

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390382

研究課題名（和文）：消化器癌のリンパ節微小転移の臨床的意義の解明

研究課題名（英文）： Investigation of clinical significance of lymph node micro metastasis in gastro intestinal cancer.

研究代表者：夏越 祥次 (NATSUGOE SHOJI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70237577

研究成果の概要（和文）：

消化器癌のリンパ節微小転移に関して、免疫染色、RT-PCR 法により臨床的意義を検討した。微小転移の診断は sentinel node navigation surgery のような縮小手術には有用であり、術中診断に臨床応用可能と考えられた。Microarray により、リンパ節転移に関係するいくつかの遺伝子を同定でき、臨床的な意義がみられた。食道癌の術前化学放射線治療はリンパ節微小転移に有効であることが明らかとなった。リンパ節微小転移の形成にはリンパ管新生因子やケモカインが関与していた。実験的に少ない癌細胞でも着床能力が認められ、今後の治療に有用な情報を提供すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In the clinical significance of lymph node micrometastasis (LMM), LMM was examined by immunostaining and RT-PCR. The diagnosis of LMM is clinically useful for less invasive surgery such as sentinel node navigation surgery. Some genes related with lymph node metastasis were found by microarray method. Such genes correlated well with clinical samples of gastrointestinal cancer. Preoperative chemo-radiation therapy was effective for LMM in esophageal cancer. The factors of lymphangiogenesis and chemokines were important for the formation and growth of LMM. In experimental study, a few cancer cells had growth ability and such result may offer important information for cancer treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 5,200,000 | 1,560,000 | 6,760,000 |
| 2010年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 2011年度 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 12,900,000 | 3,870,000 | 16,770,000 |

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：リンパ節転移，微小転移，サイトケラチン染色，RT-PCR，Gene Search System，センチネルリンパ節，ケモカイン，リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで一貫して消化器癌のリンパ節転移に関連する遺伝子の検索、原発巣の悪性度評価とリンパ節転移との関連、あるいはリンパ節微小転移の検出法とその臨床的意義について研究を行ってきた。そして、リンパ節微小転移例は食道癌や胃癌では予後不良因子であることや原発巣の接着因子の低下やリンパ管新生因子の発現が微小転移と関連があることを見出し報告してきた。また、微小転移の形態学的検討から cluster を形成する転移巣と single cell の転移巣があり、それらが原発巣の腫瘍の分化度に関連があることを報告してきた。これまでに行われてきた臨床画像診断では可視可能なリンパ節転移の存在は診断可能となってきた。これらの診断は各々の症例の治療の個別化には重要な情報を提供するが、さらに腫瘍の分子生物学的診断を応用した個別化治療が必要と考えられる。すなわち、これからは目に見える転移のみならず目に見えない転移との戦いが癌治療の個別化に重要と考える。

申請者らはこれまでリンパ節微小転移巣に関して免疫組織学的方法や RT-PCR 法によりその存在と臨床的意義を報告してきた (Cancer 83:858, 1998, Oncology 58:38, 2000; Cancer Letter 159:119, 2000, Cancer Lett. 153:189, 2000; Ann Surg Oncol. 8:158, 2001; DisEsophagus14:143, 2001; Surgery; 131:630, 2002, Am Surg 69:573, 2003, Br J Surg 90:563, 2003, World J Surg 27:455, 2003). さらに原発巣の悪性度の解析とリンパ節転移との関連に関して報告してきた (Clin Cancer Res. 10:8413, 2004, Clin Cancer Res. 11:1174, 2005, Clin Cancer Res. 12:3740, 2006, Br J Cancer. 95(5):634, 2006, Clin Cancer Res. 12:5972, 2006, Oncol Rep. 17:517, 2007, Br J Surg. 94:984, 2007). 本研究ではリンパ節微小転移の臨床的・基礎的研究の意義を追求する。

2. 研究の目的

本研究の目的はリンパ節微小転移の着床・増殖機序を明らかにすることにより、臨床的に手術によるリンパ節郭清などにより対処すべきリンパ節微小転移を明確にすることである。そのために個々の微小転移癌巣の悪性度の解析、周囲の間質における免疫応答との関連について明らかにしていくことである。目に見えない転移の一つであるリンパ節微小転移の診断と意義について分子生物学的・遺伝子学的に解明することが低侵襲性治療の適応の決定や放射線治療や化学療法の必要な症例の選択に有意義と考えられる。このようなリンパ節微小転移の基礎研究の結

果を臨床に還元することを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) 摘出リンパ節について免疫組織学および RT-PCR 法によるリンパ節微小転移の解析を行う。特に sentinel node navigation surgery の臨床応用に向けて sentinel node の微小転移について詳しく調べる。

(2) 微小転移が存在したリンパ節では laser micro-dissection 法により腫瘍片を採取、さらに原発巣に関しても同様に採取し DNA の抽出を行う。

(3) Gene Search system (SmartCycle II) に用いる primer の選択と設計を行う。至適 primer を数種類に絞込み臨床応用が可能になるように検討する。sentinel node の微小転移を中心に、臨床的に手術中に臨床応用可能になるように方法を確立する。

