

令和元年6月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10461

研究課題名(和文) 甲状腺乳頭癌における新規リンパ節転移診断キットの開発

研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic kit to detect lymph nodes in thyroid papillary carcinoma

研究代表者

大坪 竜太 (OTSUBO, Ryota)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：80570043

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)：本研究では、入割したリンパ節(LN)の洗浄液中の蛋白を用いて転移を診断する新規手法であるSemi-dry dot-blot(SDB)法を甲状腺乳頭癌のリンパ節転移診断に応用する。

甲状腺乳頭癌 40症例から161個のLNを採取し、最大割面で二分割し洗浄した液体に含まれる細胞から蛋白を抽出した。一方洗浄を終えたLNは通常の病理組織診断に提出し、洗浄液を用いたSDB法と病理組織診断の診断を比較した。SDB法に使用した抗体は AE1/AE3、抗サイログロブリン抗体、抗TTF-1抗体の3種類で、各々の感度/特異度は、33/100%、50/100%、57/96%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の研究において乳癌でのSDB法は感度・特異度・一致率ともに90%以上と高精度で、臨床的にも術中迅速病理診断に応用可能であるため、市販化を見据えた本法のキット化に着手している。しかし、甲状腺乳頭癌においては抗汎サイトケラチン抗体(AE1/AE3)、抗サイログロブリン抗体、抗TTF-1抗体を用いたSDB法の感度が低い事が判明したため、今後これら以外の抗体での評価が必要である。また、引き続き乳癌におけるキット化を継続しながら、悪性黒色腫などへのSDB法の応用を検討したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied the semi-dry dot-blot (SDB) method, which is a novel diagnostic procedure using a protein from lavage fluid of sliced lymph nodes (LNs), to detection of metastatic LNs of thyroid papillary carcinoma.

We got 161 LNs from 40 thyroid papillary carcinomas and extracted the protein from cells on a surface of divided LNs at the maximum diameter. Meanwhile, we submitted the sliced LNs to pathological department for usual intraoperative pathological diagnosis and compared results of the SDB method and the pathological diagnosis. The SDB method was evaluated with pancytokeratin antibody (AE1/AE3), anti-thyroglobulin antibody, and anti-TTF-1 antibody and their sensitivity and specificity were 33/100%, 50/100%, and 57/96%, respectively.

研究分野：内分泌外科、乳腺外科

キーワード：甲状腺乳頭癌 リンパ節転移 Semi-dry dot-blot法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

センチネルリンパ節 (以下、SLN) はリンパ流に乗った癌細胞が最初に到達するリンパ節 (以下、LN) と定義されており、SLNに転移が無ければ周囲のLN郭清を省略できる。乳癌でのSLN生検の安全性は確立し、予後もLN郭清したものと同等で、リンパ浮腫などの合併症の軽減に貢献している (Kraak DN, et al. Lancet oncol. 2010)。しかし、SLNの術中迅速病理診断には10-20%前後の偽陰性 (Cserni G, et al. J Clin Pathol 2004) があり、病理医不足による負担増大が問題である。そのため新たな診断法の開発が期待されており、病理診断との高い一致率を持つOSNA法 (Tsujiimoto M, et al. Clin Cancer Res 2007) などの分子生物学的方法は、病理医の負担軽減に寄与する。しかし、高価である、LN組織を溶解するため病理診断との併用が難しいなどの欠点もある。

