

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

学位論文題目	分子生物学的手法による癌の転移検出方法に関する研究 (Studies on detection methods using molecular biological techniques for metastasis in cancer patients)
--------	---

氏 名	中 林 一 樹
-----	---------

癌のリンパ節、他臓器への転移の有無はステージング、ひいては治療方針の決定にかかわる重要な因子である。転移の有無については、画像診断または細胞、組織（以下検体）の形態学的診断により行われているが、形態学的診断では、診断の方法や診断に用いた検体の部位による見逃しが発生する可能性がある。このような背景から分子生物学的手法を用いた、客観的な転移の検出方法の開発が望まれている。

第一章では、乳癌を対象として、術中のリンパ節転移検出方法について開発を行った。リンパ節中に存在する癌細胞をmRNAの発現量から検出するために、上皮細胞で発現が高く、リンパ節で発現の低いmRNAを選択し、Cytokeratin 19（以下KRT19）mRNAがマーカーとして有効であることを明らかにした。KRT19 mRNAの検出には、短時間で対象遺伝子の増幅が可能なLoop-mediated amplification method（以下LAMP法）を遺伝子の検出原理として用い、リンパ節の可溶化液からRNA抽出なしでKRT19mRNAを増幅できるOne-Step Nucleic acid Amplification(OSNA)法を開発した。臨床検体を用いて、病理学的にリンパ節転移の有無が確認された325個のリンパ節を用いて本法の性能評価を実施した結果、病理診断との一致率は98.2%と良好であった。

第二章では、本法の非小細胞肺癌におけるリンパ節転移検出の可能性について検討を行った。マーカーとする遺伝子について公共のマイクロアレイデータベースから抽出し評価を行った結果、KRT19mRNAが有用であることを明らかにした。165個の臨床検体を用いて検討を行った結果、病理診断との一致率は、98.8%と高く、本法が乳癌のリンパ節転移だけではなく非小細胞肺癌のリンパ節転移においても有用であることを明らかにした。

第三章では、本法による細胞診検体中の癌細胞検出についての検討を行った。胃癌患者から取得された腹腔内洗浄液中の癌細胞を検出するために、Carcinoembryonic antigen (CEA) mRNAをマーカーとして、本法の有用性について検証した。その結果、本法と細胞診との診断一致率は93.8%であり、本法が細胞診検体中の癌細胞の検出にも有用である可能性を示すことができた。

以上のように、本研究で開発した OSNA 法は、リンパ節転移、細胞診検体中の癌細胞の検出について、客観的な方法であり臨床有用性の高い方法であることを明らかとした

【論文審査結果の要旨】

癌は、わが国における死因の第一位となっている。その死亡者数は、総死亡者数の30%以上を占め、乳癌は、胃癌および肺癌と共に、罹患率の高い癌となっている。癌の他臓器への転移の有無は治療方針の決定にかかわる重要な因子である。転移がある場合は、広く癌組織を切除する必要があるが、一方で転移がない場合には切除する領域を狭めることで、手術後に早い回復が見込まれ、患者の生活が改善されることになる。特に、手術中の短時間での転移の有無の正確な診断が、癌の進行度による生存率と予後に関わる重要な課題となっている。現在、画像診断または細胞、組織（以下検体）の形態学的診断により判断されているが、形態学的診断では、診断の方法や診断に用いた検体の部位による見逃しが発生する可能性がある。例えば病理切片標本を作製する場合は、観察した切片に陽性癌組織が含まれないと転移陰性とみなされることが起こる。このような背景から分子生物学的手法を用いた、どのような組織にも対応でき、かつ、客観的な癌転移の検出方法の開発が望まれている。

