

## 論文の内容の要旨

論文題目 胃癌リンパ節微小転移の研究 —real-time RT-PCR 法の応用—

氏 名 久保田啓介

### I. 背景

リンパ節転移は胃癌の最大の転移・再発形式、予後規定因子のひとつである。肉眼的に根治手術が行われた症例においても、術後のリンパ節再発がしばしば認められる。このような症例では手術の時点で残存するリンパ節に既に微量の癌細胞が転移・生着していたと考えられる。そこで従来の H&E 染色を用いた病理学的診断よりも感度の高い微小な癌細胞・転移巣の検出方法が望まれていた。TNM (2002) 分類においては micrometastases (MM) の中で isolated tumor cells (ITC) が厳密に区別され、ITC に限定すると予後には影響しないとする考え方が優勢である。微小転移の予後への影響については今後 prospective な大規模研究により確認される必要がある。この為にも現時点では、感度・特異度の高い、正確でかつ実用的な検出法を確立しておく必要がある。

リンパ節中微量癌細胞・転移巣の検出の為に従来用いられてきた免疫組織学的方法、分子生物学的方法には各々問題点がある。免疫組織学的方法では転移巣が剖面外に存在することに起因する偽陰性判定が存在しうる。また診断には熟練された高度の専門的知識を必要とする。従来の RT-PCR 法に代表される分子生物学的方法では、1)測定手技に時間を要する、2)再現性に難がある、3)定量性がほとんどなく、発現の弱い検体の判定が主観的になりやすい、4)混入した単核球等による mRNA 発現のため低頻度ながら偽陽性判定が出現する、などの課題が指摘されてきた。

最近、蛍光プローブを用いて PCR 反応をリアルタイムにモニターできる新しい PCR 法 (real-time RT-PCR 法) が開発され、多検体の mRNA の定量を簡便に行うことが可能となってきた。胃癌リンパ節中微量癌細胞・転移巣の検出に real-time RT-PCR 法を用いた報告はこれまでになく、特に H&E 染色法、免疫組織染色法と比較しての検討は未だなされていない。

### II. 目的

本研究では、胃癌リンパ節中微量癌細胞・転移巣の検出における LightCycler を用いた real-time RT-PCR 法の実用性・有用性を検討し、H&E 染色法、免疫組織染色法との比較・検討によりその導入の意義を明らかにすることを目的とした。

### III. 方法

#### 患者とリンパ節

対象は 21 例の胃癌患者から採取したリンパ節 392 個。深達度別には、M 癌 4 例、SM 癌 5 例、MP 癌 3 例、SS 癌 2 例、SE 癌 5 例、SI 癌 2 例。病理組織学的リンパ節転移は 11 例、71 個に認めた。対照として非癌手術症例 4 例の 31 個のリンパ節を採取した。全てのリンパ節は半切し、半分を通常の H-E と免疫染色に、残る半分を real-time RT-PCR に用いた。

#### 免疫組織染色

免疫染色は、AE1/AE3 と CEA、CK20 に対して、腫瘍原発巣と全てのリンパ節に対して行った。染色強度は 3 段階に評価した。スコア 1：染色されないか、5%以下の少数個の癌細胞のみが染色される、スコア 2：中等度に染色される、スコア 3：ほぼ均一（80%以上）に染色される。

#### real-time RT-PCR

AGPC 変法を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA からランダムヘキサマー、逆転写酵素を用いて反応させ、得られた cDNA は -80°C で保存した。ハイブリダイゼーションプロンプを用いて、CEA、CK20、GAPDH に対するシングルステップの real-time RT-PCR を行った。CEA の PCR は 95°C 0 秒、50°C 10 秒、72°C 10 秒で、50 サイクルの増幅を行った。CK20 と GAPDH においては、各々アニーリング 55°C、エクステンション 20 秒であった。癌細胞 1 個から  $1 \times 10^5$  個に相当する、10 倍ごとに段階希釈した CEA mRNA、CK20 mRNA の外部標準を用意した。GAPDH mRNA の外部標準としては、細胞  $1 \times 10^2$  個から細胞  $1 \times 10^7$  個相当の 10 倍ごとの段階希釈溶液を用意した。毎回の PCR は、患者サンプルとともに、6 個の外部標準と、1 個の対照とを併せて、同時に行った。サンプルごとの mRNA の相対値は、スタンダードの対数値に対してプロットして検量曲線を作成し定量した。

#### 統計学的解析

mRNA 値、CEA/GAPDH 比の群間での有意差の検定に Mann-Whitney の U 検定を、mRNA 値と免疫染色強度の相関性の解析に Spearman の順位相関解析を用いた。p 値 0.05 未満で有意差ありと判定した。

