

論文要旨

Carcinoembryonic Antigen Messenger RNA Expression in Blood Predicts Recurrence in Esophageal Cancer

〔 食道癌術後患者の血液中CEA-mRNAの発現は再発を予測する 〕

瀬戸山 徹郎

【目的】

食道癌は根治術後のも再発を来す予後不良な消化器癌の一つである。したがって早期の再発診断が重要な課題の一つである。術後外来経過観察中の再発診断は血清腫瘍マーカー (CEA、 SCC) や画像診断で行われているのが現状である。近年、遊離癌細胞(Isolated tumor cells : 以下 ITC)は癌患者の血液、骨髄、リンパ節、腹水で検出可能となった。われわれはこれまでに食道癌、胃癌、膵臓癌において手術中の血中 CEA を標的とした nested RT-PCR 法による ITC 検出が再発と有意に相関することを報告してきた。

また、定量性のある real-time fluorescence PCR 法は従来の nested RT-PCR 法と比べ、ITC の検出により特異的である。早期に再発診断が可能になれば早期治療により予後の改善が期待される。本研究では食道癌根治術後の外来経過観察中の血中 ITC の臨床的意義について検討した。さらに従来の画像診断や血清腫瘍マーカーと比較して、血中 ITC の検出が画像診断では明らかでない再発に有用であるか解析した。

【対象と方法】

- 1) 対象:1999年7月から2004年6月まで食道癌の根治切除後に外来で経過観察がされている106例を対象とした。画像で新規病変が見られた時に再発と診断した。平均観察期間は27.9ヶ月であった。
- 2) 採血方法:3ヶ月毎の外来経過観察時に末梢静脈血を採取した。上皮細胞の混入を避けるために最初の6mlは廃棄した。
- 3) RT-PCR法:血中ITCはCEAをprimerとしてCEA-mRNAの発現をLightCycler(Roche社製)により測定した。さらに内因性遺伝子である glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)- mRNAの発現も同様の方法で測定し、CEA mRNA発現をこの値で除した。健常人70名の上限をカットオフの値とし、陽性陰性に分けた。

【結果】

- 1) 外来経過観察例 106 例中、CEA-mRNA 陽性を 39 例(36.8%)に認めた。
- 2) CEA-mRNA 陽性は深達度、リンパ節転移、臨床病期、血管侵襲と有意に相関がみられた。
- 3) 画像診断による再発は 34 例に確認され、CEA-mRNA 陽性例を 28 例(76.5%)に認めた。この 28 例中 CEA-mRNA 陽性所見が画像再発診断より先行、同時、後行であった症例は各々 18 例(52.9%)、8 例(23.5%)、2 例(5.9%)であった。
- 4) CEA-mRNA の再発に対する感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率はいずれも血清 CEA、SCC より高かった。
- 5) 多変量解析で CEA-mRNA 陽性は無再発生存期間に対する独立因子であった。

【考察】

食道癌術後の長期にわたる経過観察中の CEA-mRNA の発現を調べ、かつ血清 CEA、SCC と比較検討した研究は見当たらない。これまでの大腸癌の報告では術後の ITC 発現と再発の関係に関しては一定の見解が得られていない。これらの報告では術後 3 ヶ月以内に 1~2 回のみ血液採取である。本研究は 3 ヶ月毎の外来受診に採血を長期にわたって行い、血清 CEA、SCC と比較検討を行った。

本研究では再発 34 例中 26 例が画像による再発診断以前に CEA-mRNA が陽性であり、陰性群と比べて再発率が有意に高かった。CEA-mRNA 陽性所見は画像診断よりも平均約 6 ヶ月早く認められ、再発を早期に指摘しうることがわかった。血清 CEA、SCC と比較しても画像再発診断より前にあるいは同時に再発を指摘できた割合は CEA-mRNA で 76.4%に比べ、血清 CEA、SCC では各々 35.3%で CEA-mRNA で高率であった。CEA-mRNA は食道癌の再発予測のマーカーとなる可能性が考えられた。CEA-mRNA 陰性であった 69 例のうち 8 例に再発がみられたが、6 例はリンパ節再発であった。CEA-mRNA 陰性の理由は血行性再発と比較して再発リンパ節周囲の血流の過少が考えられた。その CEA-mRNA 陰性 6 例のうち、血清 CEA は 4 例で上昇、血清 SCC は 2 例で上昇していた。したがって、CEA-mRNA と腫瘍マーカーを併せて評価することが再発の予測に有用であると考えられた。

