

Title	Clinical significance of micrometastases in axillary lymph nodes assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction in breast cancer patients
Author(s)	増田, 慎三
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42549
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"＞ 大阪大学の博士論文について ＜/a＞ をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	増田慎三
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16097 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Clinical significance of micrometastases in axillary lymph nodes assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction in breast cancer patients (乳癌における RT-PCR 法を用いた腋窩リンパ節微小転移検出の臨床的意義)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 野口眞三郎 教授 青笹 克之

論文内容の要旨

【背景および目的】

乳癌において腋窩リンパ節の転移状況は最も有力な予後予測因子とされている。病理組織検査 (H&E 染色) で転移を認めない n0 乳癌であっても、10年生存率は85%前後で、中には比較的早期に遠隔転移を来し、死亡する症例が存在する。その高危険群を捉える目的で、連続多数切片による検索や抗サイトケラチン抗体などを用いた免疫染色法による腋窩リンパ節の微小転移巣検出が試みられ、その臨床的意義が明らかにされてきた。一方、近年 RT-PCR 法による癌微小転移検出法がより簡便かつ高感度な方法として盛んに行われているが、その意義については未だ確立していない。

そこで、本研究では、長期予後が判明している n0 乳癌症例の腋窩リンパ節標本を用いて、RT-PCR 法による微小転移検出が予後予測において有用か否かについて検討した。

【方法および成績】

(1)ホルマリン固定標本からの RNA 抽出と RT-PCR 法の確立

①飛行時間型質量分析装置 (TOF-mass) を用いた分子量変化の解析により、ホルマリンによる核酸への影響を検討した。その結果、ホルマリン処理中、RNA 塩基のアミノ基にメチロール付加反応とメチレン架橋反応が起こるが、RNA は分断化されないことがわかった。

②Proteinase-K を用いて、ホルマリン固定標本から効率よく RNA を抽出する方法を確立した。また加水分解にて付加メチロール基を除去することで、cDNA 合成および PCR の効率も高めることができた。

以上より、遺伝子発現の検討にホルマリン固定標本は使用可能であることを証明した。

(2)微小転移検出条件の設定

RNA の質を検定するための housekeeping gene として PBGD (porpho-bilinogen deaminase) mRNA を、上皮(癌)細胞特異的のマーカースとして CEA mRNA を選択した。検出感度は 10^5 個の正常リンパ球に対し1個の MCF-7 細胞であった。非担癌患者のリンパ節では27サンプル全て CEA mRNA 陰性、一方、組織学的に乳癌転移を有するリンパ節では40サンプル全て陽性と、特異度は100%であった。

(3)対象症例と微小転移性率

1986~1990年に大阪大学第二外科で根治手術が施行され、病理組織検査で腋窩リンパ節転移なし (n0) と診断さ

れた原発性乳癌131症例を対象とした。131例中、129例で解析可能なRNAを抽出でき、そのうち40例(31.0%)で、CEA mRNA陽性つまり微小転移の存在が示唆された。

(4)微小転移の有無と予後

再発は、微小転移「有」の40例中13例(32.5%)に、一方、微小転移「無」の89例中8例(9.0%)に認められた(χ^2 検定: $p=0.008$)。

Kaplan-Meier法によると、微小転移「有」の群は「無」の群に比べ、有意に予後不良であった[10年健存率:66.1% vs 87.6% ($p=0.0008$)、10年生存率:67.8% vs 93.7% ($p=0.0024$)]。しかし、微小転移「有」の予後は、同期間の腋窩リンパ節転移陽性[n(+)]乳癌と比較すると、良好な傾向があった。

(5)予後予測因子としての有用性

単変量解析では、n0乳癌における予後予測因子として、リンパ節微小転移の有無以外に、エストロゲンレセプター(ER)の発現状況、組織学的悪性度(histological grade)、組織型、リンパ管侵襲(ly)、脈管侵襲(v)が有意に有用であった。

多変量解析によると、これら6因子の中で、微小転移の有無のみが独立した最も重要な予後因子であり、Coxの比例ハザード比は、再発については3.992($p=0.0161$)、乳癌死に対しては4.293($p=0.0436$)であった。

【総括】

ホルマリン固定標本から効率的なRNA抽出法およびRT-PCR法を確立し、遺伝子発現の解析に応用できた。

RT-PCR法により検出される腋窩リンパ節微小転移の有無は、n0乳癌において、独立した有用な予後予測因子であることが判明した。同法は、従来のH&E染色による病理組織検査に重要な補助的役割を担うものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

乳癌において、腋窩リンパ節の転移状況は最も有力な予後予測因子であり、その正確な把握は治療方針決定の上で極めて重要である。病理組織検査で腋窩リンパ節に転移を認めないn0乳癌の予後は、一般に良好であるが、中には遠隔再発を来すものも少なからず存在する。その再発高危険群を捉えるため、免疫染色法やRT-PCR法による腋窩リンパ節微小転移の検出が試みられているが、まだその臨床的意義は確立していない。本研究は、RT-PCR法による微小転移検出の意義について、長期予後の判明しているn0乳癌症例の腋窩リンパ節標本を用いて検討したものである。

まず基礎実験として、長期保存されたホルマリン固定標本からの効率的なRNA抽出法とRT-PCR法を新たに確立した。本法の確立は、これまで困難と考えられていたホルマリン固定標本における遺伝子発現の解析を可能にした、非常に有用かつ画期的な成果である。

次いで、CEAを癌特異的マーカーとして、腋窩リンパ節の乳癌微小転移の検出を試みたところ、129例のn0乳癌中40例(31%)で陽性であった。また微小転移を有する症例は、転移の無い症例に比して有意に長期予後が不良であり、多変量解析にて微小転移は独立した予後予測因子であることが明らかになった。

本研究の結果は、RT-PCR法による乳癌腋窩リンパ節の微小転移検出が、従来の病理組織学的手法による転移検索に加えて、より詳細かつ重要な予後因子となることを証明し、今後の乳癌治療において極めて有用な情報をもたらしたといえる。以上より、本研究は学位に値する業績と認められる。