

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791056

研究課題名(和文) 悪性黒色腫に対する RT-LAMP 法を用いた超迅速センチネルリンパ節微小転移診断
研究課題名(英文) Rapid diagnosis for tiny sentinel node metastasis in malignant melanoma using RT-LAMP method

研究代表者

金子 高英 (KANEKO TAKAHIDE)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20333718

研究成果の概要(和文)：皮膚悪性黒色腫は、化学療法や放射療法に対して抵抗性であり、予後不良の癌である。今回の研究では、黒色腫患者の微小リンパ節転移の超迅速術中診断を臨床応用できる安定した方法・技術論を確立させることを目的とした。その結果、この研究期間に新たに約30例のセンチネルリンパ節生検を行い、総計50例の症例となった。RT-PCRと病理が一致した症例は82%であり、一方一致しなかった症例は18%であった。この結果、RT-PCRを用いてセンチネルリンパ節生検は非常に有用であることがさらに確かめられた。さらに、RT-LAMP法について検討したところ、RT-PCR法と同程度の検出能力であり、さらに条件設定の検討が必要なことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanoma is generally resistant for chemotherapy and radiation therapy, and one of malignant tumors with the worst prognosis. The purpose of this study is to establish rapid diagnosis for tiny sentinel node metastasis in malignant melanoma. As a result, we have performed sentinel node biopsies about approximate 30 cases of melanoma patients, resulting in total of 50 cases. In 82% of cases, RT-PCR diagnosis is correspond to pathological diagnosis while RT-PCR is different from pathological diagnosis in 18%. This result further confirms that RT-PCR diagnosis for tiny sentinel node metastasis in malignant melanoma is very useful method. In addition, we examined feasibility of RT-LAMP method and showed that RT-LAMP and RT-PCR methods have almost the same ability to detect tiny metastasis of malignant melanoma. We think we need further experiments to improve conditions of RT-LAMP method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫、RT-LAMP 法、センチネルリンパ節

1. 研究開始当初の背景

皮膚悪性黒色腫は、化学療法や放射療法に対して抵抗性であり、全領域の悪性腫瘍の中でも特に予後不良の癌である。その大きな理由のひとつは、早期にかつ容易に所属リンパ節に転移するからであり、現在、極微小な転移を確実に診断できる方法はない。したがって、この高率にリンパ行性に転移する皮膚悪性黒色腫において、患者の予後を改善し根治的な治療を行うためには早期の微小リンパ節転移の有無を正確に評価することが非常に重要であり、昨今、これらの微小リンパ節転移を組織学的に検索するセンチネルリンパ節生検が欧米から端を発し、国内においても悪性黒色腫、乳癌などの癌腫を中心に積極的に取り組まれている。初めて流入するリンパ節（初めてがん細胞が遭遇し転移するリンパ節＝センチネル（見張り）リンパ節）を放射性同位元素もしくは青色色素にて同定し、術中に選択的に摘出できるセンチネルリンパ節生検はエポックメイキングな検査として脚光を浴びているが、組織学的診断の限界、判定までに要する時間など問題点も多い。これらの問題を克服するために、分子生物学的アプローチが研究用途において試みられている。その代表的検査法として RT-PCR 法があげられる。RT-PCR 法は微量の癌細胞の標的 mRNA を分子レベルで検出できる有用な検査である。しかし、従来の方法であると遺伝子の抽出・増幅に 4-6 時間を要し、実験レベルではよいが、術中迅速診断を行い、腫瘍摘出術とリンパ節郭清を同時に 1 期的に行うのは、現実的に難しい。そこで、我々は非常に短時間で遺伝子増幅が可能な新しい PCR 法として最近報告された LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法に着目した。通常の PCR 法では増幅する遺伝子の両端にプライマーを設定する。そのため、伸長反応は両端で停止するが、LAMP 法ではさらに 2 つの折り返しプライマーを追加し、伸長反応の継続を可能にした。さらに、100°C の熱変性の過程が必要なく、65 度の一定の温度で反応を行えるため、短時間でかつ普通の恒温槽で PCR が可能になった。

2. 研究の目的

今回の研究では、最終的に、黒色腫患者の微小リンパ節転移の超迅速術中診断を臨床応用できる安定した方法・技術論を確立させることを目指す。そのために、RT-PCR 法でのセンチネルリンパ節生検を行い、病

