

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31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791988

研究課題名（和文） 新規遺伝子増幅法による口腔癌センチネルリンパ節の術中転移診断法の確立

研究課題名（英文） Molecular diagnosis of sentinel lymph node metastases for intraoperative detection in oral cancer

研究代表者

合田 啓之 (GODA HIROYUKI)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00464371

研究成果の概要（和文）：

これまでの成果では、cytokeratin 19 (CK19) を標的とし、リンパ節 312 個の正診率 95.2%，と良好な結果を得た。また、マイクロアレイ解析を用いて新たな診断マーカー候補 Annexin A8-like 2 (ANXA8L2), Desmoglein 3 (DSG3) を同定した。marker の感度は 3 個の marker を合わせると 100% の結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Sixty-one of 312 lymph nodes were pathologically metastasis-positive. The overall concordance rate between the OSNA assay using breast cancer criteria and histopathology was 94.2%. The optimal cut-off for the copy number of CK19 mRNA in assessing lymph node metastasis of HNSCC was 300 copies/11, which had the highest diagnostic accuracy (95.2%). The OSNA assay can be completed within 30 min. And we identified ANXA8L2 and DSG3 markers by microarray analysis. These markers diagnosed metastatic lymph nodes in 100% sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：センチネルリンパ節、分子診断、OSNA 法

1. 研究開始当初の背景

現在、臨床的に所属リンパ節に転移を認めない頭頸部癌 cN0 症例の頸部に対する治療方針には経過観察あるいは予防的頸部郭清術があるが、前者では約 3 割に後発頸部リンパ節転移が認められ、予後不良となる。一方、後者では約 7 割の症例でいわゆる over treatment となる。

近年、乳癌、皮膚癌をはじめとして種々の悪性腫瘍において第 3 の選択肢としてセンチネルリンパ節生検の有用性が明らかにされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、センチネルリンパ節の術中迅速微小転移診断に対応できる分子遺伝子学的検査法を確立、臨床応用することを目的とし、将来的には頭頸部癌 cN0 症例に対するセンチネルリンパ節生検の標準化と頭頸部癌の治療成績の向上を目指す。

3. 研究の方法

口腔癌頸部リンパ節転移の遺伝子診断における OSNA 法の有用性の検討頸部郭清術およびセンチネルリンパ節生検より得られたリンパ節を用いて CK19 を標的遺伝子とし

た OSNA 法と病理組織検査との一致率の検討し有用性の検討を行う。

また、同時に ANXA8L2 および DSG3 について RT-PCR 法にて診断精度を検討する。また、ANXA8L2 および DSG3 遺伝子に対する OSNA primer の作製として栄研化学の提供する primer explorer を用いて primer の設計を行う。

OSNA 用の primer は 1 塩基の違いでも増幅効率が大きく異なるため、複数の primer 設計を行い、臨床応用可能な約 10 分で解析可能な primer 設計を目指す。

4. 研究成果

当院臨床研究倫理審査委員会承認後（愛大医病倫 0701008 号）、OSNA 法を実際にセンチネルリンパ節生検に応用したところ、これまでの成果では、cytokeratin 19 (CK19) を標的とし、リンパ節 312 個の正診率 95.2%、と良好な結果を得ている (*Oral Oncology* 2012 inpress)。

しかしながら、口腔扁平上皮癌においては CK19 遺伝子の低発現や発現を認めないものがあることがわかり、診断精度向上のために、マルチマーカーによる診断が必要であることも分かった。

このことより、マイクロアレイ解析を用いて新たな診断マーカー候補 Annexin A8-like 2 (ANXA8L2), Desmoglein 3 (DSG3) を同定した。

現在、転移陽性リンパ節 24 個、転移陰性リンパ節 174 個にて解析を行い各 marker の感度は CK19 では 87.5%、ANXA8L2 では 87.5%、DSG3 では 83.3% であり、CK19+ANXA8L2 では 95.8%、CK19+DSG3 では 95.8%、3 個の marker を合わせると 100% の結果が得られた。

本結果にて転移診断マーカーはマルチマーカーにより確立されたため、今後は症例を蓄積しさらに有用性の検討を行う必要がある。さらには、術中迅速診断が可能となるよう、遺伝子増幅を 12 分以内に行うことが可能な OSNA 法の primer 設計が必要となる。

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. Hiroyuki Goda, Koh-ichi Nakashiro, Ryota Oka, Hiroshi Tanaka, Hiroyuki Wakisaka, Naohito Hato, Masamitsu Hyodo, Hiroyuki Hamakawa
One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. Oral

Oncology 査読有、2012 in press

[学会発表] (計 2 件)

1. 岡亮太、中城公一、合田啓之、浜川裕之
口腔扁平上皮癌センチネルリンパ節生検における分子診断の有用性

第 49 回 日本癌治療学会, 2011. 10. 27

2. Ryota Oka, Koh-ichi Nakashiro, Hiroyuki Goda, Yukiko Nishikawa, Hiroshi Tanaka, Hiroyuki Hamakawa.
Identification of molecular markers for sentinel lymph node biopsy of oral squamous cell carcinoma. 3rd World Congress of the International Academy of Oral Oncology, Singapore, 2011. 7. 14

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

合田 啓之 (GODA HIROYUKI)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00464371