CEA-mRNA 陽性で画像上で明らかな再発の認められていない症例では再発の高危険子群とみなして CEA-mRNA 陽性時点で追加治療を考慮する必要があると考えられる。迅速な治療開始によって予後改善につながると考えられた。本研究により血中 CEA-mRNA の検出は新たな腫瘍マーカーになりうると思われる。

(Clinical Cancer Research, volume12, issue 20:5972-7, 2006 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 647号	氏名	瀬戸山 徹郎
審査委員	主査	黒野 祐一	
	副査	丸山 征郎	松山 隆美

Carcinoembryonic Antigen Messenger RNA Expression in Blood Predicts Recurrence in Esophageal Cancer
Clinical Cancer Research 20:5972-7, 2006
(食道癌術後患者の血液中 CEA-mRNA の発現は再発を予測する)

食道癌は予後不良な消化器癌の一つであり、早期の再発診断が重要な課題の一つである。再発診断は血清腫瘍マーカー (CEA, SCC) や画像診断で行われているのが現状である。早期に再発診断が可能になれば早期治療により予後の改善が期待される。近年、遊離癌細胞(Isolated tumor cells: 以下 ITC)が癌患者の血液、骨髄、リンパ節、腹水で検出可能となった。

本研究では食道癌根治術後の外来経過観察中の血中 ITC の臨床的意義について検討した。さらに従来の画像診断や血清腫瘍マーカーと比較して、血中 ITC 検出の再発診断に関する有用性について解析した。

1999年7月から2004年6月まで食道癌の根治切除後に外来で経過観察がされている106例を対象とし、画像で新規病変が見られた時に再発と診断した。3ヶ月毎の外来経過観察時に末梢静脈血を採取した。血中 ITC は CEA を primer として CEA-mRNA の発現を LightCycler (Roche 社製) により測定した。さらに内因性遺伝子である glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)- mRNA の発現も同様の方法で測定し、CEA mRNA 発現をこの値で除した。健康人70名の上限をカットオフの値とし、陽性と陰性に分類した。

その結果、本研究では以下の知見が得られた。

- 1) 外来経過観察例 106 例中、CEA-mRNA 陽性を 39 例(36.8%)に認めた。
- 2) CEA-mRNA 陽性は深達度、リンパ節転移、臨床病期、血管侵襲と有意な相関がみられた。
- 3) 画像診断による再発は 34 例に確認され、CEA-mRNA 陽性例を 28 例(76.5%)に認めた。この 28 例中 CEA-mRNA 陽性所見が画像再発診断より先行、同時、後行であった症例は各々 18 例(52.9%)、8 例(23.5%)、2 例(5.9%)であった。
- 4) CEA-mRNA の再発に対する感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率はいずれも血清 CEA, SCC より高率であった。
- 5) 多変量解析で CEA-mRNA 陽性は無再発生存期間に対する独立因子であった。

本研究では食道癌術後の長期にわたる経過観察中の CEA-mRNA の発現を調べ、かつ血清 CEA, SCC と比較検討している。CEA-mRNA 陽性群は陰性群と比べて再発率が有意に高く、また、CEA-mRNA 陽性所見は画像診断よりも平均約 6ヶ月早く認められ、再発を早期に指摘しうることがわかった。血清 CEA, SCC と比較しても画像再発診断より前あるいは同時に再発を指摘できた割合は CEA-mRNA で高率であった。以上の結果から、CEA-mRNA は食道癌の再発予測のマーカーとなり、CEA-mRNA 陽性で画像上で明らかな再発の認められていない症例では再発の高危険子群とみなして CEA-mRNA 陽性時点で追加治療を考慮する必要があると考えられた。そして、こうした迅速な治療開始が予後改善につながると考えられた。本研究は血中 CEA-mRNA の検出が新たな腫瘍マーカーになりうることを示唆したもので非常に重要かつ意義深い内容を含んでいる。

