

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**

山口大学大学院医学系研究科
応用分子生命科学系専攻
平成 27 年 3 月

中 林 一 樹

目次

1. 緒言	2
2. 乳癌のリンパ節転移検出方法の開発	5
2. 1 研究の背景	5
2. 2 実験方法	9
2. 3 結果と考察	14
2. 4 まとめ	25
3 肺癌のリンパ節転移検出方法の開発	27
3. 1 研究の背景	27
3. 2 実験方法	28
3. 3 結果	31
3. 4 まとめ	38
4. OSNA 法の細胞診検体への適応	40
4. 1 研究の背景	40
4. 2 実験方法	42
4. 3 結果と考察	42
4. 4 まとめ	51
5. 結語	52
6. 謝辞	53
7. 参考文献	54

1. 緒言

癌は、昭和 56 年から、わが国における死因の第一位となっている。その死亡数は、今や総死亡数の 30%以上を占めている。癌は正常上皮細胞が遺伝子変異などによりその増殖制御機構に異常をきたし、増殖の制御ができなくなった細胞集団である。最初組織で発生した癌細胞は、組織への浸潤を得て遠隔転移をきたし、最後は死に至る悪性の腫瘍である。癌の基本的な治療法は、手術や放射線療法などの局所的治療であるが、補助的に抗癌剤による全身治療が行われている。治療方針は癌の進展度合いを示す病期(ステージ)により決定されており、このステージの決定には、腫瘍の大きさ(もしくは進達度)、所属リンパ節への転移状況、遠隔転移の有無をそれぞれ示す、T、N、M 因子により決定されている[1]。

その中でも、各臓器に発生した癌の所属リンパ節への転移状況を示す N 因子はステージの決定に重要であり、患者の病態に応じた適切な治療方法を選択するためには、正確に転移の有無を診断する必要がある。この転移の診断は、まずは、CT などの画像診断により行われるが、一般的にはその精度は低いといわれており、最終的な判定は生検もしくは手術などにより患者から摘出された組織から病理標本を作製し、病理医が顕微鏡下で組織学的に癌細胞の有無を確認することで行われている(図 1a)。しかしながら、図 1に示すように転移した癌細胞はリンパ節の一部に局在することから、転移検索の方法、プロトコルのちがいによる転移細胞の見逃しや、病理医の経験、技師の技術による結果の乖離があることが知られている(図 1b)。

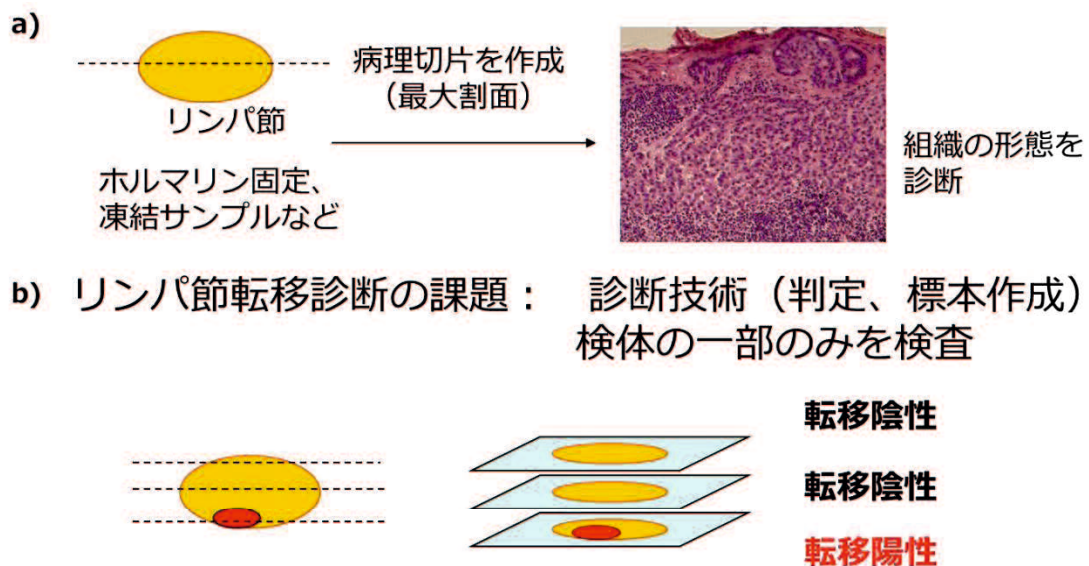


図 1 リンパ節転移の診断法と課題

a) 通常の病理診断の方法、b)リンパ節転移診断法の課題

癌細胞の局在による癌細胞の見逃しを回避するためには、リンパ節の検索部位を増やす、す

なわち、複数面の病理診断を行うことで見逃しは少なくすることが報告されている[2]。また、微小な転移細胞を検出について免疫組織化学的手法が有用であることが報告されているが[3,4]、臨床現場での労力がかかることから、現実的に運用を行うことは難しいとされている。

このような背景から、客観的でリンパ節の多くの部分を検索できる転移細胞の検出手法として、癌細胞に由来する mRNA から逆転写反応により cDNA を合成した後、RT-PCR 法などの分子生物学的手法を用いて核酸増幅を行いリンパ節に転移した微量の癌細胞を検出する方法が研究されてきた。[5-10]。この分子生物学的手法を用いることのメリットとしては、リンパ節全体もしくはその多くの部分を可溶化して得られた検体中の癌細胞由来の分子を検出することで、これまでリンパ節のごく一部のみを検査していた方法と比較して、より多くの部分を検索することができる上、対象とする mRNA の有無、その量により判定を行うことができるため客観性に優れた方法であるという点である。Noguchi ら[6]は、乳癌患者のリンパ節転移を検出する方法として MUC1, KRT19 mRNA を用いて検討を行い、リンパ節転移の検出に有用であると報告している。その後、他の研究者により、多くの研究が行われているが、いまだ実用化にいたっているものはない。この理由としては、臨床的な面と運用面での課題があることによると考えられている。臨床的な面としては、リンパ節転移の検出に適したマーカーを選定できていないこと、臨床的に転移がないと考えられる症例においても転移陽性と判定してしまう偽陽性が生じることが知られている。

運用面においては RT-PCR 法などの分子生物学的手法を行うにあたり、臨床現場に適應できるような簡便かつ迅速な試薬、装置などが存在しないことが上げられる。実際に、RT-PCR を実施する際には、リンパ節を可溶化し、その後 RNA の抽出、RT-PCR 試薬の調製などの煩雑な操作が必要になることや、RT-PCR 法で結果が得られるまでの時間がかかることなどの理由で、検査部での対応ができないことが考えられている。

そこで、本研究では臨床現場で適應できる迅速、簡便かつ客観的な新しいリンパ節転移の検出方法を開発することを目的として、分子生物学的手法を用いた癌の転移細胞検出についての研究を行った。

2. 乳癌のリンパ節転移検出法の開発

2.1 研究の背景

乳癌は、乳腺上皮細胞が癌化し、それが浸潤がんへと進展し、さらには遠隔転移をきたす悪性腫瘍である。乳癌の治療法は、手術や放射線療法による局所的治療とホルモン療法及び化学療法による全身的治療からなっている。

乳癌の手術においては、原発巣の摘出は勿論であるが、リンパ節郭清の要否、及び遠隔転移防止のための術後補助療法の要否とその選択に関する意思決定が重要であり、その意思決定は、主として所属リンパ節へのがん転移の状況に基づいてなされる。

リンパ節転移の有無の判定は、術前に実施される超音波検査などの画像検査によっても行われるが、一般的にその精度は低いため、最終的な判定は手術により郭清されたリンパ節の病理組織検査を行い、その結果に基づきリンパ節転移の状況を把握することが行われる。その診断は、術中迅速病理組織検査によっても行われるが、永久標本を用いる病理組織検査によって術後1~2週間後に確定されるのが一般的である。

通常、乳がんにおける乳房切除術においては、全乳房切除と共に、腋窩リンパ節の郭清も同時に行われる(図2)。

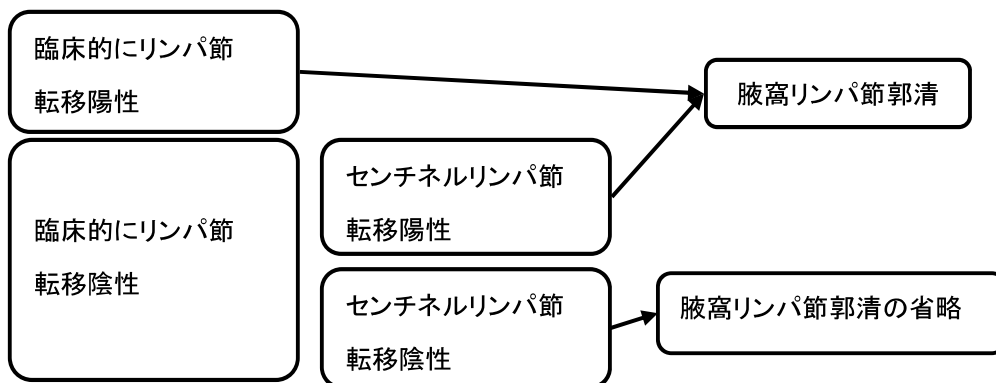


図2 乳がん患者の治療の流れ

最近、乳がん患者の QOL 向上の観点から、画像検査によりリンパ節転移が無いと判断される臨床的 N0 症例においては、腋窩リンパ節郭清に伴う上肢の浮腫、知覚異常や運動障害などの合併症を避けるため、センチネル(見張り)リンパ節の概念に基づくセンチネルリンパ節生検が採用され定着してきた。センチネルリンパ節とは、原発巣からリンパ管に入った癌細胞が最初に到達するリンパ節とされている。

この術式の場合には、ASCO(2005年:センチネル生検に関するガイドライン)[11]において、次の2点が推奨されている。

- 1) センチネルリンパ節が転移陽性と判定された場合は、完全リンパ節郭清を施行するのが標準である。
- 2) 経験豊かな外科医によって、センチネルリンパ節転移陰性と判定された場合は、完全リンパ節郭清の必要はない。

センチネルリンパ節にマクロ転移(転移巣の最大径 > 2mm)が含まれる場合には、完全リンパ節郭清が行われる。センチネルリンパ節にマイクロ転移(2mm ≥ 転移巣の最大径 > 0.2mm)が存在する場合には、非センチネルリンパ節に転移がある患者の割合は20~35%(5,6)であることが報告されていることから、ASCOガイドライン(2005年)においては、リンパ節郭清が推奨されている。その後、サンアントニオ乳がんシンポジウム(2005年)において、センチネルリンパ節にマイクロ転移が存在する場合、予後(無病生存率及び全生存率)は有意に悪いことが報告された。センチネルリンパ節におけるマイクロ転移症例に対するリンパ節郭清の臨床的意義の検証は、現在進行中の前向き大規模試験の結果を待つことになるが、それまではASCOガイドライン(2005年)の推奨を踏襲すると思われる。

乳がんリンパ節転移は、UICC第6版及びAJCC第6版に記載のTNM分類に従い[11]、観察面における転移巣の最大径に基づいて、マクロ転移(転移巣の最大径 > 2mm)、マイクロ転移(2mm ≥ 転移巣の最大径 > 0.2mm)及び転移陰性と分類される。ITC(転移巣の最大径 ≤ 0.2mm)の診断は転移陰性であり、実際の治療においても転移陰性と同様に扱われる。

腋窩リンパ節郭清を実施し、それをもって病期診断を行う際には、リンパ節転移の大きさとその個数を知ることが重要である。この場合のリンパ節転移診断は、一般に、ホルマリン固定した永久標本を用いて、図3のように最大断面の病理組織検査の結果をもって行われる。しかし、図3から明らかなように、最大断面のみの病理組織検査では、リンパ節中の転移巣の存在位置によっては転移陽性と診断できない場合がある。

最近の米国からの報告によると、pN0症例の10年後の遠隔転移による再発率は8~25%であると報告されている。このことは、リンパ節の限られた部分のみの観察をもって、転移の大きさを判定し、腋窩リンパ節郭清、延いては術後補助療法の意思決定を行うことの限界を示唆している。

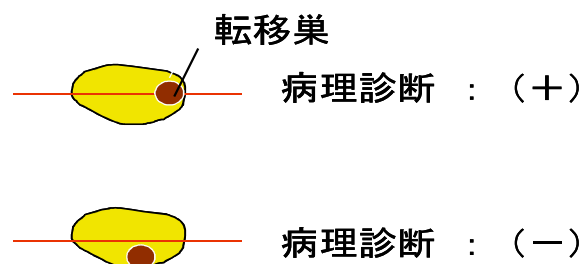


図3 リンパ節転移の局在

センチネルリンパ節生検の場合は、一個もしくは複数個のリンパ節転移の状況によって、ノンセンチネルリンパ節への転移の状況が判断される。センチネルリンパ節の病理組織検査法は各施設により様々である。術中に凍結標本を用いる迅速病理組織検査を行い、術後1～2週間後に判明する病理組織検査(永久標本)の結果をもって、最終的に病理診断を確定するのが一般的である(図4)。

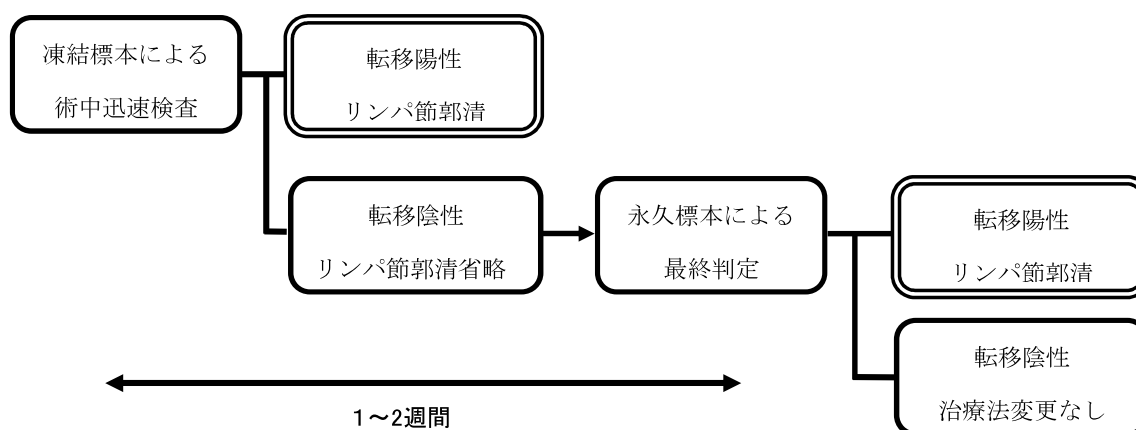


図4 センチネルリンパ節の病理診断フロー

センチネルリンパ節の取り扱いに関するコンセンサス会議(2001年、於:フィラデルフィア)[12]において、センチネルリンパ節に対する病理検査法として、マクロ転移を見逃さないために下記の方法が推奨されている。

- 1) 術中迅速病理組織検査においては、センチネルリンパ節を長軸方向に1.5～2.0mmの厚さのブロックに分割する。各ブロックのそれぞれから、3レベルの標本作製し、転移巢の有無を観察する。
- 2) 術中迅速病理組織検査に用いた残りのリンパ節は、ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、それぞれのブロックから3レベルの永久組織標本作製し、転移巢の有無を観察する。

これらの病理診断は、熟練した病理医によって行われるべきであることも付記されており、したがって、その実施は熟練した病理医がいる施設に限られる。

術中迅速病理組織検査は、時間的制約から質の良い凍結標本の作製が困難であり、したがって、精度の高い検査を行うことが困難であることは良く知られている。術中に転移陰性と判定さ

れ、術後に転移陽性に覆る偽陰性の頻度は、9～45%と報告されている[2,13]。このような理由から、術後検査のみを行う施設、あるいは術前にセンチネルリンパ節生検を行う施設が増加している。いずれの場合も、患者は、2度の手術や術後補助療法の変更を余儀なくされる。このことは、患者 QOL の低下をきたすのみならず、医療費増大の要因ともなっており、1回の検査でリンパ節転移検査を完結できる術中迅速検査の新しい方法論が望まれる。

更に、現状の病理組織検査においては、リンパ節の一部分しか観察できないため、ミクロ転移あるいは ITC が確認された場合でも、マクロ転移が存在する可能性がある。多数の切片を作製して病理組織検査を実施することにより、転移巣の大きさを把握することは可能であるが、労力、コストの面から、その実施は事実上困難である。このように、現状の病理組織検査には限界があることから、リンパ節 1 個全体を簡便に検索できる新しい術中検査法の開発が望まれている。

近年、早期乳がん患者のセンチネルリンパ節生検における転移検査精度を上げるために、新しい方法論が試みられている。例えば、RT-PCR 法など遺伝子増幅法を用いる転移検出法である[5,6,8,14,15]。一般に、この方法は、ゲノム DNA の増幅が併起することなどから、偽陽性が生じることが報告されている[16]。また、この方法では、RNA 抽出工程の収率が変動し、加えて偽陽性を避けるために多数の mRNA マーカーを用いざるを得ないため、転移巣の大きさを判定することが困難であるとされている。更に、これまでの遺伝子増幅法では RNA 抽出・精製に数時間を要し、術中の診断に必要な迅速性を確保できないなどの問題点が指摘されていた。

このように、これまで幾つかの方法の開発が試みられたにもかかわらず、術中で用いることができる精度の高いリンパ節転移検査法は未だ実用化されていない。そこで、本研究では、術中一回の検査で乳がんリンパ節転移検査を完結できる、簡便かつ精度の高い迅速なリンパ節転移の検出方法を検討した。

2. 2. 実験方法

2. 2. 1 対象

本研究で用いたヒト由来のリンパ節は、共同研究先である大阪警察病院およびシスメックス株式会社社内倫理委員会の承認のもと、患者へのインフォームドコンセントを行い、承諾が得られた症例のものを使用した。

治療を目的とした通常の手術を行い、診断を目的とした病理組織診断を行ったリンパ節の残余部分を用いて検討を行った。病理組織診断を行った後の組織の1/4から半分を本研究に用い、研究に使用するまで -80°C の条件で保存した。

2. 2. 2 定量 RT-PCR 法

リンパ節を可溶化した後、 $10,000 \times G$ で1分間遠心分離を行いその上清から RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製)を用いて RNA の抽出を行い、この RNA をサンプルとして手定量 RT-PCR 法を行った。定量 RT-PCR 法は one-step RT-PCR with QuantiTect SYBR Green (Qiagen 社製)を用い、ABI Prism 7700 sequence detector system (ABI 社製)上で実施した。プライマーの設計は Primer Express Version 2.0(ABI 社製)により行った。

反応条件は、精製した RNA $1 \mu\text{L}$ をテンプレートとして用い、30分間 42°C でインキュベーションを行った後、 95°C 15秒、 53°C 15秒、 72°C 30秒のサイクルを40回繰り返した。

