

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659164

研究課題名（和文） OSNA 残余検体を用いた乳癌リンパ節転移巣における遺伝子発現解析

研究課題名（英文） Gene expression analysis of metastatic breast cancer in lymph nodes using residual OSNA sample

研究代表者

梅北 善久 (UMEKITA YOSHIHISA)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：80244226

研究成果の概要（和文）：

OSNA法によるセンチネルリンパ節(SLN)検索後の残余検体を使用し、SLN転移巣におけるmaspin遺伝子の発現を解析した。OSNA 0 ;5例, OSNA1+;34例, OSNA2+;59例よりリアルタイム定量PCR解析を行った。maspinの発現率は49.5%で、OSNA2+と非SLN転移に多かった($p<0.0001$)。非SLN転移の有無に関する多変量解析では、maspin 発現は独立した予測因子であった($p=0.0015$)。SLN転移巣におけるmaspinの発現は原発巣におけるmaspin蛋白の発現と有意に相関した($p<0.0001$)。以上より、OSNA残余検体を用いたmaspin遺伝子の発現解析は非SLN転移を予測する有効な方法と成り得る。

研究成果の概要（英文）：

The one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay is a rapid and reliable procedure for the detection of sentinel lymph node (SLN) metastases using molecular biological techniques during the operation of breast cancer. In the present study, we focused “maspin”, which is the poor prognostic factor of human breast cancer and its expression was not detected in normal lymph nodes. The used samples were OSNA;0 (5 samples), OSNA;1+ (34 samples) and OSNA;3+ (59 samples). After the extraction of total RNA from residual OSNA samples, cDNA was generated and quantitative Real-time RT-PCR analysis was performed using human maspin primer/probe set. Maspin mRNA expression was noted in 46 samples (49.5%) and was significantly frequent in OSNA 2+ ($p<0.0001$) and non-SLN metastasis ($p<0.0001$). Multivariate logistic analysis revealed that maspin mRNA expression was an independent predictor of non-SLN metastasis. Moreover, maspin mRNA expression in SLN was significantly correlated with maspin protein expression in primary breast cancer by immunohistochemistry ($p<0.0001$). These results suggested that maspin mRNA expression analysis using residual OSNA samples of SLN-positive breast cancer patients could be a useful tool for predicting non-SLN metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：診断病理学

 1. 研究開始当初の背景
 原発性乳癌の手術中に、センチネルリンパ節

 (SLN)転移の有無をより客観的に解析し得る
 検査法である one-step nuclear

amplification (OSNA)法が近年導入された。しかしながら、OSNA 残余検体を用いて SLN 転移巣における遺伝子発現を解析した報告はまだない。我々が提唱している乳癌の予後不良因子 Maspin の原発巣での発現はリンパ節転移の個数と有意に相関することを見い出しており(未発表データ)、SLN 転移巣における Maspin 発現が非 SLN における転移の有無または個数と相関することが判明すれば、追加廓清の必要性を判断する重要な情報の一つとなることが期待される。

2. 研究の目的

ER, PgR, HER2 の発現状況は乳癌原発巣とリンパ節転移巣においてほぼ同様であることを前提に術前術後のホルモン療法や分子標的治療薬投与が施行されている。しかしながら、進行癌ほどこれらの発現状況に変化が起り易いことが報告されており、ER, PgR に関しては我々も以前報告している。従来の研究は免疫組織化学によるものが大部分であり、リンパ節転移巣における遺伝子発現検索はほとんど成されていない。一方、術中 SLN 生検が普及し、追加廓清の省略が盛んに行われるようになってきた現在ではリンパ節転移巣における遺伝子発現検索は益々困難になっている。しかしながら、近年導入された OSNA 法による術中 SLN 生検後の残余検体はリンパ節と転移巣両方の mRNA を含んでおり、正常リンパ節で発現していない ER, PgR, HER2 の mRNA 発現を定量的に検索し得ることに着目した。さらに乳癌の予後不良因子として我々が見出した Maspin も正常リンパ節では発現していないことから、検索対象とした。OSNA 法による術中 SLN 生検において転移ありと診断された残余検体約 130 例より RNA を抽出し、ER, PgR, HER2, Maspin の発現レベルをリアルタイム定量 RT-PCR 法で解析する。追加廓清された非 SLN の病理組織学的検索で転移があった場合、パラフィン切片より RNA を抽出し、リアルタイム定量 RT-PCR 法でこれらの遺伝子の発現レベルを解析する。これらの結果を原発巣における免疫組織化学による発現状況と比較することによって転移巣(SLN, 非 SLN)の生物学的特性を明らかにする。さらに追加廓清されたリンパ節における転移の有無及び個数と SLN 転移巣における各遺伝子の発現レベルを比較検討することによって追加廓清の必要性を判断する情報と成り得るかを検討する。OSNA 法は数年前に保険収斂された新しい手法であり、研究報告はまだ少ない。通常は廃棄される OSNA 残余検体を利用することで試料入手が困難なリンパ節転移巣における遺伝子発現解析を新たな患者負担を伴うことなく可能にする点が本研究の特色である。また、独自に見出した予後不良因子である

Maspin を転移巣において検索する点も本研究の特色である。転移巣における ER/PgR/HER2/Maspin 発現状況が日常的に検索可能となれば、術後補助療法決定に際し有用な情報を提供可能になることが予想され、将来的には再発の有無と関連するか否かを検討する基礎データになる点でも意義があると考えられる。また Maspin は乳癌の予後不良因子であるとともにリンパ節転移の個数が多い患者により発現頻度が高い(未発表データ)ことから追加廓清の必要性を判断する情報と成り得る可能性がある。

