

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09167

研究課題名(和文)非小細胞肺癌縮小手術におけるCDCA1-OSNA法の確立

研究課題名(英文)Establishment of CDCA1-OSNA assay for limited resection 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CK19をターゲットとした従来法のOSNAでのリンパ節転移の検出を行った結果、解析できた症例は246例、病理診断と照合するとシスメックス社推奨の基準で解析すると感度44.1%、特異度98.0%となった。また、当科にて根治的切除を行ったpN0非小細胞肺癌症例269例を対象とし、郭清2群リンパ節におけるCDCA1の発現を検討した結果、腫瘍がNUF2高発現を示した患者は、NUF2低発現の患者と比較して、有意に再発率が高かった( $P=0.01$ )。再発例のうち、NUF2高発現例では縦隔リンパ節転移での再発が多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OSNA法の結果では、特異度は高いが、感度が低いという結果であった。基準より解析したリンパ節の重量が少ない検体が多かったため、基準値の設定を見直すなど更なる解析が必要である。また、real-time PCRにおける結果ではOSNA法のマーカーであるCK19と比較し、肺門リンパ節をターゲットとした場合、CDCA1を用いたほうが優れていたため、今後CDCA1を用いたOSNA法の開発をめざしていきたい。NO症例の解析における結果からはCDCA1の検出により、病理診断で検出できないmicro metastasis を捉えることができる可能性が示唆された。今後更なる検討を行っていきたい。

研究成果の概要(英文)：The results of the detection of lymph node metastasis by OSNA, a conventional method targeting CK19, showed that 246 cases could be analyzed, and that the sensitivity and specificity were 44.1% and 98.0%, respectively, when analyzed according to the Sysmex recommended criteria in comparison with the pathological diagnosis. In addition, the results of CDCA1 expression in group 2 lymph nodes of 269 patients with pN0 non-small cell lung cancer who underwent radical resection at our department showed that patients whose tumors showed high NUF2 expression had a significantly higher recurrence rate compared to patients with low NUF2 expression ( $P=0.01$ ). Of the recurrence cases, those with high NUF2 expression were more likely to recur with mediastinal lymph node metastases.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：非小細胞肺癌 リンパ節転移 CDCA1 OSNA法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(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いるが、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による偽陽性を示すため、新たなマーカーを検討する必要性が指摘されている。

(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巢にしか発現しない遺伝子であり、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。上皮マーカーの CK19 に比べ、癌細胞と精巢にしか発現していない CDCA1 は、理想的な転移検出マーカーになりうる。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。\*IJC 1(11), 2616-26,2008.

### 2. 研究の目的

(凍結検体における CDCA1-OSNA 法の有用性の検討)

同意を得られた非小細胞肺癌手術症例において、郭清した肺門リンパ節のうち最も病変に近く、最も大きなリンパ節の一部を凍結保存し、CDCA1-OSNA 法と従来の CK19 を用いた OSNA 法を実施し、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 H-E 染色での判定と比較し、感度、特異度を算定する。CDCA1 と CK19 とを比較しマーカーとしての優劣を検定するとともに、これらの症例の予後との対比を行い、病理組織診断と比較しより微小転移を検出できる可能性について検討する。

(術中迅速診断としての CDCA1-OSNA 法の実施)

今後おこわわれる非小細胞肺癌根治術において転移リンパ節の一部で CDCA1-OSNA 法を実施し、転移検出能に加え、ランニングコストや実施の問題点を解析。迅速病理組織診断ができない施設での肺区域切除の実施に用いることができないかを検討する。

### 3. 研究の方法

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。凍結した標本から mRNA を抽出。cDNA を作成。Taqman 法を用い CDCA1 mRNA の発現定量を行う。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。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、有用性を検討、CDCA1-OSNA 法を確立する。さらに CDCA1-OSNA 法を用いた臨床試験を始める。

### 4. 研究成果

#### (1) CDCA-1-OSNA の確立

まず、CDCA-1 をターゲットとした OSNA 法の実現を目指し、65 の一定温度で進行する RT-LAMP 法の開発のためのプライマー設計を行った。Cell line を用い、サーマルサイクラーで反応を行い、吸光度で定量する系を作成して、OSNA 法で使用できる試薬の作成、機器の借用をシスメックス社と交渉したが未だ実現に至っていない。

