EpCAM+/CD44-細胞数に関して胃
癌診断におけるそれぞれの感度・特異度を ROC 曲線と AUC を用いて評価した。

結果

1. 胃癌症例ならびに健常人の末梢血における EpCAM+/CD44+ と EpCAM+/CD44- 細胞割合の比較

胃癌症例ならびに陰性コントロールとして健常人から末梢採血を行い解析した EpCAM+/CD44+ と EpCAM+/CD44- 細胞数に関する代表的な図を Figure.1 に示す。EpCAM+/CD44+ 細胞は健常人においては 12 例中 3 例 (25.0%) に検出され 0.91 ± 2.10 、胃癌症例においては 26 例中全例 (100%) に検出され 69.9 ± 52.0 であった ($P=0.0001$) (Fig.2)。一方で EpCAM+/CD44- 細胞は健常人、胃癌症例ともに全症例で検出されその平均値はそれぞれ 9.83 ± 9.91 、 59.1 ± 88.0 であった ($P=0.0313$) (Fig.3)。胃癌を診断するための ROC 解析では、EpCAM+/CD44+ 細胞数の最大 AUC は 0.9744 であり、その感度は 92.3%、特異度は 100.0% であった (Table 1)。一方で EpCAM+/CD44- 細胞数の最大 AUC は 0.8317 であり、その感度は 76.9%、特異度は 83.3% であった (Table 1)。

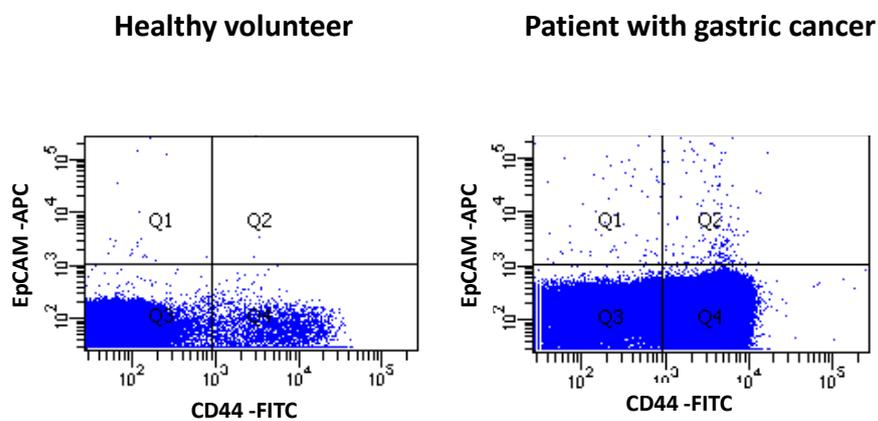


Fig.1. A comparison of EpCAM+ and/or CD44+ CTC counts in the peripheral blood of healthy volunteers and patients with GC.

FACS data from a healthy volunteer (left) and a patient with gastric cancer (right). All WBCs are EpCAM⁻ cells and CD44 was expressed not only on CSCs, but also in a proportion of WBCs. Thus, typical WBCs are found in Q3 or Q4. Q1 shows EpCAM⁺CD44⁻ cells and Q2 shows EpCAM⁺CD44⁺ cells.

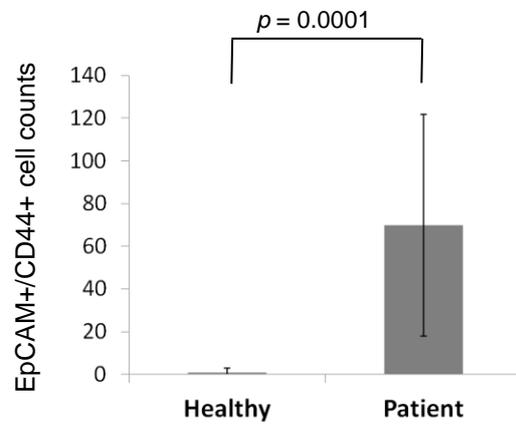


Fig. 2. A comparison of EpCAM+CD44+ CTC counts in the peripheral blood of healthy volunteers and patients with GC.

Mean data are shown. All patients with GC had EpCAM+CD44+ CTCs, whereas only 2 of 10 healthy volunteers had EpCAM+CD44+ CTCs.

