

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591818

研究課題名（和文） 分子生物学的手法を用いた術中リンパ節転移診断法の確立

研究課題名（英文） Establishment of rapid Intraoperative Detection of Lymph Node metastasis Using Molecularbiological Method

研究代表者

白石 健治 (SHIRAISHI KENJI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70363538

研究成果の概要（和文）：

肺癌の手術治療成績の向上のため、分子生物学的手法を用いた微小リンパ節転移の検出法を確立すべく、TRC法（Transcription Reverse transcription Concerted reaction）を用いたCEAメッセンジャーRNAの測定を行った。この方法は高い感度で癌細胞の存在を検出できる可能性が示されたが、従来の病理組織学的診断との整合性など、今後の更なる検討の必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To improve the results of surgical treatment for lung cancer, a molecular biological TRC method (Transcription Reverse transcription Concerted reaction) was carried out to quantify the messenger RNA level of CEA. This method have high sensitivity in detecting the presence of cancer cells, but more investigation need to verify the accuracy of this method, for exsample, the matching of the result with histopathological diagnosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：TRC法，リンパ節転移，肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本人の死因に上位を占める難治性の癌で、発見時には既に手術適応とならないことも多い。幸い臨床的に遠隔転移の認められない耐術能のある症例に対し手術治療を行うが、術後の病理学的病期診断でI期に分類されても、局所、リンパ節再発、あるいは遠隔転移再発をきたす症例も少なくない。

一方で、診断、治療技術の進歩により、治癒する癌も増えてきている。このことは、同一患者に第二、第三の癌の発生をみるという現象につながってきている。そこで初回治療での根治性を損なうことなく、新たな癌に対する治療の選択肢を少しでも多く残すために、機能温存のための積極的な縮小手術の技術の確立が急がれる。

2. 研究の目的

手術中にセンチネルリンパ節への転移の有無を迅速かつ正確に判定できれば、手術術式の決定に大いに役立つ。本研究は分子生物学的手法であるTRC法を術中迅速診断に応用することを目的としている。

①センチネルリンパ節(SN)とは腫瘍から最初にリンパ流を受けるリンパ節であり、最初に転移を生じるリンパ節である。ほとんどすべての臓器癌においてリンパ節転移の傾向から1群、2群、あるいはさらに3群のリンパ節が定められており、センチネルリンパ節のほとんどは1群のリンパ節である。しかし1群のリンパ節の中でも転移部位は様々である。また1群のリンパ節に転移をせず2群のリンパ節(跳躍転移)することがある。それは個々の症例においてリンパ流が異なるためである。非小細胞肺癌においても約20-40%の症例にその跳躍転移が認められている。そのため 癌の手術の原則は1群、2群のリンパ節をすべて切除することである。しかしその欠点として手術侵襲が多くなるものがあげられる。そこで個々の症例においてセンチネルリンパ節を手術中に同定でき、術中迅速診断によりセンチネルリンパ節に転移が無いことを確認できれば、リンパ節廓清の範囲を縮小し、患者が受ける手術のダメージを軽減できる。

縮小手術はリンパ節転移が無いことが絶対条件であるため、従来は縮小手術の適応決定に多くのリンパ節を迅速診断に提出する必要があったが、センチネルリンパ節を同定することにより1-2個のセンチネルリンパ節の迅速診断のみで、手術中のリンパ節転移診断が正確にできるようになった。転移が無ければ縮小手術で終了し、転移陽性であれば縮小手術から肺葉切除に切り替える方法である。センチネルリンパ節を同定することにより手術中のリンパ節転移の有無が正確に判断でき、結果として正しい縮小手術の適応決定ができる。

しかしこの方法の問題点として、割面のHE染色で判定するので、リンパ節内の小さな転移は見逃される危険性があることである。そのためにHE染色より精度の高い転移の検出方法が必要である。

近年、分子生物学的手法(RT-PCR法:4時間ほど必要)を用いた術中迅速転移診断が開発され、その正確性、重要性が当科および多施設で証明されつつある。さらに、最近ではTRC法(transcription reverse transcription concerted reaction)を用いることで診断の迅速化(約1時間)が可能となった(Ishiguro T, et. al. Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel. Analytical Biochemistry 314 (2003) 77-86 Ishii T, et al. Rapid Genetic

