

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Integrated fluorescent cytology with nano-biologics for peritoneally disseminated gastric cancer patients

(胃癌腹膜播種に対するナノバイオ医薬品を用いた蛍光細胞診)

渡邊めぐみ、香川俊輔、栗田和也、橋本悠里、重安邦俊、石田道弘、坂本修一、伊藤雅典、菊地覚次、黒田新士、岸本浩行、富田秀太、吉田龍一、田澤 大、浦田泰生、藤原俊義

Cancer Science 109:3263-3271,2018

平成 27 年 4 月 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016 に発表

主 論 文

Integrated fluorescent cytology with nano-biologics in peritoneally disseminated gastric cancer

(胃癌腹膜播種に対するナノバイオ医薬品を用いた蛍光細胞診)

[緒言]

胃癌が進行すると、癌細胞は漿膜に浸潤し、腹腔内で生き残った癌細胞が腹膜播種転移を引き起こす。胃癌において、腹膜播種は最も多い転移様式であり、ひとたび腹膜播種をおこすとその予後は極めて不良である。肉眼的に播種転移を認めない場合でも、腹腔内から癌細胞が検出されればその予後は不良となるため、進行胃癌手術ではルーチンに腹腔洗浄細胞診が行われる。腹腔洗浄細胞診陽性症例は stage IV に分類され、全身化学療法が行われる。このように腹腔洗浄細胞診は胃癌治療を選択する上で不可欠な検査だが、少数の癌細胞を検出することは難しく、形態学的な検出法であるがゆえに判定者の技量に頼るところが大きい。さらに、細胞診陽性患者の中でも急速な転帰をたどる症例もあれば、比較的長期の予後を得られる症例もあり、これは、従来の細胞診において、ごく少数の癌細胞の検出や、生きている癌細胞の検出に限界があるためと考えられる。従って、活性化した癌細胞を検出する新たな細胞診が開発できれば、胃癌症例の細胞学的な評価や層別化が可能になると考えられる。

本研究で我々は、テロメラーゼ活性依存的に増殖するウイルスを腹腔内の癌細胞検出に応用した。テロメスキャン (OBP-401) はテロメラーゼ活性依存的に増殖するアデノウイルスで、hTERT プロモーターによりウイルス増殖に関わる E1A や E1B の発現が促され、さらに GFP 蛋白も発現することで細胞が緑色蛍光を発する。テロメラーゼはほとんどの癌腫で活性化しており、その活性化は hTERT 遺伝子のプロモーター活性と相関するため、テロメスキャンにより、多数の正常細胞の中から癌細胞だけを緑色蛍光細胞として検出できる。今回我々は、胃癌患者の腹腔洗浄液中の癌細胞をテロメスキャンで検出し、テロメスキャン陽性細胞と患者予後との関係について調べた。また、テロメスキャン陽性細胞が GFP 蛋白を発現することを利用し、FACS を用いた細胞分離を行い、次世代シーケンサーで遺伝子解析を行った。

[材料と方法]

細胞株と組み換えウイルス

肺癌細胞株の H1299 を使用した。テロメスキャンはテロメラーゼ活性依存的に増殖するアデノウイルスで、hTERT プロモーターにより E1A、E1B が発現する。

患者と臨床検体

2011 年 3 月から 2015 年 10 月までの、計 491 例の胃癌症例のうち、術中に腹腔洗浄液を得られた 68 例の胃癌患者を対象とした。ダグラス窩 (場合により左横隔膜下からも) より、腹腔洗浄

液を 100~200ml 回収し、半分を従来の病理学的細胞診に提出し、残り半分をテロメスキャンの細胞診に使用した。

GFP 陽性細胞の定量化

臨床検体は、溶血の後、細胞成分のみ分離し、生存細胞数を数えた。生存細胞数に応じて、1MOI のテロメスキャンを感染させ、37°C で、24 時間、ゆっくり攪拌しながら培養した。その後、蛍光顕微鏡下に GFP 陽性細胞数を数えた。テロメスキャンに感染させた H1299 を GFP 陽性細胞として、マイクロプレートリーダーにより GFP 蛍光強度を測定し、GFP 蛍光強度から GFP 陽性細胞数を計算できるようにした。

免疫蛍光染色

CD45、カルレチニン、上皮系マーカーのサイトケラチン(CK)・サイトケラチン 19、マクロファージマーカーの CD14 を使用した。

GFP 陽性/CD45 陰性細胞からの DNA 抽出

腹腔洗浄液は、24 時間のテロメスキャン感染の後、CD45 で免疫蛍光染色を行い、GFP 陽性かつ CD45 陰性の細胞のみを FACS セルソーティングで分離した。集めた細胞の DNA を抽出した。