### III. 結果

#### 免疫組織染色

H&E 染色で転移陽性として判定されたリンパ節は、すべて AE1/AE3 染色においても陽性に染色された。H&E 染色では転移を認めなかったリンパ節 321 個中の 11 個 (3.6%) が AE1/AE3 染色により陽性と判定され、このうちの 2 個が MM、9 個が ITC と判定された。AE1/AE3 による免疫組織染色に比べ、CEA と CK20 による免疫組織染色では染色性は比較的弱かった。

#### real-time RT-PCR 法の評価

LightCycler を用いた real-time RT-PCR 法は、免疫組織染色法のように専門的知識を必要とせず、基本的な分子生物学的手法のみで可能な簡便な方法であった。また、リンパ節の処理開始から結果の解析まで約 3 時間を要するのみで、迅速な方法であった。H&E 染色法による病理学的転移陽性リンパ節はすべて real-time RT-PCR 法でも陽性と判定された (図)。また、H&E 染色法による病理学的転移陰性リンパ節 321 個中の 68 個 (21.2%) が real-time RT-PCR 法陽性と判定された。進行度別の検討では、壁深達度が深くなるほど高い定量値が検出された。対照群では CEA、CK20 ともにすべて定量値 0 であり、すなわち非癌細胞が発現する mRNA を検出することに由来する偽陽性判定は一切認めなかった。検出率は、標的として CEA mRNA を用いる方 (検出率 18.4%: 59/321) が、CK20 mRNA を用いる場合 (検出率 10.0%: 32/321) と比較してより高い傾向にあった。ただし、CEA で陰性で CK20 で陽性となるリンパ節も一部に存在した。

#### 免疫組織染色法、real-time RT-PCR 法の関連性

real-time RT-PCR 法は免疫組織染色法と比較して陽性リンパ節の検出能が高かったが、その

一方で免疫組織染色法にて陽性と判定されるリンパ節に対して real-time RT-PCR 法にて陰性と判定される検体が存在した (表)。組織形態学的な MM、ITC の判定結果は、real-time RT-PCR 法の定量値の結果と相関を認めなかった。このことは組織形態学的には ITC と判定されるリンパ節の中にも、実際には (ITC ではない) MM と同程度の癌細胞、あるいは極端な場合には massive な転移の含まれているものが存在する可能性があることを示唆する。すなわち単一あるいは限られた切片数の中で判定を行う H&E 染色法、免疫組織染色法には限界があり、リンパ節全体の癌細胞の転移状況を把握するためには real-time RT-PCR 法が必要である。real-time RT-PCR 法による mRNA の定量値は免疫組織染色強度と非常によく相関しており、上述のごとき免疫組織染色法陽性のリンパ節で real-time RT-PCR 法陰性と異なる判定が生じる原因は、標的 mRNA の発現の低さが原因と考えられた。

#### IV. 考 察

real-time RT-PCR 法には以下の利点がある。1)対象リンパ節全体の検索が可能であり、基本的な分子生物学的手法のみで判定可能である。2)再現性があり、検出域が極めて広がる。3)極めて迅速な方法である。4)非常に高感度で検出域が広い。5)定量的であるため、客観的な判定が可能である。上記のごとく real-time RT-PCR 法はリンパ節中微量癌細胞・転移巣の検出に応用可能性の高い方法であると考えられる。