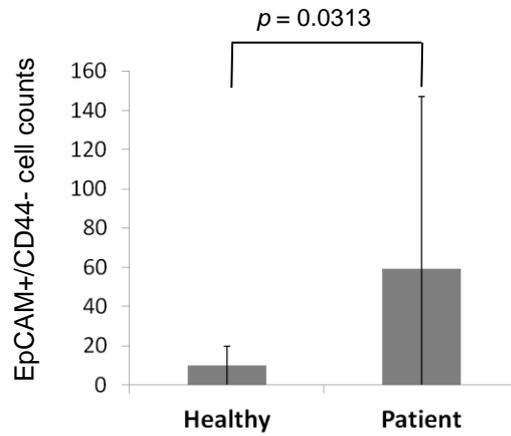


Fig. 3. A comparison of EpCAM+CD44- CTC counts in the peripheral blood of healthy volunteers and patients with GC.

Mean data are shown. EpCAM+CD44- CTCs were detected in all subjects.

Table 1. ROC analysis of the EpCAM+CD44+ and EpCAM+CD44- CTC counts in the peripheral blood.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	AUC	<i>p</i> value
EpCAM+/CD44+	97.4	100.0	0.9744	<0.0001
EpCAM+/CD44-	76.9	83.3	0.8317	0.0005

2. 胃癌症例末梢血中における EpCAM+/CD44+ 及び EpCAM+/CD44- 細胞数の比較

胃切除術を施行した 25 症例について、その臨床病理学的背景と末梢血中の EpCAM+/CD44+ 及び EpCAM+/CD44- 細胞数の比較を Table 2 に示す。

EpCAM+/CD44+ 細胞数の平均値は pStage, pT, v 因子それぞれと相関しておりそれぞれの p 値は 0.0423, 0.0314, 0.0184 であった。対照的に、EpCAM+/CD44- 細胞数の平均値はいずれの病理学的因子とも相関を示さなかった。

Table 2. Mean EpCAM+CD44+ and EpCAM+CD44- CTC counts in the peripheral blood for each clinicopathological factor.

Characteristics	n	EpCAM+/CD44+ CTC count	p value	EpCAM+/CD44- CTC count	p value
Male/Female	8/17	59.1/89.8	0.2001	68.2/41.1	0.3316
Age <75/>75 years old	12/13	63.4/74.9	0.5995	67.8/50.6	0.6338
pStage I/II-IV	6/19	43.2/77.1	*0.0423	32.1/68.2	0.0846
pT 1/2-4	7/18	44.1/78.6	*0.0314	30.7/70.8	0.0682
pN -/+	14/11	68.9/69.0	0.4974	47.5/74.9	0.2445
ly -/+	6/19	79.3/65.6	0.6708	37.8/62.6	0.1314
v -/+	8/17	43.1/81.1	*0.0184	28.8/74.0	0.0538
Her2 -/+	10/9	54.2/61.8	0.3667	35.6/104.0	0.088
CEA -/+	20/5	74.0/48.6	0.9517	39.5/139.8	0.1392
CA19-9 -/+	22/3	65.4/97.3	0.1624	51.5/118.3	0.223

*p<0.05

CTC, circulating tumor cell; ly, lymphatic invasion; v, venous invasion; Her2, epidermal growth factor receptor 2; CEA, carcinoembryonic antigen; CA19-9, cancer antigen 19-9.

3.Sorting した EpCAM+/CD44+ 細胞の形態学的評価

胃癌症例の内一例について末梢血より EpCAM+/CD44+細胞を実際に sorting し形態学的に評価した。EpCAM-APC(赤色)と CD44-FITC (緑色)に蛍光染色された代表的な図を Figure 4 に示す。この細胞の直径は 20 μ m 以上であり、N/C 比は高く、核小体も大きく、白血球でなく悪性の細胞形態を有する異型細胞と考えられた。

