

腫瘍関連マーカーの逆転写：  
ポリメラーゼ連鎖反応法による胃がんセンチネルリンパ節の微小転移検出

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9452">http://hdl.handle.net/2297/9452</a>

## 腫瘍関連マーカーの逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法による 胃がんセンチネルリンパ節の微小転移検出

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 三輪晃一教授)

鯨 坂 秀 之

胃がんが最初に転移するセンチネルリンパ節 (sentinel node, SN) の微小転移を、腫瘍関連マーカーで検索した。胃がん30症例に対し、全身麻酔下に開腹したのち、胃内視鏡にて原発巣周囲に2% パテントブルー (patent blue) を0.2mlずつ4ヶ所注入後、経時的に青染したリンパ管とSNを観察した。胃切除術前にこの範囲を結合織とともに摘出し、青染されたSNと青染されていない非SNとに分類した。このSN 184個と非SN 47個に対し、上皮特異的マーカーとしてサイトケラチン-18 (cytokeratin-18, CK-18)、腫瘍特異的マーカーとして癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、リンパ節転移に関連した因子としてマトリックスメタロプロテアーゼ-7 (matrix metalloproteinase-7, MMP-7) およびMUC-1の5種類のmRNAに対して逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法をおこなった。HE染色永久標本にてSNに転移が認められたものは5例8個 (4.3%)であったのに対し、RT-PCRで発現が認められたものは、6例でCK-18 15個 (8.2%), CEA 12個 (6.5%), hTERT 10個 (5.4%), MMP-7 4個 (2.2%), MUC-1 12個 (6.5%)で、合計25個 (13.6%)と、転移リンパ節個数は約3倍に増加した。HE染色永久標本にて転移を認めず、RT-PCRにより発現が認められた1例は、のちのCK-18免疫組織染色にて非SNに微小転移を確認できた。以上の結果から、SNの微小転移は、HE染色による組織診断より、RT-PCRによる複数の腫瘍関連マーカーの検索で、より正確に診断できると結論された。

**Key words** gastric cancer, sentinel node, micrometastasis, reverse transcription-polymerase chain reaction, matrix metalloproteinase-7

胃がんのリンパ節郭清は、リンパ節転移が認められたり、またきたす可能性のある場合には根治術に欠かせない。一方、リンパ節転移の可能性が極めて低いと考えられる場合には、郭清を省略する術式が行われるようになってきた。この縮小手術の適応は、その胃がんの原発巣の大きさ、深達度、組織型などを過去の症例と比較し、間接的にリンパ節転移がないであろうと判断し決定されている。がんのリンパ節転移はリンパ管を介して形成されるため、ある程度の秩序を保っている<sup>1)</sup>。つまり原発巣周囲のリンパ管に侵襲した癌細胞はそのリンパ管が流入するリンパ節にまず転移し、次いで他のリンパ節に転移する。この最初に転移をきたすリンパ節をセンチネルリンパ節 (sentinel node, SN) といい、ここに転移がなければ同領域のリンパ節には転移がないと判断でき、このことを利用して陰茎がん<sup>2)</sup>、悪性黒色腫<sup>3)</sup>、乳がん<sup>4)5)</sup>ではセンチネルリンパ節生検 (sentinel node biopsy, SNB) によりリンパ節郭清の省略が試みられている。SNの同定法には色素を注入する色素法<sup>3)6)</sup>とアイソトープを注入しガンマプローベで同定するガンマプローベ法<sup>4)</sup>が用いられている。われわれは胃がん原発巣周囲に術中内視鏡にてリンパ嗜好性色素パテントブルー (patent blue) を0.2mlずつ4ヶ

所に注入しSNを同定し、病理組織学的にリンパ節転移の有無を診断することで直接的に縮小手術の適応を決めている<sup>6)</sup>。

しかしここで問題となるのは、病理組織学的にとらえられない微小転移の存在と、SNに転移があった場合の郭清範囲の決定である。近年、リンパ節微小転移の検出に逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法を用いた検討がおこなわれている。筆者は、腫瘍関連因子として従来の上皮特異的因子や腫瘍特異的因子に、がんのリンパ節転移に関与しているとされる因子を加え、SNの微小転移検出等に関してHE染色永久標本と比較したので報告する。

### 材料および方法

#### I. 材 料

##### 1. RT-PCRの対象

1998年6月より1999年5月の間に金沢大学第二外科学にて色素法によるSN検出を試みた原発性胃がん30例の、センチネルリンパ節郭清 (sentinel node dissection, SND) により摘出されたリンパ節231個 (SN 184個および非SN 47個)を用いた。各臨床病理学的因子の記載は胃癌取り扱い規約 (改訂12版)<sup>7)</sup>に従っ

平成11年9月30日受付, 平成11年11月5日受理

Abbreviations : CEA, carcinoembryonic antigen; CK-18, cytokeratin-18; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; hTERT, human telomerase reverse transcriptase; MMP-7, matrix metalloproteinase-7; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SN, sentinel node; SNB, sentinel node biopsy; SND, sentinel node dissection

た。

また陽性対照はヒト胃がん由来細胞株 MKN-45 および胃がん転移リンパ節、陰性対照は健常者末梢血中リンパ球および非腫瘍性疾患患者のリンパ節とした。

## 2. 培養細胞株

本研究に用いたヒト細胞株は、ヒト胃がん由来細胞株 MKN-45 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより供与) である。細胞培養液としては 10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Grand Island, USA) と 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  カナマイシン (和光, 大阪) を含む RPMI-1640 培地 (日水製薬, 東京) を用い、5%  $\text{CO}_2$  存在下、37°C にて培養した。

