

●TRC法の術中乳癌リンパ節転移診断への応用

バイオサイエンス事業部 開発部 遺伝子G

尾本 大輔
大仲 悟
三苫 惠民

1. はじめに

最新の統計によると、現在、日本人女性が最も罹患しやすい癌は乳癌であり、毎年5万人以上が新たに乳癌と診断されている。

癌の特徴の一つに転移があるが、一般に転移を起すと予後が著しく不良となることが知られている。乳癌では乳房の周りの所属リンパ節に転移することが多く、その場合リンパ管を通して体中に転移するリスクが高くなる。そこで、従来の乳癌の手術では、癌の原発巣だけでなく、周辺組織や所属リンパ節など広範囲な切除が行われていた。しかしながら、この術式では乳房喪失に加え、浮腫の発生など整容性が大きく損なわれ、術後QOLが低下することが問題であった。

近年、多くの薬剤の登場に加え、手術法の改良により切除範囲は大きく縮小してきた。その中で、リンパ節郭清に関してはセンチネルリンパ節理論 [SLN (Sentinel Lymph Node) 理論] に基づく手術が実施されるようになった。^{1, 2)} 本理論に基づく手術では、癌が最も転移している可能性が高いSLN (図1) の転移診断の結果から、所属リンパ節切除の有無を決定する。つまり、SLNに転移が認められればより下流のリンパ節も郭清し、転移が認められなければ他のリンパ節へ

の転移もないと判断し下流のリンパ節郭清を省略する。このような不必要なリンパ節郭清の回避は、リンパ浮腫の発生を抑制し患者の術後QOL向上に繋がる。

前述のようなSLN理論に基づく術式を成功させるためには、手術中に正確なSLN転移診断を実施することが必須となってくる。しかしながら、現行の一般的転移診断法である病理検査には高精度且つ迅速な検査法が存在せず、迅速ではあるが精度の低い術中迅速病理検査 (迅速病理) と高精度だが長時間を要する永久病理検査 (永久病理) を併用することで対応している。実際には、術中は迅速病理を行い、術後の永久病理を確定診断としているが、迅速病理陰性/永久病理陽性の場合、再手術を検討することになり、精神的・体力的に患者負担が大きくなる (図2)。

そこで、迅速病理の迅速性と永久病理の精度を併せ持つ検査法として、遺伝子検査の適用が検討・一部実用化³⁾ されている。今回、TRC法によるSLN転移診断試薬を開発し、臨床的有用性を検討したので報告する。

2. CK19 mRNA測定試薬の開発

論文等の調査から乳癌リンパ節転移の検出ターゲットとしてCK19 (Cytokeratin 19) を選択した。さらに、学会等でCK19 mRNA陰性・低発現乳癌細胞の存在が

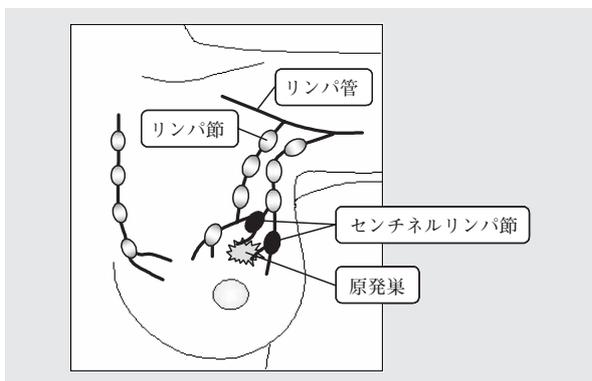


図1 乳癌原発巣とセンチネルリンパ節

乳癌原発巣周辺のリンパ節のうち、原発巣からこぼれ出た癌細胞がリンパ流の流れに沿って移動したときに、癌細胞が最初にたどり着くリンパ節をセンチネルリンパ節と呼ぶ。センチネルリンパ節に転移が認められた場合、周辺のリンパ節の追加郭清を実施する。

