

微小転移の実態把握と診断の迅速化・簡易化に関する研究

中森正二*, 藤原義之*, 山本浩文*, 門田守人*

■ はじめに

固形癌根治手術後の再発のほとんどは、手術時に切除範囲外や遠隔臓器に遺残した微小な転移巣や浸潤巣が原因であると考えられており、このような微小癌病巣の実態の把握は、新しい癌治療戦略を考える上で重要な意義を持つものと考えられる。現在、癌に対する手術後の治療方針決定は、画像診断や病理診断などの形態学的診断による進展度診断により行われているが、形態学的な診断のみで、必ずしも正確な進展度診断が行われている訳ではなく、予期し得ない再発を経験することが少なくなかった。その原因の一つとして、リンパ節転移や癌深達度など代表的な進展度診断が、病変の一部のみの検索しかできないために、潜在的な癌巣を検出するのに限界があることがあげられる。したがって、このような形態的診断の弱点を補うべく、近年、分子生物学的手法などを利用した微小癌病巣検出のための遺伝子診断が盛んに試みられている。しかしながら、現在までに試みられている遺伝子診断は、定性的なものがほとんどで客観性が低く、また、技術的、時間的制約からも広く臨床応用されるまでには至っていない。そこで、本研究では、癌進展度診断として最も重要なリンパ節転移診断および転移再発の指標となり得る流血中癌細胞検出の遺伝子診断において、キャピラリーPCR増幅装置を利用し、診断の迅速化・簡易化をはかり、さらに定量性を導入、客観

性のある臨床応用可能な遺伝子診断を行うことをめざした。

■ 対象と方法

1) 定量的リンパ節転移遺伝子診断

リンパ節転移の定量的遺伝子診断の検討材料として、大腸癌7症例から郭清したリンパ節102個を用いた。得られたリンパ節を半割し、一方をHE染色による組織学的検査を行い、残りの半分のリンパ節よりRNAを抽出し、CEAを遺伝子マーカーとして、LightCycler™ (キャピラリーリアルタイムPCR定量増幅装置; ロシュダイアグノスティック社) を用いてRT-PCRを行った。CEA遺伝子発現量の定量は、CEA発現が報告されているヒト胃癌細胞株MKN45よりRNAを抽出しRT-PCRを行い、これを用いてCEA発現の検量線を作成し、この検量線を用いて摘出リンパ節における相対的CEA発現量を求め定量化を行った。さらに、病理検査結果、従来のRT-PCR法による遺伝子増幅産物の検出による診断結果と比較した。

2) 定量的流血中癌細胞遺伝子診断

末梢血中に存在する癌細胞検出のための定量的遺伝子診断の検討材料として、肝臓癌切除16例(63検体)および非肝癌健常人41例から末梢血を採取した。肝臓癌切除例においては、切除前後の肝静脈血、門脈血も採取した。肝臓癌遺伝子マーカーとして、従来から利用されているAFP遺伝子を用いた。通常のRT-PCR反応はシングルステップ反応で増幅回数は35回とした。また、リアルタイムPCR定量増幅も通常PCRと同一のプライマ

* 大阪大学大学院医学研究科 病態制御外科

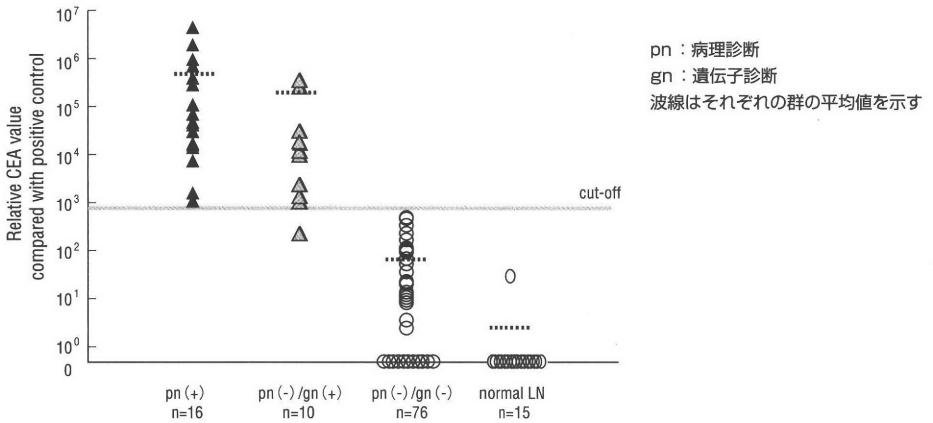


図1 リンパ節内CEA発現の定量化と陽性判定カットオフ値の設定.