2. 2. 3 mRNA マーカーの選択方法

リンパ節中の転移細胞を検出するための mRNA は Cancer Gene Anatomy Project (CGAP) のデータベースを用いて選択した。リンパ節への転移を検出するために用いる mRNA は、リンパ節で発現量が低く、乳癌組織で発現量の高い遺伝子である必要がある。このような mRNA を選択するため、リンパ節、乳癌組織での遺伝子発現情報を取得し、両組織での発現量の差の大きいもの45遺伝子を候補マーカーとして選択した。

これらの45遺伝子について、プライマーを設計したのち、病理学的に転移の認められるリンパ節(転移陽性リンパ節)と転移の認められないリンパ節(転移陰性リンパ節)の4検体ずつから RNA を抽出し、転移陽性検体、陰性検体それぞれを等量ずつ混合して、45遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法により確認した。

転移陽性検体および陰性検体の定量 RT-PCR で得られた Ct 値の差が大きいものを候補遺伝子として選択した。評価に用いたプライマーは、表1に示した。

表1 候補マーカーの選択に用いたプライマー配列

Gene ID	Gene mbol	Forward primer	Reverse primer
NM_004363	CEACAM5	AGACAATCACAGTCTCTGCGGA	ATCCTTGTCTCCACGGGTT
NM_004496	FOXA1	ATGGTTGTATTGGGCAGGGT	AGTAGGCCTCCTGCGTGTCT
NM_002276	KRT19	CAGATCGAAGGCCTGAAGGA	CTTGGCCCCTCAGCGTACT
NM_012391	SPDEF	CAGATGCCTGGCTGAGACAC	CGGCTGTGTCTGTTAGCTGC
NM_002456	MUC1	CCCAGTCTCCTTTCTCCTGCT	GCCGAAGTCTCCTTTTCTCCAC
NM_002411	MGB1	CCAAACGGATGAAACTCTGAGC	GCAGTTCTGTGAGCCAAAGGTC
NM_002353	TACSTD2	GATGCCGCCTACTACTTCGAGA	AGGCGCTTCATGGAGAACTTC
NM_014668	GREB1	CCTCAGATCGGGAAGACAGG	CTGTGAGCCGAACAAGCATC
NM_003225	TFF1	CCCTGGTGCTTCTATCCTAA	CAGATCCCTGCAGAAGTGTC
NM_212482	FN1	ACAGAACTATGATGCCGACCAG	ACCTCATCATGTGACCCATGTC
NM_000224	KRT18	GATGGTTTGCATGGAGTTGCT	GCCGCCTGCTGGAAGAT
NM_004360	CDH1	CGAGAGCTACACGTTACGG	CCATCTGTGCCACTTTGAA
NM_004448	ERBB2	CACAACCAAGTGAGGCAGGT	GCCAGGGCATAGTTGCCTC
NM_005080	XBP1	CCAGAGATCGAAAGGCTCG	TCCCCAAGCGCTGTCTTAATAC
NM_002213	ITGB5	GCACTGCATTTGCTGGTGTTT	TGTA CTGTTGGCCTCGTTCA
NM_002354	TACSTD1	TTTTGCCGCAGCTCAGGAA	AAACATTTGGCAGCCAGCTTTG
NM_012323	MAFF	AGGGCACCTTCTGCAAACAT	GTTCTCGCTCAGCTCTCGCT
NM_005228	ERBB	TCCCCGTAATTATGTGGTGACA	GGCCCTTCGCACTTCTTACACT
NM_001552	IGFBP4	TGGTGTGTGGACCGGAAGAC	CTCTCGAAAGCTGTCAGCCA
NM_147127	EVC	GGCAGGAGTCATGGACCTTC	CTTCTCTAGCAGCCCACGCT
NM_019010	KRT20	CATTGACAGTGTGCCCCAGATG	AAAGACCTAGCTCTCCTCAAAAAGG
NM_005620	S100A11	CATCGAGTCCCTGATTGCTGT	TGGTTCTTTGTGAAGGCAGCTA
NM_000484	APP	CGGTGTTGTCATAGCGACAGTC	TTCTGCTGCATCTTGACAGG
NM_001648	KLK3	AAAGCGTGATCTTGCTGGGT	GGCTCATATCGTAGAGCGGG
NM_002346	LY6Y	GGCCATCCTTCCAGAATGAAG	CCAAATGTCACGAGATTCCCAA
NM_001085	SERPINA3	AGTGAATCGACAATGCCGTC	TGTCTTCTGGGCAGCATCTC
NM_003009	SEPW1	AGTCCAGGGACCTTGACCCA	ACAGCAGCCACGAGAACATC
NM_002515	NOVA1	GATCCAGGGAACGGTTGAAG	TGGTTCTGTCTTGCCACAT
NM_003017	SFRS3	TCCAAATCCAGGTCGCGAT	TGTGTCTCGGATTCCAGACA
NM_006842	SF3B2	AAGTTGGCAGAGATCGGAGCTC	TCAAACCGGCCGATTTCAG
NM_012426	SF3B3	GGCCACGAAAGCTCAGAGAAA	TTGAGGAATGCTGCTGCCA

NM_004630	SF1	AGCTCAGAGACCCGCAGCATTA	TGACTGAGGATCACCAGGCCTT
NM_007124	UTRN	AAGGCCTCACAGGAACATCA	CCTGCAGCACTCTGTTGACG
NM_000546	TP53	GCTGCTCAGATAGCGATGGTCT	GCACCACCACACTATGTGCGAAA
NM_054014	FKBP1A	GCTGCCATCTCCATGAGTTGA	TTTCCCCTGCATTCTTTCTG
NM_005072	SLC12A4	AACATTGCGAGCAGCCATGTAC	TGGCATTGACGTGTCATGAG
NM_152454	FLJ31461	TTGTGATGCTTTGCTACATC	GAGAGAGAGAGAGGGAGGGA
NM_001101	ACTB	CCACACTGTGCCATCTACG	AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG
NM_003295	TPT1	CCTGGTGTGTGTGGATGACAA	TGAGGATGGTGTGACCCATA
NM_003380	VIM	CAGCTAACCAACGACAAAGCCC	TGTTTTCGGCTTCCCTCTCTCTG
NM_002312	LIG4	CACCTTGCGTTTTCCACGAA	CAGATGCCTTCCCCTAAGTTG
NM_001170	AQP7	ATGATGGTATTCGGCCTTGG	TCATGTGGGCTCCAGAGATG
NM_000610	CD44	TGCCGCTTTCAGGTGTATT	GGCAAGGTGCTATTGAAAGCC
NM_000146	FTL	AACCAACCATGAGCTCCAGA	CGGTCGAAATAGAAGCCCAGA
NM_001099	ACPP2	CGTTGACCGGACTTTGATGA	GATGGGCTGCCAGAGTAGGA

2. 2. 4 RT-LAMP 法

本研究では対象遺伝子を迅速に検出する必要がある。そこで、Notomi ら[17]により報告されている迅速な遺伝子増幅法である LAMP 法を用いて対象 mRNA の検出を行った。LAMP 法の反応液は、Notomi, Nagamine らの報告[17][18]に従い、3.5 μ M forward inner primer(KRT19FA) 、 reverse inner primer (KRT19RA), 0.2 μ M forward outer primer (KRT19F3)、 reverse outer primer (KRT19R3), 2.6 μ M 、 forward loop (KRT19LPF) and reverse primer (KRT19LPR)、0.9mM deoxynucleotide triphosphates、 54.3mM Tris-HCl, 10.8mM、 KCl, 10.8 μ M (NH₄)₂SO₄, 5.4 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 5.4 mM DTT, 2.5 units avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega 社製), 18 units Bst DNA Polymerase (New England Biolabs 社製), and 25 units RNasin Plus (Promega 社製)とした。この溶液 23 μ L と検体 2 μ L を混合し、65°Cで 16 分反応させた。

LAMP 法による遺伝子増幅反応は、RD-100i(シスメックス社製)上で行い、反応液の 660nm における吸光度変化を 6 秒ごとにモニタリングし、反応の進行に伴い生成するピロリン酸マグネシウムによる吸光度の変化を濁度に変換し、濁度が 0.1 を越えた時点を遺伝子増幅反応の検出時間とした[19]。LAMP 法による迅速な遺伝子増幅反応には、Nagamine ら[18]により報告されている loop primer を含む 6 種類のプライマーが必要となる。Cytokeratin 19 (以下 KRT9)を検出するための primer は、5' -GGAGTTCTCAATGGTGGCACCAACTACTACACGACCATCCA-3' (KRT19FA), 5' -GTCCTGCAGATCGACAACGCCTCCGTCTCAAACCTTGGTTTCG-3' (KRT19RA),

5'-TGGTACCAGAAGCAGGGG-3' (KRT19F3), 5'-TTGATGTCCGGCCTCCACG-3' (KRT19R3),
5'-AGAATCTTGTCCCGCAGG-3' (KRT19LPF), 5'-CGTCTGGCTGCAGATGA-3' (KRT19LPR)
の以上 6 種類の primer を用いた。

2. 2. 5 転移陰性と転移陽性を判別するカットオフ値の設定方法

30 症例の乳がん患者(浸潤性乳管癌 24 症例、特殊型 5 症例、非浸潤性乳管癌 1 症例)から採取したリンパ節 106 個(pN0 患者からの転移陰性リンパ節 42 個、pN1~3 患者からの転移陰性リンパ節 42 個、及び転移陽性リンパ節 22 個)について、リンパ節の可溶化液上清を検体として、それぞれの KRT19 mRNA 濃度を測定した。転移陰性リンパ節から調製した可溶化液中の KRT19 mRNA 濃度の平均値とその分布から平均値 + 3SD に相当する濃度をカットオフ値とした。

2. 2. 6 マクロ転移とマイクロ転移を判別するカットオフ値の設定方法

マクロ転移とマイクロ転移を区別するカットオフ値は、マクロ転移に相当する転移巣(2mm 角)中の KRT19 mRNA の発現量から算出した。9 症例の乳がん患者(浸潤性乳管癌 8 症例、浸潤性小葉癌 1 症例)から採取した 9 個の凍結保存された転移陽性リンパ節それぞれから 10 枚の凍結連続切片を作成し、1、4、7、10 枚目の切片を AE1/ AE3 抗体により免疫染色を行い、その面積を測定した。2、3 枚目、5、6 枚目、8、9 枚目の凍結切片をそれぞれ可溶化し、KRT19 mRNA の濃度を測定した。測定により得られた KRT19 mRNA 濃度とあらかじめ測定した面積の関係から、マクロ転移に相当する 2mm³ 相当の KRT19 mRNA 発現量を算出し、マクロ転移とマイクロ転移を分けるカットオフ値を設定した。

2. 2. 7 多施設臨床研究による性能の評価

本法による乳癌リンパ節転移検査の臨床的有用性を明らかにするために、大阪大学医学部附属病院、大阪警察病院、防衛医科大学校、大阪府立成人病センター、癌研究会癌研究所及び癌研有明病院、聖路加国際病院との多施設共同研究を実施した。

試験デザインとしては、乳癌リンパ節転移検査としての性能を評価するために、永久標本による 3 割面病理組織検査法の判定との比較をうため、乳癌患者由来のリンパ節を図5のように分割した。

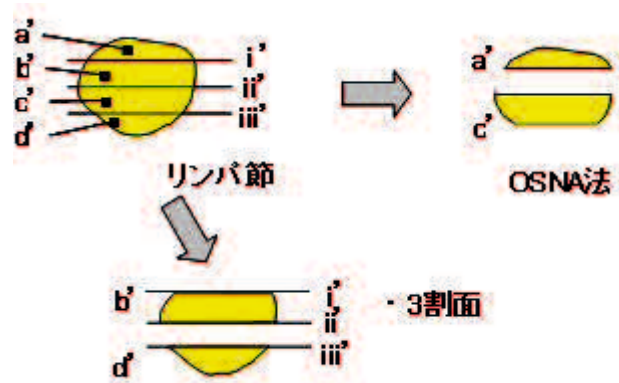


図5 試験の方法

乳がん患者から摘出されたリンパ節を、直ちに2mm又は1mm幅の4ブロック(a'、b'、c'、及びd')に分割し、分割したリンパ節ブロックのa'、c'を可溶化して、KRT19 mRNA濃度を測定した。b'、d'のブロックについては病理組織検査法を行った。

リンパ節の測定にはリンパ節分割後、速やかにa'及びc'ブロックを本法により評価する。測定結果は、++、+、及び-をもって表示する。

2. 3. 結果と考察

2. 3. 1 候補 mRNA マーカーの選択

mRNA の発現により乳癌のリンパ節転移を診断するためには、乳腺(乳癌)組織で発現が高く、リンパ節で発現の低い遺伝子を mRNA マーカーとして用いる必要がある。このような特徴を持つと考えられる遺伝子を CGAP のデータベース[20]を用いて乳腺(乳癌)組織での発現量とリンパ節の発現量の差の大きいものから上位 45 遺伝子を抽出した。

これらの mRNA について、転移陽性のリンパ節および陰性のリンパ節中での発現量を定量 RT-PCR 法により確認した。ここでは mRNA マーカーのスクリーニングを目的としているため、転移陽性のリンパ節4検体、転移陰性のリンパ節4検体からそれぞれ RNA を抽出し、転移陽性、陰性のリンパ節ごとにプールして評価を行った。mRNA の発現量については、定量 RT-PCR 法により得られる threshold cycle (Ct) 値より評価した。その結果を図6に示す。

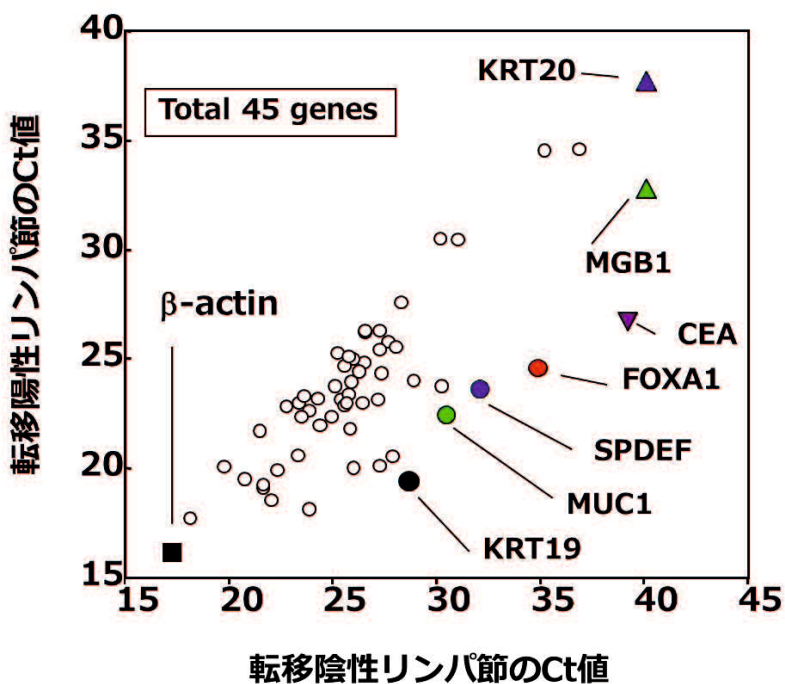


図6 乳癌のリンパ節転移検出に用いる mRNA の評価結果

ここでは、Ct 値による評価を行っているため、Ct 値が低いほど mRNA の発現が多く Ct 値が高いほど mRNA の発現が低い遺伝子となる。Housekeeping gene として知られている β -actin は転移陽性、陰性リンパ節ともに発現量が多いことを示す左下にプロットされていた。この図では、乳腺(癌)組織を含む転移陽性リンパ節での発現が高く、乳腺(癌)組織で発現の低い遺伝子ほど左下にプロットされるので、図6の左下に近い遺伝子を候補遺伝子として選択することとした。

その結果、KRT19、MUC1、SPDEF、FOXA1、CEA、MGB1、KRT20 が候補遺伝子として選択された。これらの遺伝子のうち、KRT19、MUC1、CEA、MGB1、KRT20 については過去にも乳癌のリンパ節転移を検出するための候補遺伝子として報告されている[5,10,21,22]。このことはデータベースから抽出手法が乳癌のリンパ節転移検出のマーカーとして妥当であることを示していると考えられる。

2. 3. 2 候補 mRNA マーカーの評価

先の評価においては、mRNA マーカーをスクリーニングする目的であったため、転移陽性および陰性リンパ節から抽出した RNA をプールしたものをを用いていた。この場合、1 つの検体でのみ発現量が高い mRNA があった場合、その検体の影響により、転移陽性検体での発現量が高く見積もられてしまう可能性がある。各検体での発現量をより正確に評価した上で、リンパ節転移の判定に用いる mRNA を決定するため、乳癌患者から取得されたリンパ節のうち病理診断で明らかに転移が認められる 16 検体と、転移が認められないリンパ節 11 検体それぞれでの、KRT19、FOXA1、SPDEF、CEA、MGB1、TACSTD2、MUC1 mRNA の発現を定量 RT-PCR 法により評価した。その結果を図7に示す。

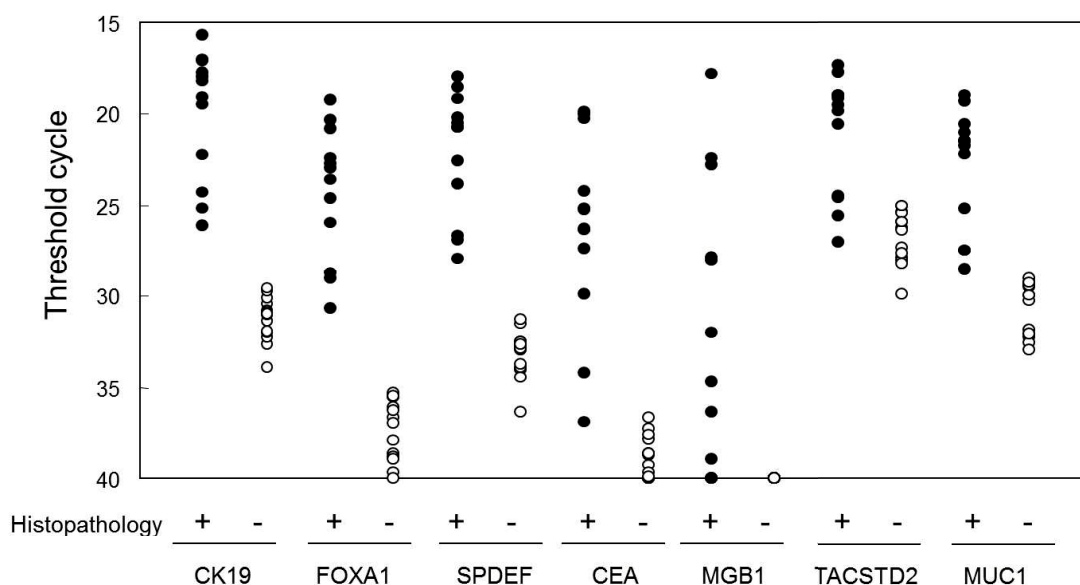


図7 定量 RT-PCR 法による候補マーカーの評価結果

転移陽性リンパ節 16 検体および転移陰性のリンパ節 11 検体から RNA を抽出し、RNA 中の各 mRNA 量を定量 RT-PCR 法により測定した。●: 転移陽性のリンパ節、○転移陰性リンパ節