そこで、本研究では、分子生物学的手法を用いた転移の検出方法の開発を目的とし、乳癌、肺癌、胃癌を対象とし、手術時間内での転移検出方法の開発を行っている。

第一章では、乳癌を対象として、術中のリンパ節転移検出方法について開発について述べている。リンパ節中に存在する癌細胞を mRNA の発現量から検出するために、上皮細胞で発現が高く、リンパ節で発現の低い mRNA の候補分子を遺伝子発現データベースから選択し、45 遺伝子を抽出した。定量 RT-PCR 法により転移陽性リンパ節と転移陰性リンパ節での遺伝子発現量を比較し、遺伝子発現量が転移陽性検体で明確に高くなるケラチン 19（以下 KRT19）mRNA がマーカーとして有効であることを明らかにした。さらに、癌組織を利用して連続凍結切片を作製し、KRT19 mRNA 発現量と癌細胞数とが比例することを見出した。これにより KRT19 mRNA 量は癌転移巣の大きさを反映することを明らかにした。次に、KRT19 mRNA 量の検出に、短時間で対象遺伝子の増幅が可能な Loop-mediated amplification method（以下 LAMP 法）を遺伝子の検出原理として用い、リンパ節の可溶化液から RNA 抽出なしで KRT19 mRNA を増幅できる One-Step Nucleic acid Amplification (OSNA) 法を開発した。さらに、臨床検体を用いて、病理学的にリンパ節転移の有無が確認された 325 個のリンパ節を用いて本法の性能評価を実施している。定量的測定が可能のため、転移検出のカットオフ値を設定することで、転移の判定が可能となった。その結果、三面病理診断との一致率は 98.1%と良好であった。したがって、本方法は、定量的であり、乳癌において信頼性の高い方法であることを明らかにした。

第二章では、本法の非小細胞肺癌におけるリンパ節転移検出の可能性について検討を行っている。肺癌においても、リンパ節転移の有無により切除する肺の領域が変更されるので、肺癌治療における重要な診断因子となる。マーカーとする遺伝子についてマイクロアレイデータベースから抽出し、評価を行った結果、ケラチン 19 (KRT19) とケラチン 7 (KRT7) mRNA が有用であることを明らかにした。165 個の臨床検体を用いて検討を行った結果、病理診断との一致率は、KRT19 では 98.8%、KRT7 で 96.4%と高く、本法が乳癌のリンパ節転移だけではなく非小細胞肺癌のリンパ節転移においても臨床応用できる方法であることを

明らかにした。

第三章では、OSNA 法による細胞診検体中の癌細胞検出についての検討を行っている。通常、胃癌における転移先の約半数が腹膜への転移となっている。そこで、胃癌患者から取得された腹腔内洗浄液中の癌細胞を検出することができれば、強めの抗癌剤や先進医療を選択する可能性を示すことができる。そこで、胃癌腹腔細胞診のために、Carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA をマーカーとして、本法の有用性について検証した。その結果、OSNA 法による CEA mRNA 濃度と癌細胞の胃壁への進達度には関連が認められた。さらに、本法と病理細胞診との診断一致率は 93.8% であり、本法が細胞診検体中の癌細胞の検出にも有用である可能性を示すことができた。

以上のように、本論文で開発した OSNA 法は、乳癌、肺癌、胃癌における転移癌細胞の検出において優れた方法であることを示した。これらの知見は、癌の転移検出と診断において、分子生物学的な手法が有効であり、転移の検索部位や病理医や技術者の技量の影響を受けない客観的な方法を確立することになった。将来この方法は、臨床現場で幅広く医療できる方法になると考えられる。

公聴会には、多数の参加があり、活発な質疑がなされた。公聴会における主な質問は以下の通りである。

- ・ KRT19 マーカーには様々な癌細胞を検出する汎用性があるのか。
- ・ 癌組織で発現するマーカー遺伝子を選択する方法とそれを選択した理由は何か。
- ・ どのような性質の遺伝子が癌マーカーとなることができるのか。
- ・ 癌マーカーを複数使用することで検出の信頼性は上がるのか。
- ・ 転移検出を行うための組織量を少なくした場合、検出限界量はどの程度になるのか。一方で、組織量を増やすことで検出感度は上がるのか。
- ・ 検出するための組織からの RNA 抽出が必要な癌組織と不必要な組織があるのはなぜか。

これらの質問に対して、発表者より、具体的で明確な回答がなされた。また、本学位論文の方法が適用されることで、手術中の癌転移検査が客観的で信頼性の高いものになることに関して議論された。

以上より、本論文は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに非常に優れており、博士としての学位論文に十分に値するものと判断した。