(4) 術前放射線あるいは化学療法施行後に切除された症例に関してリンパ節微小転移の有無を調べる。治療抵抗性と考えられる残存微小転移巣について解析する。放射線あるいは化学療法後にみられる macrometastasis, micrometastasis, isolated tumor cell で存在するものは生細胞であるか、術前治療をしていない微小転移巣と比べて遺伝子の発現に差がみられるかどうか検討する。

(5) 腫瘍のリンパ管新生因子やケモカインの発現がリンパ節転移と関連するか検討する。

(6) 臨床で凍結保存されているリンパ節のうち微小転移が認められたリンパ節を用いて移植実験を行う。具体的には現在リンパ節の 1/3 は永久保存用, 1/3 は RT-PCR 用, 1/3 は凍結保存している。Cytokeratin 用いた免疫染色あるいは RT-PCR で微小転移がみられたリンパ節について、凍結してあるリンパ節をスキットマウスあるいはヌードマウスに移植し増殖能、浸潤能を観察する

4. 研究成果

(1) Sentinel node (SN) の微小転移の存在について食道癌で検証を行った。134 例の食道癌患者で ^{99m}Tc-Tin colloid を術前に腫瘍周囲に注入して SN を同定後、微小転移を含めた転移状況を検討した。SN 同定は 134 例中 120 例で可能であり、同定率は臨床的深達度 cT1, cT2, cT3 で各々 93.3%, 100%, 87.5%であった。リンパ節転移は 50 例 (41.7%) に見られた。微小転移は 7 例、8 個のリンパ節に新たに発見された。SN が有用である cT1 では 1 例

を除き、微小転移を含めて転移は SN に存在した。cT1 の Sensitivity は 91.7%, False negative rate は 8.3%, Negative predictive value 97.8%, Accuracy rate 98.2% でリンパ節微小転移診断を行うことにより、SN navigation suregry が臨床応用可能と考えられた。

(2) Micro-dissection した微小転移巢の遺伝子解析は、申請者らがこれまで microarray 法によりリンパ節転移と関連する遺伝子、overexpressed gene 42 遺伝子と suppressed gene 138 遺伝子をもとに検討した。これまでに osteopontin などの遺伝子がリンパ節転移の関連遺伝子と考えられた。

(3) Rapid RT-PCR の機器の一つである Gene Search system (SmartCycle II) に用いる primer の選択と設計を検討した。その結果、cytokeratin 19 と mammaglobin の 2 つの至適 primer を選択し、117 例の乳癌症例で用いて SN 転移の臨床的検討を行った。204 個の SN 組織学的転移は 31 個 (15.2%) であった。組織学的転移陰性リンパ節のうち、免疫染色では 4 個の微小転移が見つかった。一方、Gene Search system ではさらに 10 個の微小転移が陽性であり、臨床的に有用な診断手段になると考えられた。

(4) 化学放射線治療後に手術が施行された 20 例 (CRT 群) と手術単独群 23 例 (手術群) の無作為化比較試験を施行した。摘出したすべてのリンパ節に関し、サイトケラチン抗体を用いた免疫染色を行い、微小転移の存在について検討した。両群に治療前の臨床因子に差はみられなかった。原発巣の病理学的所見では CRT 群は手術群に比べて、リンパ管および脈管侵襲が有意に低率であった。リンパ節転移は CRT 群の 30%、手術群の 52% に認められた。さらに微小転移を調べた結果、CRT 群ではみられなかったが、手術群では 17% に認められた。術前化学放射線治療は微小転移には有効であると考えられた。

(5) リンパ節転移に密接に関与するリンパ管新生因子の一つである Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C, VEGF-D の発現と RT-PCR によるリンパ節微小転移との関係について pN0 早期胃癌を用いて検討した。微小転移例は 23.8% に存在しており、原発巣のリンパ管侵襲と有意に関連していた。また VEGF-C・VEGF-D の発現レベルは有意にこれらのリンパ節微小転移と関連していた。早期胃癌においてもリンパ節微小転移は高頻度に存在していることが示唆された。また VEGF-C・VEGF-D 発現レベルの検索は、これらのリンパ節微小転移の予測に意義

があると考えられた。次に腫瘍免疫学的な観点から、癌の浸潤や転移の過程において重要な役割を担っているとされる CCR7・CXCR4 に注目し、これらの発現と胃癌における微小転移を含めたリンパ節転移状況との関係について検討した。CCR7・CXCR4 発現は原発巣のリンパ管侵襲と関連し、CCR7・CXCR4 高発現群は、微小転移を含めたリンパ節転移症例に高頻度に認められた。リンパ節転移の初期段階とされる微小転移との関係が認められた事より、腫瘍免疫に関連する因子の中にもリンパ節転移形成、特に微小転移の形成に重要な遺伝子が存在しており、微小転移を含めたリンパ節転移を把握する上で重要な因子の一つとなることが示唆された。