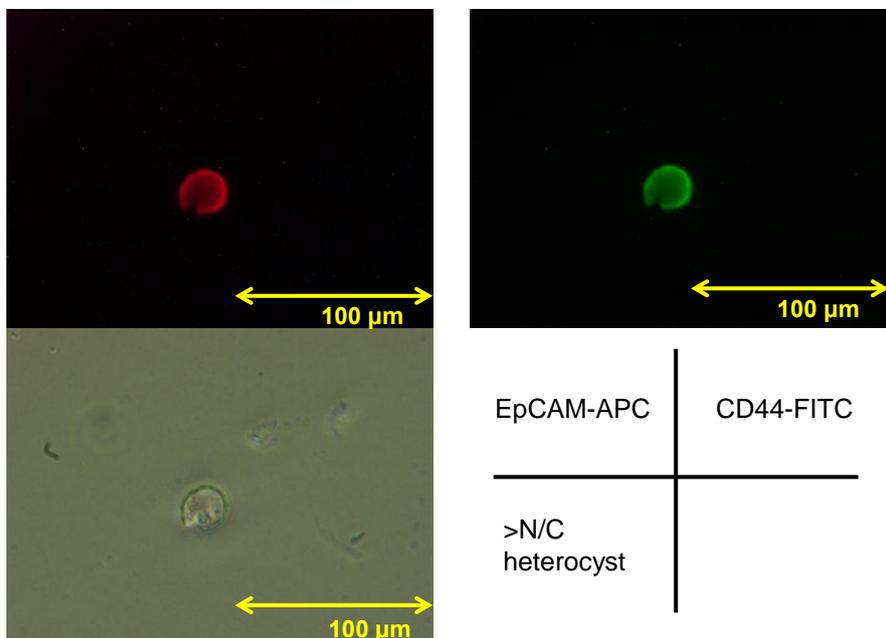


Fig. 4. Immunofluorescent staining of sorted EpCAM+/CD44+ CTCs.

This cell shows strong staining with EpCAM-APC (red staining) and CD44-FITC (green staining). The cell was identified as a 20- μ m heterocyst with a high nuclear to cytoplasmic ratio. (Original magnification: $\times 400$)

4.胃切除術前後の EpCAM+/CD44+ 細胞数の比較

胃切除術を施行された 25 例中 23 例 (92.0%) において術後も末梢血中の EpCAM+/CD44+細胞数が測定され、その術後平均日数は 96.26 ± 80.32 日であった。胃切除術後、EpCAM+/CD44+細胞数は 23 例中 21 例 (91.3%) で減少し、その平均数は術前 74.2 ± 10.8 から術後 19.2 ± 7.48 に減少した ($p=0.0001$) (Fig.5)。

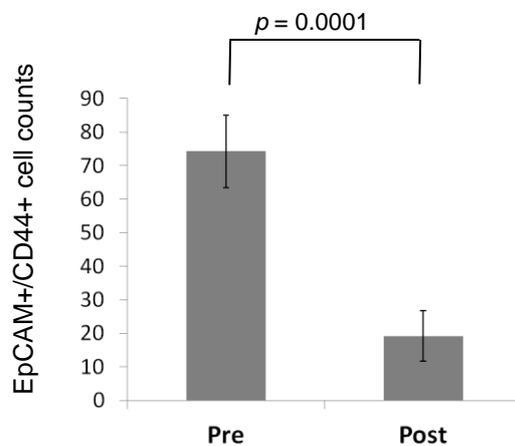


Fig. 5. EpCAM+CD44+ CTC counts pre and post gastrectomy

Mean data are shown from the 25 patients who underwent gastrectomy.

EpCAM+CD44+ CTC counts decreased in all cases following surgery.

5. 切除した胃癌原発組織の免疫組織化学染色評価

切除した胃癌原発組織に EpCAM 及び CD44 免疫組織化学染色を施行した代表例を Figure 6 に示す。胃切除術を施行した 25 例の原発組織の細胞において、CK-Oscar 染色を陽性コントロールとした胃癌細胞中に EpCAM 及び CD44 陽性細胞は全例で確認された。

