

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462614

研究課題名(和文) 新しい分子生物学的手法を用いたリンパ節転移診断の研究開発

研究課題名(英文) Research and development of the lymph node metastatic diagnosis using new molecular technique

研究代表者

鈴木 政博 (suzuki, masahiro)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90513268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮がんの頸部リンパ節転移診断においてOSNA法の有用性を検証し、臨床応用の可能性も踏まえて、研究を進めた。

原発巣CK19染色陽性のリンパ節において、HE染色に対するOSNA法の感度は85.7%、特異度は100%、Fisherの直接法で、 $p < 0.0001$ と有意であった。原発巣CK19陰性のリンパ節において、H.E.染色に対するOSNA分析の感度は50%、特異度は96.7%であった。

本研究により、原発巣CK19免疫陽性の症例では、頸部リンパ節の転移診断において、OSNA法が病理診断と同等な診断結果をもつ可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Background. This study aimed to investigate the effects of CK19 expression in the primary lesions of head and neck squamous cell carcinoma on the diagnosis of the cervical lymph node (CLN) metastasis using the one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay. Methods. Primary lesions and 54 CLNs were resected from 21 patients with head and neck squamous cell carcinoma between 2009 and 2011. Each CLN was tested by the OSNA assay, and the CK19 mRNA copy number obtained was compared to the corresponding histopathological results. Results. In the primary lesion CK19-positive group, the sensitivity and specificity of the OSNA assay against hematoxylin-eosin staining were 86% and 100%, respectively. The p value by Fisher's exact test was less than 0.0001, indicating statistical significance. Conclusion. These results suggest that OSNA offers similar diagnostic potential to that of histopathological diagnosis of CLN biopsy in patients with a CK19-positive primary lesion.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：リンパ節転移 OSNA法 頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮がんにおいて、頸部リンパ節転移の有無は予後の指標として重要な因子であり、術中の迅速かつ正確な診断が必要とされる。通常の術中迅速病理診断では、リンパ節の最大断面 1 面のみを観察する診断方法であり、微小な転移の場合、転移巣が断面に表れずに検出できない可能性がある。術後の永久診断と比較して、頭頸部領域では約 3 割の偽陰性が生じるとの報告もある。

微小なリンパ節転移診断の検索方法として、センチネルリンパ節生検による診断方法もあるが、術中にリンパ節を薄くスライスし、短時間で多くの標本を観察することは、病理医にかなりの労力と負担がかかり、また、診断方法も標準化されていないのが現状である。一方、分子生物学的な検索方法は、病理組織学的な検索方法に比べ、リンパ節全体を検索できる点で優れているとされている。

RT-PCR(Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction)法などの遺伝子検査法も試みられているが、RNA の抽出・精製には、時間を要し煩雑な操作も必要であることが問題点として挙げられる。

近年、新しい分子生物学的な検索方法として、リンパ節の可溶化から遺伝子増幅までを一工程で行うことができる OSNA(one-step nucleic acid amplification)法が開発された。OSNA は試料中に内在するサイトケラチン 19(CK19)の mRNA を約 30 分で自動的に増幅し mRNA のコピー数を定量的に計測できる方法である。乳がんではその有用性が報告されているが、頭頸部領域での報告はほとんどない。

今回、頭頸部扁平上皮がんの頸部リンパ節転

移診断において OSNA 法の有用性を検証し、臨床応用の可能性も踏まえて、研究を進めることとした。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮がんの治療および診断目的で採取したリンパ節を分割し、通常の病理組織学的検索用の検体と OSNA 法に用いる検体にわけて、それぞれ転移の有無を検索する。病理部での H.E.染色による病理組織診断結果と OSNA 法による診断結果とを比較し、H.E.染色による病理組織診断に対する OSNA 法の感度、特異度、陽性的中率(PPV)、陰性的中率(NPV)を調べる。

OSNA 法の検討では、CK19 を遺伝子として用いているが、病理組織診断用のリンパ節検体に対し CK19 抗体による免疫染色も行い、リンパ節転移診断において、OSNA 法に対する CK19 抗体免疫染色の診断結果の感度、特異度も調べる。

OSNA 法の診断結果が、通常の H.E.染色による診断結果に劣らないことが確認できかつ CK19 抗体による免疫染色による結果と同等であった場合には、原発巣の免疫染色も行い、その発現の程度を確認し CK19 が頭頸部扁平上皮がんの転移診断に最適な遺伝子となりうるかを検証する。

3. 研究の方法

1. 頭頸部扁平上皮がん患者さんを対象にリンパ節生検や頸部リンパ節郭清術で摘出したリンパ節を直ちに 4 分割し、2 分割分の検体を用いて、現行法として病理部へ提出し、得られた 3 割面から凍結標本作製する。H.E.染色を施行し鏡検により癌転移の有無