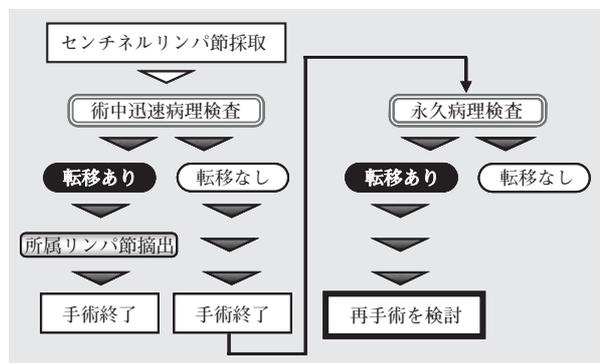


図2 一般的なセンチネルリンパ節理論に基づく術式

術中迅速病理検査の結果、転移ありの場合、所属リンパ節の追加郭清を実施する。転移なしの場合、永久病理検査を実施。永久病理検査で転移ありとなった場合は、再手術を検討する。

報告されている⁴⁾ことから、これを補完する目的でCEA (Carcinoembryonic antigen) mRNAを採用した。CEA mRNA測定試薬に関してはすでに研究用として上市していることから、今回、試薬の基本性能に関しては新たに開発したCK19 mRNA測定試薬に関するのみ報告する。

CK19はサイトケラチンの一種であり、多くのサブタイプが存在する。そこで、他のサイトケラチンの遺伝子配列との比較から、CK19 mRNAを特異的に増幅できるプライマー配列および検出用INAFプローブを設計し、TRC法によるCK19 mRNA測定試薬 (試作品)を開発した。

3. 基本性能評価^{5, 6, 7)}

[1] 定量性及び迅速性

in vitro で合成したCK19 RNA (標準RNA) の希釈溶液を本試薬で測定し、検量線を作成した [図3]。全ての測定は20分以内に終了し、1テストあたり $5 \times 10^{-3} \times 10^5$ コピーの間で、検出時間とRNA濃度の間に高い直線性 ($R^2=0.9973$) が認められ、本試薬によりCK19 RNAを迅速に定量可能であることが示された。

[2] 培養癌細胞における感度

正常リンパ節 (CK19 mRNAは発現していない) に少数の癌細胞が転移しているモデルを想定し、リンパ球抽出物で希釈した癌細胞抽出物の希釈系列におけるCK19 mRNAを測定することで癌細胞の検出を試みた。

ヒト由来肺癌細胞および、健常人全血から調製したリンパ球を用い、それぞれ10,000個および、 5×10^6 個の細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い全RNAを抽出した後、癌細胞抽出物をリンパ節抽出物で希釈することで希釈系列を作製した。本試薬を用いた測定の結果、癌細胞が0.5、5、50、500cells/テスト相当で、それぞれ 214 ± 51 、 $6,212 \pm 685$ 、 $68,574 \pm 10,597$ 、 $599,207 \pm 53,498$ コピーと見積もられ、1テスト当たり少なくとも1個以上の癌細胞があれば定量的に癌細胞を検出可能であることが示された。

[3] 特異性

本試薬の特異性を評価するため、他のサイトケラチンに対する交差反応性を調べた。種々のサイトケラチン類の中で、特にCK19と塩基配列の相同性が高く、また、腫瘍マーカーとしても汎用されるCK18およびCK20の標準RNAを調製し、本試薬との交差反応性を調べた。その結果、CK18およびCK20標準RNAは 1×10^{10} コピー/テストでも検出せず、本試薬の高い特異性が示された。また、臨床評価における増幅産物の塩基配列解析も実施し、増幅産物がCK19 mRNAに由来することを確認した。