## 3. 末梢血中リンパ球

健常者末梢血 10ml を遠心分離用試験管 (Vacutainer cell preparation tube) (Becton Dickinson, New Jersey, USA) に注入し、20°C、3,000rpm で 20 分間遠心した後、リンパ球層を採取した。PBS にて洗浄後、細胞数を測定し使用した。

## II. 色素法による SN 検出

全身麻酔下に開腹したのち、胃内視鏡にて原発巣周囲に 2% パテントブルー (patent blue) を 0.2ml ずつ 4ヶ所注入後、経時的に青染したリンパ管と SN を観察した (図 1)。胃切除術の前にこの範囲を結合織とともに摘出した (SND)。直ちにリンパ節を採取し、青染された SN と青染されなかった非 SN とに分類した。すべてのリンパ節は 2 分割され、一方は剪刀にて細切し 0.5ml のイソゲン (ISOGEN) (ニッポンジーン, 東京) を加え凍結保存した。他方は 3 割面の HE 染色永久標本を作成し、転移の有無を検索した。また SND 後に胃切除術および他領域リン

パ節郭清をおこなったが、このリンパ節は HE 染色永久標本にて転移の有無を検索し、必要な場合には抗サイトケラチン-18 (cytokeratin-18, CK-18) モノクローナル抗体 (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) および抗腫瘍胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) モノクローナル抗体 (Dakopatts) による免疫組織染色にて微小転移の有無を検索した。免疫組織染色はパラフィン包埋 10% ホルマリン固定標本より 4  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、脱パラフィン後内因性ペルオキシダーゼを不活化するため 0.3% 過酸化水素添加メタノールに 30 分間浸漬し、PBS で洗浄した。次に、非特異的抗原抗体反応を防止するために 10% 正常ヤギ血清 (Dakopatts) に 20 分間反応させた後、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈した一次抗体と一晚 4°C にて反応させた。PBS にて洗浄した後、ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Dakopatts) に室温で 2 時間反応させ、ついでストレプトアビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体に 30 分反応させた。0.04% ジアミノベンチジン (Sigma, Steinheim, Germany) 溶液で発色させ、0.3% メチルグリーンにて核染色を行った。

## III. RT-PCR を用いた mRNA 発現の解析

### 1. RNA 抽出

イソゲンとともに凍結保存した検体を解凍し、ホモジナイザーで破碎・懸濁させた後、1 分間室温に静置した。クロロホルム 0.2ml 添加後、攪拌・懸濁させ、4°C、12,000rpm で 10 分間遠心した。上層を新たなチューブに移し、0.2ml のイソプロパノールを加えて混合し、4°C、12,000rpm で 10 分間遠心した。上清を除去した後、1ml の 75% エタノールを加え、攪拌後、4°C、12,000rpm で 5 分間遠心し、再び上清を除去し、風乾した後滅

Table 1. Oligonucleotide primers and probes for RT-PCR analysis

Target gene	Sense primer/ Antisense primer/ Probe	Extended size of PCR product (bp)
CK-18	5'-TGGTCACCACACAGTCTGCT-3' 5'-CCAAGGCATCACCAGATTA-3' 5'-TGGAGGCCCGCTACGCCCTA-3'	350
CEA	5'-TCTGGAACCTTCTCTGGTCTCTCAGCTGG-3' 5'-TG TAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC-3' 5'-GGGCCACTGTCCGCATCATGATTGG-3'	160
hTRT	5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' 5'-CCCGTCACATCCACCTTGACAAAGTA-3' 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'	418
MMP-7	5'-ATGTTAAACTCCC GCGTCATA-3' 5'-CAGCATA CAGGAAGTTAATCC-3' 5'-TGCCAGATGTTGCAGAAACT-3'	216
MUC-1	5'-CGTCGTGGACATTGATGGTACC-3' 5'-GGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAA-3' 5'-CAGGTGGAGAAAAGGAGACTT-3'	288
G3PDH	5'-GCATCCTGGGCTACACTGAGC-3' 5'-GGTACATGACAAGGTGCGGC-3' 5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3'	368

