



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Detection of peritoneal micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction targeting carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 in colon cancer patients

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 青木, 信一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14939

氏名(本籍)	青木 信一郎 (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 1331 号
学位授与日付	平成 15 年 2 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Detection of peritoneal micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction targeting carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 in colon cancer patients
審査委員	(主査) 教授 佐治 重豊 (副査) 教授 森 秀樹 教授 森脇 久隆

論文内容の要旨

結腸癌治療切除例でも、術後再発がみられ、その再発形式の中で腹膜播種性転移が16~36%に認められている。かかる症例では開腹時に顕微鏡レベルの腹膜播種が存在したと推察されるため、早期腹膜播種性転移の正確な診断は、術後補助化学療法等の適応症例を選択する上で重要である。すなわち、洗浄細胞診が陰性であった症例でも術後腹膜播種性転移を来す症例の存在であるが、原因として細胞診レベルで検出不能な微小腹膜播種性転移が存在したと推察されている。これら微小転移の検出法として従来から種々の診断法が試みられているが、感度の面で限界があった。ところが、近年分子生物学的手法の進歩によりmRNAレベルで癌細胞の存在を検出可能となり、注目を集めている。そこで、申請者らは、結腸癌手術症例を対象に腹腔洗浄細胞診を行い、その洗浄液沈渣を用いて、上皮細胞に特異的に発現する遺伝子であるcarcinoembryonic antigen (CEA)およびcytokeratin 20 (CK 20)のmRNAを標的とし、これを逆転写酵素にてcDNAに変換後PCRを行うRT-PCR法を腹膜播種性転移の早期診断法に応用する方法を開発し、その精度と感度を従来の洗浄細胞診、洗浄液上清中CEA値および臨床病理学的因子との関連で比較検討し、微小腹膜播種性転移診断法としてRT-PCR法の有用性を評価、検討した。

研究対象と研究方法

[対象] 対象は1997年4月から2年間に当科で開腹した結腸癌79例で、良性疾患23例を対照群とした。症例の内訳は、年齢：24~86歳(平均65.0歳)、性別：男性49例、女性30例。病理組織型：高分化型腺癌35例、中分化型腺癌38例、低分化型腺癌4例、粘液癌2例、病期分類：pStage 0 4例、I 14例、II 24例、III 24例、IV 13例、壁深達度：pTis 4例、pT1 3例、pT2 13例、pT3 49例、pT4 10例、(共にTNM分類)。[方法] 開腹時に生食水500mlで腹腔内を洗浄し、回収液を用いて次の検索を行った。①洗浄細胞診(以下細胞診)：Papanicolaou染色により判定、②洗浄液上清中CEA(以下CEA)値：sandwich法で測定し蛋白補正した。なお、cut off値は良性疾患23例のmean+2SD値、14 ng/gを用いた。③RT-PCR(以下PCR)法：回収液細胞沈渣よりAGPC変法にてtotal RNAを抽出し、逆転写反応にてcDNAを合成した。CEA、CK20および内部標準(GAPDH)に特異的なprimerを作製しPCRを行った。PCR産物を2% agarose gelにて電気泳動し、CEA、CK 20共に特異的bandが確認できた症例をPCR法陽性と判定した。

研究結果

PCR法の検出感度・精度に関する基礎的検討：①標的細胞として結腸癌由来cell line (COLO320, SW1083, SW1222, THRC1)を用いた検討では、いずれもPCR法は陽性であった。②原発巣より採取した腫瘍細胞はいずれもPCR法陽性であった。③良性疾患23例の腹腔洗浄液沈渣、血液、リンパ節はいずれも陰性で、精度は100%と推察された。④感度は結腸癌由来cell line SW1083を用いたserial dilution法で、CEAおよびCK 20共に10⁶個り

ンパ球あたり1個の腫瘍細胞を検出可能であった。

PCR法の検出率：①CEA mRNA陽性率は24/79 (31.4%)、CK 20 mRNA陽性率は25/79 (31.7%)、どちらか一方が陽性例は30/79(38.0%)、共に陽性例は19/79 (24.1%)であった。②臨床病理学的因子との関連でPCR法陽性群と陰性群との間に有意の関連を認めたのは、腹膜播種 (p=0.0001)、壁深達度(p=0.0004)、病期 (p=0.044)、病理組織型 (p=0.007)であった。