4. 臨床評価^{5, 6, 7)}

[1] 評価方法

(1) センチネルリンパ節

帝京大学医学部附属病院においてインフォームドコンセントが得られた初期乳癌患者131名を対象にセン

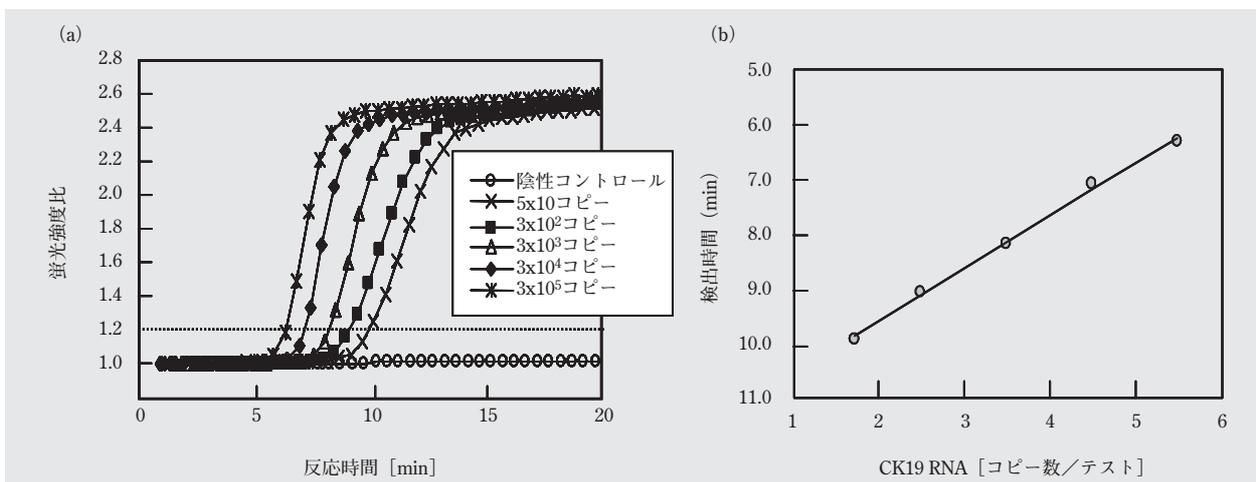


図3 標準RNA測定結果

(a) 増幅反応における蛍光強度比の時間変化

蛍光強度比 = (蛍光強度) / (初期蛍光強度)

(b) 検出時間とRNA濃度から作成した検量線

縦軸: 検出時間 (min) = 図 (a) において、蛍光強度比1.2 (点線で示す) を越えたときの反応時間

横軸: CK19 RNAコピー濃度 = 1テストあたりの標準RNAコピー数の対数表記

チネルリンパ節生検を実施し、センチネルリンパ節264個 [平均2個 (1~5個)] を同定した。センチネルリンパ節の同定はRI/色素併用法 (^{99m}Tc phytate/Lymphazurin) で行った。

(2) 転移診断 (図4)

SLN転移診断は病理検査とTRC測定によって実施した。病理検査では、迅速病理 (HE染色: Hematoxylin and Eosin stain) と永久病理 (HE染色および抗サイトケラチン抗体AE1/AE3を用いた免疫染色) を実施した。TRC測定ではCK19、CEA mRNAの測定および、内部標準としてハウスキーピング遺伝子の1種であるPBGD (Porphobilinogen deaminase) mRNAの測定を実施した。尚、ゴールドスタンダードは永久病理であり、現在の乳癌取り扱いガイドラインに即して、転移

巣の大きさ別に大型転移 (2.0mm以上)、微小転移 (0.2~2.0mm) を転移陽性、遊離癌細胞 (0.2mm以下) を転移陰性と判断した。

[2] 病理検査の結果 [表1(a)]

迅速病理では12.5% (33/264)、永久病理では17.8% (47/264) が転移陽性であった。両検査共に陽性が29例、偽陰性 (永久病理陽性・迅速病理陰性) が18例、偽陽性 (永久病理陰性・迅速病理陽性) が4例認められ、迅速病理は十分な精度が得られていないことが明らかとなった。尚、偽陽性4例に関しては、全断面の検索を実施し転移陰性であることを確認した。

[3] TRC測定の結果および病理検査との比較 [表1(b)]

SLN転移診断では、癌細胞を確実に検出することに加えて、偽陽性の回避、つまり本来は追加郭清が必要ない患者に郭清を実施する不利益を回避することが重要である。そこで、そのような観点からTRC測定および、永久病理の結果から、カットオフ値をCK19陽性は61コピー/テスト以上に、CEA陽性は329コピー/テスト以上とした。尚、内部標準であるPBGD mRNA発現量が1,000コピー/テスト以下と見積もられた検体に関してはRNA抽出不良と判断し、再抽出・再測定を実施した。

次に、今回測定したCK19およびCEA mRNAの発現量と永久病理の結果を比較した (図5)。現在、学会等で転移巣の大きさに関する臨床的意義について検討されており、遺伝子検査においても転移巣の大きさをマーカーの定量値から識別できることが求められている。今回の結果から、CK19およびCEA mRNAの発現量は転移巣の大きさに比例して大きくなる傾向にあり、適切なカットオフ値によって、転移なし/遊離癌細胞群と微小転移/大型転移群を区別できることが示