その結果、KRT19、SPDEF、FOXA1 mRNA が転移陽性および陰性のリンパ節間での発現量の差が大きく、乳癌のリンパ節転移を検出するためのマーカーとなりえることが明らかとなった。

一方で、2. 3. 1 候補 mRNA マーカーの選択の部分で発現量が高かった遺伝子でも、個別の転移陽性検体でその発現量を確認すると、発現量の差が大きいことがわかった。このような遺伝子をマーカーとして用いると、検体によってはその遺伝子の発現量が低く、転移細胞を検出できなくなる可能性がある。このことから、マーカーとする mRNA は転移陽性のリンパ節で発現が高いだけでなく、その発現量の幅が小さいものを選択する必要があるということを示していると考えられる。この観点から、KRT19 mRNA は発現量の差が SPDEF、FOXA1 と比べて大きく、転移陽性リンパ節での発現量の幅が少なかったことから、もっとも有効なマーカーであると考え、KRT19 mRNA を検出できる RT-LAMP 法の測定系を構築することとした。

2. 3. 3 KRT19 の発現頻度に関する検討

乳癌のリンパ節転移の検出に用いる mRNA の条件の一つとして、多くの乳癌症例においてその mRNA が発現していることがあげられる。そこで、手術により摘出された乳癌の原発巣から病理標本を作製し、KRT19 による免疫組織化学染色 (IHC) を行い、その発現頻度を確認した。その結果を表2に示した。

表2 乳癌の原発巣における KRT19 の発現頻度

調査対象 : 大阪警察病院における乳癌症例 (2001年5月～2004年8月)

分類方法 : 乳癌取扱い規約第15版 乳腺腫瘍の組織学的分類

2. 浸潤癌 (Invasive carcinoma)					
	組織学的分類		原発巣CK19**		
			症例数	原発巣CK19陽性症例	原発巣CK19陽性率
浸潤性乳管癌 (Invasive ductal carcinoma)	乳頭腺管癌	Papillotubular carcinoma	11	11	100%
	充実腺管癌	Solid-tubular carcinoma	11	11	100%
	硬癌	Scirrhou carcinoma	13	13	100%
特殊型 (Special types)	粘液癌	Mucinous carcinoma	3	3	100%
	髄様癌	Medullary carcinoma	1	0	—
	浸潤性小葉癌	Invasive lobular carcinoma	3	3	100%
	腺様嚢胞癌	Adenoid cystic carcinoma	1*	0	—
	アポクリン癌	Apocrine carcinoma	2*	2	100%
	骨・軟骨化生を伴う癌	Carcinoma with cartilaginous and/or osseous metaplasia	2	1	50%

* 本集計期間 (2001年5月～2004年8月) 外の症例

過去 (1998年) の症例 (1例) について、原発巣におけるCK19の発現は陰性であることを確認している。

** 原発巣でのCK19の有無は、IHC法による。

表3に乳がんリンパ節転移巣における KRT19 蛋白の発現の有無を示した。大阪警察病院に

おける乳がん患者の転移陽性郭清リンパ節(乳頭腺管癌 10 症例、充実腺管癌 3 症例、硬癌 8 症例、浸潤性小葉癌 1 症例)についてKRT19 免疫染色を行った結果、それらの転移巣は全症例とも KRT19 免疫染色が陽性であった。

これらの結果から、乳がん原発巣及びリンパ節転移巣において、組織型によらず KRT19 蛋白が発現していると判断した。また、リンパ節での転移巣においてもその発現の有無を確認した結果、評価をおこなった 22 例すべてで KRT19 の発現が認められた。

表3 乳がんリンパ節転移巣における KRT19 蛋白の陽性率

調査対象 : 大阪警察病院における乳癌患者廓清リンパ節(2001年5月~2004年8月)

分類方法 : 乳癌取扱い規約第15版 乳腺腫瘍の組織学的分類

2.浸潤癌(Invasive carcinoma)					
	組織学的分類		症例数	CK19陽性症例	CK19陽性率
浸潤性乳管癌 (Invasive ductal carcinoma)	乳頭腺管癌	Papillotubular carcinoma	10	10	100%
	充実腺管癌	Solid-tubular carcinoma	3	3	100%
	硬癌	Scirrhus carcinoma	8	8	100%
特殊型(special types)	浸潤性小葉癌	Invasive lobular carcinoma	1	1	100%

*** リンパ節転移巣でのCK19の有無は、IHC法による。

以上の結果から、KRT19 は高い頻度で乳癌組織での発現が認められており、乳癌のリンパ節転移に有効なマーカーとなりえることが明らかとなった。

2. 3. 4 KRT19 による転移巣サイズ推定の可能性に関する検討

KRT19 は上皮細胞の骨格を形成しているタンパク質であり、細胞を形作るための主要な成分のひとつである。従って、癌細胞に含まれている KRT19 の量は比較的一定である可能性がある。このことは、KRT19 mRNA の量からリンパ節に含まれている癌細胞の量を推定することができる可能性がある。リンパ節での転移巣は、その大きさに応じて、遊離細胞 (Isolated tumor cell: ITC)、マイクロ転移 (micrometastasis)、マクロ転移 (Macrometastasis) に分けられており[1]、近年では治療方法の決定に関与する因子となっている。このことを検証するために、転移が認められるリンパ節から 10 μm の凍結連続切片を作成し、1 枚おきに病理標本を作製して転移巣の面積を測定し、病理標本を作製した凍結切片の間の 1 枚から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法により KRT19 mRNA 量を測定し、病理標本の転移巣面積と比較した。その結果を図8に示した。

連続凍結切片を用いた評価の結果、リンパ節中の癌細胞の個数と KRT19 mRNA の量はよく相関しており、標本中に確認できる癌細胞の量が多いほど KRT19 mRNA の量も多くなるという結果が得られた。このことから転移巣中の KRT19 mRNA 量を元に転移巣の大きさを推算することができると考えられた。

以上の結果から、KRT19 mRNA は乳癌のリンパ節転移巣で発現量が高く安定して発現しており、かつ mRNA 濃度から転移巣の大きさを推算できる良好なマーカーであると判断した。

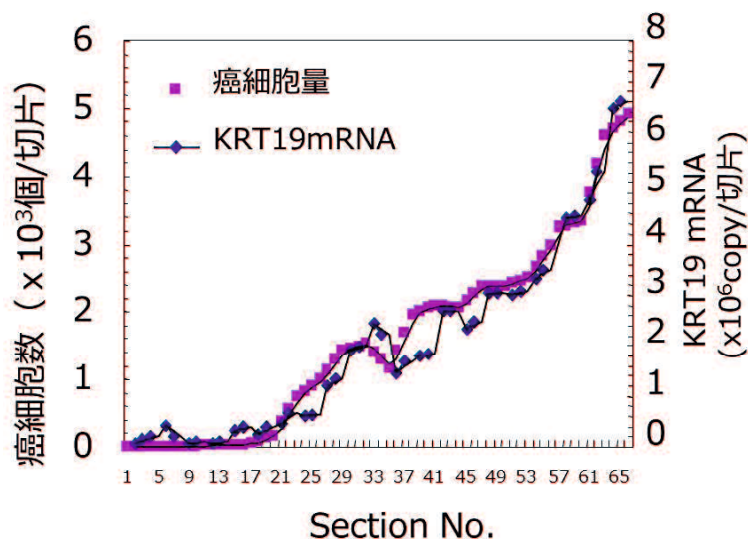


図8 乳癌の転移陽性リンパ節における癌細胞数と KRT19 mRNA 量

転移陽性のリンパ節から凍結連続切片を作成し、交互に病理標本による癌細胞数のカウントと定量 RT-PCR 法による KRT19 mRNA 量の定量を行い癌細胞数と KRT19 mRNA 量との比較を行った。

2. 3. 5 RT-LAMP 法による KRT19 mRNA の測定

乳癌の手術においては患者の QOL 向上を目的として、初期の症例においては腋下のリンパ節、および乳房の温存を目的とした縮小手術が多くの施設で行われている。縮小手術の適応には、手術中に腫瘍本体から最初に到達するリンパ節(センチネルリンパ節)の病理検査を実施し、そこに転移がない場合にこの縮小手術を実施する。この場合、センチネルリンパ節の病理検査は凍結標本を用いた迅速病理診断により手術中に行われることが多い。そのため、本法を臨床で適応するためには、迅速にリンパ節中の KRT19 mRNA を測定する必要がある。遺伝子の増幅反応に一般的に用いられる定量 RT-PCR 法では、対象遺伝子の検出までに、約 2 時間程度の時間を要するため、迅速な診断には適応が難しい。そこで、Notomi ら[17]によって開発された Loop mediated amplification method (LAMP 法)を本法での遺伝子増幅反応として用いることとした。LAMP 法では、反応液にあらかじめ逆転写酵素(reverse transcriptase)を反応系に添加しておくことで、検体中の mRNA を検出することが可能である。KRT19 を検出するための RT-LAMP 法用のプライマーセットを設計し、その性能を評価した。

2.5×10^2 , 2.5×10^3 , 2.5×10^4 , 2.5×10^5 , 2.5×10^6 及び 2.5×10^7 copies/ μ L の標準物質(KRT19 mRNA)を含む希釈溶液を RT-LAMP 法により測定を行った(図9)。

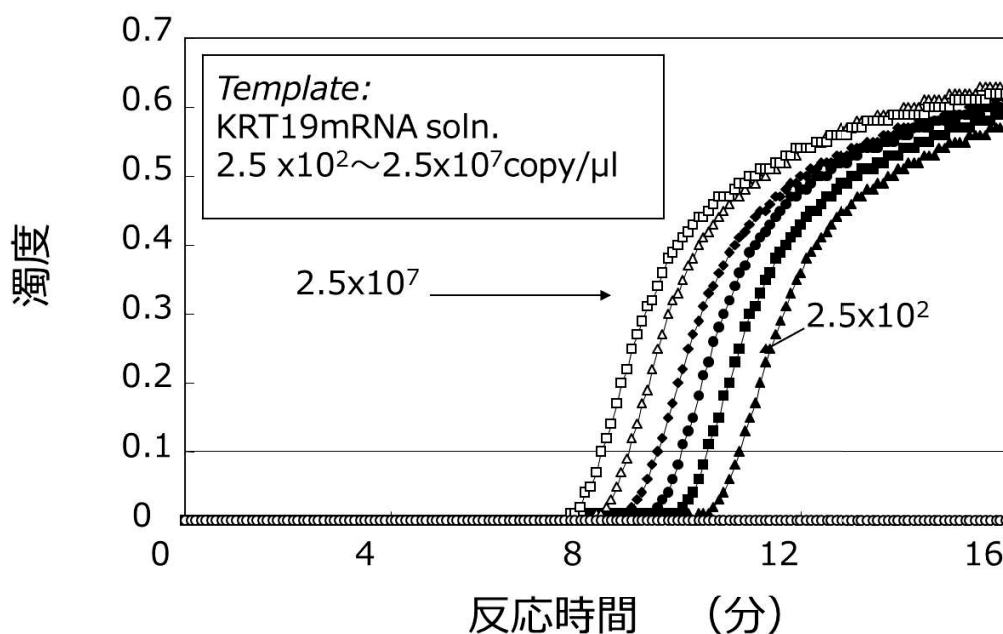


図 9 RT-LAMP 法による KRT19 mRNA の反応曲線

Negative control および KRT19 mRNA が $2.5 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^2$ copy/ μ L の濃度の溶液を RT-LAMP 法により測定した。○: Negative control, ▲: 2.5×10^2 copy/ μ L, ■: 2.5×10^3 copy/ μ L, ●: 2.5×10^4 copy/ μ L, ◆; 2.5×10^5 copy/ μ L, △: 2.5×10^6 copy/ μ L, □: 2.5×10^7 copy/ μ L

Negative control では増幅反応に伴う反応液の濁度変化は認められなかったが、KRT19 mRNA を含む溶液の場合は、いずれも増幅反応に伴う反応液の濁度上昇が認められた。濁度が 0.1 に達する時間を増幅反応の検出時間とした。検討を行った濃度範囲での反応の検出時間は、8.2 分から 11.4 分の間であった。濁度の上昇は、核酸増幅反応開始後すぐに起こるわけではなく、反応がある程度進んでから検出されていた。これは、核酸の増幅反応として用いている RT-LAMP 法の反応機構[17]から考えて、核酸増幅反応が進むにしたがってプライマーが結合できる部分の数が急激に増加することによるものと考えられる。核酸増幅法としてよく用いられている PCR 法では、遺伝子の増幅が 2^n 倍 (n は PCR のサイクル数) で核酸増幅が起こるのに対し、RT-LAMP 法では、これ以上の増幅効率で核酸が増幅されているために濁度の急激な上昇が起こると考えられる。

定量 RT-PCR 法では、遺伝子増幅反応を検出した Ct 値と遺伝子の濃度の対数値の間に負の相関があり、その関係化から遺伝子の定量が可能である。本法においても同様に遺伝子の定量が可能であるかどうかを検討した。その結果を図 10 に示した。

濁度 0.05~0.25 の範囲で直線かつ互いにほぼ平行な反応曲線が得られた。濁度が 0.1 に達する時間を遺伝子増幅反応の検出時間(以下、検出時間)として、KRT19 mRNA 濃度との間の関係を調べた。その結果、定量 RT-PCR 法と同様に、検出時間と KRT19 mRNA 濃度の対数

値とは $r=0.999$ の良好な直線関係を示し、検量線を作成することで検体中の KRT19 mRNA の検出時間から検体中の mRNA 濃度を算出できることが明らかとなった。

LAMP 法の特徴として、検体中の成分による阻害反応を受けにくいことが報告されている。そこで、上記と同様に、転移陰性リンパ節を可溶化した溶液の上清に各種既知濃度の KRT19 mRNA を添加し、RT-LAMP 法による増幅反応を行い、その検出時間と KRT19 mRNA 濃度との関係を調べた。その結果、検出時間と KRT19 mRNA 濃度とは直線関係を示し、それはリンパ節非存在下の場合とほぼ同じ値を示した。このことから、RT-PCR 法のように検体から RNA を精製することなく、既知濃度の KRT19 mRNA を用いてあらかじめ作成した検量線により、リンパ節中における KRT19 mRNA 濃度 (copy/ μ L) を測定できることが確認できた。

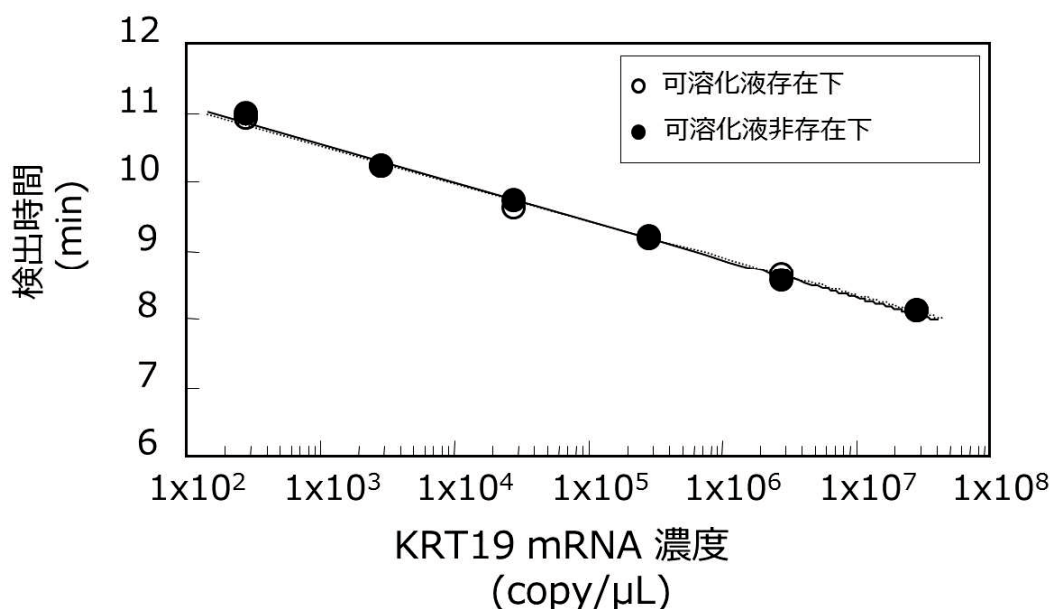


図 10 検体の RT-LAMP 法による KRT19 mRNA 増幅反応

- KRT19 mRNA 濃度と立ち上がり時間の関係 -

- 可溶化液非存在下: グリシン緩衝液に標準 KRT19 mRNA を添加し、 $2.5 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^7$ copies/ μ L の濃度に調製した試料
- 可溶化液存在下 : 乳がん転移陰性リンパ節 600mg を 4mL のグリシン緩衝液を用いて可溶化した溶液に、標準 KRT19 mRNA を添加し、 $2.5 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^7$ copies/ μ L の濃度に調製した試料

2. 3. 6 転移陰性と転移陽性を判別するカットオフ値

30 症例の乳がん患者 (浸潤性乳管癌 24 症例、特殊型 5 症例、非浸潤性乳管癌 1 症例) から採取したリンパ節 106 個 (pN0 患者からの転移陰性リンパ節 42 個、pN1~3 患者からの転移陰性リンパ節 42 個、及び転移陽性リンパ節 22 個) を用いて、カットオフ値の設定を検討した。