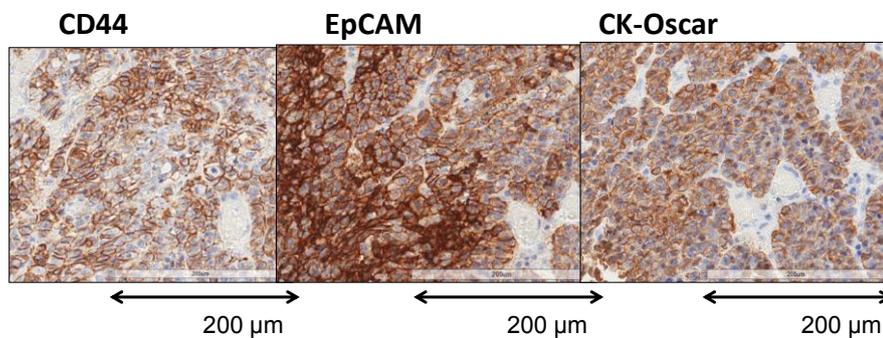


Fig. 6. Immunohistochemical evaluation of the resected primary tumor

CK-Oscar staining was used a positive control to indicate tumorous tissue. In advanced GC, almost all cancer cells were stained with EpCAM and CD44. On the other hand, in early GC, EpCAM stained cells were present in almost all cancer cells, but only a few CD44 stained cells were present. (Original magnification: $\times 400$)

6.化学療法前後における EpCAM+/CD44+細胞数の比較

根治手術不能の進行胃癌に対して 1st line の化学療法を受け、PD 判定となった 1 症例に関して示す。本症例は当科紹介後 2nd line の化学療法として weekly PTX 80mg/m²/day (90mg/day) を受けた。化学療法開始前後にこの症例より合計 7 回末梢血より EpCAM+/CD44+細胞数を測定したところ、その数は徐々に減少し最終的に検出感度以下となった (Fig.7)。化学療法 1 コース施行後、胸腹部造影 CT 検査にて治療効果を評価したところ、ステントの周囲を取り囲む胃原発巣は 30%以上の減少を示し、新規病変の出現はなく PR であった (Fig.8)。

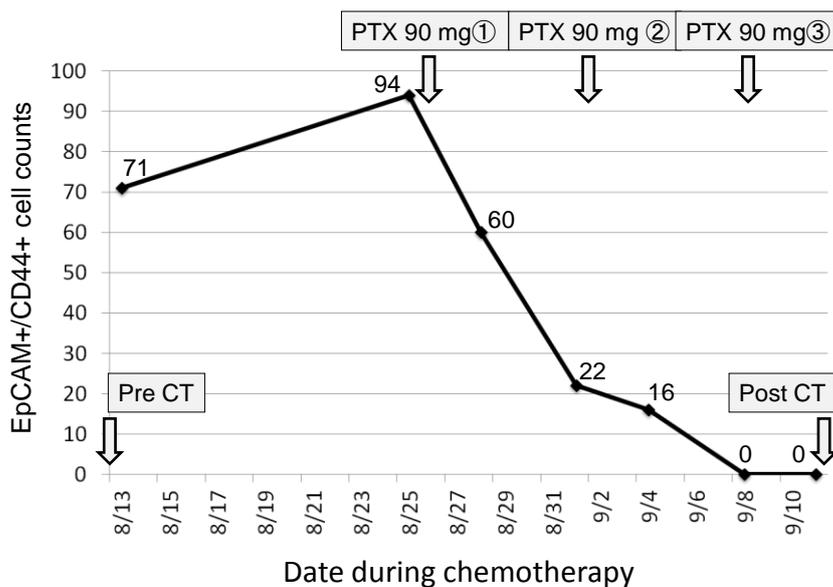


Fig. 7. Alterations in EpCAM+CD44+ CTC counts in response to chemotherapy.

During second-line paclitaxel-based chemotherapy, EpCAM+CD44+ CTC counts decreased gradually reaching undetectable levels after 3 weeks.

