

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 複数マーカー遺伝子を用いる RT-PCR に基づく胃癌
症例の腹腔内遊離腫瘍細胞検出法に関する検討

指導教官 上西紀夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月入学

医学博士過程

消化管外科学専攻

氏名 森和彦

胃がんの重要な予後因子とされている腹腔内洗浄細胞診は腫瘍細胞の存在頻度が非常に希薄であるため熟練を要する。高い再現性と感受性を達成するため、腹腔内洗浄細胞診に RT-PCR を導入する技術の研究開発は 1990 年代後半より始められ、*CEA*mRNA をマーカーとする方法が従来のスタンダードであった。*CEA* は非腫瘍細胞においても非特異的発現を認めることが知られており、この手法の問題点となっている。本研究は以下の解析過程を通じて胃癌の腹腔内洗浄細胞診に PCR を導入するためにマーカー遺伝子の探索を行い、複数マーカーによる信頼性の高い腫瘍細胞検出ア

[別紙1]

ッセイを研究開発することを目標とする。主な解析試料として国立がんセンター中央病院、東大病院、愛知県がんセンターにおいて収集された腹腔内洗浄水を用いた。まず、新規の胃がんのマーカー遺伝子の探索を行うために、マイクロアレイによる発現解析を行いグローバルに遺伝子スクリーニングを行った。このスクリーニングではマイクロアレイ解析の対象として陽性コントロールに胃癌細胞株、陰性コントロールに早期胃癌症例の腹腔内洗浄水サンプルを用い、陽性コントロールに特異的に発現する遺伝子を探索した。この解析を通じて11種のマーカーを同定した。そのうち5種 (*TFF1*、*TFF2*、*CK20*、*FABP1*、*MUC2*)は Nested PCR による細胞検出判定が可能で、多数検体 (99例)での解析において CEA より再発症例に特異的な陽性判定を示すことが明らかとなった (91-100%)。またこれら5種のマーカー遺伝子を適用した Nested PCR による判定を組み合わせた解析では2種以上のマーカーが陽性になる症例全例において転移を来すことが明らかとなった。また血行性転移を含む腹膜外再発症例群でも、ほぼ全てのマーカーにおいて有意に陽性判定の比率が高く、胃癌においては腹腔内遊離腫瘍細胞が腹膜外再発をも示唆する微小遺残病変である可能性が示された。次に複数マーカーの発現を評価する診断アッセイとして、Multiplex-RT-PCR とハイブリダイゼーションアレイを組み合わせたアッセイを試作し (以後ミニチップアッセイと呼ぶ)、胃癌の腹腔内洗浄細胞診における診断力と信頼性を検討した。ミニチップアッセイでは10種のマーカー遺伝子を用いて、他数検体での解析を行ったところ、陽性判定の再発に対する陽性的中率は 96-100%であり、同時性の転移巣のない症例では細胞診の約2倍の再発に対する感受性を有していた。生存分析においては細胞診陽性症例とミニチップアッセイのみ陽性となる症例では無病再発期間に大きな差がなく、ミニチップアッセイの判定は通常細胞診同様の予後因子としてのインパクトを有する可能性が示された。また、抗体の入手が可能であった5種のマーカー遺伝子 (*MASPIN*、*CK20*、*FABP1*、*TFF1*、*MUC2*)による免疫染色においてミニチップアッセイの判定結果との合致性を確認したところ、細胞診陰性症例も含めミニチップアッセイ陽性の症例14例のうち

12例で異型細胞の存在が確認された。*MASPIN*による免疫染色は明瞭で特異的な異型細胞への染色を示し、胃癌の細胞診に有用な抗体染色法であることが示唆された。