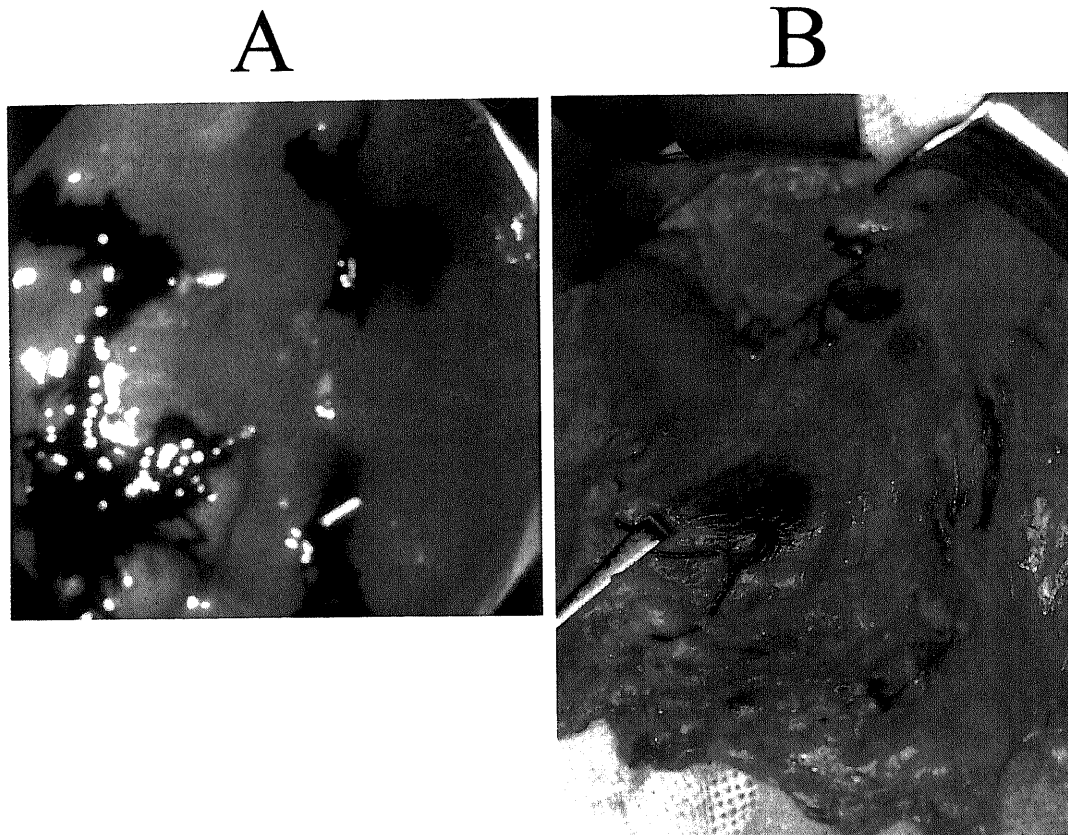


Fig. 1. SN detection of gastric cancer. Patent blue was injected in 4 points around the primary tumor (A), and stained lymphatic vessels and SNs were dissected (B).

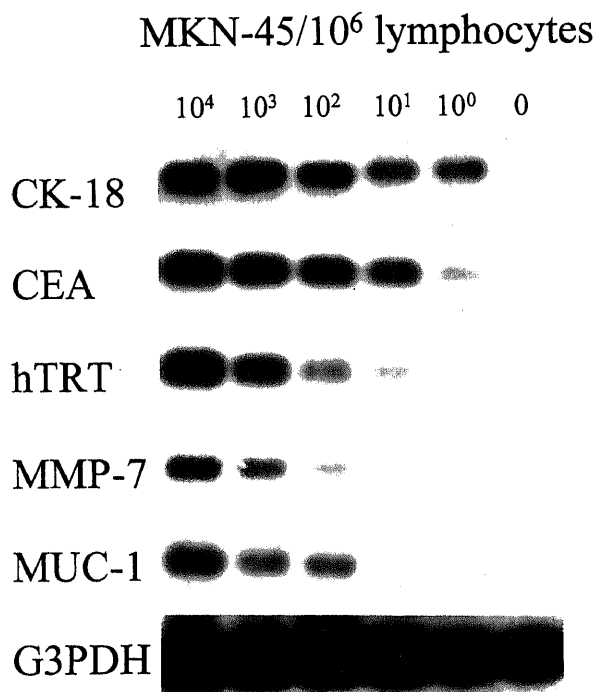


Fig. 2. RT-PCR sensitivity. In 10<sup>6</sup> lymphocytes, 10<sup>0</sup> gastric cancer cells (MKN-45) were detected by CK-18 and CEA, 10<sup>1</sup> were detected by hTRT and 10<sup>2</sup> were detected by MMP-7 and MUC-1. The lymphocytes without cancer cell were only positive for G3PDH internal control.

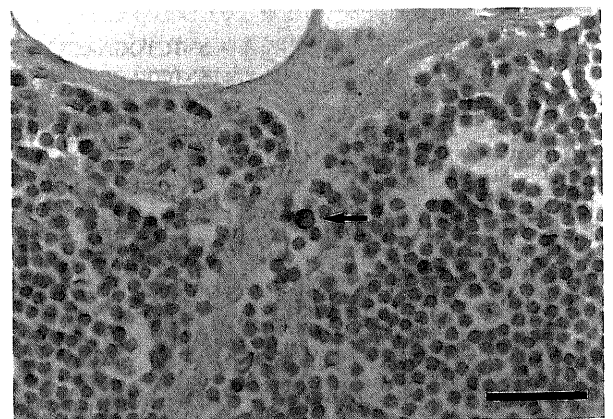


Fig. 3. Micrometastases detected by immunohistochemical staining of CK-18. Of 30 cases, only one case showed absence of CK-18 and MMP-7 in SNs by RT-PCR despite absence of lymph node metastasis by HE staining. All dissected lymph nodes of this case were stained by CK-18 and CEA and in 3 lymph nodes micrometastases were detected (arrow). The scale bar, 50  $\mu$ m.