RT-LAMP 法によって得られた、各リンパ節群における KRT19 mRNA 濃度を図 11 に示した。

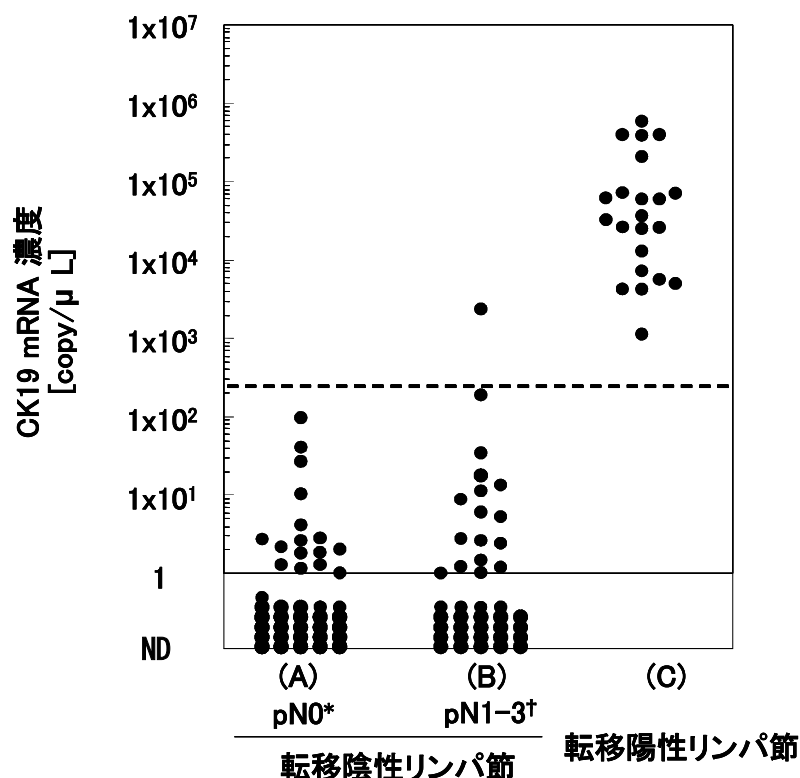


図 11 リンパ節可溶化液中の KRT19 mRNA 濃度

*pN0 患者由来の転移陰性リンパ節

† pN1~3 患者由来の転移陰性リンパ節

検討に用いたリンパ節中の KRT19 mRNA 濃度は、転移陰性のリンパ節と転移陽性リンパ節で明らかに異なっており、本法でのリンパ節転移の検出が可能であることがわかった。転移陰性と陽性のリンパ節を KRT19 mRNA の発現量から判定するためのカットオフ値は、病理学的に転移が認められなかった症例 (pN0 症例) のリンパ節中での KRT19 mRNA 濃度から決定した。pN0 症例由来のリンパ節での KRT19 mRNA 濃度の平均値にそれらの分布を考慮して、Standard deviation (SD) の 3 倍を足した値を転移陰性と陽性を見分けるためのカットオフ値とし、その値は 250copy/μL となった。

この値を用いて、再度図 10 の結果を解析すると、本評価で用いた転移陽性検体の検出感度は 100%であった。一方、陰性検体を陰性と判定する特異度は、pN0 症例を由来のリンパ節では 100%であったが、転移のあった症例から取得されたリンパ節では、1 例カットオフ以上の値となり、このリンパ節には病理学的検索を行った部位では転移が認められなかったが、本法に用いた部分には転移が含まれている可能性があると考えられた。

2. 3. 7 マクロ転移とマイクロ転移を判別するカットオフ値

マクロ転移とマイクロ転移を区別するカットオフ値は、マクロ転移に相当する転移巣(2mm 角)中の KRT19 mRNA の発現量から算出した。

9 症例の乳がん患者(浸潤性乳管癌 8 症例、浸潤性小葉癌 1 症例)から採取した 9 個の凍結保存された転移陽性リンパ節を用いて検討を行った結果、転移巣 2mm 角中の KRT19 mRNA 発現量は、上限値 1.4×10^5 copies/ μ L から下限値 4.7×10^3 copies/ μ L までの分布を示した(表4)。この結果から、その下限値に近い 5.0×10^3 copies/ μ L をマクロ転移とマイクロ転移を区別するカットオフ値とした。

表4 乳がんリンパ節転移巣 2mm 角中の KRT19 mRNA 量

	組織型	KRT19 mRNA [copy/ μ L]
1	乳頭腺管癌	2.3×10^4
2	乳頭腺管癌	1.1×10^4
3	乳頭腺管癌	4.7×10^3
4	乳頭腺管癌	5.0×10^4
5	乳頭腺管癌	1.0×10^4
6	小葉癌	1.4×10^5
7	乳頭腺管癌	2.0×10^4
8	乳頭腺管癌	6.7×10^4
9	乳頭腺管癌	2.4×10^4

この結果を図 10 に追加で記載した結果を図 12 に示した。

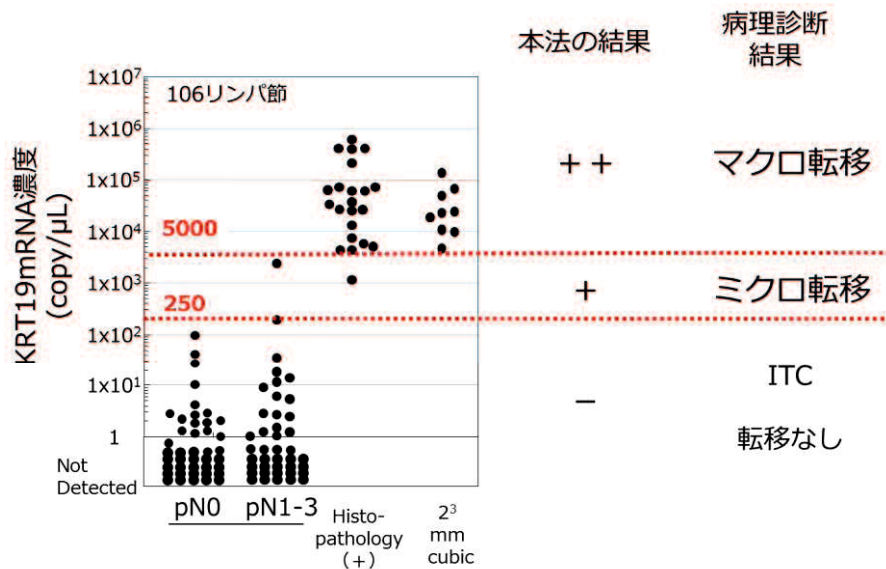


図 12 乳癌のリンパ節における転移巣のサイズと KRT19 mRNA 濃度の関係

図 11 にマクロ転移に相当する 2mm 各のリンパ節での KRT19 mRNA 量を記載した。2 本の破線は可溶化液中の KRT19 mRNA 濃度から転移陰性と陽性を判別するためのカットオフ値(250copy/μL)およびミクロ転移とマクロ転移を判別するためのカットオフ値(5,000copy/μL)を示す。図の右側は本法での判定結果と病理診断での結果の関係を示す。

図 12 に示したように、マクロ転移の下限値をカットオフ値として設定した場合、病理学的に転移がないと診断されたリンパ節ではすべてミクロ転移と判定された。このことから考えると、これらのリンパ節はミクロ転移であった可能性が高いため、上記のカットオフ値の設定は妥当であったと考えることができる。

(5) 多施設共同研究による評価

表5に本法の結果と病理組織検査法でのリンパ節転移の判定結果を示した。なお、本施設臨床研究で得られたすべての結果は、参加施設の全ての医師で構成される研究会及びその代表者で構成される幹事会で最終的に承認されたものである。

表5 本法と3 割面病理組織検査の比較

リンパ節数	OSNA 判定	3 割面病理組織検査結果			
		陽性		陰性	
		マクロ転移	ミクロ転移	ITC	陰性
325 リンパ節 101 症例	++	34	0	0	0
	+	6	3	0	4
	-	0	2	13	263

*: pN0 患者由来のリンパ節であるが、本試験における病理組織学検査に供することにより、マクロ転移が観察されたリンパ節

合計 325 リンパ節(101 症例)における本法 3 割面病理組織検査との一致率は、97.8%で良好な結果であった。

本法と病理診断で結果が乖離した検体について、臨床病理学的背景とウエスタンブロット法による KRT19 タンパク質の定量を行い、不一致となった検体について解析を行った。結果を表6に示した。

表6 本法と病理診断の間で結果が不一致となった検体の解析結果

検体番号	KRT19 mRNA (copy / μ l)	KRT19 protein (ng/ μ l)	病理診断 [†]	pN
1	2.3x10 ³	1.4	Negative	pN1
2	3.6x10 ³	1.6	Negative	pN1
3	1.5x10 ³	Not tested	Negative	pN1
4	9.6x10 ²	Not tested	Negative	pN2
5	ND*	0.04	Micrometastasis	pN1
6	ND*	Not tested	Micrometastasis	pN1

* not detected. † KRT19 の免疫染色を含む 3 面での病理診断結果

本法で陽性、病理診断で陰性であった4例については、いずれも pN の状況は pN1 以上の症例であり、いずれかのリンパ節に転移の認められる症例であった。また、検体番号 1、2についてはウエスタンブロット法による KRT19 タンパク質の測定においてタンパク質が検出されており、転移があったと考えられる(検体番号 3、4の検体については検体が残っておらず解析はできなかった)。KRT19 mRNA 濃度についても、ミクロ転移に相当する値であった。これらのことから、本法で陽性判定となったことは妥当であると考えられる。

また、本法で陰性、病理診断で陽性となったものについては、病理診断での結果がマイクロ転移であったこと、KRT19 タンパク濃度についても低い値であったことから、本法に用いたリンパ節中には検出できる量の mRNA が存在しなかったことが考えられる。

以上の結果から、可溶化液中の KRT19 の mRNA 濃度について、適切なカットオフ値を設定することで、リンパ節に存在する癌細胞の有無を検出できること、さらに、その mRNA 濃度から転移巣の大きさを推定できることを明らかにした。

2.4 まとめ

2章では乳癌のリンパ節転移検出に適した mRNA マーカーの検索、評価および迅速な mRNA 検出系の構築を行った。

リンパ節転移の検出に関して、リンパ節での発現が低く、乳癌組織で発現の高い mRNA を遺伝子発現データベースから抽出し、その性能について臨床検体を用いた評価を行った。候補マーカーをスクリーニングする目的で、転移陽性および陰性リンパ節から抽出した RNA を用いて評価を行った結果、KRT19、FOXA1、SPDEF、CEA、MGB1、TACSTD2、MUC1 の 6 種類の mRNA が候補として抽出された。これらの mRNA について転移陽性リンパ節および陰性リンパ節中の発現量を確認した結果、KRT19、FOXA1 および SPDEF で転移陽性リンパ節および陰性リンパ節での発現量が明らかに異なっていた。中でも KRT19 は転移陽性リンパ節での発現量が最も高かったため、KRT19 を乳癌のリンパ節転移の検出用マーカーとして選択した。

KRT19 は上皮細胞の骨格タンパク質であることから、細胞中で安定して発現し、細胞あたりでの発現量が比較的一定であることが考えられる。そこで、転移陽性のリンパ節を用いて凍結連続切片を作成し、組織中の RNA と病理標本中での癌細胞量を比較し、癌細胞の量と KRT19 の発現量についての関係を確認した。その結果、転移巣が大きくなるにしたがって、組織中の KRT19 mRNA の発現量も高くなっており、KRT19 の発現量から転移巣の大きさを推定できる可能性があることが示された。

KRT19 を迅速に測定するための遺伝子の検出系としては、RT-LAMP 法を用い、約 12 分程度で KRT19 mRNA を検出する系を構築した。RT-LAMP 法の測定系で、乳癌患者から取得された 106 個のリンパ節を用いて、KRT19 の発現量を検討したところ、転移陰性検体と陽性検体の間で、KRT19 の発現量が明らかに異なっており、KRT19 を用いて転移を検出できることが明らかとなった。特に、転移が陰性のリンパ節のうち、手術により摘出されたリンパ節すべてに病理学的に転移が認められなかったリンパ節においても KRT19 の発現が認められており、リンパ節転移を正確に検出するためにはカットオフ値を設定する必要があることを明らかにした。カットオフ値の設定については、pN0 の症例から摘出されたリンパ節での KRT19 発現量の分布から平均値 + 3SD の部分にカットオフ値を設定した。理論的にはこの範囲に 99% の陰性検体の KRT19 mRNA 発現量が入ることになる。

このカットオフ値をもとに、陽性検体の感度、陰性検体での特異度を確認したところ、感度は 100%、特異度は 97.7% であり、陰性検体での KRT19 の発現による偽陽性判定を回避でき、良好な結果を得ることができた。病理診断で転移陰性と判定された検体のうち、2 検体が本法で陽性判定となったが、これらの検体については手術により摘出されたリンパ節のいずれかに病理学的な転移が認められている症例に由来するものであり、KRT19 の発現量も比較的低い値であったことから、病理診断で検出できなかった微小な転移を検出できている可能性があると考えら

れた

乳癌のリンパ節転移においては、転移巣の直径が 2mm 以上であるマクロ転移と、0.2mm 以上 2mm 未満であるマイクロ転移を見分けることが重要である。先に述べた KRT19 の mRNA 発現量と、リンパ節のサイズについての比較を行った結果、2mm 角の転移巣の KRT19 mRNA の発現量は、 $4.7 \times 10^3 \sim 6.7 \times 10^4 \text{ copy}/\mu\text{L}$ であり、マイクロ転移とマクロ転移を見分けるためのカットオフ値として、下限値の $4.7 \times 10^3 \text{ copy}/\mu\text{L}$ から $5.0 \times 10^3 \text{ copy}/\mu\text{L}$ に設定した。

以上のようにして設定したカットオフ値を元に、乳癌患者由来の 325 個のリンパ節を用いて多施設での共同研究を実施した結果、3 面との病理診断（マクロ転移、マイクロ転移を陽性と判定した場合）との一致率は 98.2% という良好な結果を得ることができた。病理診断でマクロ転移と診断された 40 例のうち、本法でマクロ転移と判定できたリンパ節の数は 34 例であり、その的中率は 85% であった。実際には、リンパ節を分割するために、マクロ転移であっても本法での検討に用いる試料中に含まれる転移巣の大きさはマクロ転移以下となる場合もあることを考慮すると、この的中率は臨床診断上、十分に高いと考えられる。また、病理診断と本法で不一致となった検体において、臨床病理学的な背景と KRT19 のタンパク質量との比較を行った結果、いずれも本法の結果を指示するものであり、本法が高いリンパ節転移の検出能を有していると考えられた。

以上の結果から、本法は乳癌もリンパ節転移検査において、十分に臨床的有用性を有していると考えられる。本法はリンパ節を可溶化して可溶化液の上清を RNA の精製などの前処理なしで、リンパ節に含まれている KRT19 mRNA 濃度を測定できることから、One-Step Nucleic acid Amplification 法（以下 OSNA 法）と名づけた。

3. 肺癌のリンパ節転移検出法の開発

3.1 研究の背景

肺癌は、胃癌及び乳癌と共に、罹患率の最も高い癌の一つであり、近年はその患者数も増加傾向にある。肺癌には大きく分けて、小細胞癌と非小細胞癌の2種類があるが、小細胞癌は薬剤による治療が主である。非小細胞癌においては外科的手術が治療の第一選択肢であり、腫瘍を含む肺葉の切除もしくは片側の肺の全部を摘出することが通常の術式となっている[23-25]。

肺癌においてもリンパ節転移の有無は重要な予後因子である上[1]、治療方針を決定するための正確なステージングを行うためには、リンパ節の転移を高感度に検出することが重要である。しかしながら、現状のリンパ節転移は最大断面を含む1面のみで診断されていることから、転移を見落とす可能性もあり、臨床で使用できる高感度なリンパ節転移の検出法が望まれている。また、目的が不明な点もあるが、肺癌リンパ節の術中迅速診は多くの病院で行われており、現状で術中診断のニーズがあると考えられる。

さらに、近年では画像診断技術の向上に伴い、初期の段階で肺癌と診断される患者が多くなってきており、肺の一部のみを摘出する区域切除、部分切除といわれる縮小手術が注目されている[26-29]。

縮小手術はまだ臨床研究の段階ではあるが、先に述べたQOL向上という観点から、適応への期待も大きい。縮小手術を行う際には所属リンパ節への転移の有無が、術式を判断するひとつの指標となる。早期の肺癌患者が縮小手術の対象となるが、腫瘍近傍のリンパ節に転移がある場合は標準的な術式である葉切除を行う。一方、リンパ節に転移のない場合は、肺の区域切除、部分切除等の縮小手術が行われる。即ち縮小手術を行う際にも、リンパ節の転移状況の評価を術中に迅速に行い、患者のステージを高い精度で把握することが求められている。高感度なリンパ節転移診断法を提供することで、より高い精度で患者のステージを把握することができ、患者一人一人に合った治療を提供することができると考えられる。

以上のことから、肺癌リンパ節転移診断はOSNA法の特徴である感度、迅速性と客観性を活かすことのできる検査であると考えられる。本章では肺癌のOSNA法の適用の可能性を検証することを目的として、肺癌リンパ節転移診断用mRNAマーカーとしてのKRT19 mRNAの評価、小規模臨床研究により臨床有用性に関して評価を行いその有用性の有無について検討を行った。

3. 2 実験方法

3. 2. 1 対象

本研究で用いたヒト由来のリンパ節は、共同研究先である大阪大学医学部およびシスメックス株式会社社内倫理委員会の承認のもと、患者へのインフォームドコンセントを行い、承諾が得られた症例のものを使用した。

非小細胞癌の症例で治療を目的とした通常の手術を行い、診断を目的とした病理組織診断を行ったリンパ節の残余部分を用いて検討を行った。病理組織診断を行った後の組織の1/4から半分を本研究に用い、研究に使用するまで -80°C の条件で保存した。

3. 2. 2 mRNA マーカーの選択方法

肺癌のリンパ節転移検出に有効なマーカーの選択は以下のように行った。候補となりえる mRNA マーカーを Gene Expression Omnibus (GEO) のデータセットより抽出した。肺癌のリンパ節への転移を検出するために用いる mRNA は、リンパ節で発現量が低く、肺癌組織で発現量の高い遺伝子である必要がある。肺癌は大きく腺癌と扁平上皮癌の 2 種類があるため、両組織型で発現が高く、リンパ節で発現の低い mRNA を選択する必要がある。腺癌と扁平上皮癌を含む肺癌症例 45 症例の mRNA 発現データ (GSE7670 と GSE6253) とリンパ節 10 例 (GSE2665) Affymetrix U133 ver. 2.0 のデータセットを取得し、正規化を行った後、各 mRNA の平均値を肺癌組織とリンパ節で比較し、両組織間で 100 倍以上値が異なるもの 16 種類を候補 mRNA マーカーとした。

これらの候補 mRNA について、転移陽性検体リンパ節 15 検体および陰性リンパ節 20 検体中の 16 遺伝子中の発現量を定量 RT-PCR により確認した。定量 RT-PCR 法により得られた Ct 値の差が大きさから候補遺伝子として選択した。評価に用いたプライマーは、表7に示した。

表7 候補マーカーの選択に用いたプライマー配列

GENE SYMBOL	Forward primer	Reverse primer
KRT19	CAGATCGAAGGCCTGAAGGA	CTTGGCCCCTCAGCGTACT
TAGSTD1	GTTTCGGGCTTCTGCTTGC	GTAGTTTTACAGACACATTCTTCTCTG
KRT7	AGGAGAGCCGGTTGGCTG	CTGCTACTGCCACCAGTGGA
MUC1	TATGAGAAGGTTTCTGCAGGTAATGG	CGACGTGCCCTACAAGTTG
FXD3	AGCCCAAAGCTGATGAGGACA	ATGCAAAGGAGTCCCAGCAGA
GPRC5A	TTTATAACAACCTGCTCAGAGTGCGA	AGCCATTCTGGACCCTAGTGC
CEACAM6	TCGAGAGACAATATACCCCAATGC	GCAGCTCCGGGTATACATGGAA
CLDN3	CAGCAACATCATCACGTCGC	CAGTTCATCCACAGGCCCTC

