



Title	胃癌患者における上皮間葉転換と周術期動態に注目した循環腫瘍細胞の臨床的意義に関する研究
Author(s)	石黒, 友唯
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14314号
Issue Date	2020-12-25
DOI	10.14943/doctoral.k14314
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/80209
Type	theses (doctoral)
File Information	Yui_Ishiguro.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

胃癌患者における上皮間葉転換と周術期動態に注目した

循環腫瘍細胞の臨床的意義に関する研究

(Study on clinical significance of circulating tumor cells

focusing on epithelial mesenchymal transition and

perioperative kinetics in patients with gastric cancer)

2020年12月

北 海 道 大 学

石 黒 友 唯

学 位 論 文

胃癌患者における上皮間葉転換と周術期動態に注目した

循環腫瘍細胞の臨床的意義に関する研究

(Study on clinical significance of circulating tumor cells

focusing on epithelial mesenchymal transition and

perioperative kinetics in patients with gastric cancer)

2020年12月

北 海 道 大 学

石 黒 友 唯

目 次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・	1 頁
要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3 頁
略語集・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	6 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	7 頁
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	9 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	14 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	24 頁
総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・	28 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	29 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	30 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	31 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yui Ishiguro, Hideyasu Sakihama, Tadashi Yoshida, Nobuki Ichikawa, Shigenori Homma, Moto Fukai, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi. Prognostic significance of circulating tumor cells with mesenchymal phenotypes in patients with gastric cancer: a prospective study. *Ann Surg Oncol*. 2020 Aug 7. Doi: 10.1245/s10434-020-08827-6. Online ahead of print.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yui Ishiguro, Hideyasu Sakihama, Tadashi Yoshida, Nobuki Ichikawa, Shigenori Homma, Moto Fukai, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi.
Detection of circulating tumor cell (CTC) focusing on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer
第 75 回 日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6-8 日. 横浜
2. 石黒友唯, 崎浜秀康, 大野陽介, 市川伸樹, 吉田雅, 本間重紀, 川村秀樹, 武富紹信.
胃癌における上皮間葉転換 (EMT) に注目した血中腫瘍細胞 (CTC) の検出法
第 117 回日本外科学会定期学術総会, 2017 年 4 月 27-29 日. 横浜
3. 石黒友唯, 崎浜秀康, 市川伸樹, 大野陽介, 市川伸樹, 吉田雅, 本間重紀, 川村秀樹, 武富紹信.
胃癌患者周術期における CTC の同定と予後因子としての意義の検討～特に上皮間葉転換と周術期動態に注目して～
第 26 回日本癌病態治療研究会, 2017 年 6 月 1-2 日. 横浜
4. Yui Ishiguro, Hideyasu Sakihama, Futoshi Kawamata, Tadashi Yoshida, Nobuki Ichikawa, Susumu Shibasaki, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Akinobu Taketomi.
Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with gastric cancer: epithelial mesenchymal

transition and perioperative kinetics

American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium,
2019.1.17-19. San Francisco

5. 石黒友唯, 崎浜秀康, 市川伸樹, 吉田雅, 本間重紀, 川村秀樹, 武富紹信.
胃癌患者における循環腫瘍細胞 (CTC) の臨床的意義～特に上皮間葉転換と周術期動態に注目して～
第 120 回日本外科学会定期学術総会, 2020 年 8 月 13-15 日. 横浜

要旨

【背景と目的】

消化器癌・乳癌をはじめとする固形癌では根治術後の早期再発や、5年目以降の晩期再発が認められる。これは、根治可能と考えられる担癌患者においてさえ臨床的には同定できない程度の微量な腫瘍細胞がすでに遠隔臓器に存在することを示している。遠隔転移が成立する過程において、血管内に流入した腫瘍細胞を循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC) と呼ぶ。低侵襲かつ繰り返しのサンプリングを可能にする liquid biopsy にてこれらの微量な癌細胞を同定することにより、血行性転移における再発の早期発見や、化学療法後などの治療効果モニタリングなどに応用可能とされている。最近では、がん由来のエクソソームや microRNA、そして循環腫瘍 DNA (ctDNA) も臨床応用されるなど、CTC や腫瘍マーカーより高い感度のバイオマーカーとして注目されている。しかし、転移・再発に関与する細胞を見積もる際には、生細胞である CTC を測定する意義はきわめて高い。

血管に浸潤する癌細胞は上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition: EMT) している可能性が高く、近年では CTC の多様性が注目され、上皮系 CTC の検出だけでは少なからず見落としがあると考えられており、従来の上皮系マーカー以外の系の確立も待たれている。今回、胃癌患者の周術期において上皮系マーカーに加えて間葉系マーカーも併用して CTC を同定し、その臨床的意義を検討した。

【対象と方法】

2014年12月～2016年12月に北海道大学病院消化器外科 I で胃癌に対し R0 切除を施行した 54 例 (男:女=36:18)。術後観察期間は 7.3～53.9 (中央値 36.1) か月であり、Stage 毎の症例数は、I:II:III:IV=31:13:10:0 であった。術直前、術後 1 週間目、術後 1 か月目に末梢血 7.5ml を採取し、濃度勾配遠心分離法や Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) を用いて CD45 陰性細胞を negative selection した。免疫細胞染色法にて上皮系マーカーの Cytokeratin (CK)、間葉系マーカーの N-cadherin、そして DAPI の多重染色を行った。本研究では CK あるいは N-cadherin のいずれかを発現し、10 μ m 以上の細胞径を満たした細胞を CTC と定義した。

【結果】

健常人 10 名に Cytokeratin あるいは N-cadherin に染まった細胞は検出されなかった。胃癌患者においては、CK+/N-cadherin- CTC は認めず、CK-/N-cadherin+ CTC は 35.2% (19/54) に認め、CK+/N-cadherin+ CTC は 3.7% (2/54) に認めた。本研究では、CTC を認めた全ての症例に CK-/N-cadherin+ CTC を認め、10.5% (2/19) に CK+/N-cadherin+ CTC を認めた。従って、本研究では CTC を認めた 89% (17/19) の症例が CK-/N-cadherin+ CTC のみの検出であった。全 54 例中 10 例に術後再発

を認め、全て進行癌の患者であった。再発を認めた 10 例中 9 例は、術後補助化学療法を行った。再発した 10 例中 6 例 (60%) に血行性転移を認め (肝転移 2 例、肺転移 2 例、骨転移 1 例、脾転移 1 例)、3 例 (30%) に腹膜播種を認め、1 例 (10%) にリンパ節転移を認めた。リンパ節転移を認めた 1 例は術後補助化学療法を行ったが、リンパ節転移を認めた後に肝転移も認めた。再発 10 例中、腹膜転移の 2 例は CTC として検出することができなかった。手術から再発までの期間は 4.5~29.6 (中央値 15.5) か月であった。再発するかしないかを術前 CTC 数で分け、Receiver operating characteristic curve (ROC) によって感度と特異度を計算した。area under the curve (AUC) は 0.781 であり、これらの結果 CTC のカットオフ値は 1 であり、術前 CTC=0 を CTC 陰性、CTC \geq 1 を CTC 陽性とした。CTC 陽性率は早期癌 17% (5/29)、進行癌 56% (14/25) (P=0.004) であった。他の病理組織学的因子では、脈管侵襲があると CTC が陽性となる傾向があったが (p=0.090)、その他の因子と CTC の有無には統計学的な関連を認めなかった。周術期の CTC の増減に注目し、高リスク群：術前 CTC 陽性かつ術後に増加する群、中リスク群：術前 CTC 陽性かつ術後に減少する群、低リスク群：術前に CTC を認めない群の 3 群に分けたところ、それぞれの再発率は、57%(4/7)、33%(4/12)、6%(2/35) であった。 Kaplan-Meier 法を用いた生存曲線では、全患者では p=0.00024、進行癌の患者のみでは p=0.00103 と、リスクが高い群ほど無再発生存率が低下した。

【考察】

本研究は、上皮系マーカーの Cytokeratin のみではなく間葉系マーカーである N-cadherin を併用することで CTC の検出率を向上させることが可能であった。上皮系 CTC のみが同定できたのは 10.5% (2/19) であり、多くの症例は N-cadherin を発現する CTC であった。術前の CTC のみを測定しただけで全生存率、無再発生存率に差が出るという報告があり本研究でも同様に無再発生存率に有意な差を認めた。CTC を時系列的に把握することで病勢を判断できることがあり、化学療法前後での取り組みはすでに報告されている。今回、周術期の CTC 動態を胃癌に対して時系列的に測定することで再発リスクの層別化を行った点は新規性と言える。本研究では、再発 10 例中、腹膜転移の 2 例は CTC として検出することができなかった。理由として、本研究が血中の癌細胞を検出する系であったことから CTC として検出できなかった可能性は高い。一方で、CTC が検出できた腹膜転移 1 例やリンパ節転移 1 例に関しては、それぞれ共に脈管に高度侵襲を認め、腫瘍径が 10cm や 8cm と大きな進行癌であり遠隔臓器での肉眼的な血行性転移は認めなかったが、CTC として検出された可能性が高いと考える。今後、より精度の高い予後予測を行うには、早期癌や腫瘍量の少ない進行癌でも検出できるようにリンパ行性転移や腹膜播種転移にターゲットを広めた系の確立や他の間葉系マーカーを併用させる必要がある。

【結論】

N-cadherin は Cytokeratin の発現を欠く CTC を検出するために有用なマーカーである。また、CTC の胃癌周術期動態の把握は再発リスクの層別化に有益である可能性が示唆された。

略語集

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

AUC	area under the curve
CK	cytokeratin
CTC	circulating tumor cell
ctDNA	circulating tumor DNA
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylidole
EMT	epithelial mesenchymal transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
MACS	Magnetic-activated cell sorting
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
ROC	Receiver operating characteristic curve

緒言

胃癌は依然として世界的には深刻な癌の一つであり、2018年に100万件を超える新規発生を認め、推定783,000例の死亡原因となっている。固形癌の中では診断頻度が5番目に高く、死亡原因の上位3番目に位置している(Bray et al., 2018)。特に、東アジアでは発生率が高く、世界の胃癌の3分の2は日本、韓国、中国などの東アジアの国々で発生している。