菌蒸留水を加え溶解させた。各RNAの260nmにおける吸光度を測定し、1ODを40  $\mu\text{g/ml}$ としてRNA濃度を計算した。

## 2. RT-PCRプライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドの作成

対象とした遺伝子は上皮特異的マーカーとしてCK-18、腫瘍特異的マーカーとしてCEAおよびヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、リンパ節転移に関連した因子としてマトリックスメタロプロテアーゼ-7 (matrix metalloproteinase-7, MMP-7) およびMUC-1、内部標準としてヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, G3PDH) である。表1に、各遺伝子cDNAに対する特異的なプライマーおよびプローブを示す。サザンブロットハイブリダイゼーションは非アイソトープ法による3'-オリゴ標識検出方式 (ECL 3'-oligolabelling and detection systems) (Amersham, Buckinghamshire, England) を用いたためプローブの標識もこのキットに準じた。プローブDNA100pmolに対し、キット付属のフルオレッセイン-11-dUTP (fluorescein-11-dUTP) 10  $\mu\text{l}$ 、カコジール酸塩緩衝液 (cacodylate buffer) 16  $\mu\text{l}$ 、末端転移酵素 (terminal transferase) 16  $\mu\text{l}$  および滅菌蒸留水を加え全量160  $\mu\text{l}$  とし、37°Cで90分間反応させた後ハイブリダイゼーションに用いた。

## 3. RT-PCR反応およびサザンブロットハイブリダイゼーション

各RNAサンプル10  $\mu\text{g}$ にオリゴ (dT) プライマー (5'-TTTTTTTTTTTT-3') 1  $\mu\text{g}$ を加え蒸留水で全量を33  $\mu\text{l}$ とし、68°Cで3分間加熱後、水中にて急冷した。これにRT反応緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>], 5mM ジチオトレイトール, 0.5mM デオキシリボヌクレオチド混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2単位RNase阻害因子 (Promega Biotec, Madison, USA), および200単位逆転写酵素 (Gibco)を加え全量50  $\mu\text{l}$ とし、37°Cで90分保温してcDNAを合成した。さらに95°Cにて5分間加熱し、逆転写酵素を失活させた。冷却後、調製したcDNA 2  $\mu\text{l}$ に対してPCR反応緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH8.3), 40mM KCl, 8mM MgCl<sub>2</sub>], 0.2mM デオキシリボヌクレオチド混合液, 0.5単位Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造, 東京) および各々0.5  $\mu\text{M}$ のプライマーを加え、滅菌蒸留水により全量20  $\mu\text{l}$ に調製した。これに20  $\mu\text{l}$ のミネラルオイル (Sigma) を重層させ、サーマルサイクラー (PC700) (アステック, 福岡) でPCR反応をおこなった。熱変性を95°C, 1分間、アニーリングを50°C (CEAとMMP-7は46°C), 1分間、DNAの

伸長を72°C, 1分間とし、これを1サイクルとして、30サイクル (MUC-1は20サイクル) 行った。得られたPCR産物を、定電圧100Vにおいて1.5%アガロースゲルで電気泳動後、ゲルをアルカリ変成液 (0.4M NaOH, 0.6M NaCl) 中で30分間震盪しDNAを変成させた後、中和液 [1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH7.5)] 中で30分間震盪した。DNAは10×SSCを用いてゲルからナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N + nylon membrane) (Amersham) に転写した。転写後のフィルターは0.4N NaClにて1分間震盪した後、0.2M Tris-HCl, 2×SSC (pH7.5) にて3分間の震盪を2回繰り返して、80°C2時間で乾燥、固定した。

サザンブロットハイブリダイゼーションは3'-オリゴ標識検出方式 (ECL 3'-oligolabelling and detection systems) (Amersham) を用いた。フィルターはハイブリダイゼーション緩衝液 [5×SSC, 0.1% (w/v) 緩衝剤 (buffer component), 0.02% SDS] 中、42°Cの恒温水槽において30分間のプレハイブリダイゼーションを行なった。その後、0.16% (v/v) フルオレッセイン-11-dUTP (fluorescein-11-dUTP) 標識プローブを加え、42°Cにおいて2時間のハイブリダイゼーションを行なった。フィルターは5×SSCおよび0.1% SDSを含む溶液中で42°C, 5分の洗浄を2回行ない、引き続き1×SSCおよび0.1% SDSを含む溶液中で42°C, 15分の洗浄を2回行なった。その後、固定液 [0.15M NaCl, 0.1M Tris-HCl (pH7.5), 5% (v/v) liquid block] 中で30分間震盪後、抗体反応液 [0.4M NaCl, 0.1M Tris-HCl (pH7.5), 0.5% (w/v) ウシ血清アルブミン, 0.1% (v/v) 抗フルオレッセインHRP 接合剤 (anti-fluorescein HRP conjugate)] 中で30分間震盪させた。最後に検出試薬を1分間反応させ、X線フィルム (Kodak, New York, USA) を用いて室温下10分間のオートラジオグラフィーで解析を行なった。

Table 2. Relation between sentinel node metastases and non-sentinel node metastases by HE staining

Sentinel nodes	Non-sentinel nodes	
	Metastasis negative	Metastasis positive
Metastasis negative	25	0
Metastasis positive	3	2*

\*Non-sentinel node metastases were only in stained lymphatic flows.

