

Title	Establishment of detection system for micrometastases to lymph nodes of colorectal cancer
Author(s)	三宅, 泰裕
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44393
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	三宅泰裕
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17231 号
学位授与年月日	平成 14 年 5 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Establishment of detection system for micrometastases to lymph nodes of colorectal cancer (大腸癌微小リンパ節転移診断法の確立)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 青笹 克之 教授 野口眞三郎

論文内容の要旨

【目的】

近年、従来の病理学的検索では発見されない微小リンパ節転移の存在が指摘されているが、大腸癌における微小転移リンパ節の解剖学的な広がりや頻度についての詳細は明らかでない。本研究では、臨床検査としての微小転移検出法を確立し、リンパ節マッピングによって微小転移の実態を明らかにすることを目的とした。さらに、リンパ節中の癌細胞数を定量することで、その臨床的意義についての検討を加えた。

【方法】

(1) 免疫染色と RT-PCR 法によるリンパ節微小転移のマッピング

1998 年 6 月から 12 月に当料で切除した大腸癌症例 11 例(リンパ節転移陰性 6 例、陽性 6 例)より得た所属リンパ節 237 個を対象とした。リンパ節の解剖学的位置を記録後、半割し、一方より HE 染色とサイトケラチンの免疫染色による組織学的検査を行い、他方より RNA を抽出し CEA、CK20 をマーカーとして RT-PCR を施行した。非癌手術症例のリンパ節 15 個を陰性コントロールとした。

(2) リアルタイムモニタリングシステムによるリンパ節中の癌細胞の定量

大腸癌 7 例の所属リンパ節 102 個を対象とした。各リンパ節に対して CEA をマーカーとし従来の RT-PCR 法を行い、次に real time RT-PCR を施行した。CEA を発現する cell line (MKN45) の $10^6 \sim 1$ 個の希釈系列に正常リンパ球を加えて各系列の総数を 10^6 個とし、これより抽出した RNA より CEA の標準検量線を描き、これをもとに、各リンパ節由来の CEA RNA の発現量を計測した。Housekeeping Gene である PBGD (Porphobilinogen deaminase) によって CEA 値を補正して、従来の RT-PCR 法の結果と比較検討した。

【成績】

(1) 免疫染色と RT-PCR 法による微小転移リンパ節のマッピング

非癌患者では、陽性とならない PCR 条件をまず設定し、大腸癌 11 病変の 237 個のリンパ節について RT-PCR を行った。HE 染色で転移を認めたリンパ節 20 個での CEA、CK20 mRNA をマーカーとする RT-PCR の陽性率は 95% および 100% であった。HE 染色で転移を認めなかったリンパ節 217 個中、免疫染色では 13 個 (6.0%) の、RT-PCR 法では 57 個 (26.3%) のリンパ節に微小転移細胞が検出され、RT-PCR 法は免疫染色の 4 倍以上の感度を示した。RT-PCR 法によるリンパ節 mapping の結果、11 例中 9 例に微小転移を認めた。リンパ節転移陰性 6 例中 4 例、1 群

リンパ節転移陽性 3 例中 2 例、2 群リンパ節転移陽性 2 例中 2 例の遠位リンパ節に微小転移を認め、微小転移は組織学的転移陽性リンパ節の遠位リンパ節に高率に存在することが明らかとなった。

(2) リンパ節中の癌細胞の定量

CEA RNA の発現量は非癌患者のリンパ節では測定感度以下であった。HE 染色で転移を認めたリンパ節、HE 染色では転移を認めないが従来法の RT-PCR で陽性であったリンパ節、RT-PCR 陰性のリンパ節の平均値は各々、9.97、4.46、 2.10×10^{-3} であった。RT-PCR 陽性の約半数のリンパ節は、HE 陽性群に匹敵する高い CEA 発現を示した。

【総括】

本研究によって、組織学的転移陽性リンパ節のさらに遠位リンパ節にまで微小転移が広範かつ高頻度にひろがっていることが明らかとなった。このことは、肉眼的転移陽性リンパ節の遠位リンパ節まで予防的に郭清する現在の手術術式によって微小転移リンパ節が同時に郭清されていることを示している。さらに、微小転移の中には組織学的転移陽性リンパ節に匹敵する癌細胞が存在する例があることが示された。組織学的リンパ節転移は大腸癌の予後を規定する重要な因子であることが知られているので、定量的 RT-PCR 法による微小転移検索が従来の病理学的リンパ節転移診断を補助する有用な臨床検査となることが今後期待される。

論文審査の結果の要旨

定性 RT-PCR 法（従来法）による大腸癌微小転移の臨床的意義については未だ不明である。また、従来法は微量な RNA 量を検出する上で再現性が得られず、臨床応用が困難であることが大きな問題であった。本研究では、まず CEA をマーカーとした定性 RT-PCR 法により大腸癌微小転移の解剖学的な広がりや臨床経過について **prospective** に検討した。さらに **Real time PCR** 法による大腸癌リンパ節中の微小癌細胞の定量化を行い、再現性のある臨床応用可能な検査法をはじめて確立した。

その結果、1) 定性 RT-PCR 法により病理学的転移陰性症例にも微小リンパ節転移を高率に認め、遠位リンパ節にまで広範に微小転移をきたした症例では早期再発を認めた。2) CEA mRNA の定量的ための検量線の描出には、MKN45 胃癌細胞株をヒト正常リンパ球により段階希釈した系列を作成し、RNA 量の補正には、**house keeping gene** である **PBGD** を用いた。これらの定量コントロールによって、高度に再現性のある測定系が得られた。102 個のリンパ節（病理学的転移陽性 16 個、陰性 86 個）を定量化した結果、病理学的転移陰性であっても、CEA 発現量は極めて多様であり、転移陽性リンパ節と同程度の癌細胞量を有するリンパ節が相当数存在することが明らかとなった。

病理学的転移陽性リンパ節は、重要な予後因子であることが知られており、定量 RT-PCR 法によって、転移陽性リンパ節と同程度の癌細胞量を有するリンパ節を判別することは、臨床的に重要と考えられる。さらに、定量 RT-PCR 法による微小転移診断により、定性 RT-PCR 陽性リンパ節の中でも、癌細胞の多寡の分別が可能である。その再現性のある検査特性は、今後、臨床検査として臨床的に意義のある転移癌細胞量の決定に役立ち、外科診断学の発展に大きく寄与することが期待されるものであり、博士の学位に値するものと認める。