

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791134  
 研究課題名（和文） One Step RT-PCR による血中、リンパ節中の悪性腫瘍細胞の検出  
 研究課題名（英文） Detection of malignant cells in lymph node/blood by One Step RT-PCR method.  
 研究代表者  
 佐藤 直樹（SATO NAOKI）  
 秋田大学・医学部・助教  
 研究者番号：40447199

## 研究成果の概要：

子宮体癌において①腫瘍細胞を検出するための新たなマーカーの設定、②残存腫瘍細胞の検出法としての定量 RT-PCR 法の確立、③カットオフ値の設定、を行った。これらの手法を用いて末梢血中・リンパ節における悪性腫瘍細胞量を推定し、さらに多くの症例を対象として以下の(1)～(5)について検討を継続している。(1)末梢・リンパ節中の腫瘍細胞を定量的に検出し、病理学的診断や進行期との相関関係を検討。(2)リンパ節中の腫瘍細胞量と再発の有無、生命予後を併せて解析し、予後因子と成り得るかを検証。(3)従来腫瘍マーカーでは検出困難な早期・微小病変の検出能力について可能性を追求。(4)卵巣癌、子宮頸癌症例を対象を拡張、進行期との相関関係、再発のリスク評価、予後予測、早期発見のためのスクリーニング能力について検討。(5)放射線治療時の末梢血中の悪性腫瘍細胞量を推定し、放射線治療前後での悪性腫瘍細胞量の変化について検討。上記(1)～(5)の検討は、症例数・サンプル数を重ね継続中であり、統計学的な有意差を求めて解析中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,600,000	0	2,600,000
20 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	210,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮体癌、RT-PCR、サイトケラチン、リンパ節

## 1. 研究開始当初の背景

日本人口動態統計によると、2002 年の日本における癌死亡者数は女性が 116344 人であり、そのうち子宮癌は 5216 人と全体の 4.5%を占めている。近年、子宮癌検診の普及に伴い、子宮頸癌の占める割合は 0.68 倍（2000 年/1975 年）と減少傾向にあるもの

の、子宮体癌は 2.16 倍と増加し（癌統計白書 1999）、全子宮癌に占める子宮体癌比は著明に増加傾向にある（婦人科腫瘍委員会報告 2002）。手術療法、新規抗癌剤による術後補助化学療法など、子宮体癌の治療は近年確立されつつあり、早期発見、治療例では比較的予後良好の疾患となってきた

る（日本産科婦人科学会子宮癌委員会：全国子宮体癌調査成績、2000）。しかしながら、Ⅲ期、Ⅳ期症例における5年生存率が37.5%、8.5%と、進行例における予後が不良であること（婦人科腫瘍委員会報告2001）、再発症例に対する有効な治療法が確立されていないことなどが問題となっている。当教室では子宮体癌に対する積極的な骨盤内および傍大動脈リンパ節の郭清を行っており、その治療的意義について報告してきた（日本婦人科腫瘍学会雑誌2003;Vol 21, 82-6）。しかし、手術療法によって骨盤内、傍大動脈リンパ節を郭清したにもかかわらず、その部位から再発をきたす症例を経験する。すなわち、臨床的には遠隔転移を認めず、根治的な手術を施行し得た子宮体癌患者においても、再発をきたす場合がある。これらの再発は、従来の方法では検出不可能なごく少数の悪性腫瘍細胞によって引き起こされるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では子宮体癌患者のリンパ節および末梢血におけるごく少数の腫瘍細胞を定量的に検出する方法の確立を目的とした。このことにより、癌の正確な進行期や予後を把握し、術後化学療法の必要性を正しく判断可能となる。また、術後再発の指標となりうる新たなマーカーとして臨床に応用することを目標とする。さらに、子宮体癌を含む上皮性悪性腫瘍のスクリーニング検査として応用し、低コストなスクリーニング法を提供する。

