

肺癌におけるリンパ節の微小転移 (micrometastasis) の検出とその意義

大阪大学 呼吸器外科 奥村 明之進、前田 純、井上 匡美

本邦における肺癌による死亡者数は年間6万人であり、悪性腫瘍による死亡の中で第一位を占める。近年、胸部CT、PET-CTなどの画像診断技術の進歩により早期診断の機会は増えているが、未だに診断時に既に進行癌である症例も多く、他の固形癌に比べて切除率は低い。

肺癌の外科治療成績は病理病期診断と非常によく相関する。本邦の肺癌登録事業からの報告では、2年生存率はI A期89%、I B期75%、II A期71%、II B期64%、III A期47%であり、リンパ節転移を伴わないI期の治療成績は許容範囲内にあるが、リンパ節転移を伴うII期以上、特に縦隔リンパ節転移を伴うIII期の生存率は満足できるものではない。このように、外科的完全切除がなされても再発することは多く、治療の困難な悪性腫瘍である。

肺癌は、小細胞肺癌と非小細胞肺癌に大別される。小細胞肺癌は進行が早く外科治療による根治の可能性が低い、抗癌化学療法が奏効する可能性が高い。一方、非小細胞肺癌は抗癌化学療法感受性は乏しいものの、外科的治療による根治の可能性はある。以後、本稿では非小細胞肺癌について論ずる。

上述のように、縦隔リンパ節転移を伴うIII期症例の予後は不良であり、リンパ節転移の有無の把握は非常に重要である。しかしながら通常のhematoxylin-eosin (H-E) 染色では、微小なリンパ節転移を捉えることが難しいと考えられる。そこで、当教室では分子生物学的手法を用いて微小なリンパ節転移の検出方法を確立し、その臨床的意義を検討している。

われわれは、腫瘍組織由来のmRNAを用いて、肺癌のマーカーの発現をReverse-transcription PCR (RT-PCR) 法にて定量評価する方法を採用した¹⁾。マーカーとしては、他の種類の癌などで、サイトケラチンやCEAなど多種類が試みられているが、われわれの予備実験では肺癌においてはCEAが最も特異性が高いことが明らかにされた。forward CEA primerとして5'-AGACAATCACAGTCTCTGCGGA-3'、reverse CEA primer

として5'-ATCCTTGTCCTCCACGGGTT-3'、CEA probeとして5'-FAM-GCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTC-TAMRA-3' (TaqManプローブ) を用い、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) で定量した。

リンパ節の凍結標本を図1のように薄切し、病理標本上の転移巣の大きさと、抽出されたmRNAからのCEA mRNAのコピー数を定量して比較した。その結果、CEAの発現が陽性の場合、同部位での0.5mm²以上の微小転移巣はRT-PCRによって検出されることが示された(図2)。

当科で手術された、非小細胞肺癌29例においてすべての郭清されたすべてのリンパ節について病理組織診断結果とRT-PCRの結果を比較した。病理学的にリンパ節転移陽性と診断された13個のリンパ節のすべてでCEAのmRNA