Diagnosis With the Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction System for Cancer Micrometastasis. Annals of Surgical Oncology, 2004 11(8):778-785)。これによりこれまでの病理組織学的診断では検出できなかった微小転移が短時間で検出できるようになってきた。この技術に応用することにより、HE染色より正確にセンチネルリンパ節への転移の有無を術中に判断できると考えられる。

しかし臨床に応用するためには、TRC法でのリンパ節転移の検出のCutoff値、およびその感度と特異度を検証する必要がある。そのための基礎的な実験を行い、TRC法によるセンチネルリンパ節の転移検索への道を開くのが今回の研究の目的である。

②基礎実験として、TRC法による微小転移の検出の感度・特異度を検定する。具体的には、正常リンパ球とCell Lineの癌細胞との希釈系列を作る。これらのサンプルにTRC法を行い、時間経過とともに蛍光の強度を測定する。このデータをもとに正常細胞と癌細胞の比がどの程度まで大きくても、すなわちどの程度微小な転移まで検出できるかを検討する。

今回の研究の目的の一つは、TRC法のスピードを活かした術中リンパ節転移の有無の判断の正確さを検証することである。その為にまずは手術時に得られた組織の一部を凍結保存しておく。その後これらの検体からメッセンジャーRNAを抽出し、TRC法を行う。そしてその結果を病理組織学的診断の結果と比較検討することによりTRC法の妥当性を検証する。これらの結果が高く相関すればTRC法が術中迅速診断として信用できる方法であることが証明できる。

もう一つの研究目的は術後の追跡調査により、TRC法と病理組織学的診断それぞれの再発、予後との相関を検討し、どちらがより正確に病期診断、予後予測につながるかを検討することである。病理組織学的に転移なしと判断されたがTRC法では陽性と判定された症例が、追跡調査でTRC法で陰性であった症例より予後が悪ければ、病理組織学的に検出できなかった微小転移をTRC法で検出できたことの証明となる。

3. 研究の方法

(要旨)原発性肺癌の手術の際に摘出されるリンパ節、洗浄胸水、血液を採取し、TRC法(Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction System)を用いて癌特異的CEAメッセンジャーRNAを定量的に検出する。これを病理組織学的検査結果と照合し、TRC法による転移の有無の判定の妥当性を検定する。さらに術後の追跡調査を行い、病理組織学的に検出困難であった微小転移をTRC法で検出できる可能性を検討する。

【対象】

原発性肺癌に対する治療として原発巣切除+リンパ節郭清が必要と考えられ、かつ本研究に対して参加の合意が得られた症例を対象とする。年齢、性別は問わない。

【方法】

1. 現在、標準手術とされている肺癌手術(原発巣+リンパ節郭清)の際に摘出されるリンパ節、洗浄胸水、血液を採取する。
2. 得られたリンパ節はメスで2分割、洗浄胸水に関しては採取したものを2つに分け、1つは病理診断により、もう1つは核酸を抽出し分子生物学的手法(PCR法やTRC法)により転移診断を行う。
3. 上記の方法で得られたリンパ節、胸膜転移状況を解析し、再発・予後等と比較検討する。
4. 採取した血清、摘出した切除標本の原発巣と正常組織からそれぞれ1cm角で組織を切り出し、分子生物学的手法(PCR法やTRC法)を用いて腫瘍マーカーの検索に用いる。

試料は、連結可能匿名化を行った後、使用日まで呼吸器外科医局研究室にて-80℃で保存する。

※ TRC法について

検体から抽出したRNAをサンプルとし、TRCRリアルタイムモニターを用いてRNAの増幅と検出を同時に行うことができるシステム。

TRCは一定温度下でRNAを増幅する方法であり、標的RNAは増幅部分がトリミングされ、逆転写反応と転写反応を繰り返すことによりRNAを増幅する。続いてINAF(intercalation activating fluorescence Probe)を用いて合成されたRNAと結合させ、RNA量に依存して蛍光が増感、蛍光強度の変化を検出するシステム。