## 3. 研究の方法

### (1) 新たなマーカーの同定

我々が報告したサイトケラチン19の他にも、従来報告されてきたサイトケラチン20、CEAなど、多くの上皮性マーカー候補がある。今回は、サイトケラチン20を手始めに何種類かの標的遺伝子に対するTaqMan Probe, primerを作成する。子宮体癌由来の培養細胞のみならず、卵巣癌、子宮頸癌細胞での発現を確認するとともに子宮体癌、卵巣癌、子宮頸癌患者からの末梢血、リンパ節から検出され得ることを確認する。

(2) 残存腫瘍細胞の検出法としての定量RT-PCR法の確立、応用  
定量RT-PCR法を基礎として、より迅速、

正確に定量検出できる方法を検討する。特殊なcapillaryにより急速な温度変化が可能なPCR機器を用いること、Reverse transcription (RT) 反応からPCR Cycleまで、One-stepで行うprotocolで行う方法を組み合わせることで、臨床での使用に耐えうる迅速性、信頼性ある方法の確立をめざす。

### (3) カットオフ値の設定

子宮体癌患者における末梢血液中、リンパ節中の腫瘍細胞を実際に定量的に検出する。また、健常人や良性疾患におけるサンプルも収集し、陰性コントロールとして使用する。対象症例を増やすことにより、より信頼性のあるカットオフ値を設定する。また、対象疾患を卵巣癌、子宮頸癌にも広げ、それぞれの疾患における腫瘍細胞に特異的なマーカーの同定と、そのカットオフ値を設定する。さらには複数のマーカーの組み合わせを検討し、より特異度の高い指標を設定する。

(4) 上記の基礎的研究により確立した方法で、子宮体癌患者の末梢血中、リンパ節における悪性腫瘍細胞を定量し臨床応用し、さらに多くの症例について検討する。子宮体癌のみならず、卵巣癌、子宮頸癌症例に応用範囲を広げていく。

## 4. 研究成果

基礎的研究により①腫瘍細胞を検出するための新たなマーカーの設定、②残存腫瘍細胞の検出法としての定量RT-PCR法の確立、③カットオフ値の設定、を行った。これらの方法を用いて子宮体癌患者の末梢血中・リンパ節における悪性腫瘍細胞量を推定し、さらに多くの症例を対象として以下の(1)~(5)について検討中である。(1)当院産婦人科で治療を受けた子宮体癌患者の末梢・リンパ節中の腫瘍細胞を定量的に検出し、病理学的診断や進行期との相関関係を検討した。(2)子宮体癌患者の根治術時に摘出したリンパ節中の腫瘍細胞量と再発の有無、生命予後を併せて解析し、子宮体癌における予後因子と成り得るかを検証している。複数のマーカーを組み合わせ、従来の血清腫瘍マーカーとの相関関係も検討した。(3)末梢血液中の悪性腫瘍細胞を定量的に検出して、カットオフ値以上を示した場合には追加精査を行い、従来の腫瘍マーカーでは検出困難な早期・微小病変の

検出能力について可能性を検証した。(4)対象を子宮体癌だけでなく、卵巣癌、子宮頸癌症例に広げた。子宮体癌と同様に、進行期との相関関係、再発のリスク評価、予後予測、早期発見のためのスクリーニング能力について検討した。(5)放射線治療時の末梢血中の悪性腫瘍細胞量を推定し、放射線治療前後での悪性腫瘍細胞量の変化について検討した。上記(1)~(5)の検討は、症例数・サンプル数を重ね継続中であり、統計学的な有意差を求めて解析中である。また、臨床応用可能な効率性を追求し、検査方法・解析の手順について改良を続けている。

#### 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 2 件)

① 佐藤直樹、高橋道、田中秀則、藤本俊郎、佐藤宏和、田中俊誠、腫瘍マーカーの現状、産婦人科の実際、55 巻、2135-2140、2006、査読なし

② 藤本俊郎、佐藤直樹、佐藤宏和、田中俊誠、子宮体癌の術前診断-子宮体癌の手術療法；リンパ節郭清を中心として、産婦人科の世界、59 巻、725-734、2007、査読なし