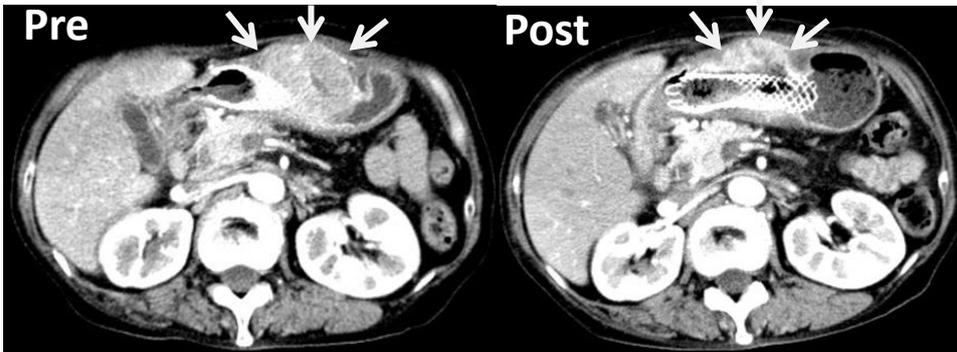


Fig. 8. CT images showing tumor shrinkage following chemotherapy

After one course of second-line paclitaxel-based chemotherapy, according to RECIST criteria, the main gastric tumor surrounding the stent showed a partial response of ~30% reduction.

考察

本研究において、胃癌症例末梢血中の CTC について癌幹細胞マーカーCD44 発現の有無とその臨床病理学的因子の関係を評価した。本研究結果によれば FACS にて検出した EpCAM+/CD44+ の CTC 数は病理学的な T 因子及び v 因子と相関していた。また、EpCAM+/CD44+ の CTC 数は胃癌の原発巣切除ないし化学療法導入により減少を示した。

健常人において、末梢血中の EpCAM+ CTC 数 (EpCAM+/CD44+ 及び EpCAM+/CD44- の合計) は 7.6 ± 5.6 であった。これらの細胞は非特異的な免疫学的反応や皮膚表皮細胞のコンタミネーションの可能性が考えられる⁽²¹⁾。加えて、マウス実験において胃上皮系表現マーカーの発現増加とともに EpCAM+ の末梢血由来の間葉系幹細胞の存在が証明されている⁽²²⁾。胃癌症例においては、EpCAM+ の CTC 数の平均は 114.0 ± 84.5 と健常人に比して優位に多い値であり、この結果は胃癌症例の担癌状態を反映していると考えられる。胃癌症例において EpCAM+/CD44- の CTC は CSC の性質を有さない CTC であると考えられるが、非特異的な免疫反応を起こした白血球細胞やコンタミネーションを起こした皮膚細胞、分化転換した末梢血由来の間葉系幹細胞である可能性もある。末梢血中の EpCAM+/CD44+ CTC と EpCAM+/CD44- CTC の分離と分子生物学的特性の解析が必要である。

EpCAM は転移性の⁽²³⁾大腸癌⁽²³⁾、前立腺癌⁽²⁴⁾、胃腸癌⁽²⁵⁾、乳癌⁽²⁶⁻²⁹⁾といった固形腫瘍に関して CTC を検出する際に最も汎用される細胞表面マーカーの 1 つである。最も汎用されている CTC 検出方法は Cell SearchTM システムであり、

これは免疫学的反応を用いて EpCAM 陽性細胞を捕捉し、後に血球細胞から上皮系細胞を区別するために DAPI、CK、CD45 免疫染色を加えて判別するものであるが、細胞の固定を要し生細胞のままでは評価出来ないという問題点がある^(17,30)。

本研究では生きた細胞の状態では複数の細胞表面マーカーを用いて表現型を解析可能であるフローサイトメトリーを用いて CTC 検出を試みた。これまでもフローサイトメトリーを用いた CTC 検出の報告はいくつか存在する。外科的切除を行った膵癌症例において、CTC は生存予後のマーカーとして報告がある⁽³¹⁾がそれらは CD45 や CD34 を用いて negative depletion を行っている⁽³²⁾。転移性肺腫瘍では研究対象症例全例に CK+/CD45- の CTC が検出され⁽³³⁾、それらは健康人では極僅かであったとする報告も存在する⁽³⁴⁾。しかしながらそれらの既報は陰性コントロールの境界線の定義について述べていないという問題点がある。本研究では、陰性コントロールの指標としてマウス IgG1-APC および FITC アイソタイプコントロール抗体を用い、陰性境界を APC/FITC 各々の染色において全細胞数の 99.9% を含むラインと定義した。研究方法が多少異なるため、厳密には既報と本研究を比較することは出来ないが、本研究に比しこれまでの報告の CTC 数はより少なかった。EpCAM+/CD44+ 細胞を生物学的に特徴付けるさらなる研究が必要であると考えられる。

