

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10051

研究課題名(和文) 化学療法施行乳癌におけるOSNA法によるセンチネルリンパ節転移診断の有用性の検討

研究課題名(英文) One-Step Nucleic Acid Amplification Assay for Detection of Axillary Lymph Node Metastases in Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy

研究代表者

島津 研三 (Shimazu, Kenzo)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30448039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：目的は原発性乳癌患者で術前化学療法施行症例におけるセンチネルリンパ節生検で、One-step nucleic amplification (OSNA)法によるセンチネルリンパ節の転移診断の有用性を明らかにする。適格症例88症例の解析で、センチネルリンパ節に限ると転移診断における感度は87.8%であり、ノンセンチネルリンパ節の95.1%に比べ有意に悪い結果であった。CK19 mRNAのIn situ hybridizationによる検討でセンチネルリンパ節におけるCK19の発現の低下はタンパクレベルでなくmRNAレベルで起こり、それは化学療法によって引き起こされたのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sentinel lymph nodes (SLNs), and non-SLNs from 88 breast cancer patients treated with NAC were examined by means of histology and OSNA. The diagnostic accuracy, sensitivity, and specificity of OSNA for were 87.8, 75.0, and 91.2 % respectively for SLNs, and the corresponding values were and 95.1, 97.3, and 94.6 % for non-SLNs. The diagnostic accuracy of OSNA was significantly lower for SLNs than for non-SLNs ($P = 0.021$), which was attributable to the low sensitivity for detection of micrometastases (micromets) due to lower CK19 mRNA expression detected by in situ hybridization (ISH) in SLN micromets than in non-SLN micromets. For primary breast tumors, CK19 mRNA expression showed a significant reduction after NAC ($P = 0.040$). The findings obtained with CK19 mRNA ISH suggest that most SLN micromets cannot be detected by OSNA due to the reduced expression of CK19 mRNA induced by NAC.

研究分野：乳腺内分泌外科

キーワード：乳癌 センチネルリンパ節生検 術前化学療法

1. 研究開始当初の背景

One-step nucleic acid amplification (OSNA)は日本で開発された転移リンパ節内に存在するCK 19 mRNAを測定することによってリンパ節転移を診断する方法で、核酸の増幅が不要なため30 - 40分で結果がでるため手術中の迅速診断に適した画期的な診断方法である。通常の乳癌症例におけるセンチネルリンパ節生検における転移診断において通常の病理診断と比べて同等の精度があると多くの研究で報告されているが、術前に化学療法を施行した症例における精度は評価されていない。

2. 研究の目的

術前化学療法施行症例におけるセンチネルリンパ節の転移診断におけるOSNA法の有用性を明らかにすることをこの研究の目的とする。さらに、OSNA法によって転移ありと診断されたセンチネルリンパ節のCK19 mRNAのコピー数を用いてノンセンチネルリンパ節転移(センチネルリンパ節以外のリンパ節)の予測モデルも作成する。

3. 研究の方法

- (1) OSNA法と病理診断の比較
術前化学療法を施行した症例のセンチネルリンパ節生検におけるOSNA法の有用性を従来の病理診断の結果と比較して明らかにする。
- (2) CK19 mRNA コピー数のcut-off値の設定
CK19 mRNA コピー数と転移のサイズの関係について検討し、術前化学療法を施行していない症例におけるcut-off値が術前化学療法施行症例にも適応可能かを明らかにする。そして適応不能の時にはcut-off値を設定する。予後とより相関するcut-off値が設定できるかどうかとも検討する。
- (3) in situ hybridizationによる解析
化学療法の影響によって腫瘍やリンパ節の転移部位のCK19 mRNAの発現がどのように変化するかをin situ hybridizationにて明らかにする。
- (4) nomogramあるいはscoring systemの作成。
腋窩郭清症例においてOSNA法によるCK19 mRNA コピー数とノンセンチネルリンパ節転移の有無との関係を明らかにして、他の手術までに判明する臨床病理学的因子と合わせて、ノンセンチネルリンパ節転移予測モデル(nomogramやscoring system)を作製する。

4. 研究成果

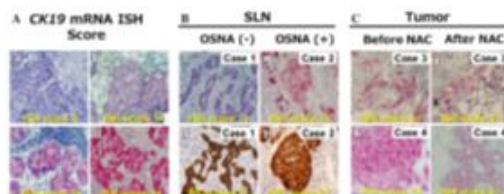
(1) 術前化学療法を施行した88症例における乳癌手術の際に摘出された115個のセンチネルリンパ節あるいは185個のノンセンチネルリンパ節においてOSNA法による転移検索と通常の病理診断による転移検索を行った。その結果、全リンパ節における転移診断精度は正診率、感度、特異度はそれぞれ92.3%、

88.5%、93.3%であった。一方、センチネルリンパ節に限った正診率、感度、特異度は87.8%、75.0%、91.2%であり、ノンセンチネルリンパ節に限った場合はそれぞれ95.1%、97.3%、94.6%であり、OSNA法の精度はセンチネルリンパ節がノンセンチネルリンパ節に比べて劣る結果であった。特に微小転移の感度が低いために転移全体が低くなっていた。

