

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10795

研究課題名(和文)非小細胞肺癌術中迅速リンパ節転移診断のためのCDCA1-OSNA法の開発

研究課題名(英文)Development of CDCA1-OSNA assay for intraoperative rapid detection of hilar lymph node metastasis of non-small lung cancer.

研究代表者

鈴木 実(Suzuki, Makoto)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：80312940

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):当科にて手術を施行した96例の非小細胞肺癌症例において正常肺および原発巣に加え、該当する肺葉の肺門リンパ節からmRNAを抽出しRealtime-PCR法にてCDCA1の発現を定量、その発現量を比較した。正常肺でのmRNA発現と比較して癌部での発現は有意に高値であり($p<0.001$)、臨床病理学的因子ではその発現高値と組織学的グレードおよび脈管浸潤が有意に相関し、術後再発と有意に相関した(RE閾値0.193, $p=0.003$)。また、肺門リンパ節での解析で、有意に転移リンパ節で発現高値であり、($p<0.001$)CK19と比較し良好なマーカーであることが示された。(感度83%, 特異度77%)

研究成果の学術的意義や社会的意義

Realtime-PCR法による定量的結果、CDCA1は肺癌組織中で正常肺と比較して優位に高値であり、その発現が高いことは非小細胞肺癌の予後不良因子であることが示された。また、肺門リンパ節における解析においてCDCA1は従来OSNA法のマーカーとして使用されているCK19と比較して有意に良好なマーカーたり得ることが示された。今後非小細胞肺癌の縮小手術適応決定のための術中迅速リンパ節転移判定においてCDCA1をマーカーとしたOSNA法の開発が有効である可能性があり、今後さらなる検討が望まれる。

研究成果の概要(英文):We analyzed the expression of CDCA1 in non-small lung cancer cases with Realtime-PCR. The expression of CDCA1 was significantly higher in lung cancer tissues than in adjacent normal lung tissues ($p<0.001$). there was significant correlation the expression and histological grade of cancer and vascular invasion. The recurrence free survival rate of CDCA1 high expression cases ($RE>0.193$) was significantly shorter than low expression cases. The expression of CDCA1 in hilar lymph nodes was significantly higher in pathologically metastatic lymph nodes ($P<0.001$). CDCA1 was a superior marker of metastatic lymph nodes (sensitivity 83%, specificity 77%) than analyzed with CK19 real-time-PCR.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 リンパ節転移 OSNA法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 小型肺腺癌の増加と積極的縮小手術の進歩

近年、高分解能 CT(HRCT)の発達に伴い肺野末梢の小型肺癌の発見率が向上するに伴い、肺機能を温存したうえで根治的な切除をめざす積極的縮小手術の適応が模索されている。積極的縮小手術の適応を判断するうえで、リンパ節転移がないことを確認することが必要とされるが、このためセンチネルリンパ節の迅速組織診断が試みられてきたが、従来の Real time PCR 法では時間がかかりすぎることが問題とされてきた。最近、リンパ節を可溶化後、RNA を抽出することなく、そのまま標的 mRNA を増幅し、転移の有無を判定する直接遺伝子増幅 (OSNA : One-step Nucleic Acid Amplification) 法が開発され、乳癌や消化器癌ではすでに実地臨床で実用化されており、非小細胞肺癌の領域でも保険収載間近である。OSNA 法は CK19 をターゲットとしており乳癌や消化器癌では高い特異度を示すが、肺癌では正常肺組織のコンタミネーションのため偽陽性を示すため、新たなマーカーを検討する必要性が指摘されている。

