

# TOPICS

## 消化器癌リンパ節微小転移検索の臨床的意義について



岐阜大学 第2外科 国枝 克行

### はじめに

根治手術し得た胃・大腸癌症例でも、なお20～30%に再発が認められるが、これらの症例では初回手術時に、通常検査法では検出できない微小転移(MM)巢の遺残による可能性があると推察される。このMMを検出するために、リンパ節の連続切片やサイトケラチンなどによる免疫組織染色が行われてきたが、最近では分子生物学的手法を用いた細胞レベルのMMが検出可能となってきた。現在までに数多くの研究結果が報告されているが、いまだにその臨床的意義は明らかにされていない。ここでは、リンパ節の微小転移検索の現状と抱える問題点を私見を交えて述べる。

### 1. RT-PCRによるMMの検索

RT-PCRによるMMの検索法は、癌細胞が有し、周囲の正常細胞に認められない遺伝子マーカーのmRNAを検出することにより、リンパ節や血液中の異所性癌細胞の存在を診断する手法である。従来の組織学的手法に比べて検出感度が高く、正常細胞 $1 \times 10^6$ 個中に1個の癌細胞が検出可能である<sup>1)</sup>。本法によりMMを検出する試みは、1991年Smithら<sup>2)</sup>が悪性黒色腫患者の末梢血について、tyrosinaseをマーカーにして施行したのが最初である。それ以後、乳癌、食道、胃・大腸癌、胆道癌などの癌患者のリンパ節、骨髄、血液、腹腔内洗浄液などに対して、種々のマーカーを用いて研究が進められている。

### 2. リンパ節におけるMM検索

リンパ節についての研究では、Moriら<sup>1)</sup>がCEAのプライマーを用いて、消化器癌、乳癌患者のリ

ンパ節について検討し、感度に優れ、MMを有する患者の早期診断、早期治療に有用であると報告した。Weitzら<sup>3)</sup>は大腸癌20例の検討において、組織学的リンパ節転移陰性(n(-))患者16例中14例(87.5%)にMMが認められたことを示し、MMが早期の段階から高率に、しかも広範囲にみられることを指摘した。RT-PCRの成績と予後との関連性を示した報告はいまだ少数であるが、Liefersら<sup>4)</sup>はstage II結腸癌患者26例について、初めて5年生存率で比較し報告した。彼らは、MM陽性群の5生率は36%で、陰性群の75%に比べ有意に不良であったことを示し、同法がstage II結腸癌の予後を予測する有用な手段であると述べている。教室でもCEAとCK-20をマーカーとしたRT-PCRにより、n(-)大腸癌37例から採取したリンパ節551個について検討した。この際、偽陽

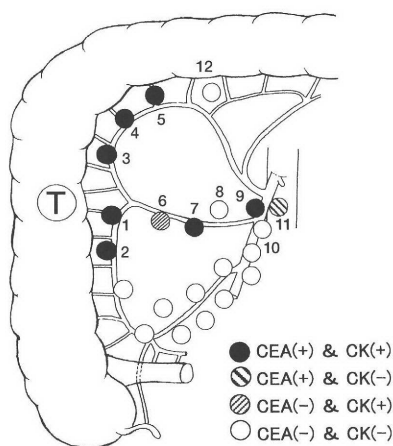


図1 肝再発を来したn(-)大腸癌症例における微小転移陽性リンパ節の分布

微小転移陽性リンパ節は腫瘍の栄養血管にそって多数、広範囲に認められた。

性の可能性を排除する目的で、CEAとCK-20のmRNAがともに検出された場合のみをMM陽性と定義したが、26例（70.3%）にMMが検出され、陽性リンパ節は136個（24.7%）であった。平均3年経過した時点で再発例は2例（5.4%）であった。再発例のMMの分布をみると、1例は44個中7個陽性であり、n3領域に3個の陽性リンパ節が認められた（図1）。他の1例は、検索した9個のリンパ節がすべて陽性であった。得られた結果から、MM陽性であることが予後に必ずしも直結するとはいえないが、多数あるいは遠位のリンパ節が陽性の症例で再発しやすいと考えられ、術後補助化学療法の対象になり得ると推察された。

### 3. 免疫組織染色によるMMの検索

サイトケラチンやその他の上皮性マーカーを用いた免疫組織染色によるMMの検索が多数報告されているが、報告者により結果が異なり、現時点で予後との関係を明確にすることは困難である。大腸癌に関するRobertらのReview<sup>6)</sup>でも、予後との関係に否定的な報告が多いと述べられている。一方、Caiら<sup>7)</sup>は胃癌について深達度別に検討し、サイトケラチン染色によるMM陽性例が有意に予後不良であることを報告している。このように結果が異なるのは、癌種が異なること以外に、検索スライドの枚数や、偽陽性の判定法、孤立型と集簇型の取り扱いなどが統一されていないこと、また、いずれも少数例での検討であることなどに起因していると考えられる。

### 4. RT-PCR以外の分子生物学的手法によるMMの検索

Nakamuraら<sup>8)</sup>は、ごくわずかの点突然変異遺伝子を検出可能であるMutant allele specific amplification (MASA)法を開発し、リンパ節中のMMの検出に応用した。すなわち、22例の大腸癌症例についてK-rasとP53の変異を確認後、リンパ節内の変異細胞の有無を探索し、組織学的検索より高感度であることを示した。また、Cespedesら<sup>9)</sup>は大腸癌肝転移切除例の肝周辺のリンパ節に