Table 3. RT-PCR and Southern blot analysis of mRNA markers expression

Specimen	mRNA marker expression					
	CK-18	CEA	hTERT	MMP-7	MUC-1	Total
Healthy donor lymphocytes	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Normal lymph nodes	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Metastatic lymph nodes of gastric cancer	8/11 (72.7%)	7/11 (63.6%)	6/11 (54.5%)	7/11 (63.6%)	6/11 (54.5%)	11/11 (100%)

## 4. 感度測定

健常者末梢血リンパ球 $10^6$ 個にMKN-45を $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ 個混入したものをRT-PCR行い、感度を測定した。

## 成 績

## I. 色素法によるSN検出

色素注入後に認められる青染リンパ流は左右胃動脈、左右胃大網動脈、後胃動脈の5方向に分類でき、個々の症例では1方向14例、2方向13例、3方向3例で、4方向以上の症例は認められなかった。この青染リンパ流領域を青染リンパ節を中心に郭清(SND)した結果、30例から231個のリンパ節を摘出し、このうち青染したSNは184個であった。非青染リンパ流領域のリンパ節とともにHE染色永久標本にて転移を検索した結果を表2に示す。SNに転移を認めなかった25例は非SNにも転移を認めず、リンパ節転移陰性つまり胃癌取り扱い規約<sup>7)</sup>における $n_0$ であった。一方、SNに転移を認めた5例のうち、3例は非SNに転移はなかったが、2例は非SNに転移を認めた。ただしこの非SNはすべて青染リンパ流領域に属していた。

## II. RT-PCR

## 1. 対照における発現

健常者末梢血中リンパ球における各因子の発現は全て0% (0/5)、非腫瘍性疾患患者のリンパ節における各因子の発現も全て0% (0/5)であった。また胃癌転移リンパ節の各因子の発現は54.5% (6/11) から72.7% (8/11)であったが、いずれかの因子が発現しているものを陽性とすれば100% (11/11)であった。つまり5因子の組み合わせによる感受性および特異性は100%であった(表3)。

## 2. 感度測定

各因子の感度を図2に示す。CK-18とCEAはリンパ球 $10^6$ 個中がん細胞 $10^0$ まで、hTRTは $10^1$ まで、MMP-7とMUC-1は $10^2$ まで検出が可能であった。

## 3. SNにおける発現

30例のSN 184個のうちHE染色永久標本にて転移が認められたものは5例の8個(4.3%)であった。一方、RT-PCRによる各因子の発現は、CK-18は15個(8.2%)、CEAは12個(6.5%)、hTRTは10個(5.4%)、MMP-7は4個(2.2%)、MUC-1は12個(6.5%)で、5因子のいずれかが発現しているものは25個(13.6%)であった(表4)。表5にはRT-PCRによるSNと非SNの転移状況を示す。HE染色永久標本ではSNおよび非SNに転移を認めなかったものは25例であった(表2)が、RT-PCRによると転移を認めなかったものは24例で1例はSN転移陽性へと病期移行(stage migration)を認めた。なお、この1例はRT-PCRによりSNの2個にCK-18、1個にMMP-7の発現を認めたものであった。

なお、SNDの際にSNとともに摘出された非SNに関しては、HE染色永久標本とRT-PCRとの結果に差異は認められなかった。

## 4. SNにおけるMMP-7の発現とリンパ節転移状況

表6に、SNにおけるMMP-7の発現とリンパ節転移状況の比較を示す。HE染色永久標本による組織学的リンパ節転移陽性の5例(症例1-5)のうち、SNにMMP-7の発現を認めた2例(症例1および2)は非SNにも組織学的転移を有し、逆にSNにMMP-7の発現を認めなかった3例(症例3-5)はSNのみに組織学的転移を有していた。またHE染色永久標本による組織学的

Table 4. Relation between pathological metastases by HE staining and expression of mRNA markers by RT-PCR about SNs

Pathological metastases by HE staining	Expression of mRNA marker by RT-PCR											
	CK-18		CEA		hTRT		MMP-7		MUC-1		Total	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Positive	6	2	5	3	4	4	3	5	4	4	8	0
Negative	9*	167	7	169	6	170	1*	175	8	168	17	159

\*Including SNs of one case without pathological metastases by HE staining.

Table 5. Relation between sentinel node metastases and non-sentinel node metastases by RT-PCR

Sentinel nodes	Non-sentinel nodes	
	Metastasis negative	Metastasis positive
Metastasis negative	24	0
Metastasis positive	4	2*

\*Non-sentinel node metastases were only in stained lymphatic flows.

Table 6. Relation between expression of MMP-7 in SNs and nodal status

Case No.	Nodal stage	Number of Metastases	Location of Metastases	Expression of MMP-7 in SNs
Cases with nodal metastases				
1	$n_3$	10	SNs + non-SNs	Positive
2	$n_1$	7	SNs + non-SNs	Positive
3	$n_2$	2	SNs only	Negative
4	$n_1$	3	SNs only	Negative
5	$n_2$	3	SNs only	Negative
Cases without nodal metastases by HE staining				
6*	$n_0$			Positive
Others	$n_0$			Negative

\*This case had CK-18 and CEA positive cells in 3 non-SNs.  $n_0$  is without nodal metastases and  $n_{1-3}$  are with nodal metastases in 1st-3rd groups<sup>7)</sup>

Table 7. Relation between expression of MUC-1 in SNs and nodal status

Case No.	Nodal stage	Number of Metastases	Location of Metastases	Expression of MUC-1 in SNs
Cases with nodal metastases				
1	n <sub>3</sub>	10	SNs + non-SNs	Negative
2	n <sub>1</sub>	7	SNs + non-SNs	Positive
3	n <sub>2</sub>	2	SNs only	Positive
4	n <sub>1</sub>	3	SNs only	Positive
5	n <sub>2</sub>	3	SNs only	Positive
Cases without nodal metastases by HE staining				Negative
All cases n <sub>0</sub>				

n<sub>0</sub> is without nodal metastases and n<sub>1,3</sub> are with nodal metastases in 1st-3rd groups<sup>7)</sup>

