論文の内容の要旨

論文題目
門脈血および末梢血のテロメラーゼ活性測定による大腸癌の遠隔臓器転移予測

指導教員　　名川弘一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名　　大西達也

Ⅰ　緒言

癌細胞の血液中への流出は、転移巣を形成する重要なステップであり、血管内を循環する腫瘍細胞を同定することは、血行性による遠隔転移を予測する上で有用な方法と考えられる。これまで、血液中の癌細胞を同定する試みが多くなされ、特に大腸癌においては、解剖学的理由から末梢血のみならず門脈血中の癌細胞を同定する方法も行われてきた。近年では癌細胞が特異的に発現するとされる蛋白や酵素の RT-PCR 法を用いた測定が、優れた感度をもつ検出法として導入されるようになった。具体的には、carcinoembyonic antigen やサイトケラチン 19、サイトケラチン 20、guanylyl cyclase C が RT-PCR 法により大腸癌患者の末梢血、門脈血において検出されたと報告されている。しかし、これらのマーカーはいずれも少数ながら健常者においても検出されることが報告されている。

テロメラーゼは触媒サブユニット TERT と逆転写のための鋳型 RNA 部分、さらに安定化のための蛋白からなる逆転写酵素である。正常細胞においては細胞分裂ごとに染色体末端のテロメアと呼ばれる TTAGGG という塩基配列の繰り返し部分が短縮する結果、細胞死に至る。それに対してテロメラーゼ活性を持つ細胞は鋳型 RNA からテロメアが連続的に逆転写されて DNA 末端が伸長されることにより細胞の不死化に寄与すると言われている。テロメラーゼは悪性腫瘍

の大部分に発現している一方、生殖細胞や活性化リンパ球にもわずかながら発現している。最近、乳癌患者における末梢血中の腫瘍細胞の同定法として、リンパ球を除いた上でテロメラーゼ活性を測定する方法が紹介されたが、現在まで健常者の血液ではテロメラーゼ活性が検出されていない。故に、テロメラーゼは最も優れた癌細胞特異性を示すマーカーとして、大腸癌患者においても血液中の癌細胞の同定や遠隔転移の予測に用いられうると考えられた。

本研究では、大腸癌患者において腫瘍のドレナージ血管である門脈、および末梢血管から採血を行い、癌細胞由来のテロメラーゼ活性を測定して従来の臨床病理学的因子との相関を解析し、遠隔転移の予測が可能かどうかを検討した。

Ⅱ　方法

1．対象

東京大学医学部附属病院大腸肛門外科で 2001 年 11 月から 2004 年 1 月に手術された原発性大腸癌 134 症例を対象とし、健常人 6 人を対照群とした。

2．採血方法

開腹時の門脈血採血については、腫瘍のドレナージ血管のうち腸間膜にある辺縁静脈より中枢側にて 10cc を採取し、同時に末梢静脈からも 10cc の採血を行った。健常人からは末梢静脈より採血 10cc を行った。

3．Immunomagnetic sorting による上皮細胞の回収

Ficoll-Paque を用いて採血検体から上皮細胞を含む層を分離し、磁気ビーズを付加した抗 human epithelial antigen（HEA）抗体と反応させた。これを磁石に装着させた MACS カラム（Miltenyi Biotec GmbH）に通し、カラムを磁石から外すことで上皮細胞を回収した。

4．TRAP assay

TRAP assay によるテロメラーゼ活性測定は TeloTAGGG Telomerase PCR ELIZA PLUS kit（Roche Diagnostics GmbH、Manheim、Germany）を用いて行った。

回収した上皮細胞を 50μl の蛋白溶解液を用いて蛋白成分を抽出した。うち上澄み 3μl にビオチン標識した 5'側プライマーを加え、25℃30 分の逆転写反応を行って telomeric repeat を複製した。次に 3'側プライマーを加えて PCR した（94℃30 秒、50℃30 秒、72℃90 秒を 30 サイクル）。反応液のうち 2.5μl を streptavidin でコートされた 96 穴プレートに移し、denature を行い、digoxigenin でラベルされた telomeric repeat を標的とするプローブと反応させた。最後に、horse raddish peroxidase が触媒する発色反応を分光光度計で測定し、450nm での吸光度を求めた。コントロールテンプレート（TTAGGG の 8 回繰り返し配列）を基質として PCR 反応を行って得られる 450nm での吸光度も測定し、これに対する検体の相

対的なテロメラーゼ活性 RTA (relative telomerase activity)を算出し、この値を解析に用いた。

Ⅲ　結果

１．臨床病理学的背景

対象患者 134 例の平均年齢は 65.3 歳、男性 78 例、女性 56 例であった。腫瘍の深達度はTNM分類におけるT≧3が100例、T≦2が33例だった(TXが1例)。39 症例（29.1%）に同時性又は異時性の遠隔転移が認められた（24 例肝転移、12 例肺転移、9 例が遠隔リンパ節転移、重複例あり）。肉眼的治癒切除を行った症例で術後再発を示した症例は計 31 例（24.4%）であった。