よって本研究は、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 647 号	氏名	瀬戸山 徹郎
審査委員	主査	黒野 祐一	
	副査	丸山 征郎	松山 隆美

主査及び副査の3名は、平成19年1月22日、学位申請者 瀬戸山 徹郎 氏に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めるとともに、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 研究の対象症例で術後に追加治療はなされなかったのか？

回答) 画像による再発が明らかになった時点で治療を行った。CEA-mRNA 陽性時点での治療は行わなかった。

質問2) 画像再発時点で治療をしたことで予後の解析に影響してこないか？

回答) 本研究では、無再発生存の検討を行っており、再発までの解析であるから、治療の影響は受けない。

質問3) total RNA 抽出の段階でリンパ球を含む有核細胞を比重で分離しているが、同時に沈殿する癌細胞はないのか？

回答) 過去に検討した論文があるかは不明であるが、この比重遠心法が一般的な方法でおそらく沈殿する癌細胞はないと思われる。

質問4) 論文の結果の中で CEA-mRNA 陽性は39例とあるのに Table 1 などでは CEA-mRNA が37例であるのは何故か？

回答) 画像再発の後に CEA-mRNA が陽性となったものが2例あった。Table1などでは、その2例を省いて検討している。

質問5) CEA-mRNA score の数値と臨床病理因子との関係はなかったのか？画像再発がはっきりしてくれば CEA-mRNA score の数値があがってくるというはなかったのか？

回答) CEA-mRNA score の数値と関係ある因子もあった。カットオフを設定した解析はより簡便で臨床的と考えられた。画像再発がはっきりしてくれば CEA-mRNA score の数値があがってくるという症例や、逆にそうでない症例もみられた。

質問6) Figure 1 で CEA-mRNA が陰性であれば1.5年程で無再発生存率はそれ以上低下していないが、1年半再発がなければ食道癌が完治したと考えてはいけないのか？

回答) 食道癌術後再発に関して、血行性再発は術後2年以内で起こってくるのが一般的である。その現象を反映していると考えられる。血行性再発に関してはとくに術後2年間は重点的に血中 CEA-mRNA 検索していくことが重要と考えられる。

質問7) 他の消化器癌においても遊離癌細胞の存在と予後との関係は言われているのか？

回答) 他の消化器癌、大腸、胃、膵臓などの癌でも遊離癌細胞の存在と再発、予後との関係の報告が散見される。

質問8) 上大静脈と末梢動脈での CEA-mRNA 発現を比較したスライドがあったが、有意差はないものの末梢動脈の方が検出率が高かったが、それは何故か？

回答) 食道の血流を還流する静脈は上大静脈、下大静脈がある。そのうち、上大静脈しか見ておらず、半分しかみていないと考えられる。末梢動脈は全てを観察できていると考える。

質問9) ITC がでている症例で放射線化学療法を行うと検出率が下がるといったことはないのか？

回答) 再発例や手術不能例に対して治療前後で ITC の比較を行っているが、治療効果のあった症例ほど血中 ITC 検出率が下がっていくことを確認している。したがって、放射線や化学療法の効果判定の一助になると考えている。

質問10) 原発食道癌からでてきた ITC なのか、それともすでに原発巣とは関係ない癌組織に起源を持つ ITC なのか？

回答) この研究では手術してすでに原発巣が取り除かれている。転移を形成した病巣からの血中へ出てくる ITC を検出していると考ええる。

質問11) 現在、tumor stem cell が注目されているが、これが CEA-mRNA の発現が強い可能性などがあるか？

回答) 消化器癌の tumor stem cell は最近その概念が提唱されてきている。Tumor stem cell は何らかの遺伝子を発現しているが、CEA-mRNA どうかはなのかどうかは現在のところ不明である。

