

氏 名	木村 恭彰
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 732 号
学位授与年月日	令和 7 年 3 月 17 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	切除不能進行・再発胃癌における循環腫瘍細胞の解析による血液モニタリングシステムの実用化の検討
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 山口 博紀 (委 員) 教授 細谷 好則 教授 眞嶋 浩聡

論文内容の要旨

1 研究目的

胃癌における HER2 ステータスの評価は、HER2 標的療法の適応を決定する上で重要である。しかし、従来の組織検体を用いた評価では、腫瘍の空間的および時間的不均一性により、HER2 陽性が過小評価される可能性が指摘されている。腫瘍内では 24%、原発巣と転移巣では 17%の差異が報告されており、不均一性を克服するための繰り返しの組織検査は、侵襲性が高く、転移巣や再発例での適応が困難である。そこで我々は、リキッドバイオプシーに注目した。リキッドバイオプシーは血液検索により腫瘍の特徴を評価する技術であり、低侵襲でリアルタイムに腫瘍の動態を把握できる利点を持つ。特に循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells; CTC) を用いることは、直接 HER2 発現を評価できると同時に、腫瘍の遺伝子変異やその他のタンパク発現を評価することが可能となる。

本研究の目的は、CTC 解析を通じて HER2 ステータスや腫瘍特性を評価し、組織に変わる新たな診断プラットフォームとして CTC の有用性を明らかにし、HER2 標的療法の適応拡大に寄与することである。

2 研究方法

【対象とデザイン】

自治医科大学附属さいたま医療センターで切除不能進行・再発胃癌に対して初回化学療法が導入された患者 27 人を対象とした。組織及び CTC の HER2 発現を評価し、その発現性から患者を 3 群に分け無増悪生存期間を比較した。

【組織の HER2 評価】

Immunohistochemistry (IHC) 3+もしくは IHC2+かつ fluorescence in situ hybridization (FISH) で HER2/CEP17 比 ≥ 2 の症例を組織 HER2 陽性と診断した。

【CTC の検出】

従来の CTC 検出方法では困難とされていた上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) が進行した CTC を検出可能である On-chip Sort システムを採用した。採取した 4-8mL の全血から On-chip Sort システムによって CTC を検出した。まず溶血処理を行い、デブリと赤血球をフローサイトメトリによって除去する。腫瘍細胞と白血球の集団を繰り返しソーティングすることで純化する。染色で「核+かつサイトケラチン+かつ CD45-」を腫瘍細胞と判断し、回収した。

【CTC の HER2 評価と EMT 評価】

CTC に発現した HER2 タンパクを染色し、その発現強度をフローサイトメトリで判断した。HER2 陽性細胞株 (PC9, HCT116, HT29) および陰性細胞株 (A549) の信号強度を参考に、信号強度 > 50 を CTC HER2 陽性とした。

EMT の進行度を EMT-index として評価した。上皮細胞マーカーであるサイトケラチンと間葉系細胞マーカーであるビメンチンの蛍光強度の比で EMT-index を算出した：(ビメンチンの蛍光強度)/(サイトケラチンの蛍光強度+ビメンチンの蛍光強度)。

【遺伝子パネル検査】組織検体から DNA を抽出した。また CTC から抽出した DNA を用いて、全ゲノム増幅を行った。その後、遺伝子パネル (Oncomine Tumor Mutation Load Assay) を用いて、409 の腫瘍関連遺伝子の遺伝子変異を検出し、胃癌、HER2、EMT に関わる 53 の遺伝子について変異を特定した。

3 研究成果

【患者背景】

切除不能進行・再発胃癌 27 症例のデータを集積した。27 症例中、20 症例が切除不能進行胃癌、7 症例が術後再発症例であった。IHC で、10 例が HER2 陽性 (3+)、11 例が equivocal (2+)、6 例が陰性 (0、1+) であり、FISH 法で 3 例が陽性 (HER2:CEP17 \geq 2.0)、8 例が陰性 (HER2:CEP17 $<$ 2.0) であった。組織 HER2 陽性は 13 例 (48%)、組織 HER2 陰性は 14 例 (52%) であった。組織 HER2 陽性の 13 症例に、化学療法に加えて HER2 標的療法が行われた。組織 HER2 陰性の 14 症例に、化学療法のみが行われた。

