

い とろ ひろ あき

氏 名	伊 藤 寛 晃
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大博(医)第1662号
学位授与の日付	平成16年11月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Detection and Quantification of Circulating Tumor Cells in Patients with Esophageal Cancer by Real-Time Polymerase Chain Reaction (食道癌患者におけるリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を 用いた遊離癌細胞の定量的検出)
論文審査委員	主査 教授 青 柳 豊 副査 教授 畠 山 勝 義 副査 教授 内 藤 眞

博士論文の要旨

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は微小腫瘍細胞の検出に用いられているが、高感度であるがゆえに腫瘍細胞と関連のないわずかなメッセンジャーRNA (mRNA) をも検出し、疑陽性が問題となっている。今回我々は、競合的 PCR を用いて食道癌における有意な微小遊離癌細胞の存在を検出することを試みた。

対象は、2000年4月から2001年3月までに新潟大学附属病院消化器・一般外科で治療を行った食道癌患者28症例と対照非担癌者35例とした。食道癌患者28例の内訳は、男性26例、女性2例であり、年齢51歳から83歳まで、中央値66.5歳であった。28例中21例が手術を受け、食道切除術20例、試験開胸術1例であった。他、化学療法、放射線療法の併用3例、化学療法単独3例、放射線療法単独1例であった。食道癌病期は、TNM stage I, II, III, IVがそれぞれ3例、2例、7例、16例であった。主病変部位は、頸部、上部食道、中部食道、下部食道がそれぞれ2例、5例、13例、8例であり、腹部食道は含まれなかった。組織型は、全例が扁平上皮癌であり、高分化、中分化、低分化がそれぞれ5例、15例、8例であった。対照は、健常者11例、胆石症6名、鼠径ヘルニア4例、外傷3例、副甲状腺機能亢進症2例などであった。検体として、末梢血5ml (未治療時、手術中、手術2~3週間後)、手術症例の腫瘍灌流血5ml (奇静脈、左胃静脈)、骨髓 (切除肋骨片より採取)、胸管リンパ液1.5~5mlを採取した。これら検体からmRNAを抽出し鋳型DNA (cDNA) を作成した。LightCyclerを用いてハイブリダイゼーションプローブ法によるリアルタイム競合的PCRを行い、胎児性癌抗原 (CEA)、サイトケラチン20 (CK-20)、内部標準としてグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を測定し、相対値を解析した。測定における標準物質として食道癌細胞株TE-1を用いた。

結果、 10^8 個の末梢血単核球中の10個の腫瘍細胞 (TE-1) が検出可能であった。対照35例中、CEA、CK-20はそれぞれ17例、20例で検出された。GAPDHとの相対比を計算し平均±

2SD を正常範囲と規定，それぞれ 0.53，4.61 以上を異常高値，陽性とした。治療前末梢血で，食道癌 28 例中，CEA 7 例 (25.0%)，CK-20 4 例 (14.3%) が陽性であった。CK-20 では食道癌症例と対照例で測定値の重なりが大きく，CEA がより目的に適していると考えられた。他検体の CEA 陽性率は，腫瘍灌流血 19 例中 11 例 (57.9%)，骨髓 14 例中 4 例 (28.6%)，胸管リンパ液 5 例中 2 例 (40.0%) であった。治療前末梢血の TNM stage 別陽性率は，I / II 20%，III 42.9%，IV 18.8% であった。測定値 (CEA/GAPDH) は，I / II 0.17 ± 0.27 ，III 3.49 ± 6.55 ，IV 20.59 ± 69.28 と進行例で高値を示す傾向にあった。腫瘍灌流血でも同様の傾向が見られたが，陽性率は他検体と比べ約 2 倍と高率であった。骨髓，胸管リンパ液では一定の傾向は見られなかった。

術後末梢血の解析では，手術を受けた 20 例中 8 例は測定値が低下し，うち 4 例は陽性から正常範囲内となった。この 4 例はいずれも根治手術が遂行された症例であるが，3 例は再発した。一方，20 例中 9 例は術後測定値が上昇した。9 例中 4 例が陽性，4 例中 2 例は再発をきたし，1 例は非根治手術例であった。20 例中残りの 3 例は，術前後を通し正常範囲内であった。

測定値と予後の関連であるが，根治手術を受けた 18 例中 8 例は再発し，うち 3 例は術前末梢血測定値が異常高値であった。一方，無再発 10 例中 9 例は術前末梢血測定値が正常範囲であった。食道癌 28 例中で術前末梢血測定値陽性は 7 例であったが，非担癌生存は 1 例のみで，3 例は根治手術後 1 年以内に再発，1 例は非根治手術，2 例は遠隔転移により手術を回避した。腫瘍灌流血では，根治手術後無再発 10 例中 6 例が陽性であった。骨髓で陽性の 4 例はいずれも根治手術を受けているが 3 例は再発し，特に高い値を示した症例は切除部以外の肋骨に骨再発をきたした。胸管リンパ液では有意な関連性は見られなかった。