様々な固形腫瘍に関して CTSC 検出に関する論文が存在する。大腸癌に関しては、CK+/CD133+ 細胞が CTSC であると報告されている⁽³³⁾。また、転移性乳癌に関しては、CK+/CD44+ が幹細胞成分を有する CTC マーカーであると報告されている⁽³⁴⁾。さらには早期乳癌症例の診断、治療効果判定、予後に関して CD45-/EpCAM+/CD44+/CD24- で定義した CTSC が有用であるとの報告がある⁽³⁵⁾。加えて、CTC 陽性の胃癌症例の内 70.4% に CK+/CD44+ CTC が検出され、CD44+ の CTC は腫瘍局在、リンパ節転移、遠隔転移、再発と関連してい

たとする報告も存在する⁽³⁶⁾。

しかしながら胃癌症例に関して生細胞の状態で捕捉し、かつ細胞表面マーカーである EpCAM と CD44 を共発現した CTSC を検出した報告はこれまでには存在しない。EpCAM+/CD44+ の CTC を sorting し、CSC の表現型を研究することで胃癌における CTSC の生物学的な基礎を解き明かせる可能性がある。本研究において、EpCAM+/CD44- ではなく EpCAM+/CD44+ の CTC 数が病理学的に T 及び v 因子と相関を認めており、これらは腫瘍の転移に CD44+ の CTC が関与している可能性を示唆する。胃癌症例に関しては一般的に病理学的な進行度が予後と相関するので⁽³⁷⁾、フローサイトメトリーを用いて EpCAM+/CD44+ の細胞数を測定するこの方法が、胃癌症例に関して新たな予後マーカーと成りうる可能性がある。今後長期予後判定を目的としたフォローアップ、前向き試験が望まれる。

結語

フローサイトメトリーを用いた本研究において、EpCAM+/CD44+ CTC は健康人に比して胃癌症例において優位に増大していた。EpCAM+/CD44-でなくEpCAM+/CD44+ CTC 数が切除標本の壁進達度と静脈侵襲とに相関していた。EpCAM+/CD44+ CTC 数は胃癌に対する外科的切除や化学療法にて減少を認めた。CD44+ CTC は腫瘍の悪性ポテンシャルを有し、胃癌症例における診断および治療反応性に関する新たなマーカーであり、さらには CTSC を研究する上で重要なマーカーである可能性がある。

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました富山大学医学部第二外科学教室 塚田一博教授に厚く御礼申し上げます。また、分子構造解析実験を行うにあたり御指導頂きました富山大学生命科学先端研究センター 川原昌彦技官、細胞診評価を頂きました富山大学附属病院病理部 堀隆先生に心から感謝致します。また、論文作成にあたり御指導頂きました奥村知之講師、および富山大学第二外科の方々に深く感謝いたします。

参考文献

- (1) Jacques Ferlay, Hai-Rim Shin, Freddie Bray, et al: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917, 2010.
- (2) Siewert JR, Bottcher K, Roder JD, et al: Prognostic relevance of systemic lymph node dissection in gastric carcinoma. German Gastric Carcinoma Study Group. *Br J Surg* 80: 1015-1018, 1993.
- (3) Ikeda Y, Mori M, Adachi Y, et al: Carcinoembryonic antigen (CEA) in stage IV gastric cancer as a risk factor for liver metastasis: a univariate and multivariate analysis. *J Surg Oncol* 53: 235-238, 1993.
- (4) Furukawa H, Hiratsuka M, Iwanaga T, et al: Adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *J Jpn Surg Soc* 97: 312-316, 1996.
- (5) Palli D: Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence. *J Gastroenterol* 35: 84-89, 2000.
- (6) Hughes AD, King MR: Nanobiotechnology for the capture and manipulation of circulating tumor cells. *Wires Nanomed Nanobiotechnol* 4: 291-309, 2012.
- (7) Ross AH, Herlyn D, Iliopoulos D, et al: Isolation and characterization of a carcinoma-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 297-303, 1986.
- (8) Mostert B, Sleijfer S, Forkens J.A, et al: Circulating tumor cells (CTCs): detection

methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 35: 463-474, 2009.