理診断と RT-PCR 法の比較をさらに症例を増やして検討する。次に、黒色腫細胞とリンパ球を様々な比率で混じり、その混合物から mRNA を抽出し、RT-LAMP 法の検出限界を確認する。また、RT-LAMP 法とすでに当教室で行ってきた RT-PCR 法、組織診断の結果を照会し、特異性、感度を比較し、より鋭敏であることを確認する。黒色腫患者に対し、現場で実践するに際し、リンパ節摘出から RT-LAMP 法の結果がでるまでの行程時間がばらつきなく安定し、時間効率に優れていることを確認する。そして、黒色腫患者に対し、術中迅速診断を RT-LAMP 法を用い、実践、その結果・問題点を検討する、の 5 点を中心に研究を行う。最後に、ラットを用い、黒色腫転移モデルを作成し、早期微小転移リンパ節を摘出し、実際に RT-LAMP 法を行い、安定した黒色腫関連遺伝子の増幅が得られることを確認する、研究を予定した。

3. 研究の方法

RT-LAMP 法の感受性と特異性の検討については、メラノーマ細胞内のメラニン合成酵素でメラノーマ特異抗原である Tyrosinase、gp100、MART-1 それぞれの遺伝子産物の検出における感受性、特異性を確認するためにヒトメラノーマ細胞株 SKmel28 とヒト単球系細胞株 JurKat を様々な比率で混合し、その混合物により RNA を抽出した RT-LAMP 法を施行、遺伝子産物の検出限度を探る。具体的には、ヒトメラノーマ細胞とヒト単球系細胞の比率を 1 対 100、1 対 1000、1 対 10000、1 対 100000 と順次比率を変更していく。組織学的検査、RT-PCR 法との比較検討に関しては、すでに我々はすでに多くの悪性黒色腫患者に対しセンチネルリンパ節生検を行い、ルーチンとなっている組織学的検査を行っている。また実験レベルでは、センチネルリンパ節の一部のサンプルから mRNA を抽出保存し、RT-PCR 法で分子生物学的レベルでメラノーマ関連遺伝子の解析をおこなってきた。それらのサンプルすべてに対し、RT-LAMP 法を施行し、組織学的検査、RT-PCR 法で検索しているメラノーマ関連遺伝子である Tyrosinase、gp100、MART-1 の遺伝子の検出を行い、過去の結果と比較し、特異度、感度を検討する。摘出から RT-LAMP 法までの要する時間の検討については、前述の実験によって検討・決定された適切なリンパ節の試料サイズをもとに摘出したリンパ節の一部をサンプリングし、mRNA を抽出、それを標的としリアルタイム

ム濁度測定装置 LA-320C を用いて、RT-LAMP 法を施行し、遺伝子検出を行い、判定する。この一連の作業をスムーズに 1 時間程度で完了させなければ、術中迅速法には適用できないので、頻回によるシュミレーションを研究代表者が行い、安定して迅速な作業ができるかを確認する。センチネルリンパ節転移モデルマウスの作成では、臨床的に明らかなリンパ節転移は、実際組織学的にもリンパ節全体を置換するほどの腫瘍細胞がみられるのが一般である。従って、どの部位を試料に用いても組織学的もしくは分子生物学的に結果はほぼ同一性が得られるはずである。一方、センチネルリンパ節の中にわずかなメラノーマ微小転移が存在する場合には、採取した部位により、腫瘍細胞の局在にばらつきができることが想定される。従って、動物実験レベルで微小リンパ節転移モデルを作成し、リンパ節のどの部位を採取して RT-LAMP 法を施行すると再現性が得られるか、検討する必要がある。そこで、マウスの腹腔内に、ヒトメラノーマ細胞株 SKme128 を注射し、メラノーマを播種させる。同時期に播種させたマウスを時期を変え腹腔内リンパ節を摘出し、組織学的にリンパ節転移を確認する。顕微鏡的に確認できうる最短時期より短い期間のマウスのリンパ節を顕微鏡的に潜在、つまり分子生物学的に検索するに適した転移リンパ節として、摘出した腹腔内リンパ節 1 個丸ごと、ホモジネートした後に、mRNA を抽出し RT-LAMP 法を施行、Tyrosinase, gp100, MART-1 それぞれの遺伝子産物を検出する。そして播種後同時期に摘出した腹腔内リンパ節を長軸に 2 分割、4 分割、8 分割し、その 1 切片を同様に試料として用い、メラノーマ関連遺伝子の検出をおこない、試料のサイズと、検出感度の関係性を検討する。

