

氏 名 わたなべ とおる
渡辺 徹

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 189 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 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

学位論文題目 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)

論文審査委員

(主査)	教授	杉山 敏郎
(副査)	教授	笹原 正清
(副査)	教授	近藤 隆
(副査)	教授	木村 友厚
(指導教員)	教授	塚田 一博

論文内容の要旨

〔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（ $P=0.0001$ ）。胃癌診断において 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 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加療前後の EpCAM+/CD44+細胞数の平均値は 74.2 \pm 10.8 個から 19.2 \pm 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、末梢血中の EpCAM+/CD44+細胞数が漸減し 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関連していた。

〔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関連し EpCAM+/CD44-細胞数よりもより臨床病理学的進行度と関連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関連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。

学位論文審査の要旨

【目的】

消化器癌治療の進歩は著しい。癌細胞の特性に基づく分子標的治療を加えた個別化治療により、例えば進行大腸癌の最近の50%生存期間は25ヶ月を超えている。胃癌治療も同様の治療戦略に基づいた個別化治療が導入されつつある。しかしながら、いずれの癌腫であっても術後の再発例では化学療法の効果は乏しく、その一要因として癌幹細胞の残存が指摘されている。そこで渡辺君は胃癌再発の早期診断に資するために、末梢血中の胃癌幹細胞の検出法を検討し、その有用性を評価することを目的に本研究を行った。

【方法】

1) 2014年4-12月に本学第二外科にて治療された胃癌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 I A：7、II A：5、II B：1、III A：3、III B：2、III C：3、IV：5名であった。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（weekly PTX 80mg/body）を施行した。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6mlを採取し、2倍量のPBSで希釈後、Lymphoprep溶液を加え遠心分離後に赤血球を除去した。洗浄後、APC標識抗EpCAM単クローン抗体およびFITC標識抗CD44を加え15分間静置、洗浄後にFACS Canto II™にて解析し、EpCAM+/CD44+群、EpCAM+/CD44-群の細胞数を解析した。このうちの1症例についてFACS Aria™にて末梢血中よりEpCAM+/CD44+細胞を分離し、顕微鏡下で細胞形態を観察した。

2) 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、その推移と臨床的治療効果を比較した。化学療法の効果判定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。原発巣を切除した25例全例について、組織中のEpCAM及びCD44発現の有無を免疫染色法により評価した。

【結果】

1) 健常人の末梢血中EpCAM+/CD44-細胞数（平均±SD）は 9.83 ± 9.91 個、胃癌症例では 59.1 ± 88.0 個であった（ $p=0.0313$ ）。他方、末梢血中EpCAM+/CD44+細胞は健常人

で 3 例(25.0%)に検出され、細胞数 (平均±SD) は 0.91 ± 2.10 個、胃癌症例では全例に検出され、細胞数は 69.9 ± 52.0 個であり、胃癌症例で有意に高値を示した ($P=0.0001$)。

2) EpCAM+/CD44-細胞数はいずれの病理学的因子とも相関が認められなかったが、EpCAM+/CD44+細胞数は pStage、pT、v 因子との相関を認めた(各々、 $p=0.0423, 0.0314, 0.0184$)。

3) 末梢血中 EpCAM+/CD44+陽性細胞を分離、顕微鏡下で細胞形態を観察すると EpCAM-APC/CD44-FITC 強陽性細胞は直径 $20 \mu m$ 以上の N/C 比の高い異型細胞であった。

4) 原発巣の免疫染色による検討では EpCAM/CD44 発現は全 25 症例の癌部に認められた。

5) 胃切除例の切除前後の EpCAM+/CD44+細胞数は 74.2 ± 10.8 個から 19.2 ± 7.48 個へと減少した ($p=0.001$)。

6) 化学療法例での EpCAM+/CD44+細胞数は治療 1 コース終了時点で検出感度以下となった。胸腹部 CT 検査による評価では原発巣は 30%の腫瘍縮小を認め、臨床的治療効果と相関していた。

【総括】

進行胃癌症例の末梢血から EpCAM+/CD44+細胞を検出できた。検出された EpCAM+/CD44+細胞が真の癌幹細胞であるか否かは今後の検討の余地を残すが、手術症例では EpCAM+/CD44+細胞数が病理学的臨床病期、深達度、静脈侵襲と相関し、末梢血 EpCAM+/CD44+細胞数が、これら因子の予測マーカーである可能性が示唆された。また、EpCAM+/CD44+細胞数は原発切除あるいは化学療法後に減少し、治療効果マーカーとしての有用性も示唆された。

よって、本審査委員会は本研究を臨床的観点から価値の高いものであると評価し、博士(医学)の学位に十分に値するものと判定した。