

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

DNA チップを用いた迅速がん診断システム開発の研究

主任研究者 落合 淳志 国立がんセンター研究所支所・臨床腫瘍病理部長

がん細胞を手術中に短時間で検出することは、外科的がん治療にとりその治療法選択のために必須である。本年度は、これまで上皮マーカおよびがん細胞マーカーとして有用と考えられる分子マーカー（CK19、CEA、HER2、Muc1 およびEカドヘリン）の発現を用いてヒト乳がん手術症例のセンチネルリンパ節におけるがん細胞の転移の検索を行い、同時に検索されている迅速病理組織における診断と比較検討した。CK19、CEA、MUC1の3種類の遺伝子発現の中で2個以上の発現が高度な場合、組織学的診断と同程度またはそれ以上の感度、特異度を有してがん転移リンパ節の診断が出来る可能性が示された。

A. 研究目的

リンパ節に転移したがん細胞や胸・腹水中のがん細胞を検出することはがん患者治療のためには重要である。現在、迅速診断として手術中に標本を凍結し組織を作製し比較的短い時間で病理組織学的に検出されてその組織内にはがん細胞が存在するかを検索し、その結果治療方針が決定されている。近年、がん細胞ががん胞巣から解離し最初に転移するリンパ節（センチネルリンパ節）の概念が出現し、実際の症例においても、センチネルリンパ節を同定しそのリンパ節への転移を検索することにより、がん細胞の転移がない症例には縮小手術を行うなど、センチネルリンパ節へのがん細胞の転移が治療法の選択に重要になってきている。しかし、センチネルリンパ節転移巢の検索には熟練した病理医が各病院に常駐する必要があり、すべての医療施設で行うことは困難な現況である。近年、分子生物学的手法を用いて各種の腫

瘍マーカー遺伝子発現によりがん細胞の微小転移を検出する試みが行われているが、迅速診断のためにはより簡便な遺伝子発現測定系の作製が必要とされる。

本研究は、新しい電気化学的活性を持つDNA二本鎖特異的縫い込み型インターカレーター（Ferrocenyl Naphthalene Diimide; FND）を用いるECA (Electrochemical Array) チップで、種々のがんマーカーおよび上皮細胞マーカーを同一条件下で同時に検出できる遺伝子診断システムを確立し、がんの遺伝子診断ならびに迅速診断をできるようにするものである。

B. 研究方法

LightCycler™を用いた定量PCR法：昨年検討したLightCycler™を用いた定量PCR法を用いて、標的として分子（CK19, CEA, E-cadherin (E-cad), HER2, Muc1, β actin）による乳がん症例のセンチネルリンパ節転移遺伝子診断について検討した。また、同時

に採取された病理標本を基準にしたセンチネルリンパ節遺伝子診断基準の作成を試みた。

材料と方法：本年度 mRNA を抽出し定量 PCR を行った症例および材料は、以下の毎くである。ヒト乳がんセンチネルリンパ節の迅速病理標本作製時に、連続して6ミクロン標本10枚を作製し、同検体から mRNA を抽出した。抽出 mRNA の一部は mRNA 量の測定に用い、採取検体の中で10 μ g を用いて reverse transcriptase により cDNA を作製した。作製された cDNA 100ng 内における各種分子のコピー数を昨年度同様に LightCycler™ を用いた定量 PCR 法により検討した。検討に用いたヒト乳がんセンチネルリンパ節29症例は迅速診断と永久標本により、免疫染色法を用いたマイクロ転移を確認した病理最終診断において、がん転移陽性10症例、陰性19症例であった。各リンパ節における分子の発現コピー数を調べ Receiver operating characteristic curve (ROC) カーブを作成し各分子発現における適切な cut off 値を設定した。

C. 研究結果

昨年度がん細胞遺伝子診断の検出に用いた遺伝子は CEA, CK19, E-cad, HER2, Muc1 の5つであり、コントロールとして β -アクチンと GAP-DH を用いた。この中で、CEA, CK19 および Muc1 遺伝子発現は正常リンパ節ではあまり高い値を示さないが、がん転移を示したリンパ節では高いコピー数を示したことより、ヒト乳がんのリンパ節転移がん細胞の検出には有効であると考えられた。また、E-カドヘリン、および HER-2 遺伝子発現はがん細胞の存在しないリンパ

節において比較的高い値を示したことより、現在用いているプライマーの設定の問題またはヒトリンパ節においてこれら分子の発現が存在する可能性があり、遺伝子診断において改良が必要と考えられた。病理組織学的診断との比較により CEA, CK19, Muc1 の遺伝子の組み合わせの中で、2種類以上の遺伝子発現が高値を示した症例においては組織学的にがん細胞を認めたことより、2種類以上の組み合わせ陽性症例を遺伝子診断陽性症例と判断した場合、病理診断陽性（マイクロ転移を含む）10症例中、9症例のがん転移を認識することが可能であった。また組織学的転移陰性症例19例の中で遺伝子診断陽性とされた症例は1例であり、18症例は陰性と判断された。これらの結果は遺伝子診断は特異度90.0%、感度94.7%でありマイクロ転移を検討しなかった迅速診断の判定における特異度85.7%、感度87.5%に比べ特異度、感度ともほぼ同程度の値で、がん細胞の検出が可能であることが示された。今後、症例数を重ねることと本遺伝子の組み合わせにより特異度・感度を上げてがん細胞を検出することが可能であることが示された。

D. 考察

本研究は、新しい電気科学的活性迅速病理診断を行った後の連続切片から抽出した mRNA を用いて検討した。本年度の研究成果より CK19, CEA, Muc1 は乳がんのセンチネルリンパ節転移の定量化には向いている分子マーカーであることが明かとなった。一方、E-カドヘリンおよび HER-2 はバックグラウンドの値が高いことより、今回の検

討には向かないと判断されたが、この原因がプライマー設定の問題もあり、今後検討が必要と思われた。理論上3種類より5種類におけるこれら分子の発現を見るためには、今後適切なプローブ領域の検索も必要と考えられる。PCR法を用いずこのECAチップにより検出が可能となれば短時間でがんの転移の有無の補助診断が可能になり今後、術中迅速だけでなく、がんのステージを決定するリンパ節病理診断においてECAチップを用いた遺伝子検索法の適応が拡大されると考えられる。

E. 結論

CK19, CEA, Muc1,の遺伝子の発現を感度よく測定することによりヒト乳がん症例におけるセンチネルリンパ節へのがん転移の有無を測定することが可能になると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashita K., Takagi A., Takagi M., Kondo H., Ikeda Y. Takenaka S	Electrochemical hybridization assay of a heterozygous deficiency of lipoprotein lipase gene with ferrocenylnaphthalene diimide.	Bioconjugate Chem	13	1193-1199	2002
池田康行、 高木敦子	高トリグリセリド血症に対するテーラーメイド医療	医学のあゆみ	201	713-720	2002
Endo H, Takenaga K, Kanno T, Satoh H, Mori S.	Methionine aminopeptidase 2 is a new target for the metastasis-associated protein, S100A4.	J Biol. Chem.	277	26396-26402	2002

20020764

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.23の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。