WIF1	GGGCAGGCAGAATACTTCTATGAAT	GGAAACCAACTTGAACAACTGATG
KRT15	AGGGCGTTGAGGCTGACA	ACTCCTTCATCTCCTCTTCGTGGT
KRT17	CAACAGTGAGCTGGTGCAGAGT	ACGCAGTAGCGGTTCTCTGTCT
SCGB1A1	CCAAAAGCCCAGAGAAAGCA	GGTGGGCGTGGACTCAAA
SFTPC	GAGATGCAGGCTCAGCACC	GTAGTAGAGCGGCACCTCGC
AGR2	AATCCAGAAATTGGCAGAGCA	AACTGTCAGAGATGGGTCAACAAA
SFN	GCAGGCCGAACGCTATGA	GCAGGTTTCGCTCTTCGCA
SFTPB	GTCCTCCGGTGCTCCATG	CTTGCACTTTTCCCTGTCCAG
TNNC1	GCCTTCGACATCTTCGTGCTG	GCTGCCGTCCTCGTCCAC
AGER	CGGTGCCAGGCAATGAAC	CACATGTCCCCACCTTATTGG
KRT6A	ACTTTCCACTGGCTCTCAAACCTCT	ATACAGGCTTTGTACATCATAGGACTAGT
KRT6B	TCCACTGAGCTCCTGTTGCTT	ATATAGGTCATTTTCTTCTCAGAATTATGG
KRT6C	ATTAATTTCTTGCCTCCAAAATTGTTC	ACTTGTGCTTCCATGCATACTGC
SFTPA2	CCTTTGGCATGAGATGGAGG	TGAAGGAACTGGACCAGATGG

3. 2. 3 定量 RT-PCR 法

リンパ節を可溶化した後、10,000 × G で 1 分間遠心分離を行いその上清から RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製)を用いて RNA の抽出を行い、この RNA をサンプルとして手定量 RT-PCR 法を行った。定量 RT-PCR 法は one-step RT-PCR with QuantiTect SYBR Green (Qiagen 社製)を用い、ABI Prism 7700 sequence detector system (ABI 社製)上で実施した。プライマーの設計は Primer Express Version 2.0(ABI 社製)により行った。

反応条件は、精製した RNA 1 μL をテンプレートとして用い、30 分間 42°C でインキュベーションを行った後、95°C 15 秒、53°C 15 秒、72°C 30 秒のサイクルを 40 回繰り返した。

3. 2. 4 RT-LAMP 法

本研究では対象遺伝子を迅速に検出する必要がある。そこで、Notomi らにより報告されている迅速な遺伝子増幅法である LAMP 法を用いて対象遺伝子の検出を行った。LAMP 法の反応液は、Notomi らの報告に従い、3.5 μM forward inner primer(KRT19FA)、reverse primer (KRT19RA)、0.2 μM forward outer (KRT19F3)、reverse primer (KRT19R3)、2.6 μM forward loop (KRT19LPF) and reverse primer (KRT19LPR)、0.9mM deoxynucleotide triphosphates、54.3mM Tris-HCl、10.8mM、KCl、10.8 μM (NH₄)₂SO₄、5.4 mM MgSO₄、0.1% Triton X-100、5.4 mM DTT、2.5 units avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega 社製)、18 units Bst DNA Polymerase (New England Biolabs 社製)、and 25 units RNasin Plus (Promega 社製)とした。この溶液 23 μL と検体 2 μL を混合し、65°C で 16 分反応させた。

LAMP 法による遺伝子増幅反応は、RD-100i(シスメックス社製)上で行い、反応液の 660nm に おける吸光度変化を 6 秒ごとにモニタリングし、反応の進行に伴い生成するピロリン酸マグネシウムによる吸光度の変化を濁度に変換し、濁度が 0.1 を越えた時点を遺伝子増幅反応の検出時間とした。LAMP 法による遺伝子増幅反応には 6 種類のプライマーが必要となる。Cytokerain (KRT)19 を検出するための primer は

5' -GGAGTTCTCAATGGTGGCACCACTACTACACGACCATCCA-3' (KRT19FA),

5' -GTCCTGCAGATCGACAACGCCTCCGTCTCAAACCTTGGTTTCG-3' (KRT19RA),

5' -TGGTACCAGAAGCAGGGG-3' (KRT19F3)、5' -GTTGATGTCGGCCTCCACG-3'

(KRT19R3), 5' -AGAATCTTGTCCCGCAGG-3' (KRT19LPF), 5' -CGTCTGGCTGCAGATGA-3'

(KRT19LPR)の合計 6 種類の primer を用いた。

3. 2. 5 転移陰性と転移陽性を判別するカットオフ値の設定方法

肺癌患者から摘出されたリンパ節 150 例(転移陽性検体 15 個、転移陰性検体 135 個)について、リンパ節の可溶化液上清を検体として、それぞれの KRT19 mRNA 濃度を測定した。転移陰性リンパ節から調製した可溶化液中の KRT19 mRNA 濃度の平均値とその分布から平均値 + 2 SD に相当する濃度をカットオフ値とした。

3. 2. 6 検出感度の見積もり

OSNA 法で KRT19 mRNA をマーカーとしてリンパ節転移の検出を行った際の、転移の検出加減を見積もるため、凍結連続切片を用いた評価を行った。11 症例の肺癌患者から採取した 11 個の転移陽性リンパ節それぞれから 10 枚の凍結連続切片を作成し、1、4、7、10 枚目の切片を AE1/ AE3 抗体により免疫染色を行い、その面積を測定した。2、3 枚目、5、6 枚目、8、9 枚目の凍結切片をそれぞれ可溶化し、KRT19 mRNA の濃度を測定した。測定により得られた KRT19 mRNA 濃度とあらかじめ測定した面積の関係から、0.1mm³ から 2.0mm³ 相当の転移巣がリンパ節に含まれていた場合の KRT19 mRNA 濃度を算出し、カットオフ値における検出感度を見積もった。

3. 3 結果と考察

3. 3. 1 候補 mRNA マーカーの評価

肺癌のリンパ節転移診断に適した mRNA マーカーを選択するために、肺癌およびリンパ節における遺伝子発現データを GEO から入手して発現量を確認した。その結果を図 13 に示した。

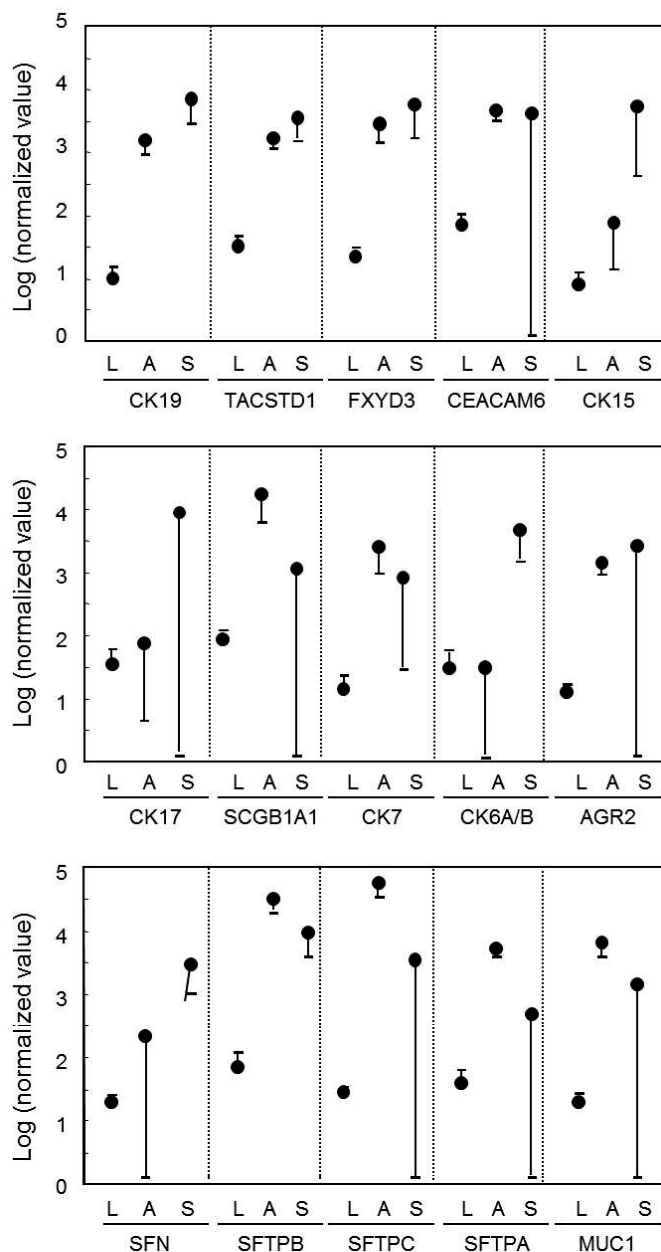


図 13 肺癌リンパ節転移検出用 mRNA の発現解析結果

L:リンパ節での発現量、A:腺癌での発現量、S:扁平上皮癌での発現量
エラーバーは、発現量の分布からの1SDを示す。

リンパ節と腺癌、扁平上皮癌の腫瘍組織で 100 倍以上発現の異なる遺伝子として、KRT19、

KRT7、AGR2、SFN、MUC1、FXD3、CEACAM6、TACSTD1、KRT17、KRT15、SCGB1A1、SFTPB、SFTPA2、SFTPA、KRT6A、KRT6B の 16 種類の mRNA が候補として抽出された。これらの mRNA のうち、KRT19、KRT7、SFTPB および TACSTD1 は過去にも肺癌のリンパ節転移の候補マーカーとして報告がある[30,31]ことから、マイクロアレイのデータからの候補 mRNA の抽出は妥当な手法であると考えられる。

マイクロアレイの発現データから選択した mRNA マーカー16 種類について、臨床検体中での発現量を確認するために、転移陽性リンパ節 15 検体、転移陰性リンパ節 20 検体中の mRNA の発現量を定量 RT-PCR 法により検討した。結果を図 14 に示す。

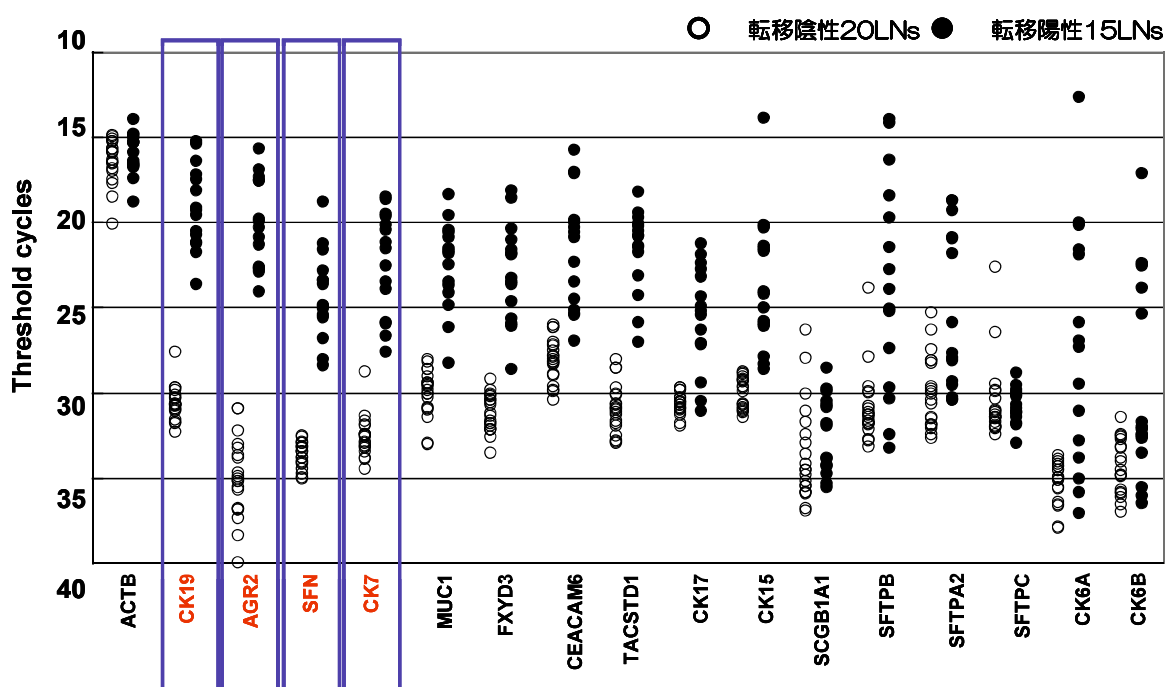


図 14 肺癌リンパ節における各 mRNA マーカーの発現量

個別の検体を用いて検討を行った結果、KRT19、AGR2、KRT7、SFN が転移陽性リンパ節と陰性リンパ節間での発現量の差が大きく、リンパ節転移の検出用 mRNA マーカーとして有用である。マイクロアレイデータの結果からは SFTPB、SFTPA、KRT6A などの mRNA も転移陽性リンパ節と陰性リンパ節間での差が大きく、有用なマーカーである可能性が示されていたが、個別検体を用いた評価では、転移陽性リンパ節の中に発現量の低い検体があり、癌細胞中での発現量が安定していないことが考えられた。また SFN については転移陽性検体での発現量が低く、小さな転移を検出できない可能性があること、AGR2については、扁平上皮癌での発現頻度が低いことから[32,33]、候補マーカーから除外した。

マイクロアレイデータの解析、定量 RT-PCR 法による Ct 値の評価、両方での結果で、腺癌、扁平上皮癌ともにリンパ節での発現量が少なく、転移巣での発現量が高いことが期待できるマーカーとして KRT19 を選択した。また、KRT7 については、過去の報告で KRT19 とのコンビネーションアッセイの有用性が報告されている[30]ことからあわせて評価を行った。

3. 3. 2 肺癌患者リンパ節中での KRT19 mRNA および KRT7mRNA の発現量

KRT19 および KRT7 を OSNA 法での肺癌のリンパ節転移検出における mRNA マーカーとした場合の性能について評価するため、臨床検体を用いた小規模臨床試験を行った。

検体は、肺癌患者から摘出されたリンパ節 150 例(転移陽性検体 15 個、転移陰性検体 135 個)を用い、乳癌リンパ節を測定する際の OSNA 法のプロトコールに従い、リンパ節組織の可溶化液上清をサンプルとして、KRT19 mRNA の測定を行った。結果を図 15 に示した。

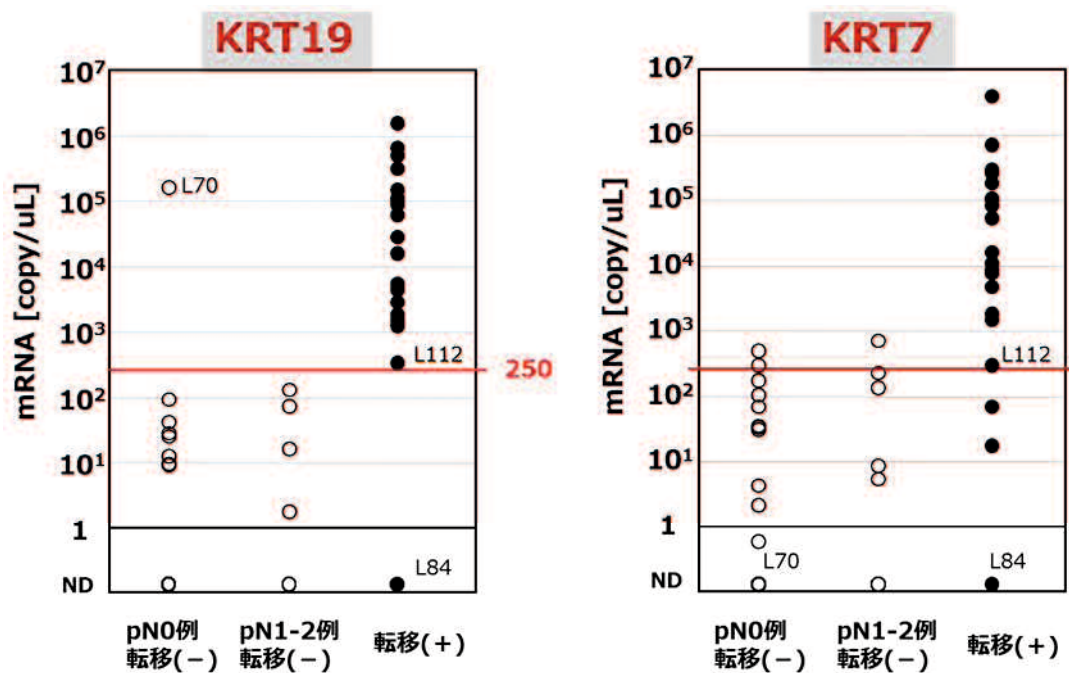


図 15 OSNA 法による肺癌リンパ節中の KRT19 mRNA 測定結果

OSNA 法による肺癌リンパ節の測定を行った結果、転移陽性リンパ節と転移陰性リンパ節での KRT19 mRNA の発現量は病理診断の結果とよく一致しており、良好な結果を得ることができた。一方で、KRT7 では転移陽性と転移陰性リンパ節での KRT7mRNA 濃度がオーバーラップしており、両者を分けることはできなかった。

3. 3. 3 転移陽性と陰性を見分けるカットオフ値の設定

pN0 と判定された症例から郭清された転移陰性リンパ節 99 個での KRT19 mRNA 濃度から、カットオフ値を設定した。pN0 症例での KRT19 mRNA 発現量をもとに、その平均値 + 2SD にカットオフ値を設定したところ、220copies/ μ L となった。(図 16)この結果から、OSNA 法による肺癌のリンパ節転移検出はこれまで検討を行ってきた癌種と同様に 250copies/ μ L と設定した。(この算出を行う際に、pN0 症例群において一例、著しく高い KRT19 mRNA 濃度を示す検体については、臨床病理学的背景を調査した結果、StageIV の症例であったため、カットオフ値の算出から除外した。)