根治治療後の再発は、固形癌の症例ではしばしば発生する。これは、根治したと考えられている患者でさえ、臨床的に特定することができない微量の腫瘍細胞がすでに幾つかの臓器に存在していることを示している。癌細胞の転移過程で血管に流入した腫瘍細胞は circulating tumor cells (CTC) と呼ばれている。臨床的にこれら微量な癌細胞を同定する意義は、再発や予後を予測すること、再発の早期発見、CTCの表現形質を把握することで個別治療に応用すること、化学療法後などの治療効果モニタリングとして活用できることである(Yu et al., 2013)。臨床病理学的 Stage 分類において、同一 Stage の症例でも予後に大きさ差が認められることがある。微小転移の検出により、再発や転移の有無などを正確に予測できればその意義は大きい。末梢血から CTC を質的に検索することは、侵襲の大きい組織生検に比べ、より低侵襲に患者の状態をリアルタイムに把握する“Liquid biopsy”としての役割があり、臨床現場への貢献もますます高くなると期待される。癌細胞の単離には、Cytokeratin や上皮細胞接着因子 (Epithelial cell adhesion molecule; EpCAM) といった上皮性マーカーに着目し、抗原抗体反応により癌細胞を検出することがこれまでの主流であった。2002年に CTC を選択的に分離・計数する装置 CellSearch[®]システム (Veridex 社) が発表され、現在ではアメリカ食品医薬品局 (FDA) に承認された唯一の装置となっている。2004年に本装置を使用し CTC の数と患者の予後不良との間に関連があることが報告(Cristofanilli et al., 2004)されて以降、CellSearch[®]システムを用いて世界各地で実用化に向けた臨床研究が盛んに行われるようになった。しかし、がんは本来、発生元である上皮細胞の特徴を有しているが浸潤能を獲得した悪性度の高い癌ではしばしば上皮間葉転換(epithelial mesenchymal transition; EMT) が生じ、上皮系の性質が失われ間葉系の性質が促進されることで、細胞が母集団から離脱し、間質内を移動し癌の浸潤転移が生じると考えられるようになった(Thiery, 2002)。近年、CTC は非常に高い異質性を持つとも報告されている(Grover et al., 2014; Yu et al., 2013)。

CellSearch[®]システムは、細胞の EpCAM に対する抗体を用いて検出する装置である。転移性乳癌において、EpCAM の発現はわずか 1/3 程度とも言われ(de Albuquerque et al., 2012)、そのため、EMT を起こした CTC の検出感度は CellSearch[®]システムでは決して高くはないと報告され(van de Stolpe et al., 2011)、

上皮系マーカーでは検出されない CTC を見逃している可能性が示唆されている。今後、これらの見逃されている癌細胞に対し新たな検出法の開発や分子学的な解明が課題である。

本研究では、間葉系マーカーとして N-cadherin を採用した。これまでの報告では、前立腺癌、頭頸部癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、腎臓癌、そして卵巣癌に対して N-cadherin を使用した CTC の評価がされている (Armstrong et al., 2011; Balasubramanian et al., 2012; Bock et al., 2014; Nel et al., 2013; Nel et al., 2016; Nel et al., 2014; Weller et al., 2014)。

近年、CTC の kinetics を観察することの重要性が注目されている。Pachmann ら (Pachmann and Schuster, 2018) は、化学療法後の CTC 数が化学療法前に比較して 10 倍以上に増加したか、10 倍以下に減少したか、またはその間の変化しかなかったの 3 つの群に乳癌患者を振り分けたところ、10 倍以上に増加した群で多くの再発があったと報告している。さらに、手術前後、術後化学療法終了時に胃癌患者の上皮系および間葉系 CTC の割合を測定し、病状が悪化した患者では間葉系 CTC の割合が高かったと報告されている (Li et al., 2015)。さらに、術前補助化学療法の前後にヒト EGFR 関連物質 2 (Human epidermal growth factor receptor type2: HER2) と plakoglobin を使用して胃癌患者の CTC を分析することは、疾患の病勢を把握し、どの患者が治療に反応する可能性が高いかを判断することに役立つと報告されている (Abdallah et al., 2019)。

以上より、本研究では Cytokeratin のみではなく N-cadherin を併用した CTC の検出を試み、さらにその周術期動態を分析することによって再発リスクの層別化を目指した。

方法

対象

本研究は北海道大学病院の定める自主臨床研究事務局（Institutional review board; IRB）の承認（承認番号 014-0124）に基づいて行われ、すべての患者から研究参加の同意を得た上で血液試料と臨床情報の提供を得た。本研究は 1975 年のヘルシンキ宣言の原則に従って実施した。末梢血サンプルは、2014 年 12 月 10 日から 2016 年 12 月 28 日までに手術施行した胃癌患者 54 例から得られたもので、患者年齢の中央値は 63（35-91）歳であった（表 1）。腫瘍病期分類は、国際対がん連合（Union for International Cancer; UICC）に則って行った。29 例（54%）が早期癌、25 例（46%）が進行癌であり、Stage 別にみると I 期が 31 例、II 期が 13 例、III 期が 10 例であった。本研究では、再発に焦点を当てているため、遠隔転移のある StageIV は除外している。健常人 10 名の末梢血をコントロールとして使用した。

表1: 患者背景

Variable	Patients (n=54)	
	No.	%
Depth of tumor invasion		
T1	29	54
T2	4	7
T3	14	26
T4	7	13
Lymph node metastasis		
N0	35	65
N1	11	20
N2	4	7
N3	4	7
Cancer stage		
I	31	57
II	13	24
III	10	19
IV	0	0
Age		
Median, years	63	
Range	35-91	
Sex		
male	36	67
female	18	33

T1: 粘膜から粘膜下層にとどまっている、T2: 筋層まで達する、T3: 筋層を超えて浸潤している、T4: 胃の表面に露出あるいは他の内臓や組織に浸潤している、N0: リンパ節転移なし、N+: リンパ節転移あり、M0: 遠隔転移なし、M1: 遠隔転移あり

positive control の確認

これまでの報告を参考に、上皮系マーカーとして Cytokeratin (Abcam, Cambridge, United Kingdom)、間葉系マーカーとして N-cadherin (Abcam, Cambridge, United Kingdom) を採用した。胃癌細胞株である MKN7 (高分化由来)、MKN74 (中分化由来)、MKN45 (低分化由来)、KATOIII (印環細胞由来) は、いずれも細胞バンクである JCRB (Japanese Cancer Research Resources Bank) より供給され、これらを使用し positive control が陽性であることを確認した。

血液サンプルの準備

術直前、術後 1 週間目、術後 1 か月目に 7.5ml の末梢血を採取した。本研究の目的として、周術期 (術後補助化学療法の開始前まで) の CTC の動態が術後再発のリスクを予測できるか検討したため末梢血採取の日程を術後 1 か月目までとした。末梢血はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA-2Na) 入りの真空採血管 (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) に回収し、4°C で保存した後に収集から 3 時間以内に次の工程を行った。

濃縮工程

濃度勾配遠心分離法を用いて、腫瘍細胞を含む単核細胞とそれ以外の成分に末梢血を分離した。Leucosep 管 (Greiner Bio-One, Kremsmünster Austria) に全血 7.5ml と Ficoll-PaquePLUS 液 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 8ml を混ぜて 25°C、800G で 15 分間遠心分離をした (図 1)。分離された末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) の薄い層を慎重に採取する。この PBMCs の層には単球やリンパ球を含む単核球や腫瘍細胞が存在することになる (図 1)。

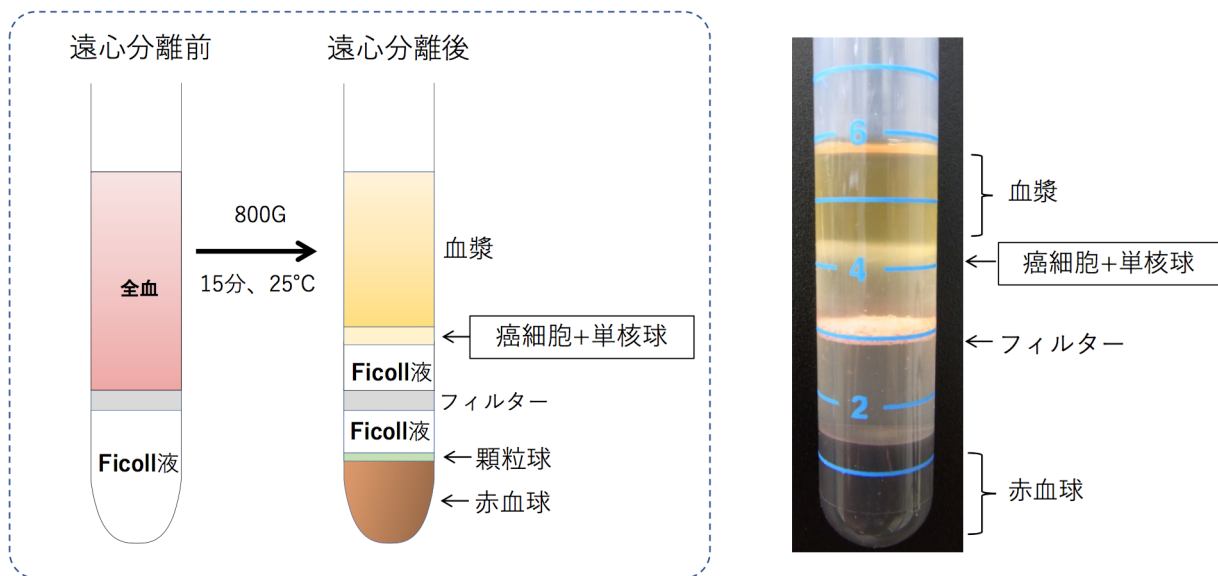


図1: 濃度勾配遠心分離

末梢血にFicoll液を混和し遠心分離することで癌細胞を含む単核球の層を抽出する。

Magnetic-activated cell sorting (MACS) による白血球の除去

次に、MACS によって腫瘍細胞以外の単核細胞を磁気標識することで PBMCs の層から白血球をできるだけ取り除く negative selection を採用した (図 2)。Positive selection であれば選択的に標的細胞を抽出できるかもしれないが取り逃しも出てくると判断し、より多くの細胞を回収するため negative selection を採用した。2mol/L ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)-2Na と 0.5%ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA) 入りのリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline containing; PBS) を希釈バッファーとする。このバッファーに先ほどの PBMCs の層を入れ 25°C、250G で 10 分間遠沈する。この作業を 2 回繰り返す。抗 CD45 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) と混和し 4°C、10 分間冷蔵保存する。混和した溶液を再度希釈バッファーで洗浄する。磁気標識された白血球は、手動の MACS システム (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) によりカラムに取り残され、CD45 陰性細胞である腫瘍細胞がカラムを通り抜け抽出される (negative selection) (図 3)。抽出された細胞を CytoSpin™4 (Thermo Fisher Scientific, Oy, Vantaa, Finland) によってスライドガラスに吹き付けた。免疫細胞染色で評価するためにスライドガラスは 95%エタノールで 30 分以上固定した。