ついて、mismatch ligation assayを用いたK-rasとp53の遺伝子変異と、MSP法を用いたp16 promoter hypermethylationの検索により、MMの有無を検索した。その結果、同法が感度に優れ、MM陰性例の予後が陽性例に比べて有意に良好であったことを示した。これらの手法はRT-PCR法に比べ、癌に特異的な変化を検出するため信頼性が高いが、変異のない症例には無効であり、しかも手技上の煩雑さがある点が、臨床応用する上で問題点として挙げられる。

## 5. RT-PCRによるMM検索に関する問題点

### 1) 至適マーカーの選択

RT-PCRによるMMの検出には、偽陽性、偽陰性を認めないマーカーが理想であるが、いまだに最適なマーカーは定まっていない。臨床で汎用されているCEAのmRNAは、癌細胞や消化管上皮に高率に存在するが、正常リンパ節や血液中にはほとんど認められないため、有用なマーカーとして容認されている。

また、上皮細胞の中間フィラメントの構成成分である種々のサイトケラチンも用いられているが、偽陽性が少ない点からCK-20が最も有用と考えられている。

RT-PCRによるMM検索を研究段階から実地臨床に移す上で、消化器癌の場合には、若干の問題はあるもののCEAの単独あるいはCEAとCK-20との併用が、最も実用的、効率的であると考えている。

### 2) 再現性、評価法の問題

従来のRT-PCRによるMM検索法は高感度ではあるが、定量が困難であり、検査条件により結果が異なる可能性がある。陽性例の中には、死細胞や不活化された細胞など臨床的意味の乏しい細胞が含まれている可能性も否定できない。また、生細胞であってもごく少量であれば、生体防御機構により淘汰されるため、再発に結びつかず、臨床的に無意味の場合もあり得る。これらの問題を解決するために、最近ではLight Cyclerやrapid

cyclerを用いたリアルタイムPCRが導入され、短時間でmRNAの定量的測定が可能になった。同法により、正常例では検出されず、しかも予後と最も相関するレベルでカットオフ値が設定できれば、これまで不明瞭であった予後との関係が明確にされ、信頼性の高い予後予測手段になると期待される。

また、従来の報告ではMM陽性リンパ節の有無で陽性群と陰性群に分けられていたものが多いが、実際にはMM陽性リンパ節の個数や存在場所を考慮に入れる必要があると推察される。教室の大腸癌における検討でも、再発症例はMM陽性リンパ節が7個と多数みられた症例と、N3領域にまでMM陽性リンパ節がみられた症例であった。

102回外科学会において高山ら<sup>10)</sup>は、ホルマリン固定標本からRNAを抽出する方法を開発し、同一症例についてCK免疫染色とRT-PCR法によるCEAmRNA検出法の成績を比較した。その結果、PCR法ではMM陽性4個以上群と3個以下群で予後に有意差が認められたが、免疫染色法では両群間に差がみられなかったと報告した。現在、MM検索法として免疫染色法とPCR法の優劣に議論が多い中で、非常に示唆に富む報告であると考えられた。

また、MM陽性例の再発形式がリンパ節再発よりも血行性転移が多い事実から、MM陽性は、単に局所に遺残した癌を示すだけにとどまらず、原発巣が局所病変から全身病変への広がりを示す可能性があると考えられた。

## 6. リンパ節MM検索の今後の展望

本法の臨床的意義を評価するためには、MMの有無と予後との関係を明確にすることが不可欠であるが、従来の報告はほとんどが少数例の検討であるため、現時点で評価するには問題がある。しかし、多数の報告者が示唆するように、評価法が確立すれば治癒切除患者の予後予測のための有力な手段となり、術後補助化学療法の適応患者の決定に有用な手段になると考えられる。さらに、リアルタイムPCRにより、手術中にsentinel nodeのMMの診断が可能となれば、現在研究段階であるsentinel node navigation surgeryの信頼性が増し、一般臨床への普及に拍車がかかると期待される。現在進行中の研究もみられるが、今後、多施設参加の大規模な共同研究により、MM検索が臨床的に意味のあることか否かを解明することが急務であると考えられる。

### [文献]

- Mori M, Mimori K, Inoue H et al : Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 55 : 3417-3420, 1995
- Smith B, Selby P, Southgate J, et al : Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 338 : 1227-1229, 1991
- Weitz J, Kienle P, Magener A et al : Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Cancer Res* 5 : 1830-1836, 1999
- Liefers JG, Jansen AMC, Velde CJH, et al : Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N, Engl. J. Med.* 339 : 223-228, 1998
- Futamura M, Takagi Y, Koumura H et al : Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. *J surg Oncol* 68 : 34-40, 1998
- Calaluce R, Miedema B, Yesus YW : Micrometastasis in colorectal carcinoma A review. *J Surg Oncol* 67 : 194-202, 1998
- Cai, J, Ikeguchi M, Maeta M, et al : Micrometastasis in lymph nodes and microinvasion of the muscularis propria in primary lesions of submucosal gastric cancer. *Surgery*, 126 : 32-39, 1999
- Hayashi N, Arakawa H, Nagase H, et al : genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res* 54 : 3853-3856, 1994
- Cespedes MS, Esteller M, Hibi K, et al : Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. *Clin cancer Res* 5 : 2450-2454, 1999
- 高山治, 池田正孝, 能村真吾, 他 : RT-PCR法および免疫染色によるDukes B 大腸癌のリンパ節微小転移の比較検討. *日本外科学会雑誌* 103 : 臨時増刊号274, 2002