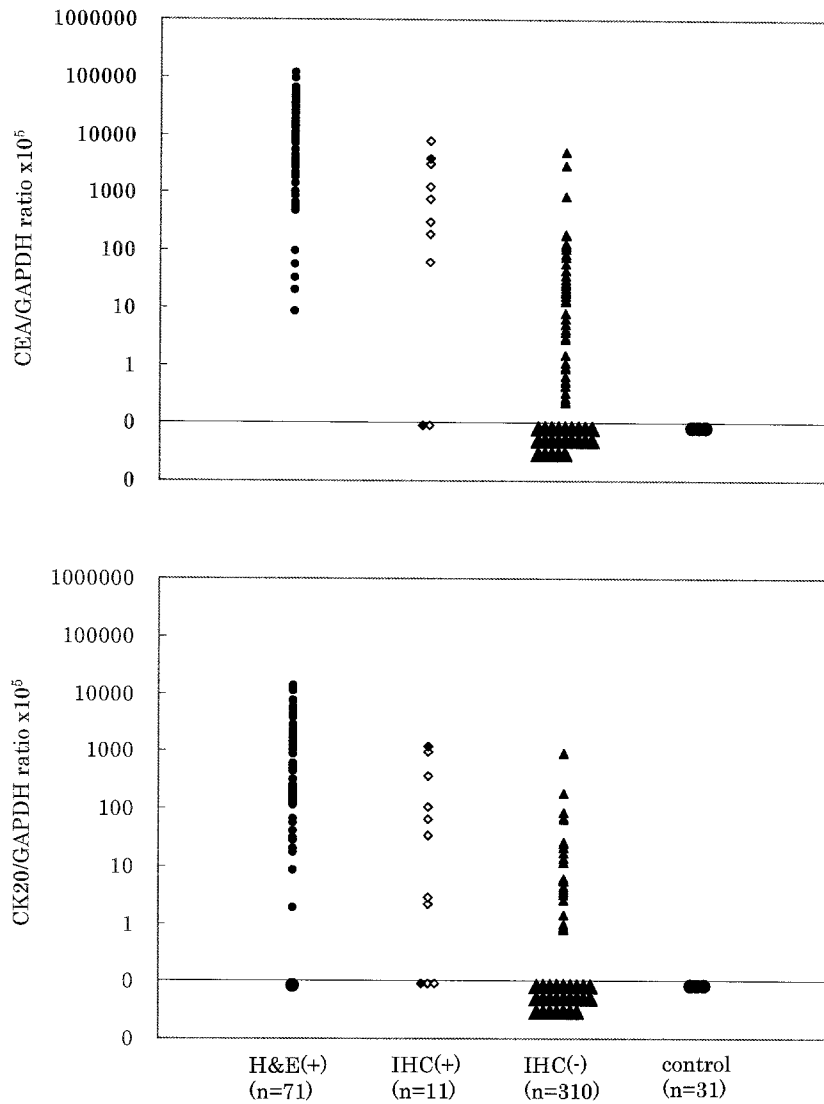
胃癌リンパ節微小転移の予後に与える影響については、いまだ議論が分かれる。近年では、MM の中で ITC を厳密に区別し、ITC に限定すると転移・再発、予後には寄与しないという考えが優勢である。今回の結果からは、1 切片のみの免疫組織染色標本で ITC と判定されるリンパ節において、切片外の部分に MM を潜在的に有している可能性がありうることを示唆された。リンパ節全体の転移状況の把握には real-time RT-PCR 法が必要不可欠であると考えられる。

対照リンパ節の蓄積により将来的には 0 以上のカットオフ値が設定される可能性もあり得ると思われる。今回の方法では、免疫組織染色法にて陽性と判定されるリンパ節に対して real-time RT-PCR 法にて陰性と判定される検体が存在し、今後は高感度・高特異度を有する新規のマーカーを導入する必要がある。今回の実験方法ではリンパ節の処理開始から定量結果を得るまで約 3 時間を有したが、近年報告され始めた TRC 法、LAMP 法などの新規手法の導入についても検討を要する。微小転移検出の予後への寄与、またその予測に基づいた追加補助化学療法の適応決定などへの応用可能性は、real-time RT-PCR 法による定量値の解析と免疫組織染色法の結果とを組み合わせ今後検討、実現されていくものと考えられる。

#### V. 結 論

LightCycler を用いた定量的 real-time RT-PCR 法は、胃癌リンパ節中微量癌細胞・転移巣の検出において、迅速、簡便で、安定した再現性を有する方法である。免疫組織染色法と比べ、極めて高感度で、更に定量的であることから臨床応用しうる可能性が高い。H&E 染色法、免疫組織染色法は胃癌リンパ節中微量癌細胞・転移巣の検出に有力な方法ではあるが、単独ではリンパ節全体の転移状況の把握には限界があり、real-time RT-PCR 法の導入・併用が必要と考えられた。現時点では real-time RT-PCR 法の陽性判定が、真に転移の存在を反映するか否かの確証は得られておらず、今後の課題である。当面は real-time RT-PCR 法の結果を参考にして、免疫組織染色法、H&E 染色法を併用しながらの転移診断を行うことが臨床上最も応用可能性が高いと考えられた。

図 免疫組織染色法との比較における real-time RT-PCR 法による mRNA の相対的定量値



IHC(+)/H&E(-)群中の◆は (ITC ではない) MM、◇は ITC を示す。IHC：免疫組織染色。

表 免疫組織染色法と real-time RT-PCR 法の陽性リンパ節検出能の比較

	AE1/AE3(+)	AE1/AE3(-)	計
<b>CEA</b>			
陽性	9	50	59
陰性	2	260	262
<b>CK20</b>			
陽性	8	24	32
陰性	3	286	289
<b>複合解析</b>			
陽性	9	59	68
陰性	2	251	253
計	11	310	321