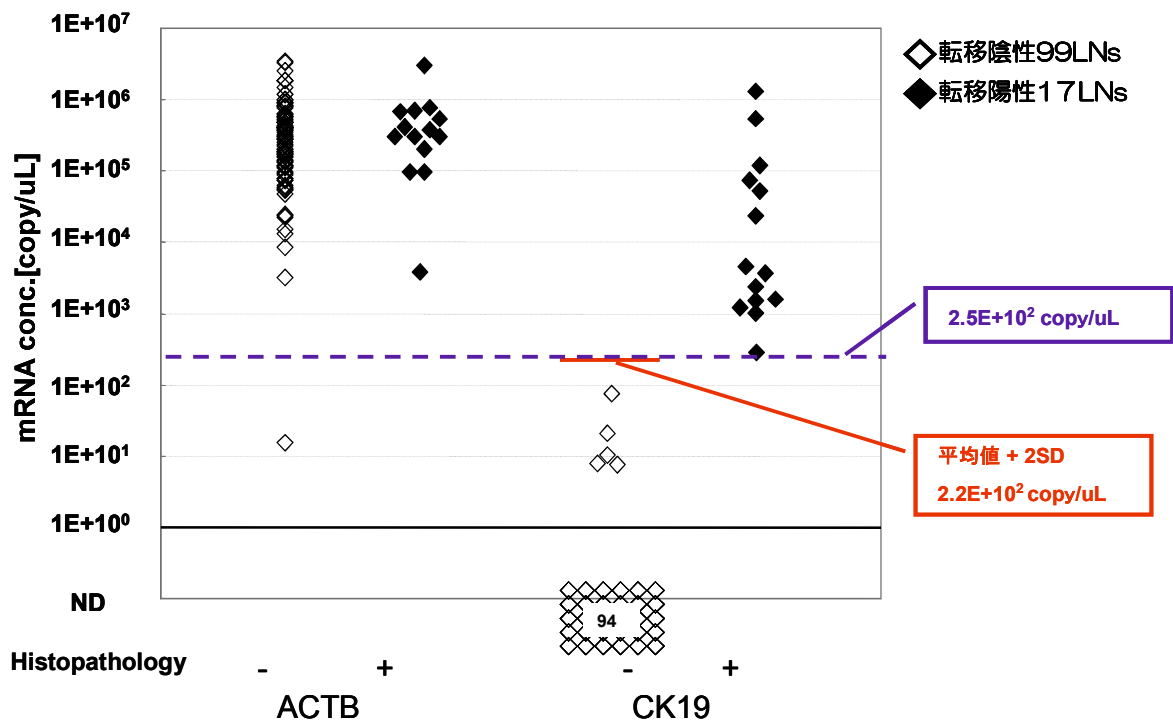


図 16 KRT19 mRNA による肺癌リンパ節転移のカットオフ値の設定

一方、KRT7 の場合は、転移陰性検体と陽性検体との発現量がオーバーラップしたため、ROC カーブから感度、特異度が最も良好になる点をカットオフ値として設定した。その結果、カットオフ値は 250copy/ μ L となった。

250copies/ μ L のカットオフ値により今回の検討結果における病理診断と OSNA 法の一致率を表 8、9 に示した。一致率、感度、特異度、PPV、NPV 算出した結果、以下のようになった。

表8 KRT19 をマーカーとする OSNA 法と病理診断の結果の一致率

165 リンパ節 (転移陽性 20 個、陰性 155 個)		病理診断	
		陽性	陰性
OSNA 法(KRT19)	陽性	19	1
	陰性	1	144

一致率: 97.0% (163/165)

感度: 95.0% (19/20)

特異度: 99.3% (144/145)

PPV: 95.0% (19/20)

NPV: 99.3% (132/133)

表9 KRT7 をマーカーとする OSNA 法と病理診断の結果の一致率

165 リンパ節 (転移陽性 15 個、陰性 135 個)		病理診断	
		陽性	陰性
OSNA 法(KRT19)	陽性	17	3
	陰性	3	142

一致率: 96.3% (148/150)

感度: 85.0% (17/20)

特異度: 97.9% (142/145)

PPV: 94.1% (17/20)

NPV: 99.2% (142/145)

今回の小規模臨床試験において、OSNA 法と病理診断の結果が乖離する検体が 2 検体認められた。これらの検体について、患者の臨床病理学的背景から考察した。

OSNA 法で陰性、病理診断で陽性となっている 1 検体については、病理診断において、腫瘍部が壊死していることが確認されており、OSNA 法に用いた試料中に含まれる癌細胞の量が少なかったことが考えられる。PCR 法において、その発現量を検討しているが、OSNA 法の結果と同様に KRT19 mRNA の量は陰性検体のもと同様であった。また、マーカースクリーニングの際に検討を行った AGR2、KRT7、SFN についても測定を行った結果、どの mRNA も発現量が低かった。これらのことから、おそらく転移陰性である可能性が強く推察される。逆に OSNA 法で陽性、

病理診断で陰性となった検体は pN0 の症例ではあるが、KRT19 mRNA の OSNA 法が陽性となっている検体が認められた。この検体については病理診断でリンパ節転移は認められていないがステージがIVの症例で、術後にリンパ節の腫脹が認められていたことから、転移があった可能性が高いと考えられる。

過去の報告で、KRT19 および KRT7 の mRNA を組み合わせて測定することで、リンパ節転移の検出感度が向上するという報告があるが、本研究では両結果を組み合わせても KRT19 mRNA の性能を上回ることはなかった。これは検体の処理方法の違いや、カットオフ値の設定の差によるものであると考えられる。

以上の結果から肺癌のリンパ節転移診断においても、適切にカットオフ値の設定をすることで、KRT19 mRNA 単独で良好な結果を得られることを明らかにした。

3. 3. 4 OSNA 法により検出できるリンパ節転移サイズの見積もり

KRT19 mRNA をマーカーとして OSNA 法を肺癌のリンパ節転移に適応した場合に検出できる最小のリンパ節転移サイズを検討した。11 例の肺癌のリンパ節転移が認められたリンパ節から凍結切片を作成し、病理標本から転移巣のサイズを測定し、隣り合った凍結切片中の KRT19 mRNA 量を測定することで、一定量の大きさの転移を含むリンパ節での KRT19 mRNA 濃度を求めることが可能となる。

その結果を図15に示した。

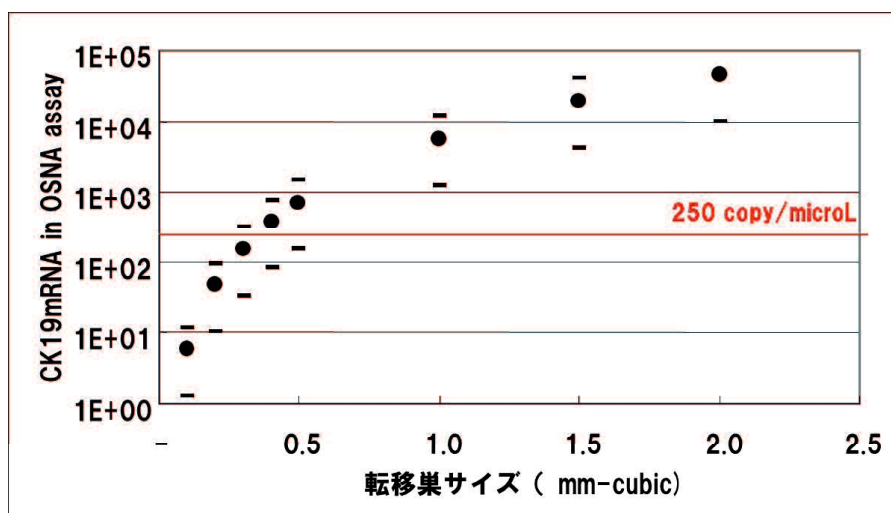


図 17 OSNA 法による検出感度の見積もり

転移巣の大きさごとに平均値と転移巣の大きさについて検討を行ったところ、OSNA 法でカットオフ値を 250copy/ μ L に設定した場合には、0.4mm 角の転移相当の場合で平均値がカットオフ値を上回っていた。上記の結果から 0.4mm 角程度以上の肺癌の転移巣であれば OSNA

法により検出が可能であると推察された。

実際に、本検討の臨床評価において、病理切片で0.2mm角の転移であった検体(図15中L112)をOSNA法で検出することができていたことから、0.4mm角程度の転移を検出できるという結果は妥当であると考えられる。

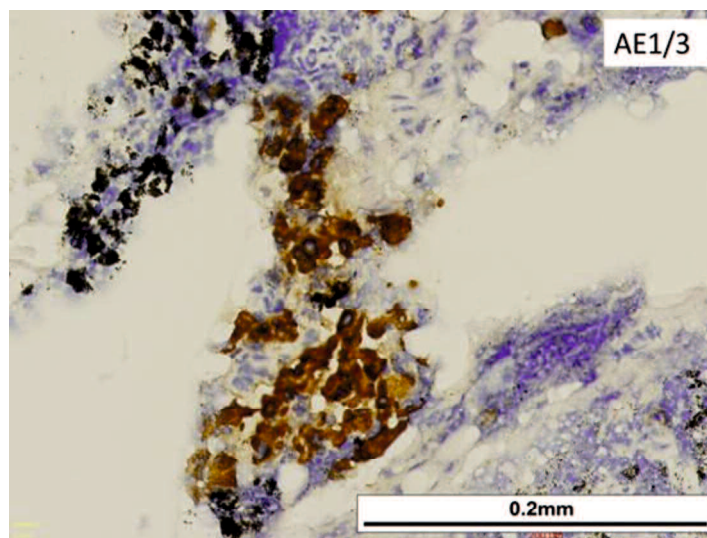


図18 ミクロ転移検体(L112)の転移巣

以上のようにリンパ節の可溶化液中に存在するKRT19 mRNAをOSNA法により検出することで、単一のマーカーで肺癌のリンパ節転移の検出が可能であることを明らかにした。

3. 4 まとめ

3章では、OSNA 法の適応拡大として、肺癌のリンパ節転移検出についての検討を行った。2章での検討と同様に、最初にリンパ節転移を検出するマーカーの検索を行った。候補のマーカーとして、マイクロアレイのデータベースからリンパ節で発現が低く、肺癌の腺癌、扁平上皮癌で発現の高い mRNA を検索し 16 種類の mRNA を選択した。次に臨床検体を用いて評価を実施したところ、KRT19、AGR2、SFN、KRT7 で転移陰性リンパ節と陽性リンパ節の間でその発現量に差が認められたが、また SFN については転移陽性検体での発現量が低く、小さな転移を検出できない可能性があること、AGR2については、扁平上皮癌での発現頻度が低いことから[32,33]、候補マーカーから除外した。KRT7 については過去の報告で、KRT19 とのコンビネーションで測定することで感度が向上するという報告がある[30]ことから、KRT19 とあわせて検討を行うこととした。

KRT19 および KRT7 についてカットオフ値の検討を行った結果、KRT19 では転移陰性検体と陽性検体の間で発現量の差が認められたことから、転移陰性検体での KRT19 発現量の平均値 + 2SD をカットオフ値として設定した。一方、KRT7 の場合は、転移陰性検体と陽性検体の間の発現量がオーバーラップしたため、ROC カーブからカットオフ値を設定した。両マーカーのカットオフ値は 250copy/ μ L となったが、病理診断との一致率は KRT19 で 98.8%、KRT7 で 96.4%という結果であった。KRT19 と KRT7 のコンビネーションによる感度の向上について検討を行ったが、KRT7 の病理診断との一致率が KRT19 よりも低く、KRT19 単独での転移の検出結果のほうが良好であり、過去の報告のようなコンビネーションによる性能の向上は認められなかった。

KRT19 mRNA による病理診断との比較において、判定が不一致となった検体が 2 例認められた。このうち、OSNA 法で陽性、病理診断で陰性の検体(L70)は、胸膜への転移が認められたステージIVの症例であり、リンパ節は試験開胸の際に取得された 1 つのみの評価であった。臨床病理学的な背景からリンパ節への転移があることが推定される症例であること、また試験開胸後に周辺のリンパ節の腫脹が認められている症例であるため、OSNA 法での検討に用いた部分に転移があったことが考えられる。また、OSNA 法陰性、病理診断で転移陽性となった検体(L84)については、リンパ節の転移巣近辺での壊死が認められる検体であったため、mRNA の分解が起こっている可能性が高いと考えられた。壊死による mRNA の分解によって転移を検出できなかったことは説明できるものの、肺癌特有の治療などにより転移巣での壊死などを起こす可能性もあるため、今後治療法との関係についても検討を行っておく必要がある。

OSNA 法において、検出できるリンパ節の大きさについて、転移陽性リンパ節の凍結連続切片を作成し、単位体積あたりの KRT19 mRNA の発現量から推算した。その結果、0.4mm 角程

度の転移巣から OSNA 法での検出が可能であることを示唆する結果を得ることができており、現状の病理診断よりも高感度に転移を検出できる可能性があると考えられた。

実際に、臨床検体の評価で用いた検体のうち、病理診断で転移巣の大きさが 0.2mm であった検体(L112)では、OSNA 法のカットオフ値近辺で陽性と判定された。実際には病理診断で診断を行う部位と OSNA 法に用いる部分は同じではないが、この結果は凍結連続切片から推算した OSNA 法の検出限界が 0.4mm 角のリンパ節であるという結果を支持するものであると考えられる。

以上の結果から、肺癌のリンパ節転移検出においても、KRT19 mRNA をマーカーとして用いて、現状の病理診断と同等以上の性能で転移の検出ができると考えられた。

4. OSNA 法の細胞診検体への適応

4.1 研究の背景

2章および3章で、リンパ節の可溶化液中に含まれる KRT19 mRNA 濃度から、乳癌および肺癌のリンパ節転移を検出できることを明らかにした。リンパ節転移は摘出した組織から病理標本を作製する組織診断といわれる検査法であるが、一方で、病変部の組織から遊離してきた細胞もしくは組織を擦過して得られた細胞を用いて、その形態を観察する細胞診による転移の診断も行われている。

細胞診による転移の診断のひとつとして、胃癌の腹腔内洗浄液中の癌細胞検出がおこなわれている[1,34]。胃癌の転移の好発部位として、リンパ節、肝臓、腹膜がよく知られており、中でも腹膜への転移はその 50%程度を占める転移の高発部位である。

現在は、胃癌の手術の際に腹腔内を生理食塩水で洗浄し、洗浄後の溶液を回収してその中に含まれている癌細胞を顕微鏡下で観察し癌細胞の有無を判定している。癌細胞が認められる場合は、その後腹膜への転移を起こすことが多く、予後の診断に有用であるとされており[35-37]、洗浄細胞診が陽性の場合、stage IV と診断される[1,11]。しかしながら、洗浄液中に癌細胞が含まれていない場合でも、後に腹膜への転移を起こす症例が多く認められている[38,39]。このことは、細胞診検査での癌細胞の見逃しによるものであると考えられており、洗浄細胞診での腹膜再発の感度については 11~80%と幅広く報告されている[39]。このような背景から、高感度かつ客観的に洗浄液中の癌細胞を検出できる方法の開発が望まれている。

腹腔内洗浄液中の癌細胞検出に関して、感度を向上の方法として、免疫細胞化学染色[37,40,41]、分子生物学的手法[42-47]によるものが報告されており、免疫細胞化学染色では通常の Papanicolaou 染色に比べて感度が 5~15%向上していた[34,37,40]。Kotera ら[48,49]は、腹腔洗浄液中の癌細胞から RNA を抽出し、CEA mRNA の検出を行った結果、細胞診が陰性で CEA mRNA が検出は予後が悪いという結果を報告した[47]。の発現が高い場合は、細胞診の結果が陰性であっても腹膜再発を起こすケースが多いことが明らかとなっている。さらに、多くの研究者が CEA または KRT20、など、別の mRNA をマーカーとして用いて、定量 RT-PCR 法などの分子生物学的手法の有用性を報告している[43,45-47,49-52]。しかしながらこれらの手法は検体、試薬の調製が煩雑で時間がかかる、遺伝子の増幅反応に時間を要するなどの欠点があり、実際の検査室で実用化に至ることが難しいと考えられる。

そこで、胃癌の腹腔内洗浄液に含まれる CEA mRNA について、簡便かつ迅速な OSNA 法のシステム(以下: OSNA system)を活用して、腹腔内洗浄液中の CEA mRNA を検出することができれば、臨床現場に高感度で迅速な癌細胞の検出方法を提供することができる。

本研究では OSNA system で高感度に CEA mRNA を検出するために、RNA 抽出サンプルによる測定および、CEA の検出系の構築を行い、臨床検体を測定することができた。

本章では、OSNA 法により胃癌の腹腔内洗浄液中の CEA mRNA を検出することの有用性につ

いて検証を行うことを目的とした。

4. 2 実験方法

4. 2. 1 対象

本研究で用いたヒト由来の腹腔内洗浄液は、共同研究先である大阪警察病院およびシスメックス株式会社社内倫理委員会の承認のもと、患者へのインフォームドコンセントを行い、承諾が得られた症例のものを使用した。

治療を目的とした通常の手術を行い、診断を目的とした細胞診断を行った腹腔内洗浄液の残余部分を用いて検討を行った。洗浄液は研究に使用するまで -80°C の条件で保存した。

4. 2. 2 腹腔内洗浄液

腹腔内洗浄液は、100mL の生理食塩水で患者の腹腔内を洗浄した後、洗浄液を回収して $1,500 \times G$ で5分間遠心分離した後の沈査部分を用いた。通常細胞診断を行った後、沈査の残余部分をRNA抽出まで、 -80°C で保存した。

4. 2. 3 細胞診

細胞診用のスライドは約 $30 \mu\text{L}$ の細胞沈査から作成した。細胞沈査をスライド上に置いた後、2枚のスライドをすり合わせて2枚のスライドを作成した。このうち1枚は、Papanicolaou染色を行い、別の1枚はCEAまたはEpithelial related antigenによる免疫染色を実施した。

4. 2. 4 定量RT-PCR法

腹腔内洗浄液から調製した細胞の沈査からRNeasy Mini Kit (Qiagen社製)を用いて、キットの取り扱い説明書に従い、RNAを抽出した。このRNAをサンプルとして手定量RT-PCR法を行った。定量RT-PCR法はTaqMan One-step RT-PCR Master mix reagent kit (Qiagen社製)を用い、ABI Prism 7700 sequence detector system (ABI社製)上で実施した。プライマーの設計はPrimer Express Version 2.0(ABI社製)により行った、CEAを検出するためのプライマーは、Forward primer; $5' -\text{AGACAATCACAGTCTCTGCGGA}-3'$; reverse CEA primer, $5' -\text{ATCCTTGTCTCCACGGT}-3'$; CEA probe, $5' -\text{FAM-GCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAAC}-\text{TAMRA}-3'$ を用いた。定量RT-PCRの条件は、 48°C 、30分で逆転写反応を行い、その後、 95°C で10分間インキュベーションを行った、その後、 95°C 15秒、 60°C 1分のサイクルを40回繰り返した。

4. 2. 5 RT-LAMP法

LAMP法の反応液は、Notomiらの報告に従い、 $1.1 \mu\text{M}$ forward inner primer(CEAFA)、reverse primer (CEARA)、 $0.1 \mu\text{M}$ forward outer (CEAF3)、reverse primer (CEAR3)、 $0.8 \mu\text{M}$ 、forward loop (CEALPF) and reverse primer (CEALPR)、 0.8mM deoxynucleotide triphosphates、

50mM Tris-HCl, 10mM, KCl, 10 μ M (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 5mM DTT, 1.4 units avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega 社製), 45 units Bst DNA Polymerase (New England Biolabs 社製), and 25 units RNasin Plus (Promega 社製)とした。この溶液 23 μ L と検体 2 μ L を混合し、65°C で 16 分反応させた。

LAMP 法による遺伝子増幅反応は、RD-100i(シスメックス社製)上で行い、反応液の 660nm に おける吸光度変化を 6 秒ごとにモニタリングし、反応の進行に伴い生成するピロリン酸マグネシウムによる吸光度の変化を濁度に変換し、濁度が 0.1 を越えた時点を遺伝子増幅反応の検出時間とした。LAMP 法による遺伝子増幅反応には 6 種類のプライマーが必要となる。CEA を検出するための primer は 5' - GGCACGTATAGGATCCACTCCAGCAATCCACCCAAGA -3' (CEAFA), 5' -