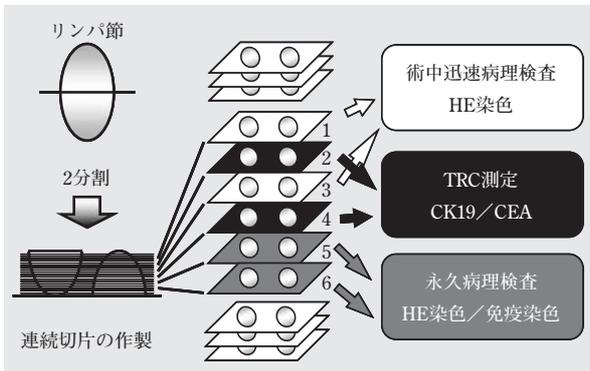


図4 SLN切片の作製と検査方法

SLNを2分割した後、上下逆になる様に並べ、連続切片を作製し、連続する6切片から1,3枚目を術中迅速病理検査に、2,4枚目をTRC測定に、5,6枚目を永久病理検査に供した。TRC測定では切片からRNeasy Mini Kit (QIGEN) を用いてRNA抽出を行い、50 μLの抽出物のうち1テストあたり5 μLを使用した。迅速病理およびTRC測定には凍結切片を、永久病理にはパラフィン包埋切片を使用。迅速病理および永久病理には5 μm切片、TRC測定には15 μm切片を使用。

表1 SLN転移診断の結果

(a) 病理検査の結果

		永久病理		一致率(%)	
		陽性	陰性	陽性	陰性
迅速病理	陽性	29	4	61.7	98.2
	陰性	18	213		

(b) 病理検査とTRC法の比較

		迅速病理*		一致率(%)		永久病理		一致率(%)		
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	
TRC	CK19	陽性	28	4	96.6	98.3	32	0	68.1	100
		陰性	1	227			15	217		
	CEA	陽性	19	16	65.5	93.1	35	0	74.5	100
		陰性	10	215			12	217		
	CK19 / CEA	陽性	29	18	100	92.2	47	0	100	100
		陰性	0	213			0	217		