(9) Moll R, Franke WW, Schiller DL et al: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24, 1982.

(10) Osborn M, van Lessen G, Weber K et al: Differential diagnosis of gastrointestinal carcinomas by using monoclonal antibodies specific for individual keratin polypeptides. *Lab Invest* 55: 497-504, 1986.

(11) Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al: Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 3213-3221, 2008.

(12) Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351: 781-791, 2004.

(13) De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res* 14: 6302-6309, 2008.

(14) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111, 2001.

- (15) P.K.Grover, A.G.Cummins, T.J.Price, et al: Circulating tumor cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Ann Oncol* 00: 1-11, 2014.
- (16) Max S. Wicha, Daniel F. Hayes: Circulating Tumor Cells: Not All Detected Cells Are Bad and Not All Bad Cells Are Detected. *J Clin Oncol* 29: 1-4, 2011.
- (17) Takaishi S, Okumura T, Tu S, et al: Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem cells* 27: 1006-1020, 2009.
- (18) Wang W, Dong L, Zhang N et al: Role of cancer stem cell marker CD44 in gastric cancer: a meta-analysis. *Int J Exp Med* 7: 5059-5066, 2014.
- (19) Yamaguchi A, Goi T, Yu J et al: Expression of CD44v6 in advanced gastric cancer and its relationship to hematogenous metastasis and long-term prognosis. *J Surg Oncol* 79: 230-235, 2002.
- (20) Yamaguchi A, Saito M, Goi T, et al: Expression of CD44 variant exons 8-10 in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 86: 1166-1171, 1995.
- (21) Patrizi P B, Naoual L B: Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Letters* 253: 180-204, 2007.
- (22) Okumura T, Wang S SW, Takaishi S et al: Identification of a bone marrow-derived mesenchymal progenitor cell subset that can contribute to the gastric

epithelium. *Laboratory Investigation* 89: 1410-1422, 2009.

(23) Satoshi Matsusaka, Mitsukuni Suenaga, Yuji Mishima et al: Circulating tumor cell as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci* 102: 1188-1192, 2011.

(24) Jose G Moreno, M. Craig Miller, Steve Gross, et al: Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 65: 713-718, 2005.

(25) Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, et al: Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Annals of Surgical Oncology* 15: 3092-3100, 2008.

(26) Evi S. Lianidou, Athina Markou: Circulating tumor cells in breast cancer: detection system, molecular characterization, and future challenges. *Clinical Chemistry* 57: 1242-1255, 2011.

(27) Nakamura S, Yagata H, Ohno S, et al: Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer* 17: 199-204, 2010.

(28) Diehn M, Cho RW, Clarke MF, et al: Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Semin Radiat Oncol* 19: 78-86, 2009.

- (29) Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al: Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 10: 8152-62, 2004.
- (30) Hayes D.F, Smerage J: is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? *Clin Cancer Res* 14: 3646-3650, 2008.
- (31) Gregory Sergeant, Rudy van Eijdsden, Tania Roskams, et al: Pancreatic cancer circulating tumor cells express a cell motility gene signature that predicts survival after surgery. *BMC Cancer* 12: 1-9, 2012.
- (32) Joost F Swennenhuis, Joke Reumers, Kim Thys, et al: Efficiency of whole genome amplification of single circulating tumor cells enriched by Cell Search and sorted by FACS. *Genome Medicine* 5: 1-11, 2013.
- (33) Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, et al: Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. *J Clin Oncol* 29: 1547-1555, 2011.
- (34) Wang NF, Shi L, Li HY, et al: Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by flow cytometry. *Tumor Biol* 33: 561-569, 2012.
- (35) Panayiotis A. Theodoropoulos, Hara Polioudaki, Sofia Agelaki, et al: Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with

breast cancer. *Cancer Letters* 288: 99-106, 2010.

(36) Li M, Zhang B, Zhang Z, et al: Stem cell-like circulating tumor cells indicate poor prognosis in gastric cancer. *BioMed Research International* 2014: 1-7, 2014.

(37) Jun L, Chang-min H, Chao-hui Z et al., Consideration of tumor size improves the accuracy of TNM predictions in patients with gastric cancer after curative gastrectomy. *Surgical Oncology* 22: 167-171, 2013.