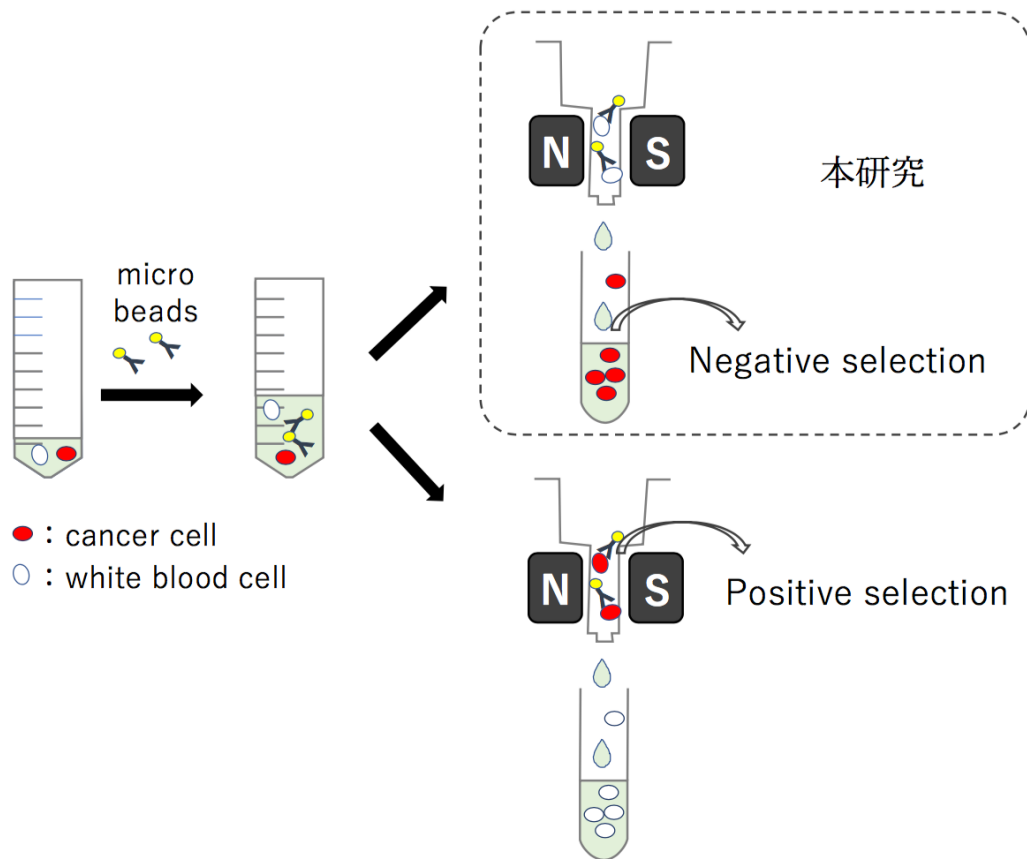


図2: MACS

磁性粒子を付けたCD45を白血球に反応させる。磁性を帯びていない癌細胞はカラムを通過し、磁性を帯びた白血球はカラムを内に残る。本研究ではNegative selectionを採用。

免疫細胞染色

スライドガラス上の腫瘍細胞を同定するために、上皮系マーカーの Cytokeratin (Abcam, Cambridge, United Kingdom)、間葉系マーカーの N-cadherin (Abcam, Cambridge, United Kingdom)、核染色のための 4',6-diamidino-2-phenylidole (DAPI)(ThermoFisherScientific, Waltham, USA) を使用した多重染色を行った。まず、スライドガラスを非特異的ブロッキング Fc-R blocking reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて 25°C、10 分間にてブロッキングを行いバッファーで 3 回洗浄を行った。100 倍希釈した N-cadherin を一次抗体として暗室で 25°C、1 時間反応させた後に、100 倍希釈した Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) を 2 次抗体として暗室で 25°C、1 時間反応させる。その後、同様に 100 倍希釈した Cytokeratin を一次抗体として暗室で 25°C、1 時間反応させた後に、100 倍希釈した Fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-Biotin antibody (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を 2 次抗体とし

て暗室で 25°C、1 時間反応させた。最後に DAPI で核の染色を行い、完成したスライドガラスは蛍光顕微鏡で観察するまで暗室で保存した。

CTC の同定

蛍光顕微鏡 BZ-9000 GenerationII Image Viewer version2.0 (Keyence, Osaka, Japan) を使用し、400 倍の倍率で描出された画像を手動で観察した。本研究では、Cytokeratin あるいは N-cadherin が染色され、DAPI による核染色があり、さらに 10 μ m 以上の細胞径を満たした細胞を CTC としてカウントした。

統計学的検討

臨床病理学的組織特徴と CTC との関連に関してはフィッシャーの正確検定を用いて行い、臨床病理学的組織特徴とリスク分類との関連では Cochran-Armitage の傾向検定を用いて行った。無再発生存曲線は Kaplan-Meier 法で作成し、Log-rank 検定を用いて比較した。P 値が 0.05 未満を統計学的有意差とみなした。全ての統計学的検討は、統計ソフトウェア EZR

(<http://www.nature.com/bmt/journal/v48/n3/pdf/bmt2012244a.pdf>) を使用した (Kanda et al., 2013)。EZR は R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアであり、自治医科大学附属さいたま医療センターのホームページで無償配布されている。

結果

1. 抗体の positive control

本研究で採用した Cytokeratin、N-cadherin 抗体が機能することを確認するために胃癌細胞株である MKN7（高分化型由来）、MKN74（中分化型由来）、MKN45（低分化型由来）、KATOIII（印環細胞由来）に対する免疫細胞染色を行ったところ、反応の強弱はあるものの抗体が機能することが確認できた（図3）。

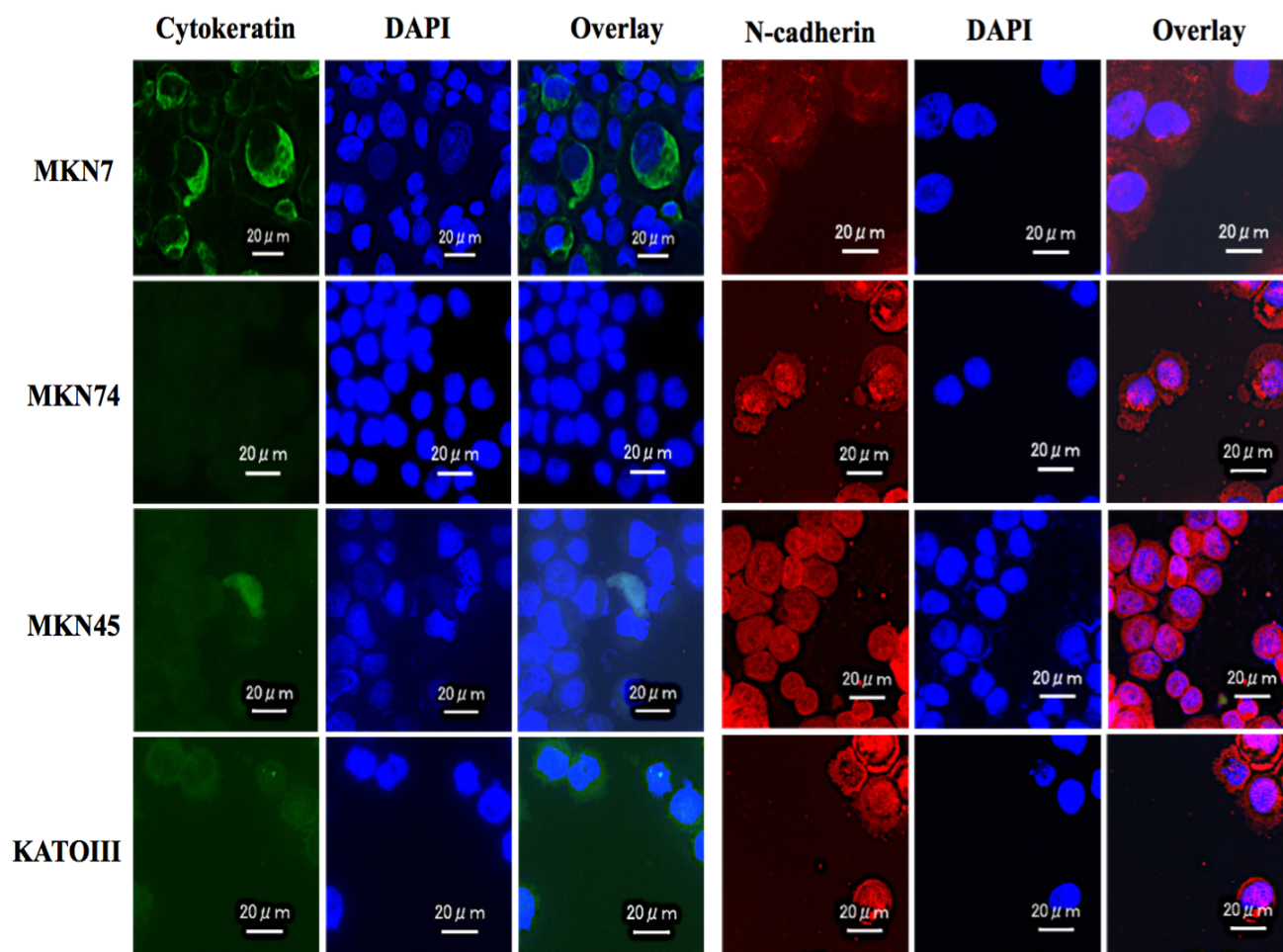


図3: 胃癌細胞株による positive control

胃癌細胞株である MKN7、MKN74、MKN45、KATOIII を使用し positive control を行い、採用した cytokeratin、N-cadherin 抗体は機能することが確認できた。

2. 濃縮工程

濃度勾配遠心分離の際に分離不十分な場合もあり、図4のように赤血球が癌細胞の層に混入してしまい、溶血させるための Red lysis buffer (Funakoshi, Tokyo, Japan) を混和した。しかし、赤血球が癌細胞の層に多量に紛れ込むため、その後の蛍光顕微鏡の観察が不可能な検体も2例ほどあり、これらの症例は除外した。