膜に直接サンプルを添加し抗原抗体反応を行うDot-blot法を応用して考案されたSDB法では、入割したLNの洗浄液中の癌細胞を溶解し、その中に含まれる蛋白、サイトケラチン (以下、CK) を膜上で可視化して転移を診断する (Hirakawa H, et al. Clin Chim Acta. 2010)。また本法は転移のないLN内には上皮性成分がなく、LNへ癌 (上皮性悪性腫瘍) が転移した時に上皮成分の蛋白が混入する事を利用して癌の転移を診断する新規手法である。更に洗浄液を用いるため組織損失がない、その後の病理組織診断に影響しないという利点がある。研究代表者らは乳癌手術症例100症例 (174 LN) において最終病理診断とSDB法の比較を行い、感度93.3%、特異度96.9%、一致率96.6%であった。平均検査時間はSDB法43.3分、術中迅速病理42.8分、費用は約900円/例であり、病理診断との併用または単独での活用が期待できる (Otsubo R, et al. Int J Cancer 2014)。更にキット化に向けての実験を2013年7月より開始し、SDB法をインフルエンザ診断のようなイムノクロマトグラフィーに応用し、新規抗CK19抗体を用いた乳癌リンパ節転移診断キットを作製した。診断時間は従来法の約半分の20分に短縮し、検出力も従来法とほぼ同等であった。また、肺癌LN転移に対してもSDB法を適応し、50例 (147LN) における永久病理標本との比較で、感度94.7%、特異度97.7%、一致率97.2%であった (Tomoshige K, Otsubo R, et al. Eur J Cardiothorac Surg 2015)。

甲状腺癌の約9割を占める乳頭癌は、LN転移を来しやすく、甲状腺切除と共に予防的に頸部リンパ節郭清術 (以下、ND) が行われている。しかし乳頭癌ではLN転移の予後への影響に確証がなく (Cooper DS, et al. Thyroid 2009)、臨床的にLN転移が検出されない患者に予防的NDを行うには議論の余地がある。本邦でのT2 (腫瘍最大径2-4cm) 乳頭癌の外側区域LN転移陽性率は6.32%であったが、基本的に外側区域NDを行っているのが現状であり、90%以上で不要なNDを行っている。転移陰性症例を同定できればNDを省略できる症例が数多くあると考えられ、近年乳癌のように不要なNDを省略できるSLN生検に関する臨床研究が甲状腺癌乳頭癌においても行われている。頸部ではリンパ流が複雑とされるが、色素法と核医学検査法を併用すると乳癌と同様に100%近いSLN同定率が得られる (Kaczka K, et al. Endokrynol Pol. 2012)。345例の前向き研究では、SLN転移陽性の28/55 症例 (50.9%) に非SLNに転移を来しており、SLN転移陰性の252/290例 (86.9%) が非SLNへの転移を認めず、約3年のLN再発率は0.9%とLN郭清群と同等であった (Paolo C, et al., Surgery 2014)。以上より、甲状腺乳頭癌においてもSLN生検によるNDの省略が一般臨床に広まりつつあり、当院でも臨床研究を開始しているが、病理医の負担は増す一方である。

## 2. 研究の目的

本研究では、入割したLNの洗浄液中の蛋白を用いて転移を診断する新規手法である Semi-dry dot-blot (以下、SDB) 法を甲状腺乳頭癌のリンパ節転移診断に応用する。

SLN生検は術中迅速病理で診断されるが、偽陰性や病理医不足による業務負担の増大が問題となっており、新規診断法の開発が望まれている。研究代表者らはこれまでにSDB法を乳癌SLN生検の前方視的臨床研究に適応し、病理診断との比較で高い一致率を得た。また、診断時間を従来法の約半分の20分に短縮した診断キットを新たに作製した。甲状腺乳頭癌に対してもSLN生検が普及しつつあるが、術中迅速病理診断が増えるため病理医の業務負担は更に増えると思われる。

本研究は病理診断の補助又は単独での使用が期待でき、病理医の負担軽減や SLN 生検の普及に寄与する。

## 3. 研究の方法

### (1) 甲状腺癌成分検出のための抗体選定

甲状腺乳頭癌細胞株の蛋白抽出液に対して、抗CK・Tg・TTF-1抗体を用いたSDB法とELISAを行う。

### (2) 臨床検体におけるSDB法の評価

- a. SDB法を用いたLN転移診断と従来の組織学的診断によるLN転移診断の結果を比較検討する。
- b. 偽陰性、偽陽性症例について臨床病理学的因子の検討を行い、手技的要因以外の原因を検索する。
- c. 上記a,bの結果から、SDB法を適用できる症例とキット化に最適な抗体を決定する。