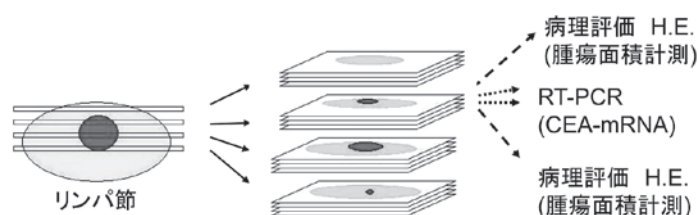


図1 リンパ節の凍結切片から病理組織学的評価とRT-PCRを行い、RT-PCRによって検出される転移巣の面積を算出する

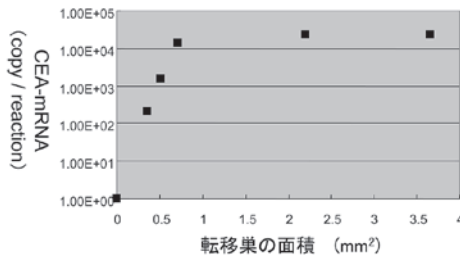


図2 転移巣の面積とCEAのmRNAのコピー数との関係

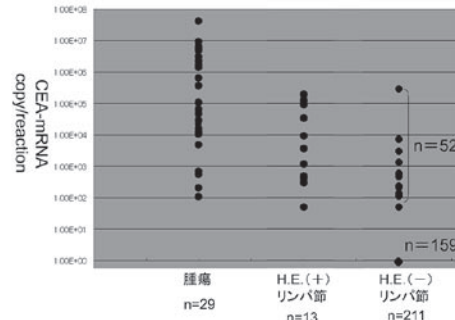


図3 腫瘍、リンパ節 (H.E. 染色で転移の認められるものと認められないもの) における、CEAのmRNAのコピー数

が検出された。一方、病理学的にリンパ節転移陰性と診断された211個のリンパ節のうち、52個(25%)でCEAのmRNAが検出され、微小転移陽性と判断された(図3)。このように、病理学的形態的評価のみでは微小なリンパ節転移の存在が認識されず、stage migrationの一因となることが考えられる。

肺癌の術後には補助化学療法が追加されることが多く、2期以上では何らかの化学療法が推奨されている。Pathological I期症例には、微小リンパ節転移があるとすれば、病期の過小評価につながっていることが懸念される。こういった症例においては、補助化学療法が再発のリスクの低下に貢献するかもしれない。

近年、他疾患観察中の胸部CT検査、CTを含む人間ドック、CT検診によるCT検査の頻度が増加しているのと同時に、CT画像の解像度の急速な向上により、比較的小さな肺癌が発見される機会が増えている。2cm以下の比較的小型の早期と考えられる肺癌に対して、積極的に機能温存を目指して区域切除のような縮小手術を行う施設も増えている。しかし

ながら、小型の肺癌でもリンパ節転移を認めることも意外に多く、当教室の検討では2cm以下の肺癌の11%でリンパ節転移を認めている²⁾。積極的縮小手術後の再発は回避されるべきであり、特にリンパ節転移のある症例では予後は不良であり、術中のリンパ節転移の評価は重要である³⁾。術中の凍結標本を用いた迅速診断では検出することのできない微小リンパ節転移を術中に検出することは、縮小手術の適応をより確実なものにし、外科における個別化医療の発展につながると期待される。そのためには、RT-PCRによる分子細胞学的手法の導入が期待される。ただし、検査にかかる時間的問題と手技的煩雑さのため、定量的RT-PCR法は現実的とはいえないであろう。当教室では、Loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP)法という新たなmRNAの検出方法を用いてCEAのmRNA発現の定量も開発している⁴⁾。この方法は、定量的RT-PCR法より簡便で短時間で結果が得られるという点で優位といえる。検出感度ではPT-PCRに劣るため、今後のsensitivityの向上が求められる。

最後に、微小リンパ節転移の予後への影響は未だ不明であるが、その生物学的意義が明らかにされ、術後補助療法の適応決定や術中診断への応用に発展することを期待する。

【文献】

- 1) Maeda, J., Inoue, M., Okumura, M., Ohta, M., Minami, M., Shiono, H., Shintani, Y., Matsuda, H., Matsuura, N. Detection of occult tumor cells in lymph nodes from non-small cell lung cancer patients using reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen mRNA with the evaluation of its sensitivity. *Lung Cancer* 52 : 235-240, 2006.
- 2) Inoue, M., Takakuwa, T., Minami, M., Shiono, H., Utsumi, T., Kadota, Y., Nasu, T., Aozasa, K., Okumura, M. Clinicopathologic factors influencing postoperative prognosis in patients with small-sized adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 135(4) : 830-836, 2008.
- 3) Okumura, M., Goto, M., Ideguchi, K., Tamura, M., Sasaki, H., Tanaka, H., Matsumura, A., Iuchi, K. Factors associated with outcome of segmentectomy for non-small cell lung cancer: Long-term follow-up study at a single institution in Japan. *Lung Cancer* 58 : 231-237, 2007.
- 4) Maeda, J., Inoue, M., Nakabayashi, K., Otomo, Y., Shintani, Y., Ohta, M., Okumura, M., Matsuura, N. Rapid diagnosis of lymph node metastasis in lung cancer with loop-mediated isothermal amplification assay using carcinoembryonic antigen-mRNA. *Lung Cancer* 65: 324-327, 2009.