
 話 題

微少癌転移の検出

京都大学医学部第1外科 嶋田 裕

最近の分子生物学の進歩には目をみはるものがある。しかしながら、まだ分子生物学的所見を充分臨床に生かしきれておらず、癌の生物学的特性を考慮した手術を行い得ていない。現在、癌悪性度に関係する各種遺伝子検索がなされているが、最近、特に癌の微少転移の検出について分子生物学を応用した研究がなされてきているので、その成果と問題点について抄述する。

PCR (polymerase chain reaction) により微小材料よりの遺伝子増幅が可能になり、各種疾患の遺伝子異常が検出されるようになった。リンパ節に微小転移があった場合、代表1剖面による従来の検索法ではこの微小転移を検出するのは極めて困難であり、いままでは切除標本の微細連続切片による多大な労力で検出が試みられてきたが、PCRを応用することにより比較的簡単に微少転移の検出が可能となった。原理は簡単であるので何をマーカーとして増幅検出するかが問題であった。ヌードマウスに人の癌細胞を移植し、各臓器の転移をみるには人特有の遺伝子配列 (Alu 配列) を見い出せば簡単であった。しかしながら、人における検出では癌遺伝子は本来正常人に存在するものであるため、正常との区別は不可能であった。

このジレンマは癌遺伝子および癌抑制遺伝子における mutation の検出と RT-PCR による mRNA の定量により解決された。すなわち正常細胞では検出されない mutation や、癌細胞においては発現しているが正常のリンパ節の細胞では発現していない mRNA をターゲットとした RT-PCR による異常遺伝子の検出で癌細胞の存在確認が開始されたのである。

神経芽細胞腫では PGP9.5 mRNA をターゲットとして、血中において腫瘍細胞1個/有核血球細胞 10^7 個と高感度であることが報告されている。乳癌では上皮細胞のマーカーである keratin-19 の mRNA をターゲットとした RT-PCR がおこなわれた。さらに乳癌に比較的特異的のマーカーとして CA15-3 の抗体をコードしている MUC-1 に対する RT-PCR にて微小リンパ節転移の検出が行われている。その感度は乳癌細胞1個/リンパ球 10^5 - 10^6 個であった。検出感度の向上のために nested PCR (一回目の PCR に用いた primer の内側に、もう1セット primer を作成して PCR をもう一回行う) を試みたところ、良性疾患患者のリンパ節から抽出した RNA から MUC1 mRNA が検出され、正常リンパ節のなかに極微量であるが MUC1 mRNA を発現している細胞が存在することが判明したと報告されている。Keratin-19 mRNA にも nested PCR にて正常リンパ節でも発現が認められたため、nested PCR にて感度を向上させたときは要注意である。

検出感度の向上をめざしたときの問題点は膀胱癌の早期診断をめざしたときにも生じている。膀胱癌においては 80% 以上に ras の point mutation が生じており、しかもコドン 12 に集中しており特異的な検出が期待された。膀胱液より ras の変異が 10^{-4} - 10^{-5} の感度で検出可能で抹消血からも変異が検

 YUTAKA SHIMADA: Detection of micrometastasis in the patients with malignant tumors

Key words: PCR, RT-PCR, Micrometastasis

検索用語: ポリメラーゼ連鎖反応, 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応, 微少癌転移

出される症例が示された。しかしながらあまりにも高率な mutation は、正常上皮の時点においてすでに遺伝子レベルでの変化が存在することの証であった。すなわち慢性膵炎、胆石症の膵液からも変異が検出された。非膵癌では変異陽性例が検出されないのは 10^{-3} の検出感度であったが、 10^{-3} まで感度を低下させると膵癌そのものの検出感度も低下した。その後、膵では膵管上皮の過形成からも 50% に ras の変異が検出され、慢性膵炎などの膵疾患を伴わない症例にも変異を認め、 10^{-3} の検出感度でも検出される症例が存在することが明らかとなり、定量により判定する必要が生じてきている。

一方、mutation の検出では p53 mutation の検出法として mutant allele specific amplification (MASA) 法が p53 mutation の増幅に有効であることが報告されている。primer の 3' 末端に mutation があると PCR の反応が stop する特性を利用したもので、目的の DNA が増幅されずかえって PCR で正常な allele のみが増幅される。逆に 3' 末端に変異をいれた primer で増幅すると mutant allele のみが増幅されることになる。正常リンパ節に mutant allele が存在しないので癌細胞の検出が可能となり、中村（東大医科研）らは大腸癌、膵癌のリンパ節転移の検出を MASA 法でおこなっている。さらに微少転移が MASA 法で陽性とされた症例は予後調査により、病理検査で転移陰性と診断された症例に比し予後不良であることが報告されている。現在のところ偽陽性はないようであるが p53 mutation は各癌腫で 40-50% にしか認められないので、mutation のない癌細胞では無力である。

食道癌においては CEAmRNA による RT-PCR がおこなわれ胃癌、大腸癌と同様にすべての食道癌で検出が可能で病理学的に検出不能であったリンパ節転移が検出されたと報告されている。我々は SCCmRNA の PT-PCR によりやはり 100% の食道癌で検出が可能で、正常上皮においても発現が認められたが、正常リンパ節では検出されず微小リンパ節の転移検出に有効と考え現在検討中である。また肝癌における血中腫瘍細胞の検出が AFP の RT-PCR により我々の教室で行われており、画像診断で転移が検出される以前に腫瘍細胞がすでに血中で陽性であったと報告している。

以上すべて来たように PCR により微少癌転移を検出できるようになり、従来リンパ節転移陰性と思われた症例にリンパ節転移陽性の症例が含まれていたことが明らかになった。リンパ節転移症例に準じた治療が必要な症例が含まれていると考えられる。また遠隔転移のみが強調されていた症例においても癌の転移の痕跡をトレースできることとなり転移の道筋を明らかにできる可能性がある。

今後は外科医もますます分子生物学の知識が要求され、それを応用した治療を要求される時代がくると考えられる。

文 献

- 1) Schoenfeld A, et al.: Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 54: 2986, 1994.
- 2) Tada M, et al.: Detection of ras gene mutation in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 53: 2472, 1993.
- 3) Mattano LA, et al.: Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 52: 4701, 1992.
- 4) Hayashi N, et al.: Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res*, 54: 3853, 1994.
- 5) 森 正樹, 他: 癌の微少リンパ節転移検出のための遺伝子診断法の確立—悪性度の正確な評価を目指して. 第95回日本外科学会抄録.