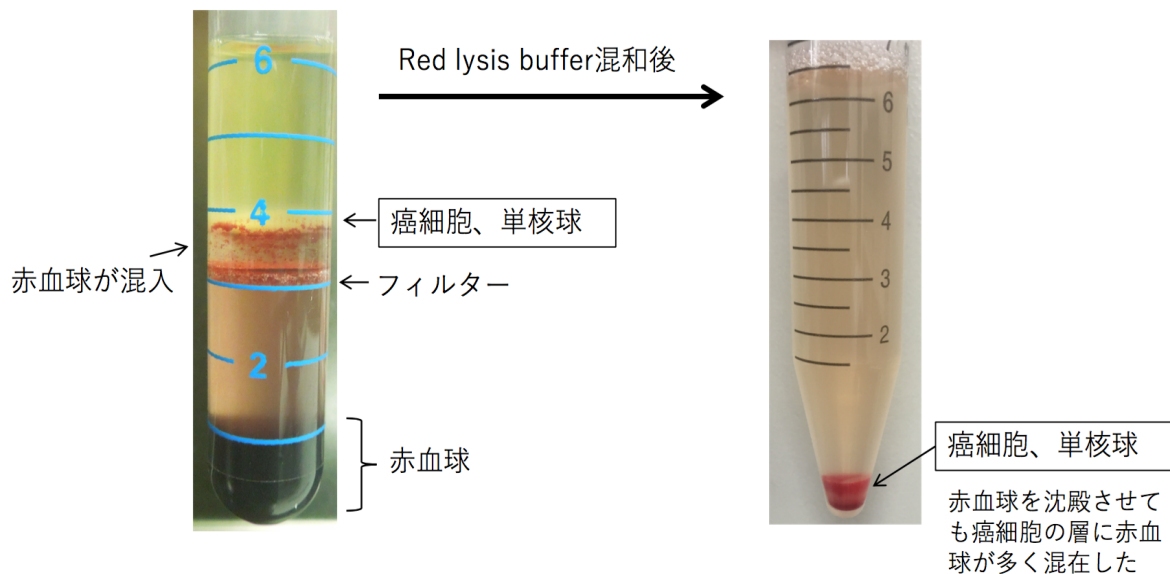


図4: 濃度勾配遠心分離 (分離不十分例)

癌細胞を含む単核球の層に赤血球が混入し、赤血球を溶血させても分離困難であった。

3. 免疫細胞染色の結果

健常人 10 名は、Cytokeratin あるいは N-cadherin に染色された細胞は検出されなかった。本研究では、CTC を認めた全ての症例 (19/19) に CK⁻/N-cadherin⁺ CTC が検出され (図 5C)、10.5% (2/19) に CK⁺/N-cadherin⁺ CTC が検出されたが、CK⁺/N-cadherin⁻ のパターンを示す CTC は検出されなかった。従来、CTC を検出するために一般的に使用されていた上皮系マーカーの Cytokeratin のみの実験系だと本研究での CTC の同定率が 3.7% (2/54) であるが、間葉系マーカーの N-cadherin も併用することで検出率は 35.2% (19/54) と向上した (表 2)。

表2: CTCにおけるCKやN-cadherinの発現状況

	Patients (n=54)	
	No.	%
CK ⁺ /N-cadherin ⁻	0	0.0
CK ⁺ /N-cadherin ⁺	2	3.7
CK ⁻ /N-cadherin ⁺	19	35.2

CK: Cytokeratin

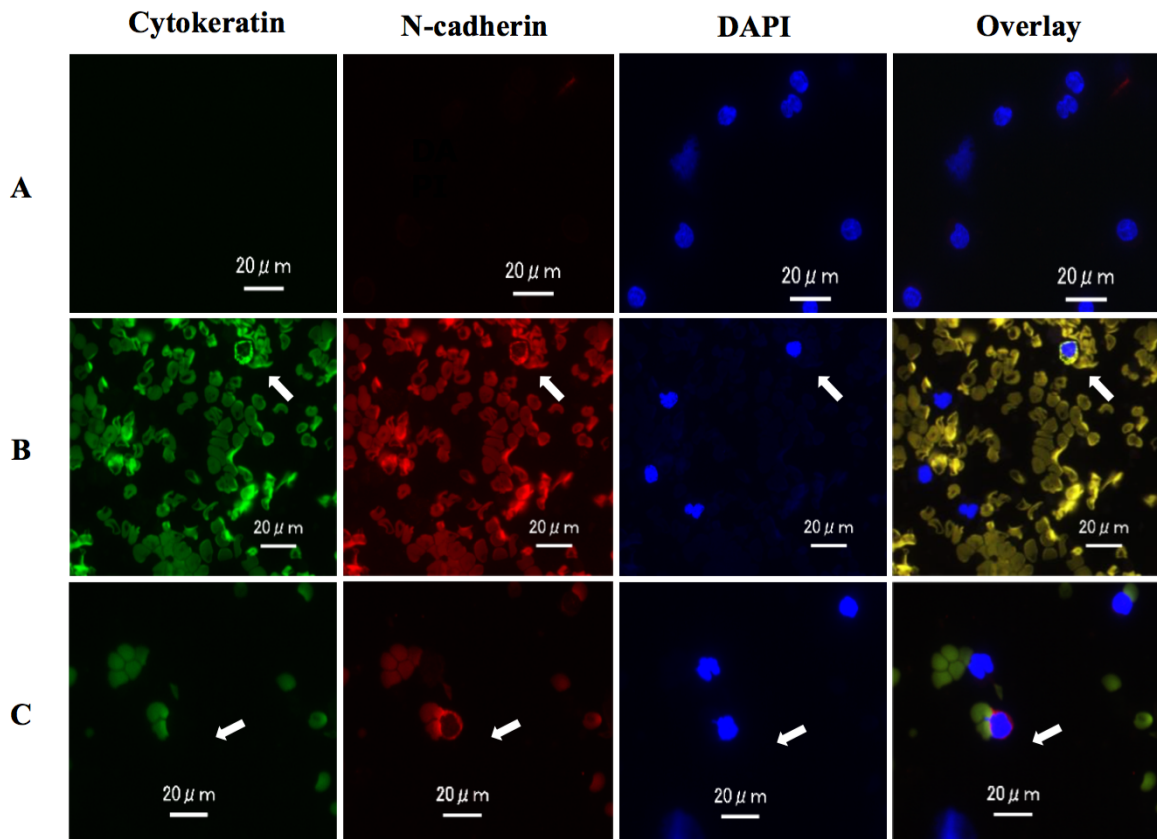


図5: CytokeratinとN-cadherinの蛍光二重染色

A: 健常人10名の検体では染色される細胞は認めなかった。B: 胃癌患者検体において上皮系のcytokeratin、間葉系のN-cadherinのどちらも発現するCTC (矢印)。cytokeratinは緑色、N-cadherinは赤色、核染色である4',6'-diamidino-2-phenylidole (DAPI)は青色で示されている。本症例では核のない多数の赤血球もcytokeratin、N-cadherinが非特異的に染色を示した。C: 胃癌患者検体においてcytokeratinは陰性、N-cadherinが陽性反応を示している (矢印)。蛍光顕微鏡の倍率は、40×;でありscale barは、20 μ mである。

観察する際に、死細胞 (DAPIが崩れて描出される) に抗体が非特異的の反応をして蛍光を発する細胞も時に認めたため、この死細胞をカウントしないように慎重にカウントした (図6)。

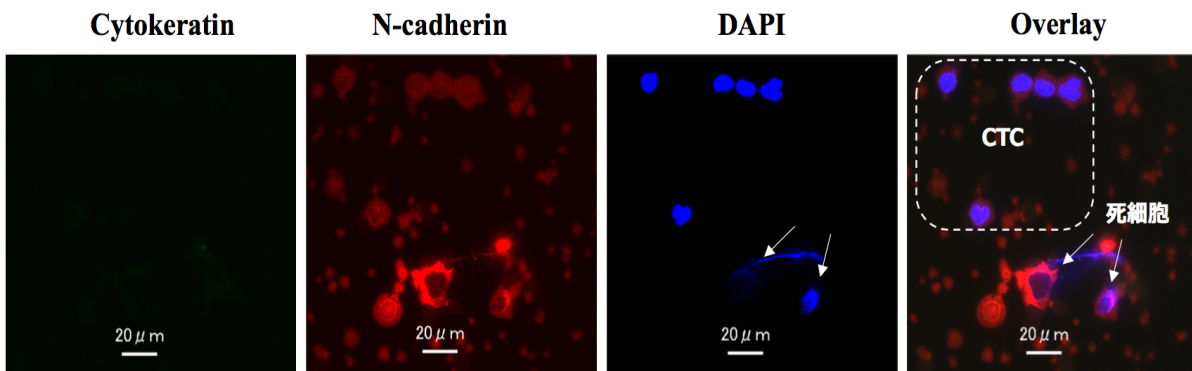


図6: CTCと非特異的に抗原抗体反応した死細胞

DAPIに染まった核は形態が崩れ死細胞として観察できる (矢印)。その死細胞が抗体と非特異的に反応し蛍光染色している。

再発するかしないかを術前 CTC 数で分け、Receiver operating characteristic curve (ROC)によって感度と特異度を計算した。area under the curve (AUC)は 0.781 であり、これらの結果 CTC のカットオフ値は 1 であった (図 7)。

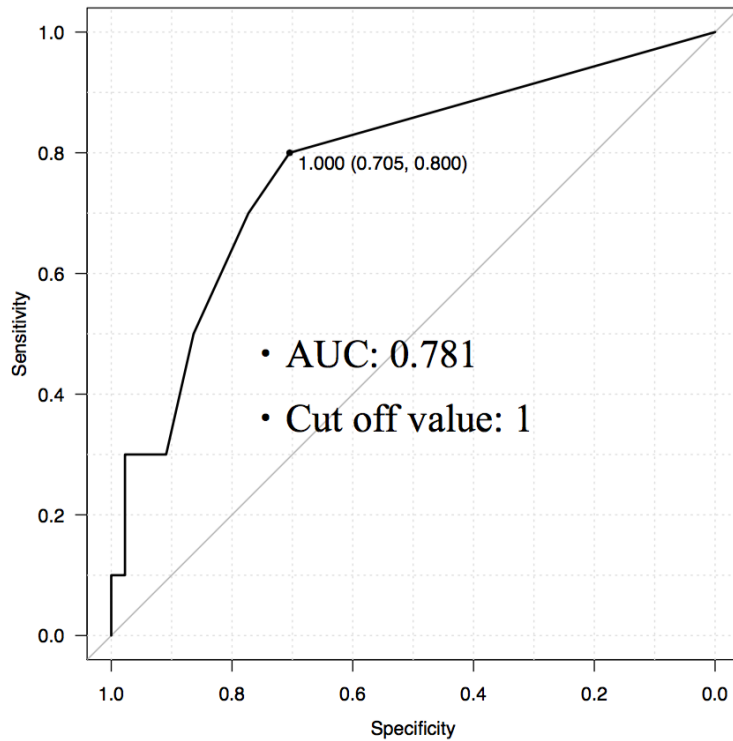


図7: 本研究におけるCTCのカットオフ値
再発するかしないかを術前CTC数で分けROC曲線を描くと、AUCは0.781でありカットオフ値は1であった。

1 個以上の CTC を認めた症例を CTC 陽性症例とカウントすると、胃癌患者の 35% (19/54) の症例で CTC 陽性であり、早期癌では 17% (5/29)、進行癌では 56% (14/25) が CTC 陽性であった。T 因子以外の他の病理組織学的因子に関しては、脈管侵襲があると CTC が陽性となる傾向があったが、その他の因子では統計学的な関連は認めなかった (表 3)。

表3: 臨床組織学的特徴とCTCとの関連

Tumor classification	CTC+ (n=19)	CTC- (n=35)	P-value*
T1	5	24	0.004
T2-4	14	11	
N0	10	25	0.266
N1-3	9	10	
Stage I	8	23	0.149
Stage II-III	11	12	
ly 0	10	21	0.774
ly 1-3	19	14	
v 0	7	22	0.090
v 1-3	12	13	
pap, tub	12	18	0.567
por, sig, muc	7	17	

* Fisher's exact test

pap: papillary adenocarcinoma, tub: tubular adenocarcinoma, por: poorly-differentiated adenocarcinoma, sig; Signet-ring cell carcinoma, muc: mucinous adenocarcinoma, v: vessel invasion, ly: lymphatic invasion

4. 術期動態とCTCの関係

術前CTCの有無で二つの群に分け無再発生存曲線を引いたところCTC陰性群では3年無再発生存率が92%に対しCTC陽性群で57%と有意に低下した(図8)。

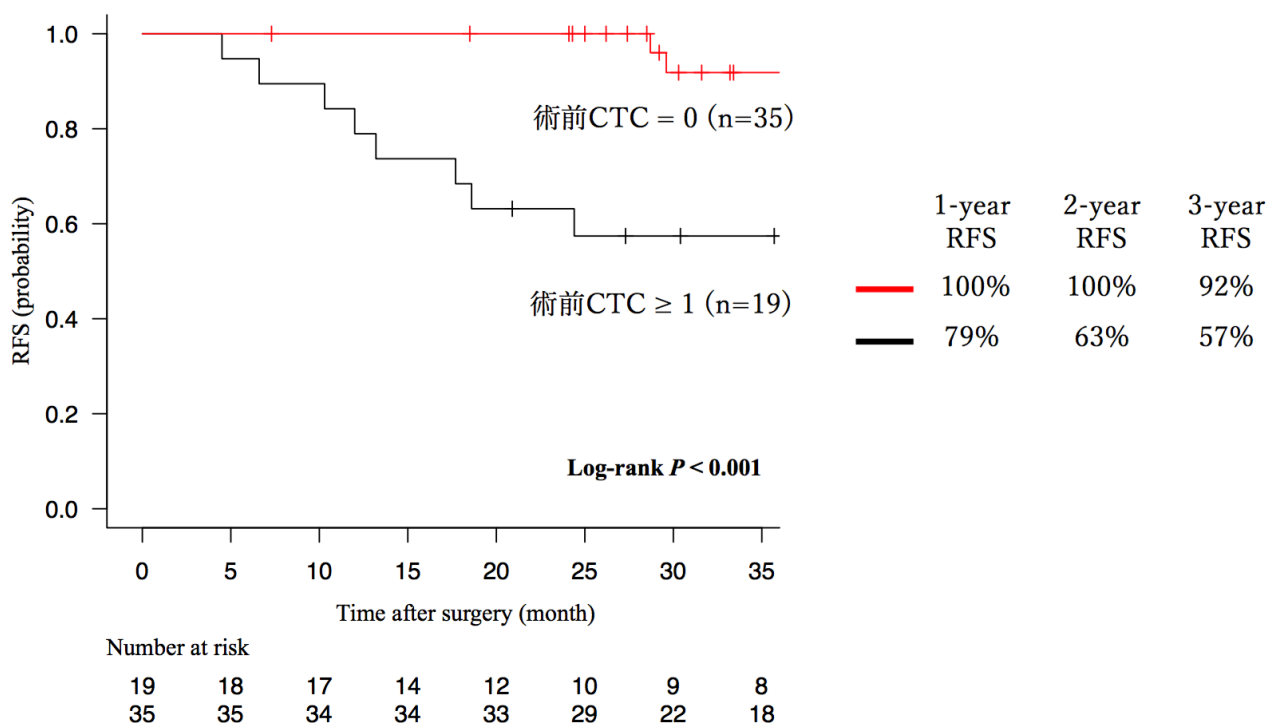


図8: 術前CTCの有無による無再発生存曲線
術前CTC陽性群で無再発生存率が有意に低下した。

更なる層別化のために周術期の CTC の推移に注目し患者を 3 つのリスク群に分けた。術前 CTC が陽性で、術後 1 週間目あるいは術後術後 1 か月目に CTC が術前より増加している群を高リスク群 (n= 7) 、術前に CTC が陽性で術後 1 週間目かつ術後 1 か月目に CTC が術前より減少している群を中リスク群 (n= 12) 、術後の CTC 有無に関係なく術前に CTC 認めなかった群を低リスク群 (n= 35) とした(図 9)。

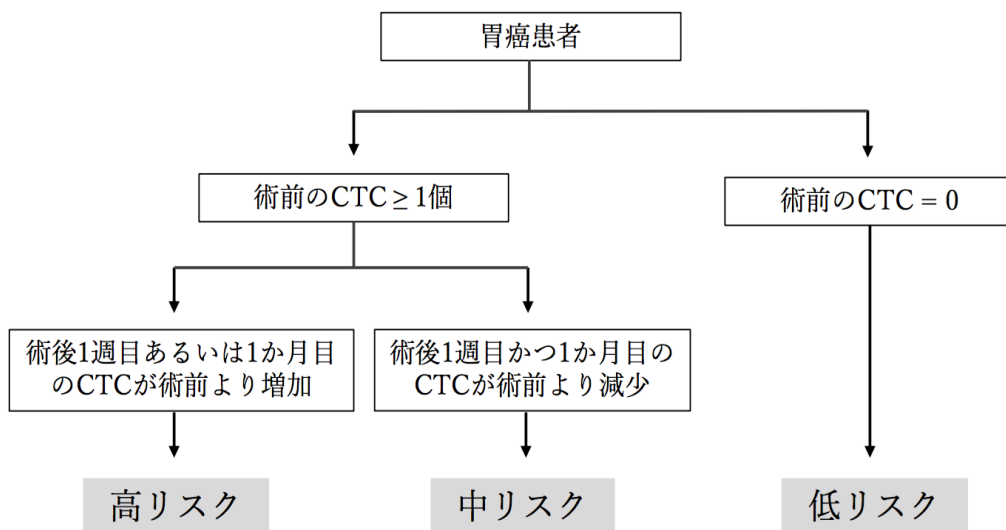


図9: 再発リスクを層別化するためのフローチャート

再発率に関しては、全てのリスク群で再発を認め、それぞれの再発率は高リスク群 57% (4/7) 、中リスク群 33% (4/12) 、低リスク群 6% (2/35) とリスクが高くなるほど再発率が高かった。高リスク群と中リスク群の比較では統計学的な差は認めなかったが (p=0.377) 、中リスク群と低リスク群の比較 (p=0.030) 、そして高リスク群と低リスク群の比較 (p=0.004) では統計学的な差を認めた (図 10) 。

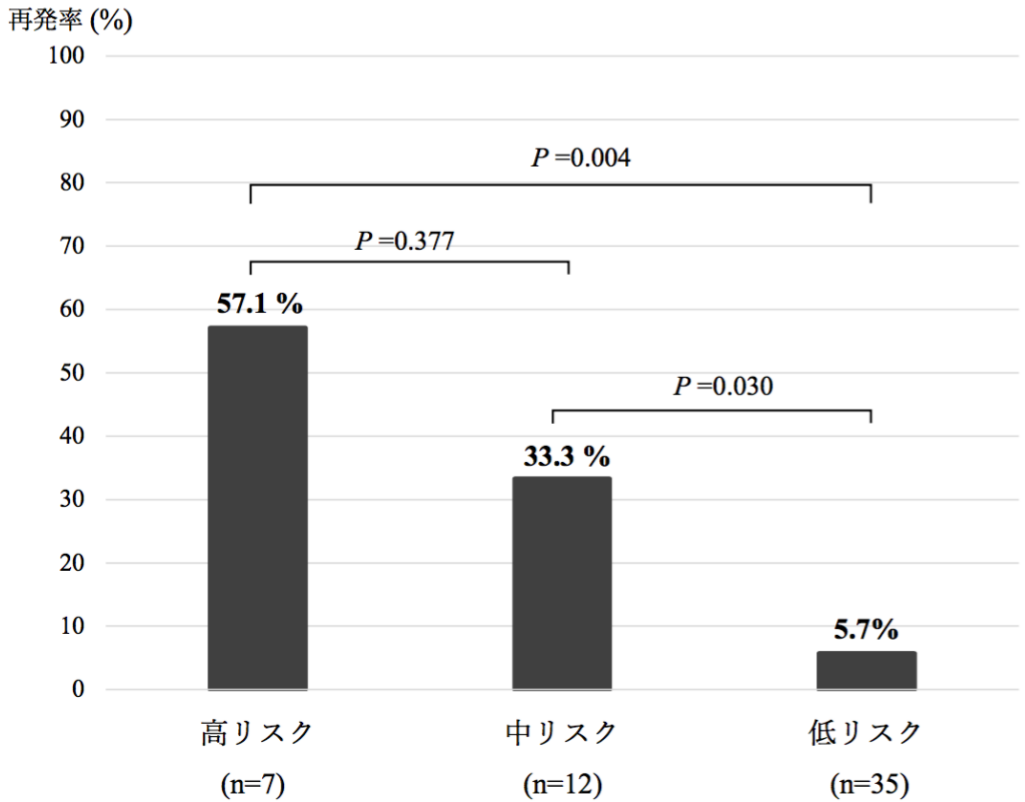


図10: リスク別の再発率

リスクが高くなるにつれて再発率が上昇した。高リスクと中リスク群の比較では統計学的な有意差はなかったが、他の群間では有意差を認めた。再発した症例は全て進行癌患者だった。

さらに、 Kaplan-Meier法による生存曲線を引くとリスクが高いほど全患者では無再発生存率が低下し ($p=0.00024$)、さらに進行癌患者のみでもリスクが高いほど全患者では無再発生存率が低下した ($p=0.00103$) (図 11)。

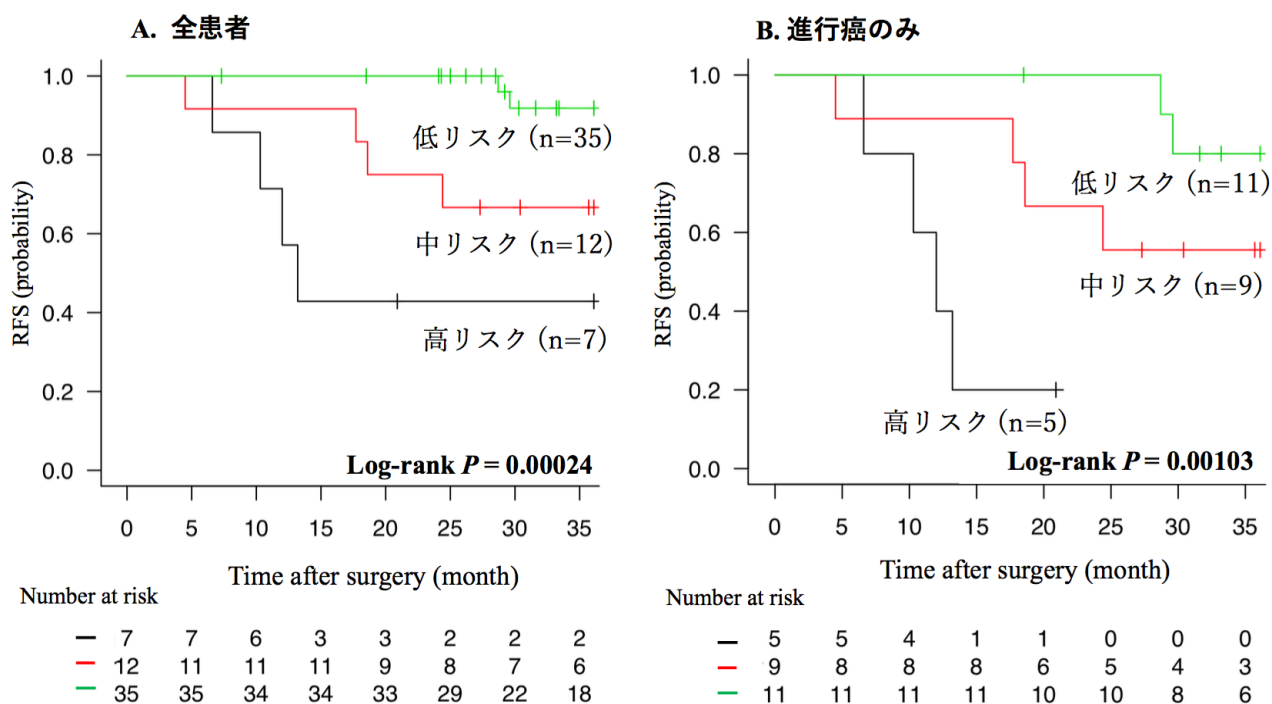


図11: リスク別における無再発生存曲線

進行癌と早期癌の全患者(A)、あるいは進行癌のみ(B)のどちらにおいてもリスクが高くなるにつれて無再発生存率が減少する。

そこで、臨床病理組織学的特徴とリスク分類との関連を検討したところ、リスクが高いほど進行癌の割合が有意差を持って高くなり、他の因子では統計学的な有意差は認めなかったが、リスクが高いほど Stage I に比べ Stage II-III の割合が多くなる傾向があった (表 4)。

表4: 臨床組織学的特徴とリスク分類との関連

Tumor classification	高リスク (n=7)	中リスク (n=12)	低リスク (n=35)	P-value*
T1	2	3	24	0.008
T2-4	5	9	11	
N0	3	7	25	0.127
N1-3	4	5	10	
Stage I	2	6	23	0.060
Stage II-III	5	6	12	
ly 0	2	8	21	0.263
ly 1-3	5	4	14	
v 0	3	4	22	0.133
v 1-3	4	8	13	
pap, tub	4	8	18	0.554
por, sig, muc	3	4	17	

* Cochran-Armitage trend test

ly: lymphatic invasion, v: vessel invasion, pap: papillary adenocarcinoma, tub: tubular adenocarcinoma, por: poorly-differentiated adenocarcinoma, sig; Signet-ring cell carcinoma, muc: mucinous adenocarcinoma,

5. 術後の補助化学療法や再発と CTC との関連

術後の観察期間は 7.3～53.9（中央値 36.1）か月であった。進行癌患者 25 例中 16 例が術後補助化学療法を行った（S-1: 15 例、S-1+oxaliplatin: 1 例）。残りの 9 例は患者の希望により術後補助化学療法を行わなかった。補助化学療法を行った 16 例中 13 例が治療を完遂したが、残りの 3 例は S-1 の副作用のため治療を途中で中断した。全 54 例中 10 例に術後再発を認め全て進行癌患者であった。再発を認めた 10 例中 9 例は、術後補助化学療法を行っていた（残り 1 例は希望のため行ななかった）（表 5）。

再発した 10 例中 6 例（60%）に血行性転移を（肝転移 2 例、肺転移 2 例、骨転移 1 例、脾転移 1 例）、3 例（30%）に腹膜播種を、1 例（10%）にリンパ節転移を認めた。リンパ節転移を認めた 1 例は術後補助化学療法を行っていたが、術後半年で多発リンパ節転移を認め、さらにその後肝転移も認めた。手術から再発までの期間は 4.5～29.6（中央値 15.5）か月であった。術後補助化学療法の施行率に関しては、高リスク群で 60%（3/5）、中リスク群で 66%（6/9）、低リスク群で 64%（7/11）と同程度であったが、リスクが高いほど再発率が高かった（表 5）。

表5:各リスク群における進行癌に対する術後補助化学療法の施行状況

補助化学療法(種類)	高リスク5例	中リスク9例	低リスク11例	計
あり(S-1)	2例(再発2例)	6例(再発4例)	7例(再発2例)	15例
あり(S-1+オキサリプラチン)	1例(再発1例)	0	0	1例
なし	2例(再発1例)	3例(再発0例)	4例(再発0例)	9例
補助化学療法施行率	60%(3/5)	66%(6/9)	64%(7/11)	
再発率	80%(4/5)	44%(4/9)	18%(2/11)	

再発を来した症例の周術期の CTC の推移を表 6 に示す。高リスク群では術前に CTC が陽性で術後 1 週間目あるいは術後術後 1 か月目に CTC が術前より増加していた。中リスク群では、術前に CTC が陽性で術後 1 週間目かつ術後術後 1 か月目に CTC が術前より減少していた。低リスク群では、術後の CTC の有無に関わらず術前の CTC が陰性である。CTC の推移に関して、高リスク群が常に増加傾向、中リスク群が常に減少傾向、低リスク群が常に CTC の検出がないとは限らず、すべての群において CTC が増減している症例を認めた。

表6: 再発症例におけるCTCの推移

症例	再発部位	リスク別	CTC数 / 7.5ml		
			術直前	術後1週間	術後1か月
1	骨	高	4	29	13
2	肝臓	高	3	0	6
3	脾臓	高	2	2	25
4	リンパ節	高	1	17	0
5	肺	中	187	41	0
6	肺	中	47	10	0
7	腹膜	中	45	26	5
8	肝臓	中	4	0	1
9	腹膜	低	0	2	0
10	腹膜	低	0	0	0

考察

本研究では間葉系マーカーである N-cadherin が胃癌患者周術期における CTC の検出率を向上させた。さらに、胃癌周術期の CTC の動態を測定することにより、再発のリスクを層別化することができた。本研究は胃癌患者において上皮間葉転換に注目して CTC を検出し、周術期動態によって再発の層別化を行った最初の報告である。

低侵襲かつ繰り返しのサンプリングを可能にする Liquid biopsy は早期診断、治療効果のモニタリング、および予後予測において臨床的に有用とされている (Cristofanilli et al., 2005; Pachmann et al., 2008)。最近では、がん細胞由来のエクソソームや microRNA、そして循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) も急速に臨床応用され、CTC や腫瘍マーカーより高い感度のバイオマーカーと言われている (Dawson et al., 2013; Ogata-Kawata et al., 2014; Schwarzenbach et al., 2014)。乳癌における検出感度は、ctDNA や CTC、CA15-3 がそれぞれ 97%、87%、78% との報告 (Dawson et al., 2013) があり、早期診断やスクリーニングに関して CTC は ctDNA には劣る。しかし、実際、転移・再発に関与している細胞を見積もる際には、生細胞の CTC を測定する必要がある、豊島ら (Toyoshima et al., 2015) は胃癌患者由来の CTC を免疫不全マウスに移植することで CTC の腫瘍形成能を示した。このことは、転移・再発形式を捉えるには生細胞と死細胞の識別ができない ctDNA のような分子生物学的手法ではなく、形態学的手法を用いた CTC のような検出方法がより実用的であることを示唆している。

血管に浸潤する癌細胞は EMT の変化を呈している可能性が高く (Klymkowsky and Savagner, 2009; Polyak and Weinberg, 2009)、上皮系 CTC の検出だけでは少なからず見落としがある (Friedlander et al., 2014)。実際、本研究では上皮系 CTC のみが検出できた症例は 10.5% (2/19) であり、多くの症例では間葉系マーカーである N-cadherin を発現する CTC であった。Wu ら (Wu et al., 2015) も胃癌患者の 53% (8/15) で間葉系成分を発現する CTC を同定している。In vivo、in vitro の実験において N-cadherin の発現は浸潤能、接着能、増殖能を惹起することが示されており (Tanaka et al., 2010)、臨床においても間葉系 CTC と病勢は相関し、予後や治療抵抗性の予測因子ともなり得る (Li et al., 2015; Yu et al., 2013)。また、N-cadherin に注目した CTC の臨床論文も散見されている (Armstrong et al., 2011; Armstrong et al., 2013; Balasubramanian et al., 2012; Nel et al., 2013; Nel et al., 2016; Nel et al., 2014; Pailler et al., 2013; Po et al., 2018; Weller et al., 2014)。Nel ら (Nel et al., 2013) は、上皮系 CTC に対して N-cadherin の発現の割合が高い症例は予後不良と報告している。CTC の検出において本研究と同様に、濃度勾配遠心分離や MACS、そして免疫

細胞染色によって CTC を同定する方法論が報告されているものの、現時点でまだ標準化されていない(Nel et al., 2013; Nel et al., 2016; Nel et al., 2014; Weller et al., 2014)。しかし、本研究では N-cadherin を発現した CTC を胃癌患者の 35%

(19/54) に検出可能であった。胃癌組織においては N-cadherin が 21% (31/146) 発現したという報告(Kamikihara et al., 2012)はすでにあるが、胃癌の CTC における N-cadherin 発現の報告は本研究が初めてである。

間葉系マーカーの選択にあたっては、これまでの報告に基づいて vimentin と N-cadherin に焦点を当て、胃癌細胞株にて評価した。vimentin に比べ N-cadherin の方が染色性に優れていること、また、vimentin は細胞質由来であるのに対し N-cadherin は細胞膜由来で、本研究のような抗原抗体反応を用いる実験系においては N-cadherin がより適していると判断し、間葉系マーカーとして採用した。本研究では N-cadherin のみを間葉系マーカーとして使用したが、他の間葉系マーカーである vimentin、snail、twist、 α -SMA、fibronectin を併用すると CTC 検出率が向上する可能性がある。設備の関係で蛍光顕微鏡のレンズの設定において間葉系マーカーを一つしか選択することができなかつたため今後、検討の余地がある。Wang ら(Wang et al., 2019)は、EpCAM と N-cadherin をターゲットとするデュアル抗体を使用して CTC を効率的に抽出できることを実証しており、今後の研究の発展に期待したい。

本研究では、CTC を胃癌周術期に経時的に測定した。Uenosono ら(Uenosono et al., 2013)や Wang ら(Wang et al., 2014)のように CTC の有無を術前の 1 回のみ測定するだけで全生存率、無再発生存率に差が出るとの報告があり、本研究でも術前 CTC の有無で有意差を認めた。乳癌において化学療法施行後の CTC が化学療法開始前に比べて増加、減少、不変の 3 群に分け、増加群で再発が多いとの報告がある(Pachmann and Schuster, 2018)。また、胃癌において手術前後と術後化学療法終了時の CTC の上皮系と間葉系の CTC の割合を測定し、病状の悪化を認める症例は間葉系 CTC の割合が多かったとする報告もある(Li et al., 2015)。このように経時的に CTC の動態を把握することで予後予測が可能になることがあり、本研究では術前のみならず CTC の周術期動態を考慮することでさらなる層別化を目指した。CTC の推移には増減を来していたが、術後に CTC が増加する理由としては、術中操作による揉み出しが関与する可能性もある。実際、開腹直後と胃切除後の CTC の比較では、切除後のみで CTC が検出できた症例が 28%認めたとの報告(Miyazono et al., 2001)がある。一方で、胃癌の術直後では 46%の CTC 陽性率が術後 2 日目にはほとんど認めなくなったという報告(Ikeguchi and Kaibara, 2005)や、CTC の半減期は数時間であるという報告(Meng et al., 2004)を考慮すると、経時的に CTC の数が減少することは論理的に理解できるが、本研究では術後 1 週間、術後 1 か月で増加する症例も存在したため今後の研究課題である。

CTC の cut-off 値に関しては、現時点で決まった値はない。乳癌においては 5 個以上の CTC を認めると無増悪生存期間 (PFS) や全生存期間 (OS) が短いという報告 (Andreopoulou and Cristofanilli, 2010) や、転移性大腸癌においては治療開始前あるいは開始後 1 週から 20 週の時点で CTC が 3 個以上を認めると PFS や OS が短いという報告 (Cohen et al., 2008)、転移性前立腺癌においては内分泌療法前の CTC が 5 個以上認めるとアンドロゲン除去療法の効果が低いという報告 (Okegawa et al., 2008)、さらには進行胃癌においては化学療法投与後の 2 週目および 4 週目の CTC が 4 個以上認めると PFS や OS が短いという報告 (Matsusaka et al., 2010) がある。一方で、本研究では術後再発を来した症例の術前 CTC 数を outcome として算出された cut-off 値は 1 であり、これを CTC の閾値と設定した。現時点では cut-off 値に関しては議論の余地があるため今後症例数を重ねさらなる検討が必要である。

胃癌の根治術後の再発の主な形式は、腹膜播種 (47.5%)、血行性転移 (37.7%)、リンパ節転移 (18.5%)、局所再発 (6.8%) と報告されている (Sasako et al., 2011)。しかし、本研究では再発の 60% (6/10) が血行性転移、30% (3/10) が腹膜播種、10% (1/10) がリンパ節転移という結果であり、再発 10 例中、腹膜転移の 2 例は CTC を検出することができなかった。これは、本研究が血中の癌細胞を検出する系であったことから CTC として検出できなかった可能性がある。一方で CTC が検出できた腹膜転移 1 例やリンパ節転移 1 例に関しては、それぞれ共に病理組織学的結果で脈管に高度侵襲を認め腫瘍径が 10cm、8cm と巨大な進行癌であったため CTC として検出された可能性はある。Takahashi ら (Takahashi et al., 2019) は、stage II/III の胃癌患者の術後補助化学療法として S-1 を投与した 396 例の患者の追跡を行った結果、122 例の再発を報告した。この報告によると、再発症例の 10% に重複した再発形式を認め、この場合、血行性転移を認めた症例では別経路としてリンパ行性転移や腹膜播種も認め得ることを示唆している。今後、より精度の高い予後予測を行うには、早期癌や腫瘍量の少ない進行癌でも検出できるようにリンパ行性転移や腹膜播種転移にターゲットを拡大した実験系も確立させる必要がある。

現在 Stage II/III 症例 (ただし T1 症例を除く) に S1 の術後補助化学療法が推奨されている。ACTS-GC 試験において 3 年無再発生存率が手術単独群で 59.6%、S-1 投与群で 72.2% であった (Sakuramoto et al., 2007)。手術単独でも約 6 割の症例が無再発と報告されているが、実際は術後の補助化学療法が施行されていることは多い。本研究の層別化では、進行癌の 44% (11/25) が低リスク群に該当し、ガイドライン上は全て術後補助化学療法の対象になる。しかし、再発の可能性が低いと判断し術後補助化学療法を省ける可能性はある。一方で、進行癌症例の 20% (5/25) が高リスク群に該当したが、これらの症例はサーベイランスの間隔を縮めること、また、より強力な化学療法の選択をすることなど個々の症例に合わせたテーラーメイド医療が行え

る可能性がある。

本研究には幾つかの limitation がある。一つ目として、N-cadherin の発現は腫瘍特異的ではないこと、二つ目として、間葉系マーカーによって検出された細胞が癌細胞であることが証明できていないこと、三つ目として、CTC は循環細胞であるため、リンパ節転移のある患者では転移経路としての理論上の限界があること、四つ目として、本研究では蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察する際は、手動によるカウントを行ったため、再現性においては自動化された方法よりも低くなる可能性があること、五つ目として、高リスク群と中リスク群間の再発率に統計学的有意差を認めなかったことである。この理由として、本研究が単一施設による研究であり、患者数が少なかったためと考えられる。しかし、本研究の結果により、N-cadherin が cytokeratin の発現を欠く CTC を検出するための有用なマーカーであり、N-cadherin を発現する CTC の周術期動態を把握することで胃癌患者の再発予後予測の層別化に有益である可能性が示唆された。本研究の臨床応用としては、術後の再発を抑制するために術後補助化学療法を本来どの患者に行ったら良いか、どの患者に対してより強固なサーベイランスをすべきかの判断の一助になる可能性がある。

総括および結論

1. 本研究から得られた新知見

- ・ N-cadherin は cytokeratin を欠く CTC を検出するためのマーカーとなり得る。
- ・ 胃癌周術期における CTC 数を把握することで、再発リスクの層別化が可能である。

2. 本研究で得られた知見の意義

層別化を行い再発の予後予測を行うことで、テーラーメイド治療に繋がる可能性がある。ガイドライン上は術後補助化学療法の対象となる症例に対しても層別化によって再発の可能性が低いと判断された場合には、術後補助化学療法を省略することで患者の身体への負担軽減と医療費の抑制にも繋がる。一方で、再発の可能性の高いと判断された症例に対してはサーベイランスの間隔を縮めこと、より強力な化学療法を選択することなど個々の症例に合わせたテーラーメイド医療ができる可能性がある。

3. 本研究から得られた知見からどのような研究が展開されうるか

本研究では、間葉系マーカーとして N-cadherin のみを採用した。今後は他の間葉系マーカーも併用することで CTC の検出率はさらに向上すると思われる。本研究のように間葉系マーカーの測定と周術期動態による層別化を、がん細胞由来のエクソソームや microRNA や ctDNA などのより感度の高い方法を用いて行うことで更に精度の高い再発の予後予測が期待できる。

本研究では、周術期の CTC の動態から再発の予後予測を行ったが、術後のサーベイランス対象患者に対して、腫瘍マーカーと同様に定期的に測定することで liquid biopsy が得意とする早期診断、治療の効果モニタリングを複合的に判断できる可能性もある。

4. 今後の課題

今後、さらなる症例の積み重ねと患者の予後追跡を行うことで本研究により得られた層別化に対しての詳細な評価を行い、実際に臨床応用できるか検討することが必要である。

謝辞

この場を借りて、指導的な立場で本研究の遂行に多大なる貢献をしていただいた、北海道大学消化器外科学教室 I 武富紹信 教授に感謝を申し上げます。

また、本研究において研究デザインの提案や示唆的な議論、助言をくださった医療法人社団養生館苫小牧日翔病院外科 崎濱秀康 部長、また本研究において技術的な補助をくださった消化器外科学教室 I の皆様に感謝を申し上げます。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費（JP24591967, JP16K10526）、榆刀会外科医学研究助成基金の助成を受け行われたものです。