リンパ節転移陰性にも関わらず、RT-PCRにてSNにCK-18およびMMP-7の発現が認められた症例6は、胃上部の表面陥凹型つまり胃癌取り扱い規約<sup>7)</sup>における0-IIcであったが、病理的に漿膜下組織浸潤および中等度のリンパ管侵襲を伴っており、胃癌取り扱い規約<sup>7)</sup>における深達度ssおよびly<sub>2</sub>であった。この症例のSNを除いた全郭清リンパ節をCK-18およびCEAにて免疫組織学的染色を行なったところ、20個中3個に微小転移と思われる陽性細胞が認められた(図3)。

#### 5. SNにおけるMUC-1の発現とリンパ節転移状況

表7に、SNにおけるMUC-1の発現とリンパ節転移状況の比較を示す。組織学的リンパ節転移陽性の5例(症例1-5)のうち、SNにMUC-1の発現を認めなかった症例1は組織学的に転移程度n<sub>3</sub>、転移個数10個で非SNにも転移を認め、逆にSNにMUC-1の発現を認めた4例(症例2-5)はSNおよび非SNの組織学的転移に共通性は認められなかった。

## 考 察

われわれは1993年より、色素法により胃がんのSNを同定し、術中病理診断にてこれに転移が認められなかった場合に縮小手術を試みている。ここで問題となるのは術中病理診断の正診率と、SNに転移が認められた場合の非SNの郭清範囲である。術中病理診断の正診率に関しては、1993年から1998年までの779個のSNにおいて、1個(0.13%)は術中病理診断で転移陰性と診断されるも、HE染色永久標本では転移陽性と差異が認められたが、HE染色では検出できない微小な転移に関しては不明であった。

近年、微小転移をRT-PCRにて検出する試みがなされているが、感受性を高めようとするの特異性が低下し、正常リンパ節でも陽性になる<sup>9-10)</sup>。そこで、反応サイクルを減少させたり<sup>10)</sup>、サザンブロットせずにエチジウムブロマイドで判定する試みがなされたが<sup>11)</sup>、これでは感受性が低下する。この感受性の問題やがん転移巣の異質性(heterogeneity)の問題を解決するためには、特異性の高いmRNAマーカーを複数組み合わせることが有用であると考えられる。しかし現在、標的となるmRNAにはサイトケラチン<sup>12)13)</sup>などの上皮特異的マーカーとCEA<sup>10)14)</sup>やテロメラゼ<sup>15)16)</sup>などの腫瘍特異的マーカーがほとんどで、これらの組み合わせでは限界があり、また単に癌細胞の存在を診断するにすぎなかった。そこで今回癌のリンパ節転移に関与しているとされる腫瘍関連マーカーを標的として追加することで、微小

転移検出の感受性を高めるとともに、もうひとつの問題点であるSNに転移が認められた場合の非SNの転移予測を検討した。まずマーカーの条件である、上皮特異的であること、リンパ節転移と相関があること、陽性率がある程度高いことなどを免疫組織染色にて確認した。

がんのリンパ節転移は、まず原発巣からリンパ節(SN)へ、次にリンパ節(SN)からリンパ節(SNの下流に存在する非SN)へと形成される。原発巣からリンパ節への転移形成には、細胞増殖・遊走・侵襲・免疫回避と段階分けされ、それぞれに多くの因子が関与しているとされる<sup>17)</sup>。筆者はそれぞれの段階からインスリン様増殖因子-2(insulin-like growth factor-2)<sup>18)</sup>・c-MET<sup>19)</sup>・MMP-7・MUC-1を選択し、胃がん原発巣およびリンパ節転移巣での発現を免疫組織染色にて検討したところ、リンパ節転移巣におけるMMP-7とMUC-1の発現が、原発巣より有意に高率であり、さらにリンパ節転移程度や転移個数に相関があった(投稿中)。このためMMP-7とMUC-1がリンパ節微小転移検出のマーカーになりうると考え、CK-18・CEA・hTERTを加えた5種類のRT-PCRをSNに対しておこなった。

胃がんのリンパ節微小転移に関しては、Maeharaら<sup>20)</sup>がサイトケラチンの免疫組織染色にて早期胃がん患者の組織学的転移陰性リンパ節420個から15個(3.6%)の微小転移を検出している。またMoriら<sup>21)</sup>はCEAのRT-PCRにて胃がんを含む消化器がんおよび乳がん患者の組織学的転移陰性リンパ節324個から163個(50.3%)に発現を認めている。今回の検討では組織学的転移陰性リンパ節176個から17個(9.7%)に陽性を認め、Moriら<sup>21)</sup>よりもむしろMaeharaら<sup>20)</sup>の値に近かった。これは色素法によるSN同定の対象症例がおもに早期の胃がんであったことによると考えられ、また非SNより転移率が高いとされるSN<sup>22)</sup>のみを対象リンパ節としたことと、RT-PCR法を用いたことからMaeharaら<sup>20)</sup>の値より高率に検出できた理由と考えられる。

また乳がんでは、色素法にて同定したSNに対して、複数の因子のRT-PCRをおこなった報告がBostickら<sup>23)</sup>よりなされている。肝細胞増殖因子受容体c-MET・炭水化物転移酵素 $\beta$ 1→4-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ・糖蛋白P97の3種類のRT-PCRにて、組織学的転移陰性リンパ節40個のうち35個(87.5%)と高率に発現を認めていたが、この報告では高感受性を求めるあまり非腫瘍性疾患患者リンパ節でも発現が認められており、微小転移検出という意味では疑問が残る。一方、今回の検討では、感受性よりも特異性を重視した設定をおこなったため、非腫瘍性疾患患者リンパ節では発現は認められず、微小転移検出という点では信頼性が高いと考えられる。またHE染色永久標本ではn<sub>0</sub>と診断されたものの、RT-PCRにてSNの2個にCK-18とMMP-7の発現が認められた1例に対し、CK-18およびCEAの免疫組織学的染色を施行したところ非SN3個に微小転移と思われる陽性細胞が検出されたことも、今回のRT-PCRによる微小転移検出の信頼性をうらづけるものと考えられる。

MMPは細胞外基質分解酵素であり、多くのMMPが間質細胞からも分泌されるのに対し、MMP-7は間質細胞やリンパ球からの分泌はなく癌細胞から分泌され<sup>24)25)</sup>、このことは微小転移検出時の偽陽性回避に有用であると考えられる。またMMP-7は脈管基底膜の主成分であるIV型コラーゲン(type-IV collagen)のみならず多くの基質に作用することが特徴で<sup>26)</sup>、胃がんにおいては深達度、脈管侵襲、遠隔転移に関与しているとされ

る<sup>25)27)</sup>。そこでSNにおけるMMP-7の発現をみることで、微小転移の検出だけでなく、非SNの転移状況予測の検討もおこなった。SNにMMP-7の発現を認めた3例は非SNに転移を有するものであった。中でも1例はHE染色永久標本では $n_0$ と診断されたものの、RT-PCRにてSN 2個にCK-18とMMP-7の発現が認められたため、CK-18およびCEAの免疫組織学的染色を施行したところ非SN 3個に微小転移が検出された例である。

またMUC-1に関しても同様の検討をおこなったが、SNにおけるMUC-1の発現と非SNにおける転移状況に関連は認められなかった。MUC-1は50%以上が糖鎖からなる分子量20,000以上の糖蛋白であるムチンの1つで上皮細胞表面の滑化作用を担っている。MUC-1には、中心のコア蛋白に糖鎖がまばらに結合した未成熟型と、コア蛋白を覆い隠すように相当数の糖鎖が結合した成熟型とがあり、腫瘍性MUC-1のコア蛋白には抗原性があることから未成熟型MUC-1は腫瘍免疫の標的の1つであるのに対し、成熟型MUC-1は免疫回避のひとつの因子であるとされる<sup>28)</sup>。胃がんにおいては、成熟型MUC-1のみがリンパ管侵襲、リンパ節転移に関与しているとされる<sup>29)</sup>。しかし、RT-PCRでは未成熟型MUC-1をふくめた全MUC-1を評価していることから、SNにおけるMUC-1の発現と非SNにおける転移状況に関連がなかったと考えている。その結果、SNにおけるMMP-7の発現のみが非SNにおける転移状況を予測するのに有用である可能性が示唆されたのに対し、MUC-1はむしろ上皮特異的のマーカースとして微小転移の存在診断にのみ有用であったといえる。

以上、CK-18・CEA・hTERT・MMP-7・MUC-1の5つの因子のRT-PCRによる微小転移検出は、HE染色永久標本単独の診断より正診率の点で有用であった。現在、色素法にて同定された胃がんSNは、単にSNのみを摘出するいわゆるSNBではなく、ある程度の郭清効果を目的に周囲結合織とともに摘出するSNDとして行っているが、病理組織学的検索では検出できない転移が存在することからも安全な方法であるといえる。しかし、至適郭清範囲の決定には、よりよい微小転移検出方法や非SN転移予測因子の検討が必要である。

## 結 論

胃がん30例から色素法にて得たSN 184個を対象に、CK-18・CEA・hTERT・MMP-7・MUC-1のRT-PCRによる微小転移検出を検討し、以下の結果を得た。

1. HE染色永久標本にて転移が認められたものは5例8個(4.3%)であったのに対し、RT-PCRで発現が認められたものは、6例でCK-18 15個(8.2%)、CEA 12個(6.5%)、hTERT 10個(5.4%)、MMP-7 4個(2.2%)、MUC-1 12個(6.5%)で、合計25個(13.6%)と、転移リンパ節個数は約3倍に増加した。

2. HE染色永久標本にて転移を認めず、RT-PCRにより発現が認められた1例は、のちのCK-18免疫組織染色にて非SNに微小転移を確認できた。

3. 転移陽性6例中、SNにMMP-7の発現を認めた3例は非SNにも転移を有するものであった。またSNにMMP-7の発現を認めなかった3例はSNのみに転移を有するものであった。

以上より、SNの微小転移は、HE染色による組織診断より、RT-PCRによる複数の腫瘍関連マーカーの検索で、より正確に診断できると結論された。またSNにおけるMMP-7の発現は、非SNの転移予測に有用である可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師三輪晃一教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導、御鞭撻を頂きました金沢大学医学部外科学第二講座伏田幸夫助手に深謝致します。さらに、御支援、御協力を頂きました金沢大学医学部外科学第二講座の皆様へ感謝いたします。