[学会発表] (計 15 件)

① 佐藤宏和、佐藤直樹、佐藤敏治、清水大、藤本俊郎、田中俊誠、当院における子宮体癌の治療成績-AP 療法と TJ 療法の比較-、第 59 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2007

② 軽部裕子、藤本俊郎、清水大、畠山佑子、佐藤敏治、佐藤直樹、佐藤宏和、高橋道、田中俊誠、子宮体癌のリンパ節転移に関する検討、第 59 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2007

③ 小西祥朝、佐藤宏和、藤本俊郎、佐藤敏治、佐藤直樹、清水大、田中俊誠、子宮原発の Epithelioid angiosarcoma の 1 例、第 59 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2007

④ 佐藤直樹、佐藤敏治、佐藤宏和、清水大、田中俊誠、卵巣原発類内膜腺癌 Sertoliform variant の 1 例、第 59 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2007

⑤ 田中秀則、高橋道、小西祥朝、佐藤敏治、清水大、佐藤直樹、藤本俊郎、佐藤宏和、田中俊誠、卵巣癌組織の核異型度で予後は推定できるか？、第 59 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2007

⑥ 佐藤直樹、佐藤敏治、熊澤由紀代、藤本俊郎、佐藤宏和、田中俊誠、卵巣明細胞腺癌における腹水細胞診陽性の意義、第 55 回日本産科婦人科学会北日本連合地方部

会総会・学術講演会、2007

⑦ 佐藤宏和、佐藤直樹、佐藤敏治、熊澤由紀代、藤本俊郎、田中俊誠、当院における過去 17 年間の Sarcoma の臨床的検討、第 60 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2008

⑧ 熊澤由紀代、藤本俊郎、佐藤敏治、佐藤直樹、佐藤宏和、田中俊誠、当院における初期子宮体癌症例の検討、第 60 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2008

⑨ 佐藤直樹、佐藤宏和、佐藤敏治、藤本俊郎、田中俊誠、卵管原発未分化癌と初期診断し、腹膜原発悪性中皮腫と最終診断された 1 例、第 60 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2008

⑩ 牧野健一、小西祥朝、木藤正彦、佐藤宏和、森耕太郎、佐藤直樹、藤本俊郎、田中俊誠、AFP 産生子宮体部腫瘍の 1 症例、第 125 回日本産科婦人科学会東北連合地方部会総会・学術講演会、2008

⑪ 久保真一、佐藤直樹、藤本俊郎、佐藤宏和、福田淳、田中俊誠、子宮全摘術後に発生した上皮性卵巣癌症例の検討、第 146 回日本産科婦人科学会秋田地方部会学術講演会、2008

⑫ 森耕太郎、小西祥朝、佐藤宏和、佐藤直樹、藤本俊郎、福田淳、田中俊誠、TC 療法により強皮症様皮膚硬化を呈した卵巣癌の 1 症例、第 61 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2009

⑬ 佐藤直樹、藤本俊郎、小西祥朝、佐藤宏和、福田淳、田中俊誠、当院における卵巣明細胞腺癌に対する治療とその成績、第 61 回日本産科婦人科学会総会ならびに学術講演会、2009

⑭ 鎌田久美子、佐藤直樹、藤本俊郎、小西祥朝、清水大、田中俊誠、体腔液細胞診において明細胞腺癌様の所見を呈した卵巣漿液性腺癌症例の臨床像、第 150 回日本産科婦人科学会秋田地方部会学術講演会、2009

⑮ 佐藤直樹、藤本俊郎、小西祥朝、清水大、鎌田久美子、田中俊誠、4 度の腫瘍減量手術を経て治療継続中の腹膜原発悪性中皮腫 1 例、第 57 回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会総会・学術講演会、2009

[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] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 直樹 (SATO NAOKI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：40447199

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし