

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462510

研究課題名(和文) 子宮体癌センチネルリンパ節転移の腫瘍量、形態による2次リンパ節転移のリスク評価

研究課題名(英文) Estimation of second lymph node metastasis risk by evaluating of metastatic volume in sentinel node

研究代表者

新倉 仁 (NIIKURA, Hitoshi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80261634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体癌におけるセンチネルリンパ節の転移検出のためには、従来の1切片のみの病理学的な検索では見逃される転移が多く、センチネルリンパ節という限られた個数のリンパ節に対しては複数の切片を切り出して転移を検索するultrastagingが用いられるべきと考えられている。その労力を軽減し、客観性を持った転移の判定のためにRT-LAMP法によるmRNAの増幅を利用したOSNA法を子宮体癌に応用するために、まず子宮体癌における最適なmRNAマーカーがCK19であることを見出した。また、実際に使用する場合のカットオフ値を250コピーに設定することで妥当な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Ultrastaging is important for detecting the micrometastasis or isolated tumor cells in sentinel lymph node of endometrial cancer. Ultrastaging by step sectioning is burdensome and time consuming. The present research clarified that a one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay using cytokeratin 19 (CK19) mRNA was applicable for detecting lymph node metastases in endometrial cancer. In sentinel lymph node in endometrial cancer, 250 copies of CK19 mRNA by OSNA assay was an optimal cutoff value.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜癌 微小転移 OSNA法 RT-LAMP法 センチネルリンパ節 ITC CK19

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌においてリンパ節転移は患者の予後を左右する最も重要な因子であるが、リンパ節郭清の意義についての議論は続いている。骨盤あるいは傍大動脈リンパ節の系統的郭清が必要な群を適切に選択できることが理想で郭清の省略により QOL の改善や医療資源の節約につながる。われわれは子宮体癌を対象としてセンチネルリンパ節(SLN)の同定法を世界に先駆けて確立し臨床応用に成功した(Niikura, Gynecol Oncol 94,528-32, 2004; Niikura, Gynecol Oncol 92,669-74, 2004; Niikura, Int J Gynecol Cancer 22,1244-50,2012)。さらに最適な SLN 検出法について検討し、簡便な子宮頸部へのトレーサー投与方法についての有用性も明らかにしてきた(Niikura, Gynecol Oncol 131,299-303,2013)。また、子宮体癌における微小転移の存在について、SLN、非 SLN を含む全摘出リンパ節について連続切片と抗サイトケラチン抗体を用いた免疫染色により、我々の同定する SLN における微小転移の検出について検討した。(Niikura, Gynecol Oncol 105,683-6, 2007; Okamoto, Int J Gynecol Cancer 19,708-11, 2009) このように子宮体癌についても成立すると考えられる SLN 理論を実際に SLN 生検を利用したリンパ節郭清の省略に応用するためには、術中迅速診断によって転移の有無を検出できるかどうか非常に重要である。迅速診断の精度、簡便性も求められる。乳癌においてはサイトケラチン(CK)19 mRNA を One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA)法を利用して検出し、術中のリンパ節転移診断が可能かどうか検討されている。(Tsujiyama, Clin Cancer Res 13, 4807-16, 2007) 子宮体癌における手術中に用いる微小転移検出の方法については、報告がない。OSNA 法とは摘出物を RT-LAMP (reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification)

法 (Nagamine, Mol Cell Probes

2002,16,223-9)により容易にターゲットとなる mRNA の増幅が可能な新しい方法であるが、mRNA の抽出、精製が不要なため 30 分程度で診断が可能であり手術中の迅速診断での使用が可能であるが婦人科領域への応用については我々が子宮頸癌について報告したのみである(Okamoto, Gynecol Oncol 130,530-6, 2013)。

そこで子宮体癌における OSNA 法による迅速診断法の確立を着想した。また SLN 転移診断により乳癌での基準である孤立性腫瘍細胞 (<0.2mm)、微小転移(0.2-2mm)の発見が体癌でも増加すると考えられるが、その全てに対し傍大動脈リンパ節郭清が追加される可能性もある。どの程度までの SLN 転移であれば系統郭清は省略できるのかを明らかにするために、SLN 転移のサイズ、形態やこれまでに研究がなされた報告のない SLN から引き続き流れる真の 2 次リンパ節を対象に、詳細に転移を検討し、OSNA 法の半定量化の実現を着想した。

2. 研究の目的

非 SLN、また孤立性腫瘍細胞、微小転移巣、肉眼的転移巣、さらに原発巣における検討から、検出率などから微小転移検出に至適なマーカーを抽出する。まず、それぞれについて適切に標的とする mRNA を検出できるように RT-LAMP 法の primer を作成する。続いてその分子について OSNA 法により検出されるコピー数と免疫染色を含めた病理診断の結果を対比することで臨床的に有用なカットオフ値を設定する。その後、実際の SLN の 2mm 毎の凍結切片による術中迅速病理診断と同等以上の結果の得られるマーカーを選択する。SLN への転移形態、サイズと検出コピー数とを比較することで OSNA 法での転移の大きさを推定できるようにする。さらに術中に検出される 2 次リンパ節でも同様に検索を加える

ことで SLN 転移陽性例についてもリンパ節郭清の追加の必要な基準を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 子宮体癌の原発巣、リンパ節転移巣、正常リンパ節における各種マーカーの発現の解析

原発巣、リンパ節転移巣で高発現し、リンパ節では発現の低いマーカー候補を決定するため、転移陽性リンパ節、転移陰性リンパ節 10-20 症例から抽出した mRNA を用いて、データベース上、条件を満たす分子の中から選択したマーカーを網羅的に予備的に検討し、それぞれについて原発巣での発現も含め臨床検体を用いて検証する。

(2) OSNA 法と step-serial section での HE 染色による病理診断との結果の比較

RT-PCR 法により決定した候補マーカーについて乳癌で応用されている CK19 のように既知でなければ新規に RT-LAMP 法の primer を設計し、妥当性を検証する。つづいて RT-LAMP 法を利用した mRNA 増幅による OSNA 法で適切にリンパ節転移が検出されるか検討する。それぞれのマーカーについて転移陽性リンパ節と陰性リンパ節における OSNA 法による発現コピー数を検討して cut off 値を設定する。SLN の 2mm 毎の凍結切片、HE 染色による術中迅速病理診断と実際に設定された cut off 値での OSNA 法によるマーカーの発現を図 2 の様な標本作製によって診断結果を比較、検討することにより、マーカーの性能を評価して、最終的に最も優れたマーカーを決定する。

(3) 決定マーカーの mRNA 量と転移巣のサイズとの関連

OSNA 法によるリンパ節転移検出法に用いるマーカーとして最も優れていると考えられるマーカーについて半定量化を実現するために以下の検討を行う。

リンパ節の新鮮凍結標本からクライオスタットを用いて 0.025mm 毎に連続切片を作成し、

HE 標本により転移の形態(孤在性か播種状かなど)、組織分化度の検討、転移巣の面積の測定、体積の推定を行い、残りの一方は mRNA の測定に供して、OSNA 法による mRNA のコピー数を算出する。両者を比較検討し、子宮体癌での転移巣の定量化を確立する。組織型や分化度による補正も考慮して、少なくとも、これまでに乳癌で報告されているような、0.2mm、2mm の cut off のような目安となる半定量化を確立する。

(4) 2 次リンパ節における転移状況の評価
SLN より色素や蛍光色素が流出し、次に到達する 2 次リンパ節を SLN と別に採取する。2 次リンパ節についても凍結標本より 0.025mm 毎に連続切片を作成し、HE 標本と pancytokeratin(AE1/AE3)による免疫染色で転移を確認する。前段階の研究で OSNA 法による転移の検出の方が優れている場合も考慮し、残りについては OSNA 法による mRNA 検出、半定量化に供する。実際の運用上、現在手術中に用いている方法との時間の比較、結果の比較により有効性を確認する。SLN での結果と比較検討することで、どのような SLN 転移が 2 次リンパ節に転移を起こしやすいのかを明らかにする。

(5) 培養細胞を用いた細胞数と OSNA 法によるコピー数との関係

3 種類 (Hec1A, HHUA, Ishikawa) の子宮体癌培養細胞数と OSNA 法によるコピー数との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) 子宮体癌の原発巣、正常リンパ節における各種マーカーの発現の解析

子宮体癌の原発巣、転移巣で高発現し、転移のないリンパ節では発現の低いマーカー候補として、GEO のデータベースより 24 個が抽出された。それぞれについて RT-PCR にて転移陽性リンパ節、転移陰性リンパ節の mRNA 発現を検討した。転移陽性リンパ節の最大 Ct

値と陰性リンパ節での最小 Ct 値の差が大きい上位 3 個のマーカーは CK7、CK19、EpCAM であり、CK19 が最も差の大きなマーカーであった。この 3 個のマーカーについて 200 例の子宮体癌組織における発現を免疫染色にて検討したところ、CK19 は 98%の陽性率を示し、最も高率であったため CK19 が最適なマーカーと判断した。

(2) OSNA 法を用いた CK19mRNA の検出とカットオフ値の設定

RT-LAMP 法を利用した mRNA 増幅による OSNA 法でリンパ節転移が適切に検出可能かを検証することとした。子宮体癌症例から転移陽性リンパ節 15 個、転移陰性リンパ節 200 個を用いて、OSNA 法による CK19mRNA の測定を行い、Receiver Operating Characteristics 曲線を作成したところ 250 copies/ μ l と 125 copies/ μ l が有用であると考えられた。陽性適中率に関して 250 copies/ μ l の方が優れており、検査として用いる場合の最適なカットオフ値を 250 copies/ μ l に設定した。

(3) SLN 転移における OSNA 法による CK19mRNA 検出の性能評価

137 個の SLN に対して 2mm 間隔で切断し、病理学的転移の検索、OSNA 法による測定を施行した。133 個の診断は一致し、病理診断にて転移陽性、OSNA 法で陰性が 3 例、逆に病理診断にて転移陰性、OSNA 法で陽性が 1 例に認められた。

初年度の検討において、OSNA 法における子宮体癌センチネルリンパ節(SLN)転移検出のために最適なマーカーは CK19mRNA であることが判明した。さらに検査として用いる場合の最適なカットオフ値として 250 copies/ μ l に設定した。この基準で 77 症例から得られた 277 個の SLN に対して 2mm 間隔で切断し、病理学的転移の検索の結果が陰性であった 11 例については 0.1mm 毎の検索(サイトケラチン免疫染色を含む)を追加した。他の 66 例について OSNA 法による測定を施行した。

OSNA 法により、10 症例から得られた 20 個の SLN より転移を検出した(2mm 以上の大型転移のうち 7 個の SLN、2mm 未満かつ 0.2mm 以上の微小転移のうち 7 個の SLN、0.2mm 未満の孤立性腫瘍細胞のうち 5 個の SLN、また 2mm 分割法では転移陰性であった SLN のうち 3 個から検出)。実際に得られた OSNA 法でのコピー数は微小転移では最低では 320 コピー、最大では 3300 コピー、孤立性腫瘍細胞では 730 コピーから 8320 コピー、陰性例では 320 コピーから 710 コピーに分布していた。臨床検体による転移診断における転移巣の最大径では、そのリンパ節における転移巣の腫瘍体積を反映していない可能性が考えられた。孤立性腫瘍細胞や微小転移とされるものの中にも、小集塊で多数の転移を有している症例が存在し、結果としてリンパ節あたりの腫瘍量が大きくなっている可能性があり、転移形態についても注意する必要がある。

(4) 転移面積と OSNA 法によるコピー数との関連

転移面積が 4mm²以下の 22 個の転移センチネルリンパ節を転移面積の測定値と OSNA 法によるコピー数との関連を解析した。両者には相関関係がみられたが明細胞腺癌の 1 例については特異的に高い値を示した。OSNA 法による測定値では 4 個のセンチネルリンパ節においては 250 コピー以下であった(グループ A)。17 個のセンチネルリンパ節については 250 コピーから 3500 コピーの間に分布した(グループ B)。1 個のセンチネルリンパ節については 170000 コピーの値を示した(前述の明細胞腺癌)(グループ C)。各リンパ節における最大の転移面積はグループ A で 0.002-0.007mm²、グループ B で 0.002-2.5067mm²、グループ C で 2.598mm²であった。

(5) 培養細胞を用いた細胞数と OSNA 法によるコピー数との関係

3 種類 (Hec1A, HHUA, Ishikawa)の子宮体癌培養細胞数と OSNA 法によるコピー数との関連

を検討した。3種類の培養細胞のうち Hec1 が最も安定した値を示したため、今回はまず Hec1 における腫瘍細胞数と OSNA 法における場コピー数の関連を分析した。腫瘍細胞として 50000, 100000、10000、1000 個の腫瘍細胞を測定した。腫瘍細胞数と OSNA 法による測定値には相関関係が認められた。微小転移の下限と考えられる腫瘍細胞数 10000 個ではコピー数は 6.3-260 コピーで陰性例はなく検出限界として矛盾のない結果であった。

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6件)

新倉仁

婦人科癌リンパ節転移の術中迅速遺伝子診断、臨床婦人科産科、査読無、2016、70巻2号、227 - 233

DOI: <http://dx.doi.org/10.11477/mf.1409208619>

新倉仁、八重樫伸生

センチネルリンパ節生検と微小転移の意義、産婦人科の実際、査読無、2015、64巻13号、2013-2019

新倉仁、八重樫伸生

子宮内膜癌に対するセンチネルリンパ節検索の現況と展望、産婦人科の実際、査読無、2015、64巻5号、627 - 633

Nagai T, Niikura H, Okamoto S, Nakabayashi K, Matoda M, Utsunomiya H, Nagase S, Watanabe M, Takeshima N, Yaegashi N.