質問 12) 逆流性食道炎の一部が癌化するが、この CEA-mRNA の評価などは使えないのか？

回答) 基本的に炎症は評価できないシステムとなっている。ただし、癌の発生に炎症は関連が深く、癌化した時点で血液中に CEA-mRNA 発現を来す可能性はあると考える。

質問 13) CEA-mRNA は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、接着機能を持っていると考えられるが、CEA-mRNA が発現することで転移を形成しやすいということはないのか？

回答) これまでのカドヘリンを中心とした接着因子の検討から、癌細胞の接着の低下は転移に相関すると考えられる。CEA-mRNA の発現が転移をしやすいかどうかは今後の検討課題と思われる。

質問 14) 術後経過観察中 1 回でも CEA-mRNA が陽性となれば陽性としているのか？

回答) 今回の研究では 1 回でも CEA-mRNA が陽性となれば陽性とした。

質問 15) これらの 106 例の症例では術中全て CEA-mRNA は陽性であったのか？

回答) 106 例中 57 例が術中の CEA-mRNA も併せて検討している。57 例中 38 例で術中に CEA-mRNA が陽性であった。さらに術中陽性 38 例中 22 例が外来経過観察で陽性であった。一方、術中陰性 19 例中 3 例が外来経過観察で陽性であった。

質問 16) 外来で検出される CEA-mRNA は原発巣癌細胞の術中の揉みだしを検出しているのか？

回答) すでに形成されていた転移巣からの血液中へ癌細胞がでてきているのではないかと考える。

質問 17) 外来で再発をきたすにもかかわらず、CEA-mRNA が陽性になったり、陰性に戻ったりするのは何故か？

回答) 過去の報告にもあるが、癌巣から血液中に出て行く癌細胞のスピードは必ずしも一定ではなく、むらがあると考えられる。さらに遊離癌細胞の量にも依存すると考えられるために、陽性になったり、陰性になったりすると考えられる。

質問 18) 肺転移などは再発なのか、転移なのか？

回答) 肺転移などは血行性転移で一つの再発形式と考える。再発形式の中に血行性再発、リンパ節再発、局所再発。複合再発が有ると考える。

質問 19) CEA-mRNA と血清 CEA の違いは？

回答) 基本的に違うものをみている。CEA-mRNA は上皮に存在する遺伝子であり、今回検出した癌の上皮成分を検出している。血清 CEA は癌組織が分泌する糖蛋白である。

質問 20) 男女で CEA-mRNA 発現に有意差があるが何故か？

回答) 食道癌でステージを揃えて男女差と予後を見ていくと女性が有意に良好である。食道癌に関連する p53, cyclin D1 の発現を調べたが差はなかった。女性ホルモンとの関連性も文献的には無いとする報告がある。したがって他の遺伝子の関与も考えられる。また、免疫などを含め、女性の方が体力が優れると考えられる。予後が良いということは再発も少ない。CEA-mRNA は再発をみているため、女性のほうが CEA-mRNA 発現が少ないと考えられる。

質問 21) 扁平上皮癌の分化度で CEA-mRNA 発現に差があるが何故か？

回答) 細胞接着因子の観点から高分化であるほど接着力が強く、癌は病巣から遊離しにくい。逆に分化度が低ければ接着力が弱く、癌は病巣から離れて、血液中に散布されやすいと考えられる。

質問 22) 化学療法を行った再発症例で CEA-mRNA 発現と治療効果の関係は認められなかったか？

回答) 現在食道癌再発治療例で CEA-mRNA 発現と治療効果の検索を行っているが、治療効果のあった症例では治療前後で CEA-mRNA の発現が少なくなってきたことを確認している。

質問 23) CEA-mRNA 発現は血液中癌細胞の悪性度をみているのか、存在診断なのか？

回答) 癌から遊離された血中の上皮をみているため存在診断の一つである。遊離されやすい癌細胞という観点からは悪性度をみている可能性もある。

質問 24) 血清 SCC は食道癌においてどのような位置付けなのか？

回答) 経過観察中に SCC の上昇した症例は再発が多くみられるが、再発していても SCC が上昇しない症例も多い。再発に対する補助的な診断として使われている。今後は、血中遊離癌細胞が新規マーカーになると考えている。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。