## 文 献

- 1) Borgstein P, Meijer S. Historical perspective of lymphatic tumour spread and the emergence of the sentinel node concept. *Eur J Surg Oncol* 24: 85-95, 1998
- 2) Cabanas R. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 39: 456-466, 1977
- 3) Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 27: 392-399, 1992
- 4) Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol* 2: 335-340, 1993
- 5) Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 220: 398-401, 1994
- 6) 三輪晃一. 胃癌縮小手術における根治性確保の工夫：内視鏡的リンパ系描出法 (endoscopic lymphatic mapping: ELM). *医学のあゆみ* 170: 940-941, 1994
- 7) 胃癌研究会編. 胃癌取り扱い規約, 改訂12版, 1-89頁, 金原出版株式会社, 東京, 1993
- 8) Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnott HD, Combes RC. Detection of breast cancer micrometastases by using polymerase chain reaction. *Cancer Res* 54: 2986-2990, 1994
- 9) Hoon D, Doi F, Giuliano AE, Schmid P, Conrad AJ. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 76: 533-534, 1995
- 10) Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nabara S, Ueo H, Akiyoshi T. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse-transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 55: 3417-3429, 1995
- 11) Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 148: 649-656, 1996
- 12) Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, Doeberitz MK. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 4: 343-348, 1998
- 13) Tschentscher P, Wagener C, Neumaier M. Sensitive and specific cytokeratin 18 reverse transcription-polymerase chain reaction that excludes amplification of processed pseudogenes from contaminating genomic DNA. *Clin Chem* 43: 2244-2250, 1997



- 14) Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12: 725-729, 1994
- 15) Yashima K, Piatyszek MA, Saboorian HM, Virmani AK, Brown D, Shay JW, Gazdar AF. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. *J Clin Pathol* 50: 110-117, 1997
- 16) Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L, Armand JP, Boussin FD, Sabatier L. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 5: 971-975, 1999
- 17) 中島元夫: 癌転移の分子機構. *日臨* 53: 1563-1570, 1995
- 18) Shiraishi T, Mori M, Yamagata M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K. Expression of insulin-like growth factor 2 mRNA in human gastric cancer. *Int J Oncol* 13: 519-523, 1998
- 19) Kaji M, Yonemura Y, Harada S, Liu X, Terada I, Yamamoto H. Participation of c-met in the progression of human gastric cancers: anti-c-met oligonucleotides inhibit proliferation or invasiveness of gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 6: 393-404, 1996
- 20) Maehara Y, Oshiro T, Endo K, Baba H, Oda S, Ichiyoshi Y, Kohnoe S, Sugimachi K. Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 119: 397-402, 1996
- 21) Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J Clin Oncology* 16: 128-132, 1998
- 22) Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg* 222: 394-401, 1995
- 23) Bostick PJ, Huynh KT, Sarantou T, Turner RR, Qi K, Giuliano AE, Hoon DSB. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple-marker RT-PCR. *Int J Cancer* 79: 645-651, 1998
- 24) McDonnell S, Navre M, Coffey RJ, Matrisian M. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas. *Molecular Carcinogenesis* 4: 527-533, 1991
- 25) Honda M, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Matrix metalloproteinase-7 expression in gastric carcinoma. *Gut* 39: 444-448, 1996
- 26) Sires UI, Griffin GL, Broekelmann TJ, Mecham RP, Murphy G, Chung AE, Welgus HG, Senior RM. Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 268: 2069-2074, 1993
- 27) Yamashita K, Azumano I, Mai M, Okada Y. Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis. *Int J Cancer* 79: 187-194, 1998
- 28) Bara J, Imberty A, Perez S, Imai K, Yachi A, Oriol R. A fucose residue can mask the MUC-1 epitopes in normal and cancerous gastric mucosae. *Int J Cancer* 54: 607-613, 1993
- 29) Reis CA, David L, Seixas M, Burchell J, Sobrinho-Simoes M. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC-1 mucin in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 79: 402-410, 1998

**Detection of Micrometastases in Sentinel Nodes of Gastric Cancer Patients by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction of Tumor-Related Markers** Hideyuki Ajisaka, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **108**, 620 — 627 (1999)

**Key words** gastric cancer, sentinel node, micrometastasis, reverse transcription-polymerase chain reaction, matrix metalloproteinase-7

#### Abstract

This study was performed to determine whether tumor-related markers such as epithelial or tumor markers were useful for detection of micrometastases in the sentinel nodes (SNs) of gastric cancer patients. The SN is the first draining lymph node from the primary tumor. Expression of cytokeratin-18 (CK-18), carcinoembryonic antigen (CEA), human telomerase reverse transcriptase (hTERT), matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and MUC-1 were evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 184 SNs detected from 30 cases of gastric cancer by intra operative endoscopic lymphatic mapping using blue dye. By HE staining, histopathological metastases were found to be present in 8 SNs (4.3%) of 5 cases. By RT-PCR, CK-18 was expressed in 15 SNs (8.2%), CEA in 12 SNs (6.5%), hTERT in 10 SNs (5.4%), MMP-7 in 4 SNs (2.2%), MUC-1 in 12 SNs (6.5%) and any one of them in 25 SNs (13.6%) of 6 cases. Of these 6 cases, one who had no metastases by HE staining had micrometastases in non-SNs by immunohistochemistry of CK-18. These results suggest that RT-PCR of multiple markers in SNs is useful for detecting micrometastases.