【評価】

上記方法で得られたリンパ節や胸膜への転移状況と再発、予後との相関を検討する。同時に血中の微量癌細胞の検出と原発巣の解析を行い腫瘍マーカーの検索を行う。

4. 研究成果

平成21年度は本研究に対して院内倫理委員会の承認を得た。その上で原発性肺癌に対する治療として原発巣切除+リンパ節郭清が必要と考えられ、かつ本研究に対して参加の合意が得られた症例を対象とし、手術(原発巣+リンパ節郭清)の際に摘出した原発巣、正常肺組織、リンパ節を採取し連結可能匿名化を行った後、使用日まで呼吸器外科医局研究室にて-80℃で保存した。研究期間中に42症例分の腫瘍サンプル、2011個のリンパ節サンプルを採取、保存した。このうち、4例、6

リンパ節ステーションに病理組織学的に癌の転移が認められた。

RNAの抽出には、TaKaRa FastPure RNA Kitを用いた。凍結しておいた組織を約5mm角の大きさに切断しメスで刻み、2mLのμチューブ内にジルコニアボール、バッファーLBと共にLBQIAGEN TissueLyserIIで30Hzで5分間処理した。そのうち、TaKaRa FastPure RNA Kitを用いホモジネートをカラムへ加え、RNAの吸着、洗浄を行った。そうして得られたTotal RNAは氷上で移送し、東ソー社のTRCRリアルタイムモニターTRCRapid-160でCEAのメッセンジャーRNAを定量した。東ソー株式会社のCEA mRNA測定試薬、TRCRtest CEA-mを取扱説明書にのっとり使用した。はじめに添付の陽性標準液の希釈系列を作製し、これに基質試薬、プライマー試薬を混合し専用のチューブにいれ加温した酵素試薬を加えTRCRapid-160で経時的に蛍光強度を測定した。このデータを基に検量線を作製し、以下の測定に用いた。腫瘍やリンパ節から抽出したTotal RNAも同様に、TRCRtest CEA-mの基質試薬、プライマー試薬と混合、専用チューブに入れたのち東ソーTRCRリアルタイムモニターTRCRapid-160で加温した酵素試薬を加え測定した。TRCRapid-160に付属のソフトウェアを用いて先に作製した検量線をもとにサンプル中のCEA mRNAを定量した。

その結果、概ね腫瘍から抽出したRNAではCEAのmRNAが検出された。しかしながら、病理組織学的に転移なしとされたリンパ節でもTRC法ではCEAのmRNAが検出されるものがあった。また、手術時に切除標本から同時に保存しておいた非癌部の肺組織から抽出したRNAでもCEAのmRNAが陽性となる症例も認められた。全般的にこの検査法の偽陽性の頻度が高い傾向が認められた。この原因としては、(1)癌組織と正常肺の細胞密度の違いによるサンプル量の不均一性、(2)サンプル採取時のコンタミネーション、不適切な部位でのサンプル採取、あるいは(3)病理組織学的検査の方が、検鏡したスライスに癌細胞がなかったことによる偽陰性であった可能性などが考えられる。

(1)に関しては、RNAの抽出はRNaseの影響を受けやすいため、手早くなるべく凍結状態を保って処理する必要があるため、正確な重量の測定など組織量をそろえることが技術的に難しい問題がある。また、組織によるRNA抽出の効率の問題なども影響してくる。Total RNAで吸光度などにより定量し以後の反応に一定量のサンプルを持ち込むなどの工夫を必要とすると考えられる。

(2)に関しては、手術室で標本摘出後、清潔なメスを用いてまず正常肺から、その後腫瘍組織を、病理組織学的検索に影響を与えない部位で行っている。リンパ節に関しても、現

在のところで病理組織学的検査が以後の治療方針にも影響を与える重要な検査になるので、それに影響を与えない範囲でのサンプリングとなってしまうその影響は否定できない。これについては、病理組織検査用のホルマリン固定・パラフィン包埋をサンプルとし、マイクロダイセクションなどにより腫瘍部、非腫瘍部を高純度に採取してRNAを抽出し解析する方法なども考えられるが、質の良いRNAを得るには現在の技術では新鮮凍結標本にはおよばないと考えられるので、現時点では有効な改善策は立案できない。

(3)に関しては、この研究で最も明らかにしたかったことではあるが、偽陽性率の高さ、観察期間の短さ、また症例数の不足により、現段階ではこの検査法の結果によって治療方針を決定するまでの科学的根拠は得られなかった。

今回の研究により、TRC法を用いて微小癌転移を検出できる可能性は示唆されたが、臨床応用へはさらなる症例の積み重ねと、技術的な問題点の克服が必要と考えられた。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

白石 健治 (SHIRAISHI KENJI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70363538