【CTC の検出と HER2 評価】

CTC の検出数の中央値は 9 個 (範囲：1-39 個) であった。組織陰性 14 例のうち CTC HER2 陽性は 8 例 (57%)、CTC HER2 陰性は 6 例 (43%) であった。組織 HER2 ステータスと CTC HER2 ステータスの一致率は 57% であった。

【CTC における EMT と HER2】

EMT-index の中央値は、0.17 (範囲：0.15-0.24) であった。EMT-index と CTC HER2 status に有意な相関関係を認めた ($p < 0.001$ 、Spearman の相関係数=0.765)。CTC の検出数と EMT-index、CTC HER2 status に有意な相関関係を認めなかった ($p=0.693$ 、 $p=0.686$)。EMT-index、HER2 に関わらず CTC を検出することに成功した。組織 HER2 陽性群、組織 HER2 陰性 CTC HER2 陽性群、組織 HER2 陰性 CTC HER2 陰性群に分類したところ、それぞれ EMT-index の中央値は 0.18 (0.14-0.23)、0.17 (0.16-0.25)、0.15 (0.14-0.16) であり、組織 HER2 陽性群、CTC HER2 陽性群の EMT-index は組織 HER2 陰性 CTC HER2 陰性群に比べて有意に大きかった。

【組織と CTC の HER2 ステータスによる無増悪生存期間の比較】

組織 HER2 陽性が 13 例 (A 群)、組織陰性 CTC 陽性 8 例 (B 群) そして組織陰性 CTC 陰性 6 例 (C 群) の 3 群に分け比較検討した。A 群、B 群、C 群の無増悪生存期間 (PFS) の中央値はそれぞれ 15.7 カ月、7.0 カ月、13.7 カ月であり、B 群は有意に PFS が短かった ($P=0.005$)。

【CTC と組織を用いた遺伝子パネル検査解析】

27 症例のうち、腫瘍組織 DNA は 6 症例、CTC-DNA は 15 症例から得られた。CTC を用いて検出した遺伝子変異では、A 群と B 群に EMT を誘導する遺伝子変異を多く認め、C 群には 3 群に共通して認めた一つの遺伝子変異以外認めなかった。組織と CTC 両方で遺伝子解析を行った 6 症例をみると、CTC と組織に不一致を認め、CTC は組織で検出できない遺伝子変異を特定していることがわかった。また CTC の方が組織よりも遺伝子変異数が多い傾向を認めた。CTC と組織の遺伝子変異数の差が最も大きい症例は再発症例であったため、再発症例と非再発症例を比較すると、再発症例で遺伝子変異数の差が大きい傾向を認め

た。

4 考察

本研究では、On-chip Sort システムを用いて CTC を検出し、切除不能進行・再発胃癌患者における CTC と組織検体の HER2 ステータスを比較した。その結果、組織で HER2 陰性と評価された患者の 57%で CTC HER2 陽性が検出され、これらの患者は PFS が短く予後が不良であることが明らかとなった。また CTC および組織検体のいずれかで HER2 陽性であった患者群で EMT-index が上昇していることが示され、さらに EMT を誘導する遺伝子変異を多く有している傾向が示唆された。この結果は、HER2 と EMT において組織 HER2 陽性群と CTC HER2 陽性群が類似した腫瘍特性を持つことを示唆しており、CTC 解析による潜在的な HER2 陽性患者の同定が、HER2 標的療法の適応拡大に寄与する可能性を示している。

従来の EpCAM 依存型 CTC 検出方法では、EMT の進行に伴う EpCAM 発現低下により CTC が検出されにくいという課題があった。本研究では、EpCAM に代わりサイトケラチンを上皮細胞マーカーとする On-chip Sort システムを採用し、CTC 検出率を向上させることに成功した。EMT が進行した悪性度の高い CTC も高感度で検出可能であり、HER2 と EMT の関連性を包括的に評価することができた。

さらに、CTC を用いた遺伝子解析では、再発患者において CTC と組織検体間で遺伝子変異に大きな差異が認められた。この結果は、CTC が腫瘍の時間的・空間的不均一性を反映するモニタリングツールであることを示している。

5 結論

本研究は、CTC の HER2 発現解析、EMT 解析、遺伝子解析により、CTC HER2 陽性患者の治療介入の必要性および腫瘍特性を明らかにすることで、HER2 標的療法の適応拡大に貢献する可能性を示した。CTC は、切除不能進行・再発胃癌患者に対する治療法の適切な選択において組織検査の限界を克服する重要なツールになると考える。