を診断する。

2. OSNA 法として、以下の手順で CK19 の mRNA 量を計測する。

1) 1. で提出した残りの 2 分割分の検体へ専用の溶媒を加えたのちにホモジナイズして検体を可溶化する。

2) 1) で作製した可溶化液を 10000G で 60 秒間遠心し中間層を 500 μ l 分注し、測定サンプルを調整する。

3) あらかじめキャリブレーション、既成試薬を用いて検量線を作成した RD-100i (シスメックス社) へ で調整したサンプルをセットし LAMP 法を全自動で行い濁度を測定検量線から濁度を規定量あたりのコピー数 (copy/ μ l) に換算する。

4) 乳がんにおける OSNA 法の判定基準は 250 copy/ μ l 以上を陽性 (+) と定めているが本研究では、当科での他施設との共同研究により、頭頸部扁平上皮がんにおける OSNA 法の有用性を報告した際の判定基準を参考に 131 copy/ μ l 以上を陽性 (+) とする。(Matsuzuka T, Ann Surgical Oncol 2012)

3. 1. における H.E. 染色での病理組織学的診断結果と 2. で得られた OSNA 法の診断結果を比較する。

4. 採取されたリンパ節において、病理診断用の検体に対し CK19 抗体による免疫染色を行い、その診断結果と OSNA 法との診断結果を比較することで感度、特異度を含めた正診率を検討する。

5. 免疫染色と OSNA 法との診断結果が同等な結果であった場合、CK19 がリンパ節の転移診断において有用である可能性が高いことが示される。CK19 が頭頸部扁平上皮がん診断そのものに有用な上皮系のマー

カーであることを更に証明するために、原発巣も CK19 抗体による免疫染色を行う。その発現の程度から CK19 が頭頸部扁平上皮がんの転移診断に最適な遺伝子となりうるかを検証する。

尚、研究が当初計画通りに進まなかった場合として採取されたリンパ節の検体が少ない場合には、本研究の計画以前に採取され、OSNA 法の研究に用いられた病理診断用の検体に対して、免疫染色を行い、検体数を増やして比較検討を行う。CK19 抗体による免疫染色が困難な場合には、パンサイトケラチンなど他の抗体での免疫染色も考慮する。

4. 研究成果

原発巣の CK19 免染陽性は 9 例、陰性は 12 例であった。リンパ節の CK19 免染陽性は 6 個、陰性は 48 個であった。OSNA 法では、陽性が 8 個 (コピー数: $1.31 \times 10^2 \sim 9.5 \times 10^5$ copies/ μ l、平均: 1.6×10^4 copies/ μ l)、陰性が 46 個であった。リンパ節における CK19 免疫染色に対する OSNA 法の感度は 100%、特異度は 96%、Fisher の直接法で、 $p < 0.0001$ と有意であった。

原発巣 CK19 免染により 54 個のリンパ節を 2 群に分けたところ、原発巣 CK19 免染陽性群 9 例の 22 個のリンパ節中、H.E. 陽性は 7 個、陰性は 15 個、OSNA 法は、陽性が 6 個、陰性が 16 個であった。原発巣 CK19 陽性のリンパ節において、H.E. 染色に対する OSNA 法の感度は 85.7%、特異度は 100%、Fisher の直接法で、 $p < 0.0001$ と有意であった。原発巣 CK19 免染陰性群 12 例の 32 個のリンパ節は、H.E. 陽性は 2 個、陰性は 30 個、OSNA 法は、陽性

が2個、陰性が30個あった。原発巣CK19陰性のリンパ節において、H.E.染色に対するOSNA分析の感度は50%、特異度は96.7%であった。

本研究により、原発巣CK19免染陽性の症例では、頸部リンパ節の転移診断において、OSNA法が病理診断と同等な診断結果をもつ可能性があることが示された。

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)

[雑誌論文](計1件)

Suzuki M, Matsuzuka T, Hashimoto Y, Ikeda M, Saijo S, Omori K. Diagnostic potential of 1-step nucleic acid amplification assay in patients with head and neck squamous cell carcinoma based on CK19 expression in a primary lesion. Head Neck. 38 (Suppl 1): E239-245, 2016.

[学会発表](計1件)

頭頸部扁平上皮癌における原発巣のCK19発現に基づいたOSNA法の有用性について 鈴木政博 他、
第17回SNN S研究会学術集会
2015年11月13~14日、横浜市

[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:

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

鈴木 政博 (SUZUKI MASAHIRO)

福島県立医科大学・医学部医学研究科・医学博士

研究者番号: 90513268

(2) 研究分担者

松塚 崇 (MATSUZUKA TAKASHI)

福島県立医科大学・医学部医学研究科・医学博士

研究者番号: 80336461

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()