CAGACACTGGCCTCAATAGGAGGTTTGGGTGGCTCTGCAT -3' (CEARA), 5' - TGCACAGTACTCTTGGTTTG -3' (CEAF3), 5' - ACGGGGTTGGAGTTGTTGG -3' (CEAR3), 5' - TCACAGTGATGTTGGGGAT -3' (CEALPF), 5' - ACAGTCACGACGATCACA -3' (CEALPR) の合計 6 種類の primer を用いた。

以下、本検討で OSNA 法用の遺伝子増幅装置(RD-100i)を用いて CEA mRNA の増幅を行ったものを OSNA system と記載する。

4. 2. 6 転移陰性と転移陽性を判別するカットオフ値の設定方法

胃癌患者から抽出された洗浄液(転移陽性検体 15 個、転移陰性検体 135 個)について、抽出した RNA 中の CEA mRNA 濃度を測定した。ROC カーブにより、最適なカットオフ値を求め、細胞診との一致率を検証した。

4. 3 結果と考察

4. 3. 1 OSNA system による CEA mRNA の測定

2.5×10^2 , 2.5×10^3 , 2.5×10^4 , 2.5×10^5 , 2.5×10^6 及び 2.5×10^7 copies/ μ L の標準物質 (CEA mRNA) を含む希釈溶液を OSNA 法により測定を行った。いずれの CEA mRNA 濃度においても増幅反応が認められ、濁度 0.05~0.25 の範囲で直線的かつ互いにほぼ平行な反応曲線が得られた(図 19a)。濁度が 0.1 に達する時間を立ち上がり時間として、KRT19 mRNA 濃度との間の関係を調べた。その結果、立ち上がり時間と KRT19 mRNA 濃度とは直線関係を示し CEA mRNA の定量が可能であることがわかった。(図 19b)。

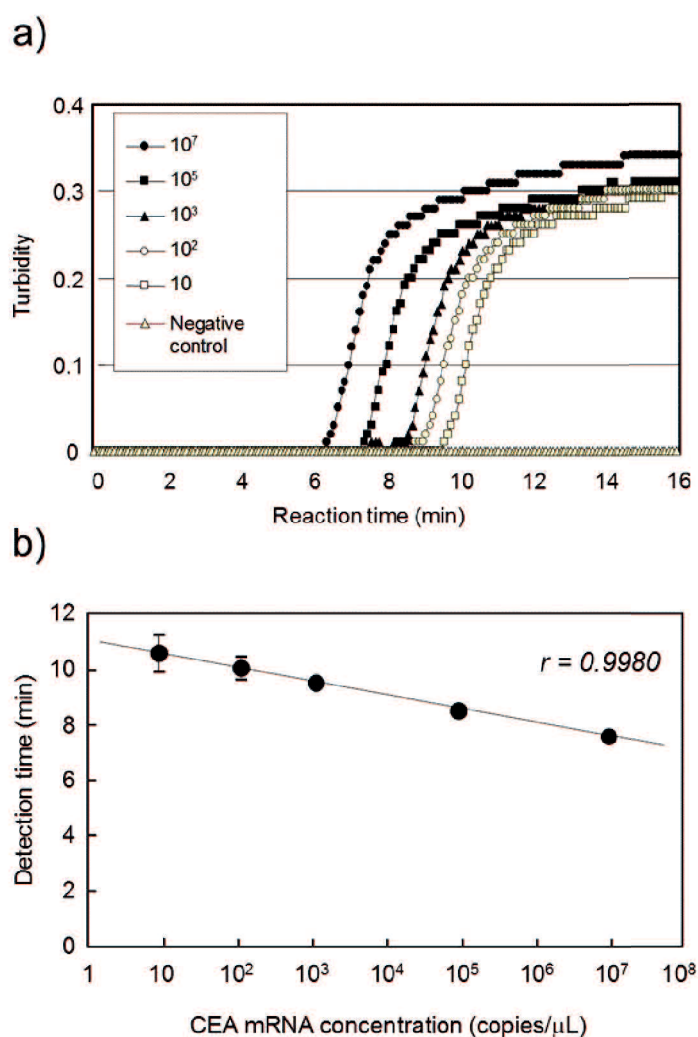


図 19 OSNA system による CEA mRNA の測定結果

a) CEA mRNA の増幅曲線、b) CEA mRNA 濃度と検出時間の関係

4. 3. 2 定量 RT-PCR 法との相関性

CEA mRNA の発現が確認された細胞診検体 26 検体について、定量 RT-PCR 法と OSNA

system での CEA mRNA 測定値の相関を確認した。(図 20)

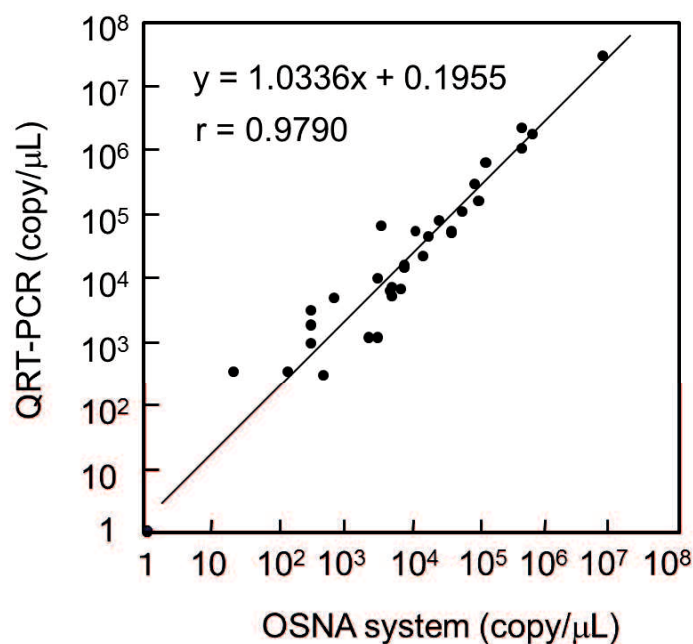


図 20 OSNA 法と定量 RT-PCR 法の相関

その結果、定量 RT-PCR 法での CEA mRNA 定量値と OSNA system との相関は、相関係数 0.979、回帰式 $1.034x + 0.196$ の良好な相関が認められた。

4. 3. 3 胃癌における T-stage との関連

胃癌の細胞診における陽性率は、T 因子(胃壁への進達度)とよく相関することが知られている。過去の報告においても、T 因子と CEA mRNA の濃度(陽性率)の間には相関があることが報告されている[43,48]。そこで、細胞診検体 128 例について、T 因子と OSNA system で測定した CEA mRNA 濃度の関係について確認した。結果を図 21 に示す。

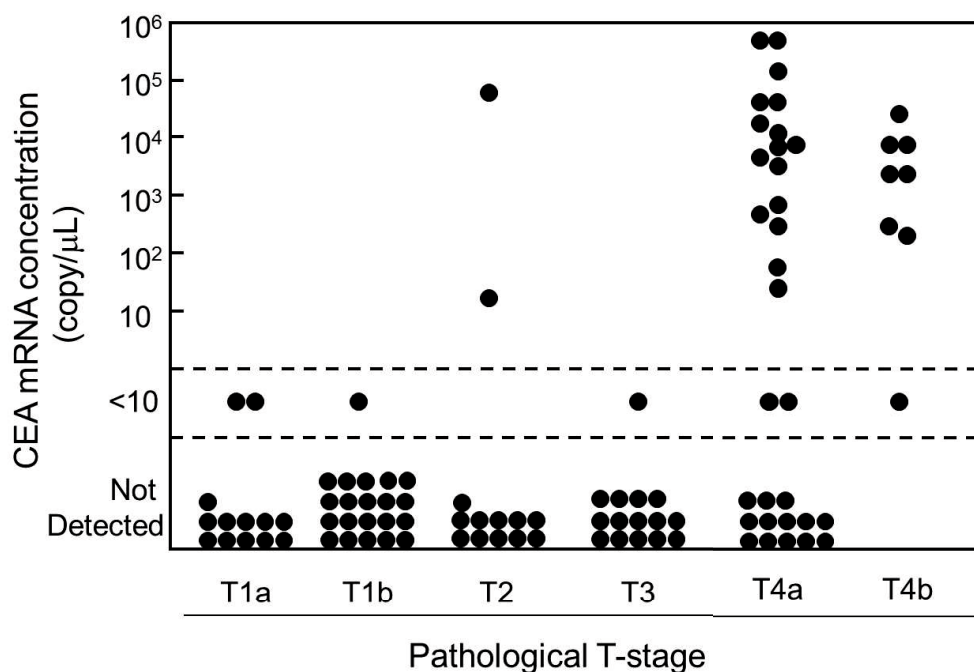


図 21 CEA mRNA 濃度と T-stage との関係

OSNA system で測定した CEA mRNA 濃度と T 因子の間にも相関が認められ、優位に T4a、b 症例では CEA mRNA 濃度が高くなることがわかった。

4. 3. 4 転移陰性と転移陽性を判別するカットオフ値の設定

胃癌患者から抽出された洗浄液 128 検体を用いて、抽出した RNA 中の CEA mRNA 濃度と細胞診の結果を比較し、ROC カーブにより、最適なカットオフ値を決定した。(図 22)

ROC カーブの結果から、細胞診陽性、陰性を区別するためのカットオフ値は $10\text{copy}/\mu\text{L}$ が最適であると考えられた。しかしながらこのカットオフ値では、転移が存在しないと考えられる、きわめて初期の症例も陽性と判定してしまうことから、腹腔洗浄液に含まれる正常細胞でも微量 CEA mRNA が発現している可能性が高いと考え、カットオフ値を $25\text{copy}/\mu\text{L}$ に設定することとした。

このカットオフ値を元に、腹腔内洗浄液 128 検体中の CEA mRNA 濃度をもとに転移陽性、陰性の判定を行った。結果を表 10 に示した。

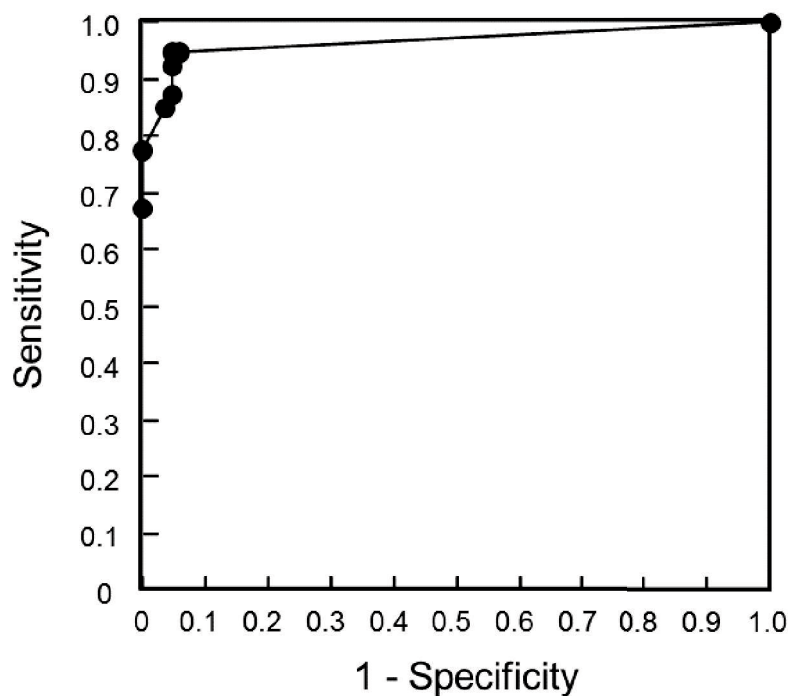


図 22 OSNA system と細胞診の結果の ROC カーブ

表 10 OSNA system による転移判定と細胞診の結果

腹腔内洗浄液 128 検体		細胞診*	
		+	-
OSNA	+	34	2
	-	6	86

* Pap 染色および免疫染色 (CEA or MOC-31) を実施

細胞診陽性、陰性に相当する CEA mRNA のカットオフ値を、25copy/ μ L に設定して細胞診との結果を比較した結果、感度 85.0%、特異度：97.7%、一致率：93.8%という結果になった。OSNA system による転移の検出では、細胞診陽性の検体 40 検体のうち 6 検体を陰性と判定した。これは胃癌の細胞における CEA の発現頻度が 100%ではないことによるものであると考えられる [53]。カットオフ値を低く設定することで感度を上げることはできるが、臨床的に転移がないと考えられる T2 症例なども陽性と偽陽性の判定をしてしまうため、より精度の高い検出系を構築するためには、カットオフ値を下げるのではなく、その他の候補遺伝子を検索して感度を上げるべきであると考えられる。過去の報告では、細胞診陰性でも、CEA mRNA により転移陽性と判定され

ることが多いが、本検討ではそのような結果は得られなかった。しかし T4a、T4b の症例での陽性判定例は、それぞれ 51.8%と 87.5%であり(図 21)、細胞診で報告されている T4a、T4b での陽性率(それぞれ 31~58%、36~64%)よりも高かった。このことから、細胞診陰性、OSNA system 陽性の検体が他の検討に比較して少なかったのは、感度の高い免疫染色を含む細胞診と比較したためと考えられる。このことから OSNA system での転移細胞の検出率は、免疫染色を併用した細胞診の感度と同等であると考えられた。

4. 3. 5 予後との関連

細胞診の陽性率は胃壁への進達度と関連することが知られている。したがって、CEA mRNA で陽性および陰性判定となった場合の予後について Kaplan-Meier 法による解析を行った。その結果を図 21 に示した。

カットオフ値を 25copy/ μ L とした場合の細胞診との判定一致率は 97.5%と良好であり、OSNA 法が細胞診での適応が可能であると考えられた。

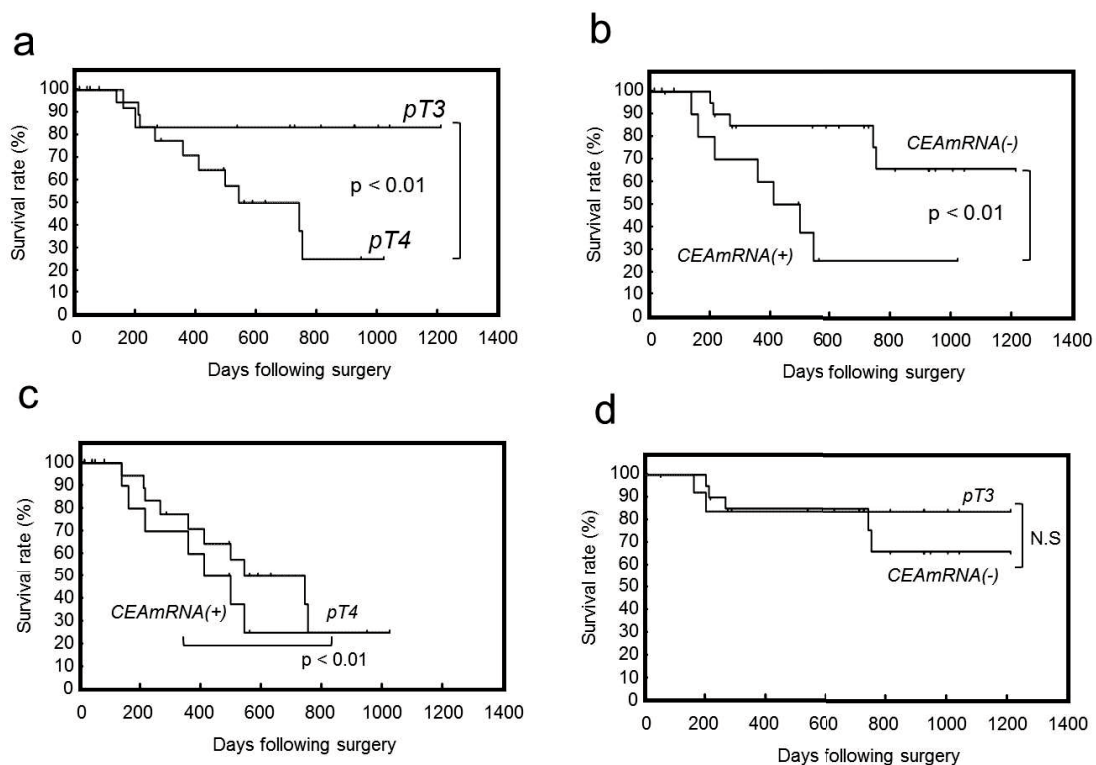


図 23 腹腔内洗浄液中の CEA mRNA 発現、胃壁進達度との予後の関係

胃癌の症例の中で、予後不良と考えられる 35 例の T3、T4 症例について、CEA mRNA 陽性および陰性の場合についてその予後を解析した。予想されたように、T3 症例と T4 症例の間では、

T4 症例のほうが有意に予後不良であった(図 23a)。CEA mRNA 陽性および陰性例の間では、CEA mRNA 陽性例のほうが有意に予後不良であった(図 23b)。CEA mRNA 陽性の場合のハザード比は、CEA mRNA 陰性の場合に比べて、4.56(1.63~12.74:95%CI)であり、胃癌症例における予後の予測に有用であることがわかった。さらに興味深いことに、CEA mRNA 陽性、T4 症例間での予後について比較したところ、CEA mRNA のほうが有意に予後不良であり(図 23c)、一方で CEA mRNA 陰性と T3 症例との間には有意差がないという結果が得られた(図 23d)。

4. 4 まとめ

胃癌患者における腹腔内洗浄液中の細胞診の結果は重要な予後因子である。しかしながら、細胞診が陰性の場合でもたびたび後に腹腔内転移を起こすことから、検出感度の向上が求められている[38]。研究者たちは単に細胞の形態額的な情報からだけでなく、上皮細胞で発現している分子を免疫細胞化学染色や分子生物学的手法により検出することで癌細胞の検出感度の向上を試みている。事実、通常の細胞診と免疫細胞化学染色を組み合わせることで、腹腔内洗浄液中の癌細胞の検出率が上昇することが報告されている[39-41]。また分子生物学的手法により、定量的に腹腔内洗浄液中の CEA mRNA 濃度を検出し、それが予後とよく相関することについても報告されている[46,50,51,53,54]。しかし、従来の分子生物学的手法では、検体の前処理、PCR などの遺伝子増幅反応に時間がかかるなどの課題があり、病院の検査室などで実用化されているものはない。

本論文の 1 章、2 章部分で報告したように、OSNA 法では迅速、簡便に対象とする遺伝子を検出することで、転移の検出が可能であることを報告した[55,56]。この方法は迅速かつ簡単であることから腹腔内洗浄液中の mRNA の検出に適応できるのではないかと考え、胃癌の細胞診への適応について研究を進めることとした。