一、同一条件で行った。さらに、肝細胞癌切除例36検体（末梢血26，肝静脈血7，門脈血3），非坦癌健常人末梢血41検体については蛍光ハイブリダイゼーションプローブをAFP増幅のためのPCRプライマー間に設定し，AFP特異的増幅を定量した。なお，リアルタイムPCRにおけるAFP定量のための検量線は，肝癌培養細胞HuH7を用いて作成した。

■ 成 果

1) 定量的リンパ節転移遺伝子診断

組織学的検査で転移を認めたリンパ節16個の平均相対的発現量は 8.3×10^5 であり，組織学的に転移を認めないものの従来のRT-PCR法でバンドを確認できたリンパ節10個の平均相対的発現量は 1.5×10^5 ，病理組織検査，RT-PCR法ともに陰性であった76個では， 3.7×10^1 であった。また，陰性対象とした非坦癌患者より採取したリンパ節15個の平均は， 2.5×10^0 であり， 8×10^2 前後にカットオフ値を設定することにより，偽陽性，偽陰性の少ない判定が可能となる可能性が見いだされた(図1)。なお，手術時に採取したリンパ節からRNA

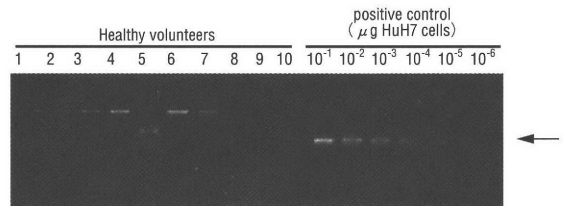


図2 リアルタイムPCRによるAFPmRNA増幅産物の電気泳動。←で示した大きさのバンドが想定されるAFP遺伝子増幅産物の大きさであるが，健康人サンプルにおいて，サイズの異なるバンドが検出され，このような場合は，リアルタイムPCRによる定量性が不確かとなる。

を抽出し，定量結果が得られるまでの平均的所要時間は，約2時間半ほどであった。

2) 血液中癌細胞の定量的遺伝子診断

従来から行われてきた遺伝子診断の手法である通常のRT-PCR法による検出では，健康人29例においてAFP特異的増幅バンドは検出されなかった(同一検体を3回反応させ，3回とも検出されなかった)。肝臓癌検体では，健康人と同様に3回の反応で3回とも検出されなかった検体が53あり，3回のうち1回以上検出された検体が10で，再現性に関する問題，検出感度限界に関する問題が明

らかになった。そこで、同一検体をリアルタイムPCRを用いて定量し、HuH7肝癌細胞5細胞が1mlに存在した場合を1とした時、健常人、肝臓癌症例の定量値は0から4とばらつき、健常人と肝臓癌症例の間で違いは無かった(図2)。しかしながら、これらのリアルタイムPCR産物の泳動を行うと、目的のAFP以外の産物も検出され(図3)、本反応では、リアルタイムPCRが必ずしも目的AFP遺伝子のみを増幅している訳ではないものと考えられた。より特異的にAFP発現を検出すべく、蛍光ハイブリダイゼーションプローブをAFP増幅のためのPCRプライマー間に設定してリアルタイムPCRを行った結果、健常人31例の末梢血サンプルではAFPの検出ができず、肝臓癌症例では、36サンプル中9サンプルでHuH7肝癌細胞 $1 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ におけるAFP発現量以上の発現を認めた(図4)。

□ おわりに

リアルタイムPCRを用いた定量的PCRにより、リンパ節中や血液中微量癌細胞の定量的検出の可能性が見いだせた。従来の定性的な遺伝子診断に

比べ、より客観的な判定が行えるものと考えられ、手技自体も簡便で、測定も自動化が可能であることから、これまでの血清腫瘍マーカーのような利用も可能と考えられた。しかしながら、本手法を広く利用していくためには、癌それぞれによる遺伝子マーカーの設定、PCR条件、またハイブリダイゼーションプローブの利用などの更なる検討が必要であると考えられ、さらに、現在行われている病理迅速診断に比べ検査時間がかかることを考えると、今後は、その検査の適応を明らかにした上で、多数症例での再発や予後との関連性の検討を行い、臨床応用の可能性を検討していく必要があるものと考えられた。

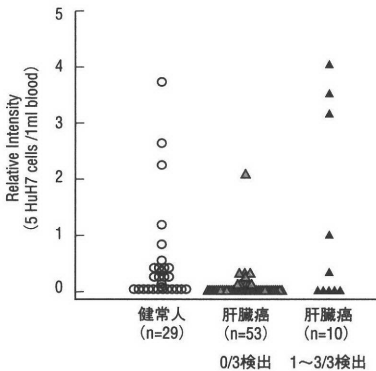


図3 リアルタイムPCRによるAFPmRNAの定量。0/3検出：同一サンプルを用いた3回の異なる通常PCR反応で1回もAFPmRNA増幅産物が検出されず。1~3/3検出：3回の異なる通常PCR反応で1~3回のAFPmRNA増幅産物が検出された。

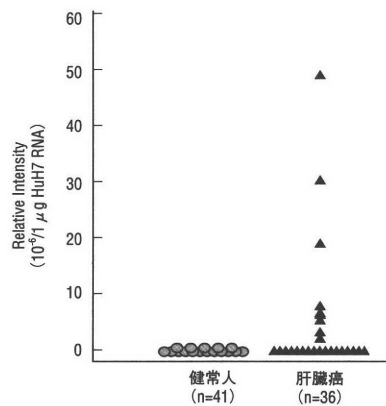


図4 ハイブリダイゼーションプローブを利用したリアルタイムPCRによるAFPmRNAの定量。