次世代シーケンサーによる遺伝子解析

抽出された DNA は定量的 PCR で評価した。29 の胃癌遺伝子のパネルで標的エクソンを増幅し、MiSeq でディープシーケンスした。

統計

GFP 陽性細胞数は細胞診の結果や臨床病理学的データと比較した。生存曲線はカプランマイヤー法で検討し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計解析は JMP を用い、臨床病理学的データは t 検定やカイ二乗検定で解析した。

[結果]

テロメスキャンによる癌細胞の可視化

テロメラーゼ活性依存的に増殖する 5 型アデノウイルスの、CMV プロモーター下流に GFP 遺伝子を挿入してテロメスキャンを作成した。テロメスキャンは、腹腔洗浄液中に多数の正常細胞が存在していても癌細胞だけを可視化することができた。胃癌患者から採取した検体を溶血し、細胞沈査に 1MOI のテロメスキャンを加えて 24 時間培養し、蛍光顕微鏡で GFP 陽性細胞数を計測した。

テロメスキャン陽性細胞の蛍光強度の定量化

テロメスキャンによる癌細胞検出は蛍光による検出であるため、主観的な細胞学的判定を必要としない点が有用である。テロメスキャンに感染している GFP 陽性細胞と、テロメスキャンに感染していない GFP 陰性細胞とを、様々な割合で混ぜて、マイクロプレートリーダーで GFP 蛍光強度を測定した。蛍光強度から GFP 陽性細胞数を計算した。臨床検体の GFP 蛍光強度も同様に測定し、GFP 陽性細胞数を計算した。

腹腔内のテロメスキャン陽性細胞の多色染色

細胞診陽性患者のテロメスキャン陽性細胞の検索のため、免疫細胞化学的な多色染色を行った。腹腔洗浄液中のテロメスキャン陽性細胞は CK 陽性で CD45 陰性であり、そういった細胞は上皮性の細胞であるため、癌細胞と考えられた。これらの細胞はカルレチニンなどの中皮細胞マーカーを発現しておらず、中皮細胞である可能性は否定的であった。GFP 陰性/CK 陰性/CD45 陽性細胞が癌細胞周囲に存在していたが、これらの細胞はマクロファージなどの白血球であると考えられた。テロメスキャン陽性細胞のまわりに、テロメスキャン陰性/CD45 陽性細胞が集まり、クラスターを形成していた。テロメスキャン陽性細胞の多くは CK を発現していたが、時に CK を発現していないテロメスキャン陽性細胞も存在し、上皮マーカー発現の消失、つまり、上皮間葉移行 (EMT) が起きている可能性が示唆された。また、テロメスキャン陰性/CK 陽性/CD45 陰性細胞も認められたが、これは死んでいる癌細胞を検出したと考えられた。以上により、テロメスキャンは腹腔洗浄液中の癌細胞を EMT の有無に関わらず検出することができ、生きている、より悪性度の高い癌細胞を検出できることが示された。

従来細胞診との比較

2011年3月から2015年10月にかけて、胃癌手術で採取された腹腔洗浄液を用いて、テロメスキャンによる細胞診を行った。計68検体を解析し、GFP陽性細胞数についてのROC曲線を描き、GFP陽性細胞数100個以上をテロメスキャン陽性とした。患者の臨床病理学的特徴について解析したところ、化学療法としては、S-1単独療法、S-1+シスプラチン、パクリタキセル、S-1+ドセタキセル+トラスツズマブを用いていた。T因子、N因子、P因子については、胃癌取扱い規約に準じて分類したが、進行症例ほどテロメスキャン陽性であった。68例中、21例で従来の細胞診が陽性であり、47例で陰性であったが、21例の細胞診陽性症例のうち14例がテロメスキャン陽性、47例の細胞診陰性症例のうち36例がテロメスキャン陰性で、有意な差を認めた ($p=0.0006$)。細胞診の結果に基づく、テロメスキャンによる細胞診の特異性、感受性、正確性は、76.7%、66.7%、73.5%であった。

テロメスキャンによる腹腔洗浄細胞診を用いた胃癌予後の層別化

従来の細胞診の陽性症例と陰性症例では有意に陽性症例の予後が不良であったが ($p=0.0011$)、テロメスキャン陽性症例とテロメスキャン陰性症例でも予後に有意な差を認めた ($p=0.0126$)。さらに、21例の細胞診陽性症例のうち、テロメスキャン陽性の14例はさらに予後不良であった。

