

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792227

研究課題名(和文) マルチマーカーによる OSNA 法を用いた口腔癌センチネルリンパ節生検の確立

研究課題名(英文) Establishment of sentinel node biopsy for oral cancer using one-step nucleic acid amplification method

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：口腔癌リンパ節転移の迅速診断法としてサイトケラチン19 (CK19) を対象とした OSNA 法の有用性について検討を行ってきた。CK19 を対象とした OSNA 法では、正診率が 95% であったが、低発現症例における偽陰性症例が問題であった。そこで、マイクロアレイを用いて転移マーカーを検索し、ANXA8L2 を同定した。CK19 と ANXA8L2 のマルチマーカーでの転移リンパ節の診断は 100% 可能であった。CK19 と ANXA8L2 を用いた OSNA 法による術中迅速遺伝子診断は口腔癌のリンパ節転移において有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We carried out a clinical study to evaluate a novel automated assay system for cytokeratin 19 (CK19) mRNA, the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method, to detect the lymph node metastasis of OSCC. The accuracy of OSNA assay was nearly 95%, but it could not detect occult metastasis in case of no or low expression of CK19 mRNA in the primary tumor. We identified ANXA8L2 that were commonly expressed in all OSCC metastatic lymph nodes but not in benign lymph nodes. This molecular marker and CK19 detected all histopathological metastasis-positive lymph nodes in OSCC. We confirmed the expression of ANXA8L2 mRNA in all OSCC primary tumor tissues. ANXA8L2 and CK19 could be useful molecular markers for detecting lymph node metastasis of OSCC.

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：口腔癌 分子診断 OSNA 法

1. 研究開始当初の背景

1) 早期口腔癌における治療上の問題点

近年の外科的手術手技ならびに放射線化学療法 of 進歩にも関わらず、早期ステージでの著明な生存率の向上は未だ認められていないのが現状である。これらの原因としては局所再発、後発頸部リンパ節転移、遠隔転移が挙げられるが、後発頸部リンパ節転移の占める割合は高い。すなわち、PET-CT も含め従来の検査法では口腔癌の頸部リンパ節微小転移の正確な診断が困難であり、進行病期に応じた適切な治療が行えていないことが原因であると考えられる。これら画像検査においては、後発転移の主な原因である微小転移の検出という点に関しては、これらの検査法の感度は低いのが現状である。

2) センチネルリンパ節生検の有用性

この点を改善する目的でわれわれの施設では、2000 年よりセンチネルリンパ節生検の臨床応用を実践してきており良好な結果を報告してきた (Elsheikh MN, Rinaldo A, Hamakawa H et al. Head Neck 28: 842-9, 2006)。センチネルリンパ節とは、原発巣の腫瘍細胞が初めて辿り着く所属リンパ節であり、最初に転移を生じるリンパ節と考えられている。つまり、センチネルリンパ節への転移の有無を微小転移を含めて正確に診断することにより、進行病期に基づく適切な治療を行うことができる。

3) 従来の病理組織診断、遺伝子診断 (PCR 法) における転移診断の問題点

リンパ節転移をより正確に診断するためには、センチネルリンパ節生検は最も有用な検査法である。しかしながら、従来の病理組織診断ではリンパ節のごく一部しか検査対象

としないため、微小転移の存在を見落とす可能性がある。また、問題解決のための順連続切片等の作製は、検査に要する時間と病理医の労力が一般普及の障壁となっている。そこで、病理組織検査に代わる方法として分子遺伝子学的検査に着目した。遺伝子診断はリンパ節全体を検査対象とするため微小転移を含めてより正確に診断できる。しかしながら、従来の遺伝子診断 (PCR 法) に関してはその工程の改良にも関わらず診断を得るまで 2 時間を要するため術中応用が困難であることが問題であった。

2. 研究の目的

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。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。

ANXA8L2 および DSG3 遺伝子に対する OSNA primer の作製
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

リンパ節転移マーカーとして以前より検討を行ってきた、cytokeratin-19 に加え、新たなマーカー遺伝子の同定を試みた結果、マイクロアレイの手法を用いて、ヒト全遺伝子より、非担癌患者由来リンパ節 1 個と比較して、転移リンパ節 7 個すべてに共通して 3 倍以上の発現亢進を認める遺伝子として 36 遺伝子を同定した。次に、新たに非担癌患者由来リンパ節 9 個、口腔扁平上皮癌転移リンパ節 23 個より抽出した total RNA を用いてリアルタイム定量化 RT-PCR 法による発現定量解析を行ったところ、ANXA8L2 遺伝子において転移リンパ節 23 個すべてが高発現を認めた。続いて、LAMP 法による迅速遺伝子診断を実現するために ANXA8L2 に対する LAMP primer を設計し、20 分以内の遺伝子増幅を可能とした。また、CK-19 遺伝子を対象とした、OSNA 法の多施設共同研究を開始した。6 施設計 322 個のリンパ節

の結果は、感度 75%、特異度 96.8%、正診率は 93.8% であった。偽陰性症例 8 症例に関しては、7 症例にて CK-19 の発現が原発組織にて認められなかった。また、CK-19 と ANXA8L2 遺伝子との併用においては、感度 100% であり、今後、十分に臨床応用可能な結果が得られた。

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)

Goda H, Nakashiro K, Oka R, Tanaka H, Wakisaka H, Hato N, Hyodo M, Hamakawa H. One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncology 48(10) 958-63, 2012. 査読有り

[学会発表](計 4 件)

岡亮太、中城公一、合田啓之、岩本和樹、浜川裕之 新規分子マーカー ANXA8L2 による RT-LAMP 法を用いた口腔扁平上皮癌リンパ節転移迅速診断 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会 2014 年 1 月 23 日、札幌

岡亮太、中城公一、合田啓之、岩本和樹、川又均、井川香織、北村直也、原田耕志、内田大亮、今井裕、迫田隅男、山本哲也、上山吉哉、宮本洋二、浜川裕之 多施設共同研究による口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移診

断への OSNA 法応用の検討 第 67 回日本
口腔科学会総会 2013 年 5 月 23 日、宇都宮

合田啓之、中城公一、住田知樹、日野聡史、
岡亮太、浜川裕之 口腔癌の SNNS のエビデ
ンスと今後の展望 SNNS 研究会学術大会
(招待講演) 2012 年 11 月 16-17 日 ウ
ィンク愛知

Goda H, Nakashiro K, Oka R, Shintani S,
Hamakawa H. Sentinel lymph node biopsy for
clinically N0 oral squamous cell carcinoma.
2012 American Society of Clinical Oncology
annual meetin. 2012 年 6 月 1-5 日、
Chicago, USA.

〔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

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