OSNA system での CEA mRNA 測定系を構築し、測定系の評価を行ったところ、CEA mRNA 濃度が 10copy/ μ L のものを約 10.5 分で検出することができた。Ohashi らによると、mRNA 自体を増幅する迅速な遺伝子増幅法である Transcription reverse-transcription concerted (TRC) 法により 100 copy/ μ L の CEA mRNA を含む溶液を約 10 分で増幅できるという報告があるが[42]、まだ実用化されていない。

腹腔内洗浄液中の CEA mRNA と予後の結果については、すべて定量 RT-PCR 法により取得されたものである。遺伝子の定量を行うという点では OSNA system、定量 RT-PCR 間での差はないと考えられるが、臨床検体を用いて OSNA system と定量 RT-PCR 法の CEA mRNA の定量値について相関を確認した。その結果、両核酸増幅法での CEA mRNA 測定値の相関は $r=0.9790$ と良好であったことから、OSNA system での測定結果は定量 RT-PCR と同じ扱いができることを示している。

細胞診陽性に相当する CEA mRNA 濃度について、ROC カーブを用いて検討を行った。細胞診の結果は、Papanicolaou 染色の結果のみではなく、免疫染色を併用した場合の結果を用いた。カットオフ値を 25copy/ μ L とした場合、免疫染色を併用した細胞診と OSNA system との一致率は 93.8%、感度 85.0%、特異度 97.7%であり、良好な結果が得られた。免疫細胞化学染色を併用する細胞診は、癌細胞の検出感度を上げることが知られているが、煩雑で時間もかかるため、こちらでも一般の病院で実施することは難しいと考えられるため、すでに乳癌、大腸癌、胃癌での臨床応用が実施されている OSNA system を用いることができれば一般の病院でのルーチン稼働

が可能ではないかと考えられる。

細胞診の陽性検体 40 例のうち、6 例は OSNA system で陰性判定となった。これらの検体については定量 RT-PCR 法においても CEA mRNA の発現量が低かったことから、本法にのみ起こる問題ではないと考えられる。今回の検討では、ルーチンの細胞診検体の残渣を用いていることもあり、残った細胞の量が少ない場合は RNA の抽出工程においてその効率が下がっている可能性もある。また、胃癌組織(細胞)における CEA mRNA の発現頻度は 100%ではないことから [53]、細胞診との一致率、より感度の高い検査システムを構築するためには、CEA を発現していない細胞で発現しているほかのマーカーとの組み合わせによる感度向上を進めていく必要があると考えられる。実際に、KRT20、DOPA carboxylase[57]、regenerating gene type IV[58,59]、matrix metaroprotease7[60] などのマーカーを単独、CEA と組み合わせた場合の有用性も報告されている[45,49,51,52,61]。上記のことから、CEA mRNA のカットオフ値を下げて感度を上げた場合には、細胞診陰性の検体を誤って陽性と判定してしまうことも考えられるため、本研究でのカットオフ値は ROC カーブによる解析結果で最適と判断される 10copy/ μ L よりも高い 25copy/ μ L に設定した。

今後、継続して大規模な臨床研究、CEA mRNA を発現していない癌細胞を検出のための mRNA マーカーを検索し、システムに組み入れて癌細胞の検出感度を上げていくことで、より精度が高く、客観的な細胞診に適応したシステムを構築できると考えられる[62]。

5. 結語

本研究では、分子生物学的手法を用いた新しい転移の検出方法について、癌細胞を検出するための mRNA マーカーを検索および適切なカットオフ値を設定することで、複数面の病理診断と同等の性能を持つ転移の検出系を構築できることを明らかにした。

これまでに報告されている RT-PCR、定量 RT-PCR 法によるリンパ節転移の検出系では、リンパ節ではマーカーとしている mRNA の発現はないという前提で測定系が構築されてきていたが、本研究ではリンパ節への転移がない可能性が高い pN0 症例でも mRNA マーカーがわずかながら発現していることを明らかにし、その発現を考慮した上でカットオフ値を設定することが重要であることを示した。

また、臨床で使用するための条件として、術中迅速診断に対応できるように、リンパ節の可溶化処理～測定用試料の調製までを RNA の精製なしで測定できることを示し、遺伝子増幅反応については、RT-LAMP 法を用いて 16 分間の測定で対象 mRNA を検出できる系を構築した。

本研究では、まず乳癌を対象としてリンパ節転移の検出系を構築し、次に肺癌においても同様に有用であることを示すことができた。これは、本研究のコンセプトが癌のリンパ節転移を検出するための方法として、癌の種類に関係なく普遍的に適応できるものであることを示している。事実、本法を用いて、胃癌[63]、大腸癌[64]、子宮頸癌[28]、子宮体癌[65]のリンパ節転移検出においても有用であることが報告されている。

また、リンパ節という組織への転移の診断だけではなく、同じ考え方で細胞診検体中の癌細胞の検出にも適応できることを明らかにした。細胞診の検体は組織診断で用いる検体に比べて、検体の量が少なくなることから、細胞を可溶化した検体をそのまま用いるのではなく、RNA の精製を行い癌細胞の mRNA を濃縮することで微量の癌細胞を検出することが可能であることを示した[62]。考察部分に記載したように、CEA mRNA を単一のマーカーとして用いた場合は、CEA mRNA を発現していない癌細胞を検出できないため、他のマーカーと組み合わせて癌細胞を検出する必要があると考えられるが、高感度かつ、客観的に細胞診中の癌細胞を検出できる可能性を持つ方法であると考えられる。

またさらに、本法のシステムを活用することで、遺伝子の体細胞変異検出などへの用途が拡大できる可能性もある。

本研究で開発した方法については、One-Step Nucleic acid Amplification (OSNA)法をとして、現在厚生労働省の製造許認可を取得し、世界の約 300 施設においてリンパ節の転移検出に用いられており、今後も継続して用途の拡大を行うことで、客観性が高く、臨床現場で活用できる検査方法として、医療の標準化に寄与できると考えている。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導をいただきました山口大学大学院 医学系研究科 応用分子生命科学系専攻 ゲノム生命機能工学分野 教授 赤田倫治先生に深く感謝いたします。また本論文の作成にあたり、貴重なご意見をいただきました山口大学大学院 医学系研究科 応用分子生命科学系専攻 ゲノム生命機能工学分野 准教授 星田尚司先生にも深く感謝をいたします。

臨床での評価にあたりまして、医療での考えなどをご指導いただきました、大阪警察病院 病理診断科 部長 辻本正彦先生にも深くお礼申し上げます。

シスメックス株式会社で、本研究を進めるにあたり、ご指導いただきました岩崎為雄博士、大友泰裕博士にも深くお礼を申し上げます。

7. 参考文献

- [1] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2009.
- [2] Tanis PJ, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Th Rutgers EJ, Kroon BB. History of sentinel node and validation of the technique. *Breast Cancer Res* 2001;3:109–12.
- [3] Lee I-K, Lee H-D, Jeong J, Park B-W, Jung WH, Hong SW, et al. Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by immunohistochemical staining in patients with breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:405–9.
- [4] Nāhrig JM, Richter T, Kuhn W, Avril N, Flatau B, Kowolik J, et al. Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by ultrarapid immunohistochemistry. *Breast J* n.d.;9:277–81.
- [5] Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, Baron PL, Elliott BM, Brothers TE, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer* 2001;93:162–71.
- [6] Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol* 1996;148:649–56.
- [7] Sakaguchi M, Virmani A, Dudak MW, Peters GN, Leitch AM, Saboorian H, et al. Clinical relevance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of axillary lymph node metastases in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2003;10:117–25.
- [8] Weigelt B, Bosma AJ, Hart AAM, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003;88:1091–4.
- [9] Backus J, Laughlin T, Wang Y, Belly R, White R, Baden J, et al. Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. *J Mol Diagn* 2005;7:327–36.

- [10] Wallwiener CW, Wallwiener M, Kurth RR, Röhm C, Neubauer H, Banys MJ, et al. Molecular detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR): identifying, evaluating and establishing multi-marker panels. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:833-44.
- [11] Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB, Bodurka DC, Burstein HJ, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7703-20.
- [12] Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U. Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast, April 19-22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer* 2002;94:2542-51.
- [13] Wada N, Imoto S, Hasebe T, Ochiai A, Ebihara S, Moriyama N. Evaluation of intraoperative frozen section diagnosis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004;34:113-7.
- [14] Manzotti M, Dell'Orto P, Maisonneuve P, Zurrada S, Mazzarol G, Viale G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Int J Cancer* 2001;95:307-12.
- [15] Inokuchi M, Ninomiya I, Tsugawa K, Terada I, Miwa K. Quantitative evaluation of metastases in axillary lymph nodes of breast cancer. *Br J Cancer* 2003;89:1750-6.
- [16] Yuan C-C, Wang P-H, Ng H-T, Li Y-F, Huang T-S, Chen C-Y, et al. Detecting cytokeratin 19 mRNA in the peripheral blood cells of cervical cancer patients and its clinical-pathological correlation. *Gynecol Oncol* 2002;85:148-53.
- [17] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28:e63.
- [18] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223-9.
- [19] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:150-4.

- [20] Strausberg RL, Greenhut SF, Grouse LH, Schaefer CF, Buetow KH. In silico analysis of cancer through the Cancer Genome Anatomy Project. *Trends Cell Biol* 2001;11:S66–71.
- [21] Farshid G, Pradhan M, Kollias J, Gill PG. Computer simulations of lymph node metastasis for optimizing the pathologic examination of sentinel lymph nodes in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2000;89:2527–37.
- [22] Ooka M, Sakita I, Fujiwara Y, Tamaki Y, Yamamoto H, Aihara T, et al. Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients. *Oncol Rep* 2000;7:561–6.
- [23] Kilic A, Schuchert MJ, Pettiford BL, Pennathur A, Landreneau JR, Landreneau JP, et al. Anatomic segmentectomy for stage I non-small cell lung cancer in the elderly. *Ann Thorac Surg* 2009;87:1662–6; discussion 1667–8.
- [24] Kates M, Swanson S, Wisnivesky JP. Survival following lobectomy and limited resection for the treatment of stage I non-small cell lung cancer ≤ 1 cm in size: a review of SEER data. *Chest* 2011;139:491–6.
- [25] Okada M, Koike T, Higashiyama M, Yamato Y, Kodama K, Tsubota N. Radical sublobar resection for small-sized non-small cell lung cancer: a multicenter study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:769–75.
- [26] Inoue M, Minami M, Sawabata N, Utsumi T, Kadota Y, Shigemura N, et al. Clinical outcome of resected solid-type small-sized c-stage IA non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:1445–9.
- [27] Asamura H, Suzuki K, Watanabe S, Matsuno Y, Maeshima A, Tsuchiya R. A clinicopathological study of resected subcentimeter lung cancers: a favorable prognosis for ground glass opacity lesions. *Ann Thorac Surg* 2003;76:1016–22.
- [28] Hashizume T, Yamada K, Okamoto N, Saito H, Oshita F, Kato Y, et al. Prognostic significance of thin-section CT scan findings in small-sized lung adenocarcinoma. *Chest* 2008;133:441–7.
- [29] Melfi FMA, Lucchi M, Davini F, Viti A, Fontanini G, Boldrini L, et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping in stage I non-small cell lung cancer: detection of micrometastases by polymerase chain reaction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:181–6.

- [30] Saintigny P, Coulon S, Kambouchner M, Ricci S, Martinot E, Danel C, et al. Real-time RT-PCR detection of CK19, CK7 and MUC1 mRNA for diagnosis of lymph node micrometastases in non small cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 2005;115:777–82.
- [31] Xi L, Coello MC, Litle VR, Raja S, Gooding WE, Yousem SA, et al. A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:2484–91.
- [32] Camilo R, Capelozzi VL, Siqueira SAC, Del Carlo Bernardi F. Expression of p63, keratin 5/6, keratin 7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 2006;37:542–6.
- [33] Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol* 2000;13:962–72.
- [34] Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010;17:3077–9.
- [35] Boku T, Nakane Y, Minoura T, Takada H, Yamamura M, Hioki K, et al. Prognostic significance of serosal invasion and free intraperitoneal cancer cells in gastric cancer. *Br J Surg* 1990;77:436–9.
- [36] Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, van de Velde CJ. Prognostic value of positive cytology findings from abdominal washings in patients with gastric cancer. *Br J Surg* 1996;83:672–4.
- [37] Schott A, Vogel I, Krueger U, Kalthoff H, Schreiber HW, Schmiegel W, et al. Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker. *Ann Surg* 1998;227:372–9.
- [38] Abe S, Yoshimura H, Tabara H, Tachibana M, Monden N, Nakamura T, et al. Curative resection of gastric cancer: limitation of peritoneal lavage cytology in predicting the outcome. *J Surg Oncol* 1995;59:226–9.
- [39] Leake P-A, Cardoso R, Seevaratnam R, Lourenco L, Helyer L, Mahar A, et al. A systematic review of the accuracy and utility of peritoneal cytology in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2012;15 Suppl 1:S27–37.

- [40] Vogel P, Rüschoff J, Kümmel S, Zirngibl H, Hofstädter F, Hohenberger W, et al. Immunocytology improves prognostic impact of peritoneal tumour cell detection compared to conventional cytology in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:515–9.
- [41] Nekarda H, Gess C, Stark M, Mueller JD, Fink U, Schenck U, et al. Immunocytochemically detected free peritoneal tumour cells (FPTC) are a strong prognostic factor in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1999;79:611–9.
- [42] Ohashi N, Nakanishi H, Kodera Y, Ito S, Mochizuki Y, Koike M, et al. Intraoperative quantitative detection of CEA mRNA in the peritoneal lavage of gastric cancer patients with transcription reverse–transcription concerted (TRC) method. A comparative study with real–time quantitative RT–PCR. *Anticancer Res* 2007;27:2769–77.
- [43] Nakanishi H, Kodera Y, Yamamura Y, Ito S, Kato T, Ezaki T, et al. Rapid quantitative detection of carcinoembryonic antigen–expressing free tumor cells in the peritoneal cavity of gastric–cancer patients with real–time RT–PCR on the lightcycler. *Int J Cancer* 2000;89:411–7.
- [44] Fujiwara Y, Doki Y, Taniguchi H, Sohma I, Takiguchi S, Miyata H, et al. Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status and future perspectives. *Gastric Cancer* 2007;10:197–204.
- [45] Tamura N, Iinuma H, Takada T. Prospective study of the quantitative carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 mRNA detection in peritoneal washes to predict peritoneal recurrence in gastric carcinoma patients. *Oncol Rep* 2007;17:667–72.
- [46] Ito S, Nakanishi H, Kodera Y, Mochizuki Y, Tatematsu M, Yamamura Y. Prospective validation of quantitative CEA mRNA detection in peritoneal washes in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer* 2005;93:986–92.
- [47] Kodera Y, Nakanishi H, Yamamura Y, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, et al. Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase–polymerase chain reaction and cytology. *Int J Cancer* 1998;79:429–33.
- [48] Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Kanemitsu Y, Shimizu Y, et al. Quantitative detection of disseminated cancer cells in the greater omentum of gastric carcinoma patients

- with real-time RT-PCR: a comparison with peritoneal lavage cytology. *Gastric Cancer* 2002;5:69-76.
- [49] Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, et al. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen. *Gastric Cancer* 2005;8:142-8.
- [50] To EMC, Chan W-Y, Chow C, Ng EK-W, Chung S-CS. Gastric cancer cell detection in peritoneal washing: cytology versus RT-PCR for CEA transcripts. *Diagnostic Mol Pathol* 2003;12:88-95.
- [51] Katsuragi K, Yashiro M, Sawada T, Osaka H, Ohira M, Hirakawa K. Prognostic impact of PCR-based identification of isolated tumour cells in the peritoneal lavage fluid of gastric cancer patients who underwent a curative R0 resection. *Br J Cancer* 2007;97:550-6.
- [52] Lee SR, Kim HO, Shin JH. Prognostic Significance of Quantitative Carcinoembryonic Antigen and Cytokeratin 20 mRNA Detection in Peritoneal Washes of Gastric Cancer Patients. *Hepatogastroenterology* 2013;60:1237-44.
- [53] Hockey MS, Stokes HJ, Thompson H, Woodhouse CS, Macdonald F, Fielding JW, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) expression and heterogeneity in primary and autologous metastatic gastric tumours demonstrated by a monoclonal antibody. *Br J Cancer* 1984;49:129-33.
- [54] Ishii T, Fujiwara Y, Ohnaka S, Hayashi T, Taniguchi H, Takiguchi S, et al. Rapid genetic diagnosis with the transcription-reverse transcription concerted reaction system for cancer micrometastasis. *Ann Surg Oncol* 2004;11:778-85.
- [55] Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:4807-16.
- [56] Inoue M, Hiyama K, Nakabayashi K, Morii E, Minami M, Sawabata N, et al. An accurate and rapid detection of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients based on one-step nucleic acid amplification assay. *Lung Cancer* 2012;78:6-12.

- [57] Sakakura C, Takemura M, Hagiwara A, Shimomura K, Miyagawa K, Nakashima S, et al. Overexpression of dopa decarboxylase in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastases with real-time RT-PCR. *Br J Cancer* 2004;90:665-71.
- [58] Miyagawa K, Sakakura C, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, et al. Analysis of Reg IV expression in peritoneal dissemination of gastric cancer using real-time RT-PCR. *Gan to Kagaku Ryoho* 2005;32:1707-8.
- [59] Moon J-H, Fujiwara Y, Nakamura Y, Okada K, Hanada H, Sakakura C, et al. REGIV as a potential biomarker for peritoneal dissemination in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2011;105:189-94.
- [60] Yonemura Y, Fujimura T, Ninomiya I, Kim BS, Bandou E, Sawa T, et al. Prediction of peritoneal micrometastasis by peritoneal lavaged cytology and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for matrix metalloproteinase-7 mRNA. *Clin Cancer Res* 2001;7:1647-53.
- [61] Dalal KM, Woo Y, Galanis C, Gonen M, Tang L, Allen P, et al. Detection of micrometastases in peritoneal washings of pancreatic cancer patients by the reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Gastrointest Surg* 2007;11:206-13.
- [62] Nakabayashi K, Uraoka T, Shibuya M, Matsuura N, Tsujimoto M. Rapid detection of CEA mRNA in peritoneal washes using One-Step Nucleic acid Amplification (OSNA®) for gastric cancer patients. *Clin Chim Acta* 2015;439:137-42.
- [63] Yaguchi Y, Sugawara H, Tsujimoto H, Takata H, Nakabayashi K, Ichikura T, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2011;18:2289-96.
- [64] Yamamoto N, Daito M, Hiyama K, Ding J, Nakabayashi K, Otomo Y, et al. An optimal mRNA marker for OSNA (One-step nucleic acid amplification) based lymph node metastasis detection in colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2013;43:264-70.
- [65] Nagai T, Niikura H, Okamoto S, Nakabayashi K, Matoda M, Utsunomiya H, et al. A New Diagnostic Method for Rapid Detection of Lymph Node Metastases Using a One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Assay in Endometrial Cancer. *Ann Surg Oncol* 2014.