3. 研究の方法

(1) OSNA 残余検体より絶対定量法を用いて解析目的遺伝子である ER, PgR, HER2, Maspin を測定するため、検量線作成用に使用するスタンダードサンプルが必要となる。そのためヒト乳癌培養細胞株(MCF-7, T-47D, SK-BR-3, MDA-MB-231)より total RNA Mini kit (VIOGENE 社)を用いて total RNA を抽出し、Nano Drop (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて RNA の定量及び品質検定を施行後、High Capacity RNA-to-cDNA kit (ABI 社)を用いて cDNA を合成する。cDNA を蛍光標識プローブ (TaqMan Probe, ABI 社)、マスターミックス(Eagle Taq Master Mix with ROX、Roche 社)と反応させ、Roche LightCycler 480 (Roche 社)を用いてリアルタイム定量 PCR を行う。内因性コントロールには GAPDH (ABI 社)を使用する。相対定量法を用いて検討し、それぞれの遺伝子を最も多く発現している培養細胞株を検量線用のスタンダードサンプルに用いる。

(2) OSNA 残余検体のうち、OSNA 結果: 0 (転移なし) 10 例、OSNA 結果: 1+ (2 mm 以下の転移あり) 50 例、OSNA 結果: 2+ (2 mm を超える転移あり) 80 例、病理組織学的に転移あった非センチネルリンパ節それぞれより total RNA Mini kit (VIOGENE 社)を用いて total RNA を抽出し、Nano Drop (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて RNA の定量及び品質検定を施行する。次に High Capacity RNA-to-cDNA kit (ABI 社)を用いて cDNA 合成を行う。ER, PgR, HER2, Maspin それぞれの蛍光標識プローブ (TaqMan Probe, ABI 社)、マスターミックス(Eagle Taq Master Mix with ROX、Roche 社)と反応させ、Roche LightCycler 480 (Roche 社)を用いてリアルタイム定量 PCR を行う。内因性コントロールには GAPDH (ABI 社)を使用する。

3) Roche LightCycler 480 を用いて解析目的遺伝子及び内因性コントロール遺伝子 GAPDH それぞれの検量線を作成し、OSNA 残余検体における各遺伝子の発現を定量解析する。

(4) 乳癌原発巣における ER, PgR, HER2, Maspin の発現を自動免疫染色装置 (DAKO社) を用いた免疫組織化学で検索し、センチネルリンパ節転移巣及び非センチネルリンパ節転移巣における各遺伝子の発現と比較検討する。

(5) 手術時に追加廓清された非センチネルリンパ節における転移の有無及び個数とセンチネルリンパ節転移巣における各遺伝子の発現とを比較検討する。

4. 研究成果

HER2及びER/PgRに関しては期間中に十分なデータ取得ができなかったため、Maspin mRNA発現に的を絞り、研究を施行した。

SLN転移巣において、maspin mRNAの発現は46例(49.5%)に認められ、年齢、病理学的腫瘍径、リンパ管侵襲、組織異型度、ER発現及びHER2過剰発現との有意な相関は見られなかった。maspin mRNAはOSNA2+に有意に発現が多く認められた (図1)。

	Maspin mRNA expression		P 値
	あり 46 例	なし 47 例	
年齢			
≤ 50	15	16	0.883
> 50	31	31	
pT (mm)			
≤ 20	18	24	0.508
> 20	28	23	
リンパ管侵襲			
あり	12	16	0.403
なし	34	31	
組織異型度			
I	12	14	0.517
II	24	27	
III	10	6	

OSNA 分類			
1+	7	27	0.0001
2+	39	20	
ER			
陰性	7	8	0.813
陽性	39	39	
HER2			
陰性	40	37	0.293
陽性	6	10	

図1. Maspin mRNA発現と臨床病理学的因子との関連

また、maspin mRNA発現例には非SLN転移が有意に多く認められた (図2)。

	転移 SLN における maspin mRNA 発現		P 値
	あり	なし	
非 SLN 転移			
あり	28	9	<0.0001
なし	18	38	

図2. Maspin 発現と非SLN転移との関連

非SLN転移の有無に関する多変量解析を施行した結果、maspin mRNA発現は、リンパ管侵襲及び病理学的腫瘍径とともに独立した予測因子であった (図3)。

Factors	Hazard ratio (95% CI)	P 値
Maspin	7.209 (2.115 - 24.575)	0.0015
pT	6.721 (1.837 - 24.583)	0.0039
異型度	0.288 (0.039 - 2.090)	0.218
リンパ管侵襲	7.418 (1.645 - 33.452)	0.009
ER	0.534 (0.082 - 3.481)	0.512
年齢	2.268 (0.082 - 3.481)	0.221

OSNA 2.636 (0.611 - 8.424) 0.175
1+ vs 2+

番号：
取得年月日：
国内外の別：

図3. 非SLN転移の有無に関する多変量解析

また、SLN転移巣におけるmaspin mRNAの発現は原発巣におけるmaspin蛋白の発現と有意に関連した(図4)。

[その他]
ホームページ等

転移 SLN におけ る		Maspin mRNA 発現		P 値
陽性	陰性	陽性	陰性	

6. 研究組織
(1)研究代表者
梅北 善久 (UMEKITA YOSHIHISA)
鳥取大学・医学部病理学講座器官病理学分
野・教授

原発巣におけ る Maspin 発現				
陽性	28	6		< 0.0001
陰性	18	41		

研究者番号：80244226

(2)研究分担者
()

図4. 乳癌原発巣におけるmaspin蛋白発現と転移SLNにおけるmRNA発現との関連

OSNA法施行後の残余検体を用いたmaspin遺伝子の発現解析は非SLN転移を予測する上で有効な方法と成りえる可能性が示唆された。

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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：