

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 28 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591812
 研究課題名（和文） Dormant Cancer Cell の分布に基づいた肺癌術後転移再発制御の試み
 研究課題名（英文） Regulation of postoperative recurrence on the basis of the dormant cancer cell distribution in lung cancer
 研究代表者
 井上 匡美 (Masayoshi Inoue)
 大阪大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：10379232

研究成果の概要（和文）：

One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA)法による肺癌リンパ節転移検出を有効な標的分子マーカーを探索しつつ試みた。遺伝子発現データベースから肺癌で高発現の遺伝子を抽出し、肺癌転移陽性および陰性リンパ節を用いて RT-PCR 法により発現レベルを評価し、選択された分子の発現をリンパ節を用いて OSNA 法により解析した。KRT19 と KRT7 を用いて OSNA 法を行ったところ、転移陽性リンパ節と陰性リンパ節に発現レベルの差を認め再現性が確認された。OSNA 法と組織学的病理診断が異なった症例について、ケラチンによる免疫染色で再評価を行い、臨床において OSNA 法がリンパ節転移診断に応用できる可能性があることを結論付けた。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated the usefulness of one-step nucleic acid amplification (OSNA) method to detect lymph node metastasis with exploration of target markers. Molecules with high expression in lung cancer were extracted using a gene data base and the expression in the lymph nodes was analyzed with OSNA method. We found the significant expression of KRT19 and KRT7 in metastatic lymph nodes using OSNA method. One false negative was found due to massive necrosis of cancer cells and one false positive was caused by the non-specific cytokeratin expression of epithelioid cells in the lymph node with OSNA assay using CK19. In conclusion, OSNA assay using CK19 could be available for the rapid molecular diagnosis of lymph node metastasis in lung cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000 円	690,000 円	2,990,000 円
2010 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
2011 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

癌患者の予後は遠隔転移病巣により決定されることが少なくない。完全切除後の遠隔転移再発は、原発病巣の診断時にすでに画像診断等ではとらえられていない微小転移がすでに遠隔臓器に存在したものが術後経過中に再発として発見されると考えられている。局所に限局した非小細胞肺癌は外科的切除の適応とされるが、完全切除がなされた症例の約半数は再発し、その再発部位は局所再発よりも遠隔転移が多いことが知られている。近年、癌治療後再発には、二次臓器にすでに移行した Dormant Cancer Cell の存在が関与している可能性が示唆されている。乳癌では骨髄への微小転移が DTC として免疫細胞染色で高頻度に検出され、かつ術後再発や生存に関与することが数多く報告されている。そして、これらの骨髄中 DTC は Cancer Stem Cell に特徴的な表面抗原を発現し、骨髄に蓄えられた状態で術後補助化学療法に耐え、将来的に末梢血中へ移入し転移病巣を形成する可能性のある細胞集団である可能性も指摘されている。肺癌でも同様に骨髄中 DTC は、cytokeratin (CK) や melanoma associated antigen (MAGE) を標的分子として免疫細胞染色または RT-PCR 法で検出され、一部の研究では予後因子となる可能性が述べられている。肺癌においても乳癌と同様に、骨髄中の "Metastatic Stem Cell" と称される Dormant Cancer Cell が遠隔期に転移再発をきたす可能性がある。リンパ節転移は局所進展のひとつの病態で病期の決定に重要視されているが、一般的な病理学組織学的検査では見逃される微小リンパ節転移の存在が明らかにされつつある。我々はこれまでに、Carcinoembryonic Antigen (CEA) を標的分子とした RT-PCR 法で、非小細胞肺癌切除例における微小リンパ節転移の存在を明らかにしてきた。これらの免疫組織染色や分子生物学的手法で検出される微小リンパ節転移の臨床病理学的意義は未だ不明であるが、このようなリンパ節内に存在する微小癌細胞集団も術後補助化学療法に抵抗性の Dormant Cancer Cell として遠隔期の局所または遠隔臓器再発の原因となる可能性があると考えている。

2. 研究の目的

Dormant Cancer Cell である Disseminated Tumor Cell (DTC) や局所再発の原因となりうるリンパ節微小転移を高感度な分子生物学的手法で検出し、再発率や再発形式との相関

を検索し、これらの Dormant Cancer Cell の分布により個別化された術後補助療法を行うことで治療成績の向上を目指す。

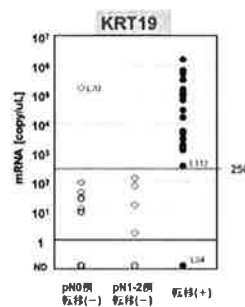
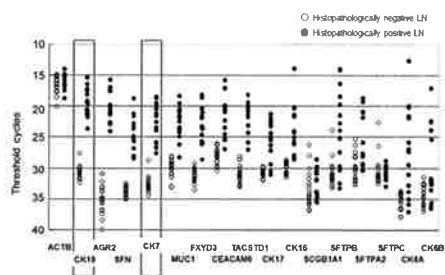
3. 研究の方法