*永久病理陰性の4検体を除く

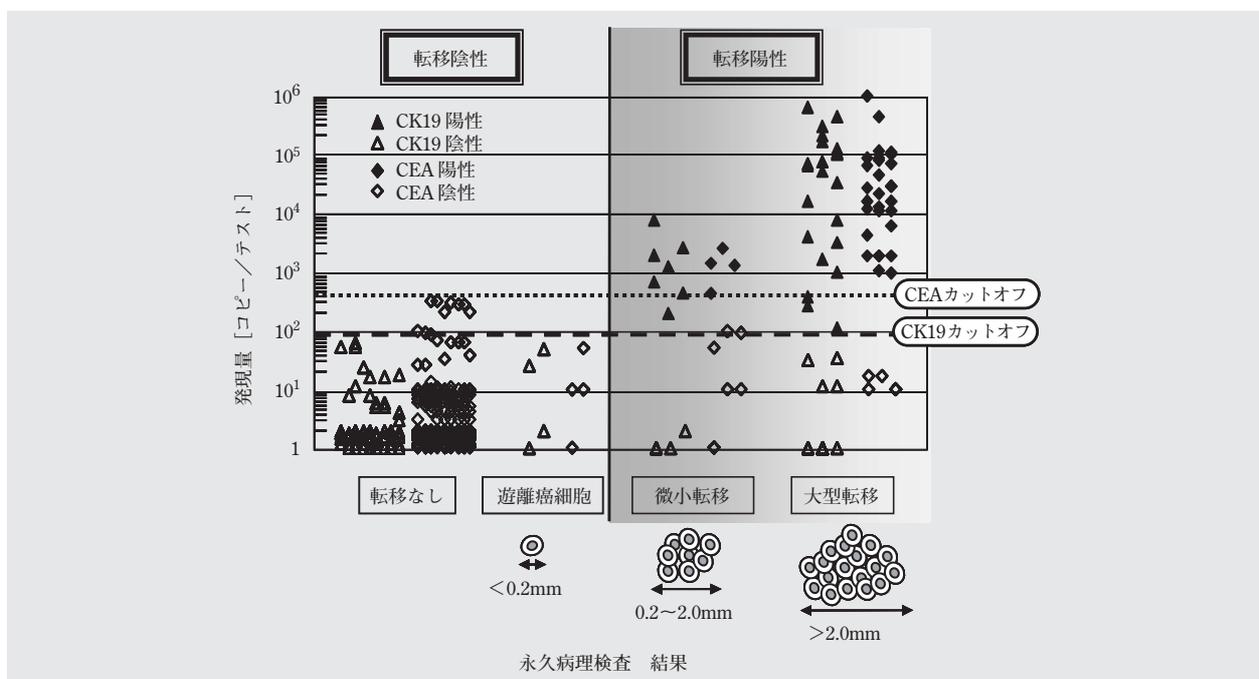


図5 転移巣の大きさとTRC測定の結果

縦軸：1テストあたりのCK19あるいはCEAコピー数（対数表示）
横軸：永久病理検査の結果

された。また、微小転移・大型転移群でもCK19あるいはCEA mRNAの発現量が低い検体が存在することが明らかとなった。

上記のカットオフ値から、CK19陽性は12.1% (32/264)、CEA陽性は13.3% (35/264)、CK19、CEAの両方が陽性は7.6% (20/264)、CK19、CEAの両方またはいずれかが陽性は17.8% (47/264)であった。

TRC測定の結果を迅速病理と比較すると、CK19の陽性一致率が96.6% (28/29、永久病理陰性の4例を除く)と非常に高く、CK19の単独測定で迅速病理と同等の精度が得られていることが示された。次に、永久病理との比較では、CK19あるいはCEA単独測定では偽陰性がそれぞれ15および12例認められたが、両マーカー併用で陽性一致率100% (47/47)が達成できた。

今回使用したRNA抽出キットによる所要時間は15分程度、TRC測定は20分で終了する。その他の準備時間等を合わせても1時間以内に実施可能であり、術中診断に適用可能であると考えられた。

5. 考 察

リンパ節切片を顕微鏡で観察する従来の病理学的検査法では、時間的制約から術中に検索可能な切片数が

限定される。したがって、転移巣のリンパ節内における局在に起因する偽陰性が指摘されてきた。⁸⁾ しながら、遺伝子検査では、リンパ節を丸ごと破碎して検索できるため、そのようなサンプリングエラーは起きないという利点がある。

一方、遺伝子検査では癌細胞が発現するmRNAを指標としてその存在を検出するため、どのmRNAを標的とするのが非常に重要となる。本研究でも、一般的に乳腺細胞マーカーと考えられているCK19 mRNAのみでは感度不足であり、これを補完するCEA mRNAも標的に加えたことで永久病理と匹敵する感度を達成できた。このことは、学会でも議論されているが、CK19 mRNA陰性・低発現乳癌細胞の存在が無視できないことを示している。多くのマーカーを使用すると高精度になることは自明であるが、簡便さやコスト面からできるだけ少数のマーカー使用が望ましい。その意味でも、今回ダブルマーカーで100%の一致率を得られたことは意義がある。

また、今回、病理学的検査法による転移巣の大きさを、TRC法によりある程度定量可能であることが示された。このことは、単なる癌細胞の有無だけではなく、治療方針の決定に役立つ更なる情報を提供できる可能性があることを示唆している。

6. ま と め

迅速・簡便にCK19 mRNAを測定可能な試薬を開発した。また、乳癌センチネルリンパ節転移診断において、TRC法によるCK19およびCEA mRNA測定が永久病理検査と同等の精度を有し、その迅速性から術中迅速診断へと応用可能であることが示唆された。

7. 謝 辞

本研究は、帝京大学医学部外科 飯沼久恵先生との共同研究によって実施された。臨床評価の実施に対し、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) AE. Guiliano *et al.*, *Ann Surg.*, **220**, 391 (1994)
- 2) JB. Richard, *Cancer*, **103**, 444 (2005)
- 3) M. Tsujimoto *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 4807 (2007)
- 4) PG. Chu *et al.*, *Histopathology*, **40**, 403 (2002)
- 5) 尾本大輔 他、第56回日本臨床検査学会抄録集、296 (2009)
- 6) 田村純子 他、第68回日本癌学会学術集会抄録集、437 (2009)
- 7) 尾本大輔 他、日本臨床検査自動化学会第41回大会抄録集、578 (2009)
- 8) K. Dowlatshahi *et al.*, *Cancer*, **80**, 1188 (1997)