これらの結果から，競合的 PCR を用いた微小癌細胞検出方法は，臨床上有意な真の陽性と疑陽性を区別できる可能性があると考えられた。また，根治切除症例において，CEA の競合的 PCR を用いた検出が再発の早期診断に利用できる可能性があると考えられた。

審査結果の要旨

【背景及び目的】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は微小腫瘍細胞の検出に用いられているが，高感度であるがゆえに腫瘍細胞と関連のないわずかなメッセンジャー RNA (mRNA) をも検出し，疑陽性が問題となっている。今回申請者らは，競合的 PCR を用いて食道癌における有意な微小遊離癌細胞の存在を検出することを試みた。

【対象及び方法】

対象は，2000 年 4 月から 2001 年 3 月までに新潟大学附属病院消化器・一般外科で治療を行った食道癌患者 28 症例と対照非担癌者 35 例とした。食道癌患者 28 例の内訳は，男性 26 例，女性 2 例であった。食道癌病期は，TNM stage I，II，III，IV がそれぞれ 3 例，2 例，7 例，16 例であった。組織型は，全例が扁平上皮癌であった。対照は，健常者 11 例，胆石症 6 名，鼠径ヘルニア 4 例，外傷 3 例，副甲状腺機能亢進症 2 例などであった。検体として，末梢血 5ml (未治療時，手術中，手術 2～3 週間後)，手術症例の腫瘍灌流血 5ml (奇静脈，左胃静脈)，骨髓 (切除肋骨片より採取)，胸管リンパ液 1.5～5ml を採取した。これら検体から mRNA を抽出し鋳型 DNA (cDNA) を作成した。LightCycler を用いてハイブリダイゼーションプロ

ープ法によるリアルタイム競合的 PCR を行い、胎児性癌抗原 (CEA)、サイトケラチン 20 (CK-20)、内部標準としてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を測定し、相対値を解析した。測定における標準物質として食道癌細胞株 TE-1 を用いた。

【結果】

対照 35 例中、CEA、CK-20 はそれぞれ 17 例、20 例で検出されたため、GAPDH との相対比を計算し平均±2SD を正常範囲と規定、それぞれ 0.53、4.61 以上を異常高値、陽性とした。治療前末梢血で、食道癌 28 例中、CEA 7 例 (25.0%)、CK-20 4 例 (14.3%) が陽性であった。CK-20 では食道癌症例と対照例で測定値の重なりが大きく、CEA がより目的に適していると考えられた。他検体の CEA 陽性率は、腫瘍灌流血 19 例中 11 例 (57.9%)、骨髄 14 例中 4 例 (28.6%)、胸管リンパ液 5 例中 2 例 (40.0%) であった。治療前末梢血の TNM stage 別陽性率は、I/II 20%、III 42.9%、IV 18.8% であった。測定値 (CEA/GAPDH) は進行例で高値を示す傾向にあった。腫瘍灌流血でも同様の傾向が見られたが、陽性率は他検体と比べ約 2 倍と高率であった。骨髄、胸管リンパ液では一定の傾向は見られなかった。

術後末梢血の解析では、手術を受けた 20 例中 8 例は測定値が低下し、うち 4 例は陽性から正常範囲内となった。この 4 例はいずれも根治手術が遂行された症例であるが、3 例は再発した。一方、20 例中 9 例は術後測定値が上昇した。9 例中 4 例が陽性、4 例中 2 例は再発をきたし、1 例は非根治手術例であった。20 例中残りの 3 例は、術前後を通し正常範囲内であった。

測定値と予後の関連であるが、根治手術を受けた 18 例中 8 例は再発し、うち 3 例は術前末梢血測定値が異常高値であった。一方、無再発 10 例中 9 例は術前末梢血測定値が正常範囲であった。食道癌 28 例中で術前末梢血測定値陽性は 7 例であったが、非担癌生存は 1 例のみで、3 例は根治手術後 1 年以内に再発、1 例は非根治手術、2 例は遠隔転移により手術を回避した。腫瘍灌流血では、根治手術後無再発 10 例中 6 例が陽性であった。骨髄で陽性の 4 例はいずれも根治手術を受けているが 3 例は再発し、特に高い値を示した症例は切除部以外の肋骨に骨再発をきたした。胸管リンパ液では有意な関連性は見られなかった。

【結論】

これらの結果から、CEA の競合的 PCR を用いた微小癌細胞検出方法は、臨床上有意な真の陽性と疑陽性を区別できる可能性があると考えられた。また、根治切除症例においても再発の早期診断に利用できる可能性があると考えられた。

以上本研究は CEA の競合的 PCR を用いた微小癌細胞検出方法の臨床的意義を明らかにしたものであり、この点に学位論文としての価値を認めた。