論文審査の結果の要旨

木村氏は、胃癌患者における HER2 ステータスの評価において、リキッドバイオプシーを用いた循環腫瘍細胞（CTC）解析の有用性を検証した。

切除不能進行・再発胃癌患者 27 人を対象に、組織と CTC の HER2 発現を評価し、その発現性から患者を 3 群に分けて無増悪生存期間を比較した。

CTC の検出には、従来の検出方法では困難とされていた上皮間葉転換（EMT）が進行した CTC を検出可能な On-chip Sort システムを採用した。CTC の HER2 評価はフローサイトメトリで HER2 タンパクの発現強度を測定し、EMT の進行度は EMT-index として評価した。また、組織および CTC から抽出した DNA を用いて遺伝子パネル検査を行い、遺伝子変異を検出した。

その結果、組織 HER2 陰性患者のうち 57%が CTC HER2 陽性であり、組織 HER2 ステータスと CTC HER2 ステータスの一致率は 57%でした。また、CTC HER2 陽性群は組織 HER2 陰性群に比べて有意に無増悪生存期間が短く、EMT-index も高いことが示された。

さらに、CTC を用いた遺伝子パネル検査では、組織では検出できない遺伝子変異を特定できることが示された。

本研究は、CTC 解析が胃癌における HER2 ステータス評価や腫瘍特性の把握に有用である可能性を示唆

しており、組織に変わる新たな診断プラットフォームとしての CTC の有用性を示したと言える。

これらは新規な知見であり、学術的意義も高く、今後の臨床応用も期待することができ、学位論文として申し分のない内容であった。

図表の形式を整え、臨床データを最新のものにすること、語句の統一や考察への内容追加などの指摘がなされたが、これらは適切に修正された。

審査委員 3 名 全員一致で本学学位論文として妥当であると判断した。

最終試験の結果の要旨

本研究では、切除不能進行・再発胃癌患者を対象に、On-chip Sort システムを用いて循環腫瘍細胞 (CTC) を検出し、CTC と組織検体の HER2 ステータスを比較した。組織検体による HER2 評価は腫瘍内不均一性から過小評価の可能性がある、繰り返し検査の侵襲性も課題であった。一方、CTC 解析は低侵襲でリアルタイムな腫瘍動態把握に優れる。

本研究では、従来の EpCAM 依存型 CTC 検出法の課題を克服し、サイトケラチンを上皮細胞マーカーとする On-chip Sort システムを採用。これにより、EMT 進行した悪性度の高い CTC 検出率が向上し、HER2 と EMT の関連性を包括的に評価できた。

その結果、組織 HER2 陰性患者の 57% で CTC HER2 陽性が検出され、これらの患者は PFS が短く予後不良であることが示された。また、CTC および組織検体で HER2 陽性であった患者群では EMT-index が上昇し、EMT 誘導遺伝子変異が多い傾向が示唆された。これは、HER2 と EMT において組織 HER2 陽性群と CTC HER2 陽性群が類似した腫瘍特性を持つことを示し、CTC 解析による潜在的な HER2 陽性患者の同定が HER2 標的療法適応拡大に寄与する可能性を示唆する。

さらに、CTC を用いた遺伝子解析では、再発患者において CTC と組織検体間で遺伝子変異に大きな差異が認められ、CTC が腫瘍の時間的・空間的不均一性を反映するモニタリングツールであることが示された。

本研究は、CTC の HER2 発現解析、EMT 解析、遺伝子解析により、CTC HER2 陽性患者の治療介入必要性および腫瘍特性を明らかにし、HER2 標的療法適応拡大に貢献する可能性を示した。CTC は、切除不能進行・再発胃癌患者に対する適切な治療法選択において、組織検査の限界を克服する重要なツールとなり得ると結論付けられた。

本研究は、On-chip Sort システムを用いた CTC 検出による切除不能進行・再発胃癌患者における HER2 ステータス評価の新たな知見を提供するものであり、今後のリキッドバイオプシーの臨床応用において重要な役割を果たすことが期待される。

プレゼンテーションでは、研究の背景、目的、方法、結果、考察が図表、シェーマを用いて明瞭に説明され、本研究の学術的意義が十分に伝わった。

審査委員 3 名からの質問に対しても適切な応答がなされ、本論文は学位論文として妥当であると全員一致で判断された。また審査委員からの修正事項にも迅速に対応し、学位論文には適切な修正が加えられた。

以上の結果から、最終試験を合格と判定する。