論文、遺伝子発現データベース、マイクロアレイ発現データから、肺癌組織で発現が高く、リンパ節で発現の低い遺伝子を約 50 個抽出し、各候補分子に対する定量 RT-PCR 法用プライマーを設計する。病理学的に転移陽性および陰性と判定された症例約 20 例のリンパ節から、Qiagen 社製 RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し、定量 RT-PCR 装置 PRISM 7700 (ABI 社製) でその発現を定量し、各候補マーカー遺伝子の発現量を比較する。転移陽性リンパ節と陰性リンパ節で発現量の差が大きく、かつその発現が安定している遺伝子を選択。RT-PCR で選択された分子マーカーに対して、OSNA 法用のプライマーを専用ソフト (富士通システムソリューション株式会社) で設計する。骨髄とリンパ節の試料を OSNA 法用の試薬を用いて専用遺伝子増幅検出装置 RD-100i (SYSMEX 社製) で遺伝子増幅反応を行う。65°C 16 分間の遺伝子増幅反応を行い、反応液中副産物の濁度変化をリアルタイムに計測し、濁度が 0.1 を越えた時間を遺伝子増幅の検出時間とし定量する。転移陽性および陰性リンパ節を用いて OSNA 法により解析し、病理組織診断と乖離した結果を呈した試料に関しては、Cytokeratin に対する免疫組織染色を行い再検討した。

4. 研究成果

Screening で選択された 16 候補分子について、転移陽性および陰性リンパ節を用いて RT-PCR を行ったところ、KRT19 と KRT7、AGR2、SFN の 4 分子が最も発現レベルの差

が大きいマーカーとして同定された。AGR2は肺癌原発巣 100 例の免疫染色で発現率が、腺癌 98.7%、扁平上皮癌 95.5%と陰性例を認めため、マーカーとしては不適と判断した。SFNは、転移陽性例での発現レベルがやや低かったためマーカー候補から除外した。最終的に KRT19と KRT7を用いて OSNA 法を行ったところ、転移陽性リンパ節と陰性リンパ節に発現レベルの差を認め再現性が確認された。KRT19と KRT7についての感度/特異度/陽性適中率/陰性適中率/正診率は、それぞれ、95%/99.3%/95%/99.3%/98.8%、85%/97.9%/85%/97.9%/96.4%であった。OSNA 法と組織診断の不一致検体を用いてケラチン抗体による免疫染色を行ったところ、サルコイド反応リンパ節の 1 例で OSNA 法偽陽性となり、癌組織が壊死に陥っていた 1 例では OSNA 法で偽陰性となった。また、微小転移は OSNA 法で発現量が低く陽性に検出された。KRT19と KRT7を組み合わせた場合でも、KRT19のみによる正診率を上回ることがなく、結論としては、KRT19による OSNA 法は非小細胞肺癌リンパ節転移診断に応用できる可能性がある」と結論した。



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)

① Inoue M. Risk of pleural recurrence after computed tomographic-guided percutaneous needle biopsy in stage I lung cancer patients. *Ann Thorac Surg*.

2011;91:1066-71. ,査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 井上匡美、胸腺上皮性腫瘍の免疫・分子病理学的研究 / 小型肺癌の臨床病理学的解析. 第 28 回日本呼吸器外科学会総会 2011 年 5 月 12-13 日 別府

② 井上匡美、One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA)法による肺癌リンパ節転移検出の試み、第 51 回日本肺癌学会総会、2010 年 11 月 3 日～2010 年 11 月 4 日、広島

③ 井上匡美、One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA)法による肺癌リンパ節転移検出の試み、第 48 回日本癌治療学会学術集会、2010 年 10 月 28 日～2010 年 10 月 30 日、京都

④井上匡美、局所進行非小細胞肺癌に対する
新たな術後補助化学療法の試み-抗癌剤感受
性試験 CDDST 法による個別化を目指して-、
第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010 年
4 月 8 日～2010 年 4 月 10 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 匡美 (Masayoshi Inoue)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：10379232

(2) 研究分担者

奥村 明之進 (Meinoshin Okumura)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40252647

南 正人 (Masato Minami)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10240847

澤端 章好 (Noriyoshi Sawabata)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50403184

門田 嘉久 (Yoshihisa Kadota)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50464243

※平成 23 年 4 月より他施設に異動と
なったため、平成 23 年 4 月より辞退

(3) 連携研究者

()

研究者番号：