4. 研究成果

この研究期間に新たに約 20 例のセンチネルリンパ節生検を行い、総計 50 例の症例となった。その結果、RT-PCR と病理が一致した症例は 82%であり、一方一致しなかった症例は 18%であった。この結果、RT-PCR を用いてセンチネルリンパ節生検は非常に有用であることがさらに確かめられた。さらに、RT-LAMP 法について検討したところ、RT-PCR 法と同程度の検出能力であり、さらに条件設定の検討が必要なことが明らかになった。今回、動物実験を予定していたが、動物購入資金や研究時間が十分ではなく、おこなうことができなかった。その他の研究成果については、下記の論文に記載した。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kimura Y, Kaneko T, Akasaka E, Nakajima K, Aizu T, Nakano H, Sawamura D.
Multiple eruptive dermatofibromas associated with Hashimoto's thyroiditis and myasthenia gravis. *Eur J Dermatol*, 20: 538-539, 2010. 査読有
- ② Takemoto H, Tamai K, Akasaka E, Rokunohe D, Takiyoshi N, Umegaki N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Nakano H, Sawamura D.
Relation between the expression levels of the POU transcription factors Skn-1a and Skn-1n and keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci*, 60, 203-205, 2010. 査読有
- ③ Miura H, Ono S, Nagahata M, Shibutani K, Kakehata S, Morimoto K, Seino H, Kakuta A, Aoki M, Hatayama Y, Kawaguchi H, Takai Y, Abe Y, Kaneko T, Sawamura D, Hanada K.
Lymphoscintigraphy for sentinel lymph node mapping in patients with malignant skin neoplasms of the lower extremities. *Ann Nucl Med*, 24:601-608, 2010. 査読有
- ④ Takeda H, Ikenaga S, Kaneko T, Nakajima K, Harada K, Hanada K, Sawamura D.
Proliferating trichilemmal tumor developing in nevus sebaceous. *Eur J Dermatol*, 20: 664-665, 2010. 査読有
- ⑤ Rokunohe D, Nakano H, Oshima H, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Sawamura D.
Giant cutaneous granular cell tumour with papillomatous appearance. *Clin Exp Dermatol*. 2010; 35: e7-9. 査読有
- ⑥ Takiyoshi N, Nakano H, Kaneko T, Aizu T, Nakajima K, Akasaka E, Rokunohe D, Sawamura D.
A linear basal cell carcinoma undergoing spontaneous regression. *Clin Exp Dermatol* 34: e411-413, 2009. 査読有
- ⑦ Takiyoshi N, Nakano H, Kaneko T, Aizu T, Nakajima K, Akasaka E, Rokunohe D, Sawamura D.
Multiple desmoplastic trichoepitheliomas with ossification

and cholesterol deposition.
Clin Exp Dermatol 34: 634-635, 2009.
査読有

- ⑧ Takiyoshi N, Nakano H, Matsuzaki Y, Aizu T, Kaneko T, Rokunohe D, Akasaka E, Jin K, Sawamura D, OharaK.

An eclipse in the subungual space: a diagnostic sign for a subungual epidermal cyst?

Br J Dermatol 161: 962-963, 2009.

- ⑨ Nishikawa Y, Kaneko T, Kakiyoshi N, Aizu T, Nakajima K, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D.

Dermascopy of eccrine poroma with calcification.

J Dermatol Case Rep 3: 52-54, 2009.

査読有

〔学会発表〕(計3件)

- ① 金子高英, 西川陽平, 滝吉典子, 六戸亜希子, 神 可代, 会津隆幸, 松崎康司, 中野 創, 澤村大輔, 西澤 綾

Weekly Docetaxel 療法を施行し予後の改善がみられた進行期乳房外 Paget 癌の1例.

第26回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2010.6.4-5. 東京

- ② 金子高英, 中島康爾, 中野 創, 澤村大輔, 大石祐子

Favre-Racouchot 症候群の囊腫壁から生じた基底細胞癌の1例.

第61回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 2009.10.24-25. 大分

- ③ 金子高英, 竹内園子, 六戸亜希子, 秋田美季, 池永五月, 木村有子, 中野 創, 澤村大輔, 板井恒二: ボーエン病を伴った放射線角化症に対してエトレチナート内服療法を試行した1例.

第108回日本皮膚科学会総会, 2009.4.24-26. 福岡

〔図書〕(計1件)

- ① 金子高英, 他、学研メディカル秀潤社、皮膚外科学、2010、476-481

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 高英 (KANeko TAKAHIDE)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20333718

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：