(2) 新規癌精巢抗原 CDCA1 の同定

当院の原尾らは 2008 年に東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターの中村祐輔博士との共同研究により、非小細胞肺癌症例における cDNA のマイクロアレイをもとに肺癌の新規癌精巢抗原 CDCA1 cell division cycle associated 1;CDCA1 の同定に成功した。これは非癌組織では胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された精巣にしか発現しない遺伝子であり、肺癌細胞株および非小細胞癌組織では高率に発現していた。原尾らの解析によると解析した非小細胞肺癌 19 例全例に CDCA1 mRNA の高発現を認めたという。CDCA1 は、細胞が有糸分裂をする際にキネトコアと紡錘体の微小管とが結合する際に必須なので、細胞周期の維持に不可欠であることが報告されている。また CDCA1 は、キネトコアの重要な部位である nuclear division cycle (NDC) 複合体の構成成分であり、染色体分裂が適切に行われるために重要な役割を果たしている。高頻度に非小細胞肺癌に発現していることから、CDCA1 由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを用いて CTL を誘導する癌免疫療法の治験が行われている。

2. 研究の目的

(1) CDCA1 の非小細胞肺癌における発現率の検討

当科にて手術を施行する非小細胞肺癌症例において正常肺および原発巣に加え、該当する肺葉の肺門リンパ節を凍結保存する。それぞれから mRNA を抽出し cDNA に転換。Realtime PCR 法にて CDCA1 の発現を定量、その発現量を比較する。

(2) 新規癌精巢抗原の発現の転移リンパ節における発現の検討

凍結したリンパ節からも mRNA を抽出、cDNA を作成し、Real time-PCR にて陰性、陽性を判定。組織診断での陰性、陽性と対比し、感度、特異度を判定する。

(3) 新規癌精巢抗原の OSNA 法での活用の開発

Real-time PCR 法にて CDCA1 mRNA 発現の有用性が証明した場合、シスメックス株式会社のご協力のもと、OSNA で使用できる試薬の開発を行う。これを用いて凍結リンパ節にて OSNA を行い、閾値を決定。その感度、特異度を組織診断と対比して行う。

3. 研究の方法

肺癌切除症例からのサンプル採取

当科にて手術を行う非小細胞肺癌切除症例のうち、肺門、縦隔リンパ節郭清をおこなうものを対象とする。腫瘍部および正常肺に加え、センチネルリンパ節にあたると思われる肺門リンパ節を凍結保存する。得られたリンパ節はメスで 3 分割し、中央の切片は迅速診断に提出する。1 つはホルマリン固定、もう 1 つは凍結保存し、RNA 抽出を行う。

凍結保存標本からの mRNA 抽出。

凍結保存した標本は、Tissue Lyser II でホモジナイズする。PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen) で DNA を、FastPure RNA Kit (Takara) にて RNA を抽出する。抽出した RNA から速やかに Super Script First Strand System にて cDNA を作製し保存する。

Real-time PCR

作成した cDNA を用い、Taqman 法を用い CDCA1 mRNA の発現定量を行う。当院の総合研究室に設置済みの ABI 社製 Viia7 を用いる。コントロールとして GAPDH を用い、CT 法にて relative expression (RE) 値を算出する。まずは同一検体での腫瘍部と正常肺の RE 値を比較し、CDCA1 が腫瘍部で有意に高発現していることを確認する。さらに、ROC curve を用いて正常肺から腫瘍部を判別する閾値を決定。この値をもとにリンパ節での転移陽性、陰性を判別し、この結果と組織診断での結果を対比し、感度、特異度を算定する。また、この CDCA1 mRNA 陽性の予後との関連性を検証する。

4. 研究成果

(1) CDCA1 の非小細胞肺癌における発現率の検討

96 例の肺癌切除症例において、正常肺での mRNA 発現と比較して癌部での発現は有意に高値であり (表 1 : $p < 0.001$)、ROC 曲線 (表 2) において delta-delta CT 法での Relative-expression (RE) の閾値を 0.101 とするとその感度は 75%、特異度は 79% となった。臨床病理学的因子ではその発現高値と組織学的グレードおよび脈管浸潤が有意に相関し、術後再発と有意に相関した (表 2 : RE 閾値 0.193, $p = 0.003$)。