(6) 臨床検体を NOG マウスに移植し、生着腫瘍を摘出後、細切、トリプシン処理後に単細胞化した。希釈系列を作成し、NOG マウスに再移植し、造腫瘍能の評価を行った。先ず、MKN45, MKN74, NUGC4 の胃癌細胞株である cell line で検討した結果、 1×10^3 個で腫瘍形成が認められた。臨床検体では 50 個の移植で腫瘍形成能が認められた。さらに移植個数の検討を継続中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- 1) Uenosono Y, Natsugoe S et al. Sentinel node navigation surgery is acceptable for clinical T1 and N0 esophageal cancer. Ann Surg Oncol 18: 2003-2009, 2011 (査読有)
- 2) Ishigami S, Natsugoe S, et al. Prognostic impact of CD168 expression in gastric cancer. BMC Cancer 24:106-110, 2011 (査読有)
- 3) Natsugoe S. Neoadjuvant chemoradiotherapy for advanced esophageal cancer. Nihon Geka Gakkai Zasshi 112:111-116, 2011 (査読無)
- 4) Natsugoe S. From uniformed treatment to individualized treatment for superficial esophageal cancer -what is potentially a new approach? Ann Thorac Cardiovasc Surg. 16:1-3, 2010 (査読無)
- 5) Funasako Y, Natsugoe S, et al. Utility of the GeneSearch breast lymph node assay for the rapid evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. Cancer 116:4450-4455, 2010 (査読有)
- 6) Arigami T, Natsugoe S, et al. Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis. Journal of Surgical Oncology

102:748-752, 2010 (査読有)

7) Natsugoe S, Matsumoto M, et al. Clinical course and outcome after esophagectomy with three-field lymphadenectomy in esophageal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 395:341-346, 2010 (査読有)

8) Ishigami S, Natsugoe S, et al. Prognostic impact of Cdl33 expression in gastric carcinoma. *Anticancer Res* 30:5175-5180, 2010 (査読有)

9) Okumura H, Natsugoe S, et al. Nuclear expression of 14-3-3 sigma is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 30:5175-5180, 2010 (査読有)

10) Arigami T, Natsugoe S et al. Vascular endothelial growth factor-C and -D expression correlates with lymph node micrometastasis in pN0 early gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology* 99:148-153, 2009. (査読有)

11) Arigami T, Natsugoe S et al. CCR7 and CXCR4 expression predicts lymph node status including micrometastasis in gastric cancer. *International Journal of Oncology* 35:19-24, 2009 (査読有)

12) Yanagita S, Natsugoe S, et al. The utility of rapid diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer using a multiplex real-time RT-PCR assay. *Oncology* 77:205-211, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 50 件)

1) Natsugoe S, et al. Current Status and Future Perspective of Sentinel Node Navigation Surgery for Gastrointestinal Cancer The International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists 2011年11月11日, Tokyo

2) Natsugoe S, et al. Clinical significance of isolated tumor cells in esophageal and gastric cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer Symposium 2011年9月22日 Osaka

3) Natsugoe S, et al. Minimally invasive treatment for adenocarcinoma of esophago-gastric junction. *International Surgical Week* 2011年8月30日 Yokohama

4) Natsugoe S, et al. Assay as an Intraoperative Diagnostic Tool for Sentinel Lymph Nodes in Patients with Breast and Gastric Cancer. The 7th International Sentinel Node Society Meeting 2010年11月18日 Yokohama

5) Natsugoe S, et al. The Development of RT-PCR Assay as an Intraoperative Diagnostic Tool for Sentinel Lymph Nodes

in Patients with Breast and Gastric Cancer. The 7th International Sentinel Node Society Meeting 2010年11月18日 Yokohama

6) Natsugoe S, et al. The Clinical Utility of Laparoscopic Gastrectomy Based on Sentinel Node Concept in Patients With Early Gastric Cancer The 7th International Sentinel Node Society Meeting 2010年11月18日, Yokohama

7) Natsugoe S, et al. Assessment of lymph node metastasis in esophageal cancer using ultrasound and endoscopic ultrasound. The 12th World Congress of International Society for Disease of the Esophagus. 2010年9月5日 Kagoshima

8) Natsugoe S, et al. Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis The 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society 2010年8月25日, Gifu

9) Natsugoe S. Current Status and Future Perspective of Sentinel Node Navigation Surgery for Gastric Cancer. The 2nd National Yang-Ming University Hospital International Symposium. 2010年6月27日 Taiwan

10) Natsugoe S, et al. Identification of micrometastasis in sentinel node using immunohistochemical staining and RT-PCR for gastric cancer. The 8th International Gastric Cancer Congress 2009年6月11日 Krakow, Poland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏越 祥次 (NATSUGOE SHOJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：70237577

(2) 研究分担者

石神純也 (ISHIGAMI SUMIYA)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：90325803

松本正隆 (MATSUMOTO MASATAKA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・客員
研究員

研究者番号：40398293

喜島祐子 (KIJIMA YUKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：60381175

上之園芳一 (UENOSONO YOSHIKAZU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任
准教授

研究者番号：60398279

内門泰斗 (UCHIKADO YASUTO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：30464465