２．　RTA と臨床病理学的因子（遠隔転移を除く）

健常人の末梢血 RTA は 0-32.7%の分布を示し、以降はこの最大値 32.7 をカットオフ値として採用し、それより高いものを RTA 陽性、低いものを陰性とした。対象患者 134 例の RTA の平均値は門脈血で 38.3%、末梢血で 43.2%であった。50 例（37.6%）が門脈血 RTA 陽性を示し、37 例（27.8%）が末梢血 RTA 陽性と判定された。

門脈血、末梢血双方の RTA と相関が認められたのは腫瘍の深達度（それぞれ p=0.0010、p=0.0007）、術中に切除された局所リンパ節転移（それぞれ p<0.0001、p=0.011）、病期（共に p<0.0001）であった。静脈侵襲は門脈血 RTA とのみ有意な相関を示した（p=0.025）。

３．　RTA と遠隔転移

同時性、異時性の双方を含む転移全般においては転移陽性例の門脈血 RTA は平均 83.3%、末梢血 RTA は平均 108.6%であり、陰性例（それぞれの RTA 平均値が 19.5%、16.4%）よりも高値を示した（共に p<0.0001）。臓器別では肝転移陽性例の門脈血 RTA は平均 77.4%、末梢血 RTA は平均 113.0%であり、陰性例（それぞれ 29.7%、28.0%）よりも高値を示した（共に p<0.0001）。同様に肺転移陽性例の門脈血 RTA は平均 63.8%、末梢血 RTA は平均 70.8%であり、陰性例（門脈血 RTA の平均 35.8%、末梢血 RTA の平均 40.5%）よりも高値を示した（各々 p=0.011、p=0.012）。

さらに同時性と異時性に分類して RTA との相関を検討した。門脈血 RTA と有意な相関を示した項目は同時性肝転移（p=0.049）、異時性肝転移（p=0.0055）であり、末梢血 RTA と有意な相関を示した項目は異時性肝転移（p=0.0037）（いずれも転移陽性群で RTA 高値）であった。

４．RTA と予後

Kaplan-Meier 法による生存曲線による比較では、門脈血 RTA 陽性例は陰性例

に比較して有意に低い 3 年無再発生存率を示した（陽性 50.8%vs.陰性 85.3%；p<0.0001）。同様に末梢血 RTA についても同様の結果が得られた（陽性 49.9%vs.陰性 80.8%；p=0.0001）。Cox regression hazard model を用いた多変量解析では、門脈血 RTA 陽性（hazard ratio；2.91、p=0.038）および局所リンパ節転移（hazard ratio；3.27、p=0.012）が術後再発の有無に影響を及ぼす因子であると判定された。再発に対する陽性適中率は門脈血の RTA 陽性が 41%、局所リンパ節転移陽性が 43%であった。

Ⅳ　考察

本研究は大腸癌手術患者における門脈血、末梢血のテロメラーゼ活性と臨床病理学的因子や遠隔転移との関係を示した初めての研究である。本研究におけるテロメラーゼ活性測定法の感受性は、門脈血 RTA 陽性が 37.6%、末梢血 RTA 陽性が 27.8%であり、以前に報告された方法とほぼ同様の検出率であった。一方で健常人の採血検体を基準にテロメラーゼ活性のカットオフ値を設定したので、特異性は 100%となる。従って総合的には本法が、現在のところ最も優れた血中の癌細胞の検出方法の 1 つと考えられた。

血液のテロメラーゼ活性と腫瘍の深達度、局所リンパ節転移、病期が相関するという今回の結果は、原発巣での高いテロメラーゼ活性が、転移、病期、予後不良と相関するという過去の報告と矛盾しない。門脈血のテロメラーゼ活性が静脈侵襲と相関するという結果、同時性、異時性肝転移と相関するという結果は seed and soil theory に合致する。一方、末梢血テロメラーゼ活性は特に異時性肝転移との相関が強く認められた。この結果は全身を循環する癌細胞が、後に肝にトラップされて異時性肝転移が顕在化する可能性を示唆している。術後再発例では門脈血、末梢血とも RTA が高値であったが、これは癌細胞が様々なルートで再発巣を形成しうることを示唆しており、最終的に生命予後の低下につながると考えられた。

本研究の多変量解析では、再発に相関する独立因子は門脈血のテロメラーゼ活性陽性と手術時のリンパ節転移の存在であった。従って門脈血のテロメラーゼ活性は、将来の再発全般を予測するという点で末梢血のテロメラーゼ活性よりも優れ、他の臨床病理学的因子にも勝る指標となることが示された。通常なら補助化学療法の対象とならないような比較的早い病期に分類される患者から門脈血のテロメラーゼ活性が高い患者を選別して術後療法を加えることにより本当に予後が改善するかは、今後の興味深い研究課題である。