A New Diagnostic Method for Rapid Detection of Lymph Node Metastases Using a one-Step Nucleic Acid Amplification

(OSNA) Assay in Endometrial Cancer.

Annals of Surgical Oncology, 査読有、2015、22(3), 980-986.

DOI:10.1245/s10434-014-4038-2.

新倉仁、八重樫伸生

子宮頸癌、体癌のセンチネルリンパ節生検臨床婦人科産科、査読無、2014、68巻7号、665 - 671

新倉仁、八重樫伸生

子宮体癌におけるセンチネルリンパ節検出の意義、産科と婦人科、査読無、2014、81巻、170-175

[学会発表](計10件)

佐藤いずみ、岡本聡、新倉仁、重田昌吾、橋本千明、辻圭太、徳永英樹、豊島将文、三浦弘守、渡部みか、八重樫伸生

子宮体癌のセンチネルリンパ節生検における捺印細胞診の診断精度についての検討
第55回日本臨床細胞学会秋季大会、2016年11月18日、別府国際コンベンションセンター(大分県別府市)

Okamoto S, Niikura H, Shigeta S, Tsuji K, Sato I, Hashimoto C, Nagai T, Tokunaga H, Takano T, Ito K, Watanabe Y, Yaegashi N.

Clinical significance of sentinel lymph node metastases detected by ultrastaging of three different methods.

第68回日本産科婦人科学会、2016年4月23日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

岡本聡、新倉仁、徳永英樹、永井智之、辻圭太、重田昌吾、佐藤いずみ、橋本千明、八重樫伸生

子宮体癌センチネルリンパ節の術中2mm間隔転移検出法の検討

第 17 回 SNNS 研究会学術集会、2015 年 11 月 14 日、ワークピア横浜（神奈川県横浜市）

新倉仁

術中にみる婦人科癌センチネルリンパ節検出部位と転移診断法 リンパ節転移を効率よく発見するために

第 53 回日本癌治療学会、2015 年 10 月 29 日、グランドプリンスホテル京都（京都市）

岡本聡、新倉仁、永井智之、田中創太、辻圭太、重田昌吾、佐藤いずみ、橋本千明、櫻田尚子、城伶史、長谷川純子、大槻愛、徳永英樹、海法道子、高野忠夫、伊藤潔、渡部洋、八重樫伸生

OSNA 法による術中センチネルリンパ節転移診断の妥当性の検証

第 57 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2015 年 8 月 8 日、アイーナいわて県民情報交流センター（岩手県盛岡市）

新倉仁

子宮頸癌、子宮体がんのセンチネルリンパ節からリンパ節郭清範囲を考える

第 8 回兵庫県婦人科がん診療連携懇話会（招待講演）2015 年 7 月 4 日、神戸三宮東急 REI ホテル（兵庫県神戸市）

永井智之、新倉仁、岡本聡、海法道子、徳永英樹、永瀬智、高野忠夫、渡部洋、八重樫伸生

分子生物学的診断(One-step Nucleic acid Amplification OSNA 法)を利用した子宮体癌リンパ節転移検出とリンパ節郭清省略手術に向けた戦略

第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会、2015 年 4 月 12 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

新倉仁

開腹手術、腹腔鏡下手術における THUNDERBEAT の有用性

第 67 回日本産科婦人科学会、2015 年 4 月 11 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

新倉仁

婦人科癌でのセンチネルリンパ節生検

札幌婦人科がんの会(招待講演)、2014 年 8 月 2 日 ホテルさっぽろ芸文館（札幌市）

永井智之、新倉仁、海法道子、徳永英樹、永瀬智、高野忠夫、伊藤潔、渡部洋、八重樫伸生

安全な縮小手術を目指した子宮体癌リンパ節郭清の検討

第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2014 年 7 月 18 日 栃木県総合文化センター（栃木県宇都宮市）

〔その他〕なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新倉 仁 (NIIKURA, Hitoshi)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80261634

(2)研究分担者

永瀬 智 (NAGASE, Satoru)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：00292326

岡本 聡 (OKAMOTO, Satoshi)

東北大学・大学病院・臨床検査技師

研究者番号：40420020

海法 道子 (KAIHO, Michiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50531331