#### (2) 手術検体での OSNA 法の実施

患者に同意を取得し、凍結保存した郭清リンパ節の一部を用いて OSNA 法を行うために、機器の貸し出し、試薬の提供をシスメックス社と交渉したが、受託で解析を依頼するほうがコストを低減できるとの結論に達し、2018 年から 2020 年までの 250 症例の肺門リンパ節と縦隔リンパ節を各 1 検体の合計 500 検体をシスメックス社に提出し、CK19 をターゲットとした従来法の OSNA でのリンパ節転移の検出を行った（図 1）。解析できた症例は 246 例、病理診断と照合するとシスメックス社推奨の基準で解析すると感度 44.1%、特異度 98.0%となった。

図 1

N1

	OSNA minus	OSNA plus
Patho minus	221	6
Patho plus	11	8

N2

	OSNA minus	OSNA plus
Patho minus	226	3
Patho plus	8	7

Total

	OSNA minus	OSNA plus
Patho minus	447	9

Patho plus	19	15
------------	----	----

Sensitivity=44.1

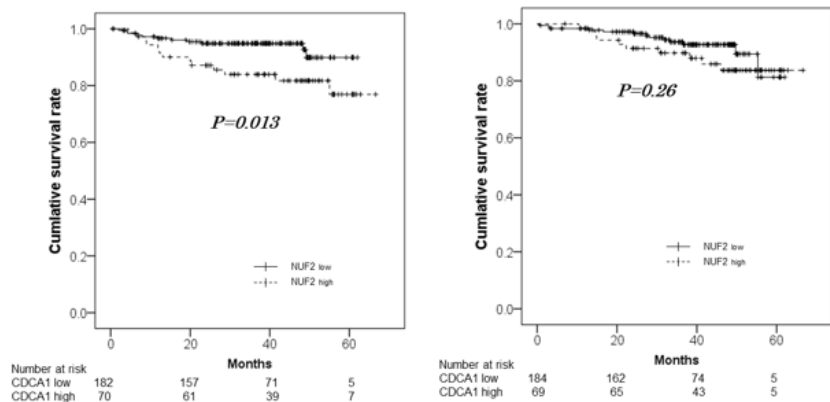
Specificity=98.0

(3) 郭清リンパ節での CDCA1 の発現解析)

2017 年 10 月から 2021 年 9 月までに当科にて根治的切除を行った pN0 非小細胞肺癌症例 269 例を対象とし、郭清 2 群リンパ節における CDCA1 の発現を検討した。男性 148 例、女性 121 例、年齢は平均 70.1 歳 (16 歳から 90 歳)、喫煙歴ありが 169 例、なしが 100 例。肺葉切除が 103 例、区域切除が 11 例、肺全摘が 2 例であった。組織型は腺癌が 213 例、扁平上皮癌が 51 例、腺扁平上皮癌が 5 例、大細胞癌が 1 例であった。図 2 は、郭清リンパ節における NUF2 発現量と患者の生存率との相関を示したものである。ROC 曲線に基づき、NUF2 高発現例と低発現例の間の閾値を 0.120 とした。腫瘍が NUF2 高発現を示した患者は、NUF2 低発現の患者と比較して、無再発生存期間 (P=0.013、図 2 a) は短い、全生存期間 (図 2 b) は変わらなかった。再発例のうち、NUF2 高発現例では 14 例中 9 例 (64.3%) が初回再発時に縦隔リンパ節転移を有していた。一方、NUF2 低発現例では 11 例中 3 例 (27.3%) しか縦隔リンパ節転移の再発が確認されなかった。

図 2 a

図 2 b



(4) 結論、考察

OSNA 法の結果では、特異度は高いが、感度が低いという結果であった。基準より解析したリンパ節の重量が少ない検体が多かったため、基準値の設定を見直すなど更なる解析が必要である。また、real-time PCR における結果では OSNA 法のマーカーである CK19 と比較し、肺門リンパ節をターゲットとした場合、CDCA1 を用いたほうが優れていたため、今後 CDCA1 を用いた OSNA 法の開発をめざしていきたい。N0 症例の解析における結果からは CDCA1 の検出により、病理診断で検出できない micro metastasis を捉えることができる可能性が示唆された。今後更なる検討を行っていきたい。

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 白神 慈
2. 発表標題 N0非小細胞肺癌における縦隔リンパ節微小転移の検出：CDCA1の有用性
3. 学会等名 第39回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2022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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------