利益相反

本研究に開示すべき利益相反状態はない

引用文献

- Abdallah, E.A., Braun, A.C., Flores, B., Senda, L., Urvanegia, A.C., Calsavara, V., Fonseca de Jesus, V.H., Almeida, M.F.A., Begnami, M.D., Coimbra, F.J.F., et al. (2019). The Potential Clinical Implications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Gastric Cancer. *Oncologist* 24, e854-e863.
- Andreopoulou, E., and Cristofanilli, M. (2010). Circulating tumor cells as prognostic marker in metastatic breast cancer. *Expert. Rev. AntiCancer. Ther.* 10, 171-177.
- Armstrong, A.J., Marengo, M.S., Oltean, S., Kemeny, G., Bitting, R.L., Turnbull, J.D., Herold, C.I., Marcom, P.K., George, D.J., and Garcia-Blanco, M.A. (2011). Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol. Cancer. Res.* 9, 997-1007.
- Armstrong, A.J., Shen, T., Halabi, S., Kemeny, G., Bitting, R.L., Kartcheske, P., Embree, E., Morris, K., Winters, C., Jaffe, T., et al. (2013). A phase II trial of temsirolimus in men with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Clin. Genitourin. Cancer.* 11, 397-406.
- Balasubramanian, P., Lang, J.C., Jatana, K.R., Miller, B., Ozer, E., Old, M., Schuller, D.E., Agrawal, A., Teknos, T.N., Summers, T.A., Jr., et al. (2012). Multiparameter analysis, including EMT markers, on negatively enriched blood samples from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One* 7, e42048.
- Bock, C., Rack, B., Huober, J., Andergassen, U., Jeschke, U., and Doisneau-Sixou, S. (2014). Distinct expression of cytokeratin, N-cadherin and CD133 in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Future. Oncol.* 10, 1751-1765.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer. J. Clin.* 68, 394-424.
- Cohen, S.J., Punt, C.J., Iannotti, N., Saidman, B.H., Sabbath, K.D., Gabrail, N.Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M.C., et al. (2008). 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.

- Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W., et al. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *351*, 781-791.
- Cristofanilli, M., Hayes, D.F., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Matera, J., Allard, W.J., Miller, M.C., et al. (2005). Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *23*, 1420-1430.
- Dawson, S.J., Rosenfeld, N., and Caldas, C. (2013). Circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *369*, 93-94.
- de Albuquerque, A., Kaul, S., Breier, G., Krabisch, P., and Fersis, N. (2012). Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Metastatic Breast Cancer Patients: A Step Forward in Personalized Medicine. *Breast care (Basel)* *7*, 7-12.
- Friedlander, T.W., Premasekharan, G., and Paris, P.L. (2014). Looking back, to the future of circulating tumor cells. *Pharmacol. Ther.* *142*, 271-280.
- Grover, P.K., Cummins, A.G., Price, T.J., Roberts-Thomson, I.C., and Hardingham, J.E. (2014). Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Ann Oncol.* *25*, 1506-1516.
- Ikeguchi, M., and Kaibara, N. (2005). Detection of circulating cancer cells after a gastrectomy for gastric cancer. *Surg. Today.* *35*, 436-441.
- Kamikihara, T., Ishigami, S., Arigami, T., Matsumoto, M., Okumura, H., Uchikado, Y., Kita, Y., Kurahara, H., Kijima, Y., Ueno, S., et al. (2012). Clinical implications of N-cadherin expression in gastric cancer. *Pathol. Int.* *62*, 161-166.
- Klymkowsky, M.W., and Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am. J. Pathol.* *174*, 1588-1593.
- Li, T.T., Liu, H., Li, F.P., Hu, Y.F., Mou, T.Y., Lin, T., Yu, J., Zheng, L., and Li, G.X. (2015). Evaluation of epithelial-mesenchymal transitioned circulating tumor cells in patients with resectable gastric cancer: Relevance to therapy response. *World. J. Gastroenterol.* *21*, 13259-13267.

Matsusaka, S., Chìn, K., Ogura, M., Suenaga, M., Shinozaki, E., Mishima, Y., Terui, Y., Mizunuma, N., and Hatake, K. (2010). Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer. Sci.* *101*, 1067-1071.

Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E.P., Shete, S., Naftalis, E.Z., Huth, J.F., Beitsch, P.D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D., et al. (2004). Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin. Cancer. Res. : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 8152-8162.

Miyazono, F., Natsugoe, S., Takao, S., Tokuda, K., Kijima, F., Aridome, K., Hokita, S., Baba, M., Eizuru, Y., and Aikou, T. (2001). Surgical maneuvers enhance molecular detection of circulating tumor cells during gastric cancer surgery. *Ann. Surg.* *233*, 189-194.

Nel, I., Baba, H.A., Ertle, J., Weber, F., Sitek, B., Eisenacher, M., Meyer, H.E., Schlaak, J.F., and Hoffmann, A.C. (2013). Individual profiling of circulating tumor cell composition and therapeutic outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Transl. Oncol.* *6*, 420-428.

Nel, I., Gauler, T.C., Bublitz, K., Lazaridis, L., Goergens, A., Giebel, B., Schuler, M., and Hoffmann, A.C. (2016). Circulating Tumor Cell Composition in Renal Cell Carcinoma. *PLoS One* *11*, e0153018.

Nel, I., Jehn, U., Gauler, T., and Hoffmann, A.C. (2014). Individual profiling of circulating tumor cell composition in patients with non-small cell lung cancer receiving platinum based treatment. *Transl. Lung. Cancer. Res.* *3*, 100-106.

Ogata-Kawata, H., Izumiya, M., Kurioka, D., Honma, Y., Yamada, Y., Furuta, K., Gunji, T., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., et al. (2014). Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One* *9*, e92921.

Okegawa, T., Nutahara, K., and Higashihara, E. (2008). Immunomagnetic quantification of circulating tumor cells as a prognostic factor of androgen deprivation responsiveness in patients with hormone naive metastatic prostate cancer. *J. Urol.* *180*, 1342-1347.

Pachmann, K., Camara, O., Kavallaris, A., Krauspe, S., Malarski, N., Gajda, M., Kroll, T., Jörke, C., Hammer, U., Altendorf-Hofmann, A., et al. (2008). Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J. Clin. Oncol. : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 1208-1215.

Pachmann, K., and Schuster, S. (2018). The Value of Monitoring the Behavior of Circulating Tumor Cells at the End of Endocrine Therapy in Breast Cancer Patients. *Cancers* 10.

Pailler, E., Adam, J., Barthélémy, A., Oulhen, M., Auger, N., Valent, A., Borget, I., Planchard, D., Taylor, M., André, F., et al. (2013). Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 2273-2281.

Po, J.W., Roohullah, A., Lynch, D., DeFazio, A., Harrison, M., Harnett, P.R., Kennedy, C., de Souza, P., and Becker, T.M. (2018). Improved ovarian cancer EMT-CTC isolation by immunomagnetic targeting of epithelial EpCAM and mesenchymal N-cadherin. *J. Circ. Biomark.* 7, 1849454418782617.

Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer.* 9, 265-273.

Sakuramoto, S., Sasako, M., Yamaguchi, T., Kinoshita, T., Fujii, M., Nashimoto, A., Furukawa, H., Nakajima, T., Ohashi, Y., Imamura, H., et al. (2007). Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N. Engl. J. Med.* 357, 1810-1820.

Sasako, M., Sakuramoto, S., Katai, H., Kinoshita, T., Furukawa, H., Yamaguchi, T., Nashimoto, A., Fujii, M., Nakajima, T., and Ohashi, Y. (2011). Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 4387-4393.

Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G.A., and Pantel, K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 145-156.

- Takahashi, R., Ohashi, M., Kano, Y., Ida, S., Kumagai, K., Nunobe, S., Chin, K., Yamaguchi, K., Nagino, M., Sano, T., et al. (2019). Timing and site-specific trends of recurrence in patients with pathological stage II or III gastric cancer after curative gastrectomy followed by adjuvant S-1 monotherapy. *Gastric cancer* 22, 1256-1262.
- Tanaka, H., Kono, E., Tran, C.P., Miyazaki, H., Yamashiro, J., Shimomura, T., Fazli, L., Wada, R., Huang, J., Vessella, R.L., et al. (2010). Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat. Med.* 16, 1414-1420.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 442-454.
- Toyoshima, K., Hayashi, A., Kashiwagi, M., Hayashi, N., Iwatsuki, M., Ishimoto, T., Baba, Y., Baba, H., and Ohta, Y. (2015). Analysis of circulating tumor cells derived from advanced gastric cancer. *Int. J. Cancer.* 137, 991-998.
- Uenosono, Y., Arigami, T., Kozono, T., Yanagita, S., Hagihara, T., Haraguchi, N., Matsushita, D., Hirata, M., Arima, H., Funasako, Y., et al. (2013). Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer. *Cancer* 119, 3984-3991.
- van de Stolpe, A., Pantel, K., Sleijfer, S., Terstappen, L.W., and den Toonder, J.M. (2011). Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer. Res.* 71, 5955-5960.
- Wang, S., Zheng, G., Cheng, B., Chen, F., Wang, Z., Chen, Y., Wang, Y., and Xiong, B. (2014). Circulating tumor cells (CTCs) detected by RT-PCR and its prognostic role in gastric cancer: a meta-analysis of published literature. *PLoS One* 9, e99259.
- Wang, Z., Sun, N., Liu, H., Chen, C., Ding, P., Yue, X., Zou, H., Xing, C., and Pei, R. (2019). High-Efficiency Isolation and Rapid Identification of Heterogeneous Circulating Tumor Cells (CTCs) Using Dual-Antibody-Modified Fluorescent-Magnetic Nanoparticles. *ACS. Appl. Mater. Interfaces.* 11, 39586-39593.
- Weller, P., Nel, I., Hassenkamp, P., Gauler, T., Schlueter, A., Lang, S., Dountsop, P., Hoffmann, A.C., and Lehnerdt, G. (2014). Detection of circulating tumor cell

subpopulations in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS One* *9*, e113706.

Wu, S., Liu, S., Liu, Z., Huang, J., Pu, X., Li, J., Yang, D., Deng, H., Yang, N., and Xu, J. (2015). Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers. *PLoS One* *10*, e0123976.

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., et al. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* *339*, 580-584.