表 1

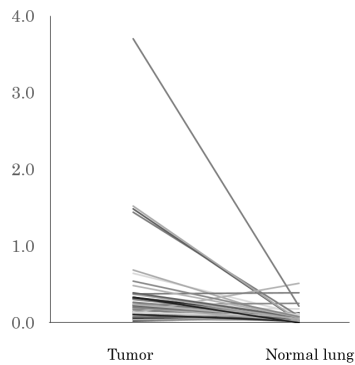
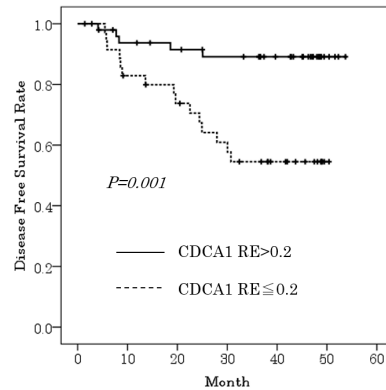


表 2



(2) 新規癌精巢抗原の発現の転移リンパ節における発現の検討

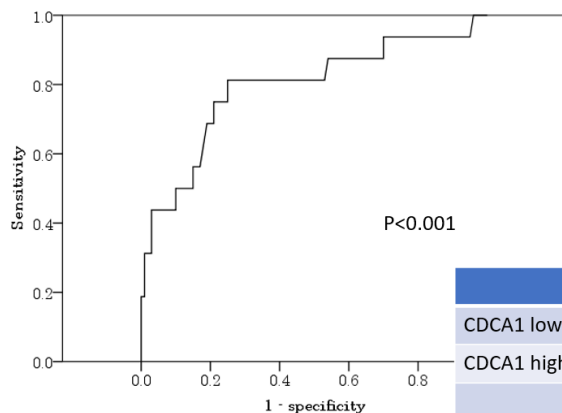
肺門リンパ節での解析で、有意に転移リンパ節で発現高値であり、(表 4 : $p < 0.001$) CK19 と比較し良好なマーカーであることが示された。(感度 83%、特異度 77%) CDCA1 は肺癌組織において高率に高発現しており、その高発現は予後因子としても有用であった。また、リンパ節転移の分子マーカーとしての有用性も示され、今後縮小手術適応決定のためのリンパ節転移術中迅速診断へと応用できる可能性が示された。今後 CDCA1 をマーカーとした OSNA 法を開発し、臨床応用をめざしていく。

表 3

ROC curve (positive VS negative): CDCA1

AUC 0.791

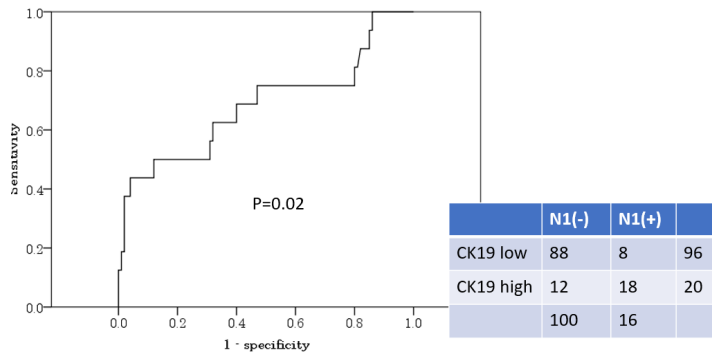
threshold 0.232 sensitivity 0.813 specificity 0.750



	N1(-)	N1(+)	
CDCA1 low	75	3	78
CDCA1 high	25	13	38
	100	16	

表 4

ROC curve (positive VS negative): CK19
AUC 0.684
threshold 0.518 sensitivity 0.500 specificity 0.880



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田公英
2. 発表標題 肺癌リンパ節転移検出マーカーとしてのCDCA1の有用性の検討
3. 学会等名 日本肺癌学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池田 公英 (Ikeda Koei) (20448525)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	白石 健治 (Shiraishi Kenji) (70363538)	熊本大学・病院・講師 (17401)	