($p=0.0062$)。生存期間中央値は、テロメスキャン陽性症例は 235 日であったのに対し、テロメスキャン陰性症例は 671 日であった。テロメスキャン陽性症例と陰性症例で、患者背景（年齢、性別、組織型、肝転移）には差をみとめなかったが、テロメスキャン陽性症例では腹膜播種を伴う症例が 9 例であったのに対し、テロメスキャン陰性症例では 1 例のみであった。しかし、これらの腹膜播種症例を除いても、テロメスキャン陽性症例とテロメスキャン陰性症例の予後には有意差を認めた。テロメスキャンによる細胞診で細胞診陽性症例の予後を層別化でき、従来の細胞診とテロメスキャンによる細胞診とを組み合わせることで、より予後不良な症例を選別できると考えられた。

遺伝子解析のための蛍光による癌細胞補足

テロメスキャン陽性癌細胞を補足し、遺伝子解析を行った。細胞沈査に IMOI でテロメスキャンを感染させ、CD45-PE で標識し、多レーザーFACS で細胞を分離した。抽出された DNA は 29 の胃癌遺伝子パネルを用いて解析した。774 の遺伝子変異（SNP・欠失・挿入・点変異含む）を検出することができたが、その意義は不明瞭であった。さらなる大規模な試験が必要ではあるが、テロメスキャンを用いた細胞診と癌細胞補足は、胃癌腹膜播種の遺伝子解析において有用な技術であると考えられた。

[考察]

テロメスキャンにより腹腔洗浄液中の生きている胃癌細胞の検出と定量化ができ、予後予測に有用であることがわかった。テロメスキャンによる細胞診と従来の細胞診とを組み合わせることで、胃癌患者の予後をより正確に層別化できる可能性が考えられた。また、テロメスキャンによる GFP を用いた細胞補足で、腹腔内の播種細胞の遺伝子解析が可能になると考えられた。マルチモードマイクロプレートリーダーによりテロメスキャン陽性細胞の定量化が自動的に行えるようになれば、より多くの検体を解析することができ、テロメスキャンによる細胞診の有用性をさらに検討できると考えられた。

従来の腹腔洗浄液細胞診は現時点で最も広く行われている検査ではあるが、さらに診断能を向上させるために様々な検出法が研究されている。PCR を用いた検出法は広く開発されているが、胃癌特異的なマーカーが存在しないことが問題点である。一方、テロメラーゼ活性依存的なウイルスを用いた検出法は、テロメラーゼが多癌腫で発現しているため、汎用性という点で優れている。加えて、ウイルスの感染と増殖のためには、細胞が生きていることが必要となるため、テロメスキャンは生きている癌細胞を検出でき、テロメスキャン陰性かつ CK 陽性細胞は、死んだ癌細胞ということになる。テロメスキャンによる細胞診は従来の細胞診を補完する役割をもち、従来の細胞診で陽性となった患者のさらなる層別化を行うことができ、より強力な化学療法や腹腔内化学療法の適応決定に有用であると考えられる。

癌細胞の免疫組織化学的検索では一般的に上皮系マーカーである EpCAM や E-カドヘリンが使われるが、転移して EMT を起こしている段階の細胞では上皮系マーカーは発現していない。テ

ロメスキャン陽性細胞はCKを発現しているものと、発現していないものの両方を認めたが、後者はEMTの段階にある癌細胞と考えることができる。テロメスキャンによる細胞診はEMTの有無に関わらず癌細胞を検出できることが示唆された。

癌細胞の遺伝子検索では、多くの場合原発巣の癌細胞が対象となるが、転移巣の癌細胞の検索こそが癌そのものの悪性度を反映する。したがって、予後をより正確に予測するためには、腹腔内遊離癌細胞の遺伝子情報が有用である。今回検索した腹腔内遊離癌細胞の遺伝子変異と臨床的予後の関係についてはさらなる検討が必要だが、テロメスキャンにより腹腔内遊離癌細胞を捕捉し、29の胃癌遺伝子を次世代シーケンサーで検索するためのDNA量を十分に得ることができた。

テロメスキャンによる細胞診の問題点としては、感染に24時間必要であるため、従来の細胞診のように、術中の迅速細胞診として行うことはできない点があげられる。しかし、そのかわり、従来の細胞診と組み合わせて、術後の化学療法などの治療を考える際の参考になる。例えば、審査腹腔鏡後にどの化学療法を選択するか考える際にも有用である。

もうひとつの問題点としては、今回の検討では、症例数も少なく、その背景もそろっていないため、従来の細胞診陰性症例でのテロメスキャン陽性と陰性の臨床的意義がはっきりしなかった。今後、大規模な他施設共同研究で前向き臨床試験を行うことで検討していく必要があると考えられた。

[結論]

今回、テロメスキャンにより、腹腔洗浄液中の生物学的悪性度の高い腹腔内遊離胃癌細胞を検出ことができ、その存在は予後と関連していた。また、テロメスキャン陽性細胞は蛍光強度の自動測定で検出できた。この技術が、腹腔洗浄液から新たな情報を引き出し、進行胃癌の予後向上の一助となることを期待する。