### (3) イムノクロマトグラフィー(IC)キットの作製と評価

これまでの結果を基にSDB法を応用したICキットを作製し、臨床検体で評価する。

## 4. 研究成果

これまで SDB 法を乳癌と肺癌に適応し、乳癌では感度 93.3%・特異度 96.9%・一致率 96.6%、肺癌では感度 94.7%、特異度 97.7%、一致率 97.2%と全て 90%を超える良好な成績を得た。これを基に SDB 法を抗サイトケラチン 19 抗体を用いたイムノクロマトグラフィーへの適応を行い、乳癌における診断キット (SDB キット) を作成した。臨床検体による評価を行い、論文化した(R. Otsubo, et al. Clin Breast Cancer 2018)。また、長崎大学 腫瘍外科と国内企業が連携し、市販化と保険収載を目指した臨床性能試験を計画中である。

甲状腺乳頭癌 40 症例から 161 個の LN を採取し、LN を最大断面で二分割し、LN を洗浄した液体に含まれる細胞から蛋白を抽出した。一方洗浄を終えた LN は通常の病理組織診断に提出し、洗浄液を用いた SDB 法と病理組織診断の診断を比較した。なお、SDB 法に使用した抗体は pan cytokeratin 抗体である AE1/AE3、抗サイログロブリン抗体、抗 TTF-1 抗体の 3 種類で、各々の感度/特異度は、33/100%、50/100%、57/96%であった。平成 30 年度は前述した抗サイトケラチン 19 抗体を用いた SDB キットを用いて評価し、永久病理標本との比較では感度 69%、特異度 88%であった。SDB 法と比較して SDB キットの感度は高かったが、特異度が低下した。最終的には実臨床において甲状腺乳頭

癌におけるセンチネルリンパ節生検と術中迅速診断の必要性が高くないことから市販化への移行は難しいと思われるが、今後悪性黒色腫などの悪性腫瘍への応用を検討する。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕（計1件）

1. Otsubo R, Hirakawa H, Oikawa M, Baba M, Inamasu E, Shibata K, Hatachi T, Matsumoto M, Yano H, Abe K, Taniguchi H, Nakashima M, Nagayasu T. Validation of a Novel Diagnostic Kit Using the Semidry Dot-Blot Method to Detect Metastatic Lymph Nodes in Breast Cancer: Distinguishing Macrometastases From Nonmacrometastases. *Clinical Breast Cancer* 2018; 18(3):e345-351. (査読あり)

### 〔学会発表〕（計1件）

1. Otsubo R, Hirakawa H, Oikawa M, Tanaka A, Matsumoto M, Yano H, Kinoshita N, Abe K, Fukuoka J, Nagayasu T. Validation of novel diagnostic kits using the semi-dry dot-blot method for detecting metastatic lymph nodes in breast cancer; distinguishing macrometastases and micrometastases. San Antonio Breast Cancer Symposium 2016 2016年

### 〔図書〕（計0件）

### 〔産業財産権〕

#### 出願状況（計2件）

名称：CK19に特異的なモノクローナル抗体およびこれを産生するハイブリドーマ、癌の検出キット、癌の検出方法および癌の転移の判定方法

発明者：大坪 竜太、永安 武

権利者：永安 武

種類：特許

番号：特願 2015-217735

出願年：2015年

国内外の別：国内

名称：分割補助デバイスおよびこれを用いた組織切片の作製方法

発明者：大坪 竜太、永安 武

権利者：永安 武

種類：特許

番号：特願 2017-121315

出願年：2017年

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：永安 武

ローマ字氏名：NAGAYASU, Takeshi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：教授

研究者番号（8桁）：80284686

研究分担者氏名：中島 正洋

ローマ字氏名：NAKASHIMA, Masahiro

所属研究機関名：長崎大学

部局名：原爆後障害医療研究所

職名：教授

研究者番号（8桁）：50284683

研究分担者氏名：矢野 洋

ローマ字氏名：YANO, Hiroshi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院（医学系）

職名：講師

研究者番号（8桁）：50380887

研究分担者氏名：馬場 雅之

ローマ字氏名：BABA, Masayuki

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：研究協力員

研究者番号（8桁）：90771957

### (2) 研究協力者： なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。