各検査法 (細胞診、CEA値、PCR法) の検出率：①結腸癌全症例の陽性率は細胞診が6/79 (7.6%)、CEA値が14/79 (17.7%)、PCR法が19/79 (24.1%)で、PCR法の検出率は細胞診に比べ有意に高率であった(p=0.0046)。②肉眼的腹膜播種(以下P)陽性群での陽性率は細胞診が 3/6 (50%)、CEA値が 4/6 (66.6%)、PCR法が 6/6 (100%)、P陰性で洗浄細胞診陽性群での陽性率はCEA値が 2/3 (66.6%)、PCR法が 3/3 (100%)であった。

各検査値と臨床病理学的所見との関連：①各検査法ともpTis とpT1 は全例陰性であったが、細胞診でpT2 0/13 (0%)、pT3 2/48 (4.2%)、pT4 4/11 (36.4%)、CEA値でpT2 1/13 (7.7%)、pT3 7/48 (14.6%)、pT4 6/11 (54.5%)、PCR法でpT2 2/13 (15.4%)、pT3 9/48 (18.8%)、pT4 8/11 (72.7%)で有意差はみられないが、PCR法の感度が最も高かった。②病期との関連でpStage 0 は全て陰性であったが、細胞診でpStage I 0/14 (0%)、II 2/24 (8.3%)、III 0/24 (0%)、IV 4/13 (30.8%)、CEA値でpStage I 1/14 (7.1%)、II 3/24 (12.5%)、III 5/24 (20.8%)、IV 5/13 (38.5%)、RT-PCR法でpStage I 2/14 (14.2%)、II 7/24 (29.2%)、III 2/24 (8.3%)、IV 8/13 (61.5%)であった。なお、pStageIVでPCR法陰性群は全例肝転移陽性であったが、肉眼的腹膜播種は陰性であった。

考察と結語

結腸癌に特異的な癌関連遺伝子は未だ同定されていないため、上皮細胞に特異的に発現する遺伝子が標的として用いられている。本研究ではCEAとCK 20を標的遺伝子として用いたが、腹腔洗浄液沈渣中にこれら遺伝子が存在すれば、癌細胞の存在を示唆すると考えられるが、単独では偽陽性の可能性があり、CEAとCK20が共に発現例を腹膜播種と診断することで、精度向上を期待した。本研究で施行したRT-PCR法は、洗浄細胞診や洗浄液CEA値測定法に比べ有意に高い検出率 (感度) を示し、偽陽性例や偽陰性例は検出されず高い精度を有するものと推察された。またRT-PCR法での陽性率は壁深達度の進行に伴い上昇し、洗浄細胞診や洗浄液CEA値測定法よりも高い検出率を示した。それゆえ、RT-PCR法は洗浄細胞診や洗浄液CEA値測定法より感度の高い検出法であると推察された。以上の研究結果、腹腔洗浄液を用いたCEAとCK 20のmRNAを標的としたRT-PCR法による診断は、微小腹膜播種性転移の早期発見に極めて有用である可能性が確認された。なお、結腸癌症例を対象としたRT-PCR法による微小腹膜播種性転移診断法の報告は現時点ではみられず、今後さらに長期間の経過観察で、臨床的意義を再検索する必要があると考えている。

論文審査の結果の要旨

申請者 青木信一郎らは、結腸癌手術症例を対象に、腹腔洗浄液を用いてCEAとCK 20のmRNAを標的としたRT-PCR法を行い、腹膜播種性転移の診断法としての有用性を、従来の洗浄細胞診や洗浄液CEA値および臨床病理学的因子との関連で評価・検討した。その結果、RT-PCR法は従来の診断法に比べ感度および精度とも高く、微小腹膜播種性転移の早期診断法として有用である可能性を示唆した。これらの研究結果は癌治療分野の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Detection of peritoneal micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction targeting carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 in colon cancer patients

Journal of Experimental And Clinical Cancer Research 21 : 421~428, 2002