



HOKKAIDO UNIVERSITY

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〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	石黒, 友唯
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14314号
Issue Date	2020-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80208
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yui_Ishiguro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 石 黒 友 唯

学 位 論 文 題 名

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)

【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（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、われわれは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た 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 月に当科で胃癌に対し 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 だった。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 の多重染色をおこなった。本研究では CK あるいは N-cadherin のいずれかを発現し、 $10\mu\text{m}$ 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 例に 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。つまり、我々の実験系では、CTC を認めた 90% (19/21) の症例が CK-/N-cadherin+CTC だったことになる。全 54 例中 10 例に術後再発を認め全て進行癌の患者だった。再発を認めた 10 例中 9 例は、術後補助化学療法をおこなっていた。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おこなっていたが、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) か月だった。術後再発した症例の術前 CTC 数を outcome として ROC 曲線を引いたところ Area under the curve (AUC) が 0.893 となり、この ROC 曲線を基に算出された cut-off 値 1 を CTC の閾値と設定し、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=0.052)、その他の因子と CTC の有無には相関を認めなかった。周術期の CTC の増減に注目し、高リスク群：術前 CTC 陽性で術後 1 週間あるいは術後 1 か月に術前より増加する群、中リスク群：術前 CTC 陽性で術後 1 週間と術後 1 か月が術前より減少する群、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) だった。 Kaplan-Meier の生存曲線では、全患者では p=0.00024、進行癌の患者のみでは p=0.0103 と、層別化の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 9.5% (2/21) であり、多くの症例は N-cadherin を発現する CTC だった。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もあるが本研究では差は認めなかった。CTC の同定を時系列的に把握することで病勢を判断することが可能になることがあり、化学療法前後での取り組みはすでに報告されている。今回我々は胃癌周術期の CTC の動態を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。今回、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 と大きな進行癌だからこそ遠隔臓器での肉眼的な血行性転移は認めなかったが、CTC としては検出された可能性は高いと考える。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にターゲットを拡大した実験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 を検出するのに非常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。