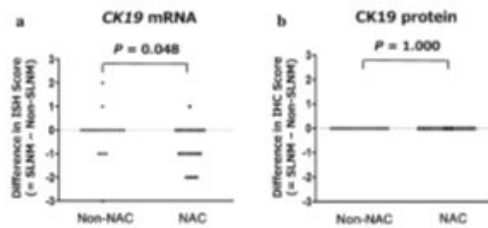
(2) 術前化学療法を施行していない症例におけるcut-off値が術前化学療法施行症例にも適応可能かを明らかにすることに関して、上記のように、当該症例におけるOSNAの信頼性をさらに検証してから検討になると判断した。そのため、まず(3)のin situ hybridizationによる解析、すなわち化学療法の影響によって腫瘍やリンパ節の転移部位のCK19 mRNAの発現がどのように変化するかをin situ hybridizationにて明らかにすることをを行った。

(3) 術前化学療法施行症例および非施行症の両方においてセンチネルリンパ節とノンセンチネルリンパ節の転移部位でのCK-19mRNAの発現についてmRNA in situ hybridizationによって検索を行い(図1)センチネルリンパ節の転移部位におけるCK-19mRNAの発現はノンセンチネルリンパ節のそれに比べ低く、その傾向は術前化学療法施行症例において有意に非施行症例よりも顕著であった(図2)。化学療法のCK-19mRNAの発現への影響をさらに検索するため術前化学療法前に針生検にて採取した乳癌組織と化学療法施行後に手術にて得られた乳癌組織におけるCK-19mRNAの発現と化学療法を行っていない症例の術前術後の乳癌組織におけるCK-19mRNAの発現をmRNA in situ hybridizationによって比較したところ化学療法施行前後のほうがCK-19mRNAの発現の低下が非施行症例のそれに比べ有意に低下していることが分かった(図3 a,b)。さらに同様の解析を術前化学療法施行症のなかで治療効果の高かった症例と低かった症例に分けて解析を行ったところ、前者のほうが後者に比べCK-19mRNAが低下していた(図3 c,d)。以上よりOSNA法における感度の低下は化学療法の影響による転移部位におけるCK-19mRNAの発現の低下が原因と考えられた。

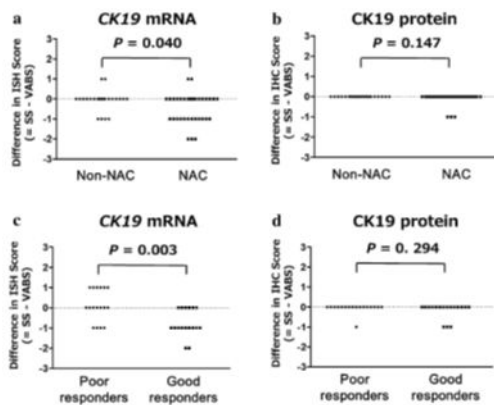
(図1)



(図2)

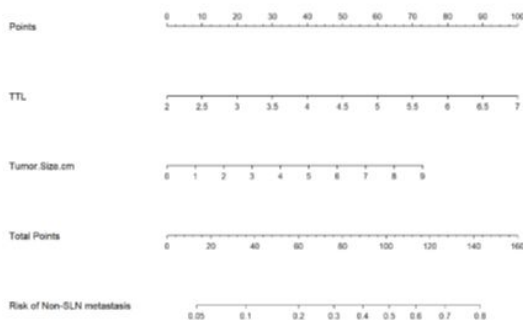


(図3)



(4) in situ hybridization による CK19 mRNA の解析と同時進行で、ノンセンチネルリンパ節転移予測モデル (nomogram や scoring system) について検討した。まず、術前化学療法を施行しない症例 623 症例 (センチネルリンパ節転移あり) の症例の臨床病理学的因子と OSNA のコピー数から得られる因子を用いて、ノンセンチネルリンパ節転移を予測する因子を単変量および多変量解析を行って nomogram を作成した (図4)。ROC 曲線によってその信頼を検証したところ AUC は 0.71 であり、既存のモデルとほぼ同等の結果であった。

(図4)



(5) 考察と展望

今回の検討において OSNA 法は現行の cut-off 値を用いた場合、センチネルリンパ節転移の同定に関しては、通常の病理検査に比べ精度が落ちる結果であった。in situ hybridization による解析によって CK19

mRNA の発現の低下が化学療法によって引き起こされていることが示唆された。今後は新たなマーカーの検討や、cut-off 値の再検討が必要と思われた。

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1件)

Takamoto K, Shimazu K, Naoi Y, Shimomura A, Shimoda M, Kagara N, Kim SJ, Tamaki Y, Noguchi S. One-Step Nucleic Acid Amplification Assay for Detection of Axillary Lymph Node Metastases in Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. 2016 Jan;23(1):78-86. *Annals of Surgical Oncology*

〔学会発表〕(計2件)

荻谷 朗子、島津研三、OSNA 法を用いたノモグラムによる乳癌ノンセンチネルリンパ節術中診断
第25回日本乳癌学会学術総会
2017年7月13日

Sato N, Shimazu K, et al. Construction of an intraoperative nomogram, based on one-step nucleic acid amplification (OSNA), for prediction of non-sentinel node metastasis in breast cancer patients with sentinel node metastasis. 15th St. Gallen International Breast Cancer Conference Primary Therapy of Early Breast Cancer Vienna, Austria 2017年3月15日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島津 研三 (SHIMAZU, Kenzo)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：30448039

(2) 研究協力者

高本 香 (TAKAMOTO, Kaori)