日消外会誌　30（4）：891～896，1997年

特集2

分子生物学的アプローチによる血液中およびリンパ節内微小癌細胞の検出とその臨床応用

大阪府立成人病センター第1外科
タカラアドバンスドバイオメディカルセンター[1)]
東京大学医科学研究所分子病態研究施設
兼，大阪大学医学部バイオメディカルセンター臨床遺伝学講座[2)]

中森　正二　亀山　雅男　今岡　真義　安田　卓司
甲　利幸　平塚　正弘　古河　洋　大東　弘明
石川　治　相原　智彦　中野　博史　佐々木　洋
岩永　剛　武田　理[1)]　中村　祐輔[2)]

大腸癌細胞の分子生物学的特性を利用し，血液中やリンパ節内の微小癌病巣の検出が遺伝子レベルで可能であるか検討した．血液中癌細胞の検出は，末梢血および腫瘍部位からの流出静脈血中でのサイトケラチン19および20遺伝子発現を指標として行い，リンパ節内の微小癌病巣の検出は，パラフィン包埋材料を用い，原発巣と同一のK-ras，p53遺伝子変異がリンパ節において認められるかを検討した．その結果，22例中4例の大腸癌患者で血液中癌細胞の存在が認められた．サイトケラチン免疫染色による細胞診は，全例陰性であった．また，病理組織学的にn（－）と診断された109例の大腸癌中20例のリンパ節に原発巣と同一遺伝子変異が検出され，うち13例に再発が認められた．以上より，分子生物学的手法を用いることにより，従来の方法では検出されなかった微小癌細胞が証明され，その臨床応用の可能性が示された．

Key words: genetic diagnosis, micrometastatsis, colorectal cancer

はじめに

癌の進展度を正確に判定することは，切除範囲の決定や予後の推定，それに基づく術後補助療法の選択など治療方針を決定する上で極めて重要なことである．従来，進展度の判定は特に消化管の癌において，腫瘍の深達度や浸潤の程度，リンパ節転移の程度など，術前の画像診断，術後は摘出標本の詳細な病理組織学的検索に基づき行われてきた．しかし，画像診断や病理組織学的診断では把握できない癌の進展も存在し，必ずしも臨床経過が正確に反映されない場合も少なからず経験される．その原因として，従来の病理組織学的診断などでは見逃されていた微小癌病巣の存在が考えられる．

最近，癌の分子生物学的研究の進歩により，癌の分子生物学的特性が明らかにされつつあり，また，polymerase chain reaction（PCR）法のような微量検体の解析が可能となる技術が確立されてきている．このような理解や手法に基づき，血液中やリンパ節に存在する微小癌病巣を検出し，癌の進展度判定をより正確に行い，治療法の決定などに役立てようとする研究も盛んに行われつつある[1)2)]．今回，われわれは大腸癌において，癌細胞の持つ分子生物学的特性を利用することにより，遺伝子レベルで血液中やリンパ節内の微小癌病巣の診断が可能か否かを調べ，その進展度指標としての臨床的意義を検討した．

対象と方法

1．血液中癌細胞検出

大腸癌切除例22例を対象とした．その内訳は，stage I：1例，stage II：7例，stage III：4例，stage IV：

＊第48回日消外会総会シンポ1・消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開
＜1996年12月11日受理＞別刷請求先：中森　正二
〒537　大阪市東成区中道1－3－3　大阪府立成人病センター第1外科

7例，肝または肺転移切除例：3例である．手術直前に末梢血，開腹直後に腫瘍存在部位からの流出静脈血をそれぞれ20mlヘパリン加採血し，半量の10mlから単核球成分のみを分離しRNAを抽出し解析に用いた．肝または肺転移切除例は末梢血のみを採取した．また，対照として健常人14名の末梢血を用いた．

癌細胞の存在は上皮細胞特異的に発現するサイトケラチン(CK) 19および20mRNAの発現を指標とした．分離した単核球成分からRNAを抽出し，reverse transcriptase (RT)-PCR法により，CK19および20 mRNAのRT-PCR産物を増幅，アガロース電気泳動を行いゲル上でエチレンブロマイドに染色されるバンドとしてCK増幅産物を検出することにより判定した．偽陽性例を避けるため，判定はduplicateにて行い，両回とも検出された場合を血液中癌細胞陽性［bc(+)］と判定した．同時に，採取血液の半量の10mlを用いて抗サイトケラチン抗体による免疫染色細胞診を併せて行った．

2．リンパ節内微小癌病巣検出

手術後の病理組織学的診断によりリンパ節転移陰性［n (−)］と診断された大腸癌切除例109例のパラフィン包埋材料を用いた．その内訳は経過観察中に再発が認められた29例と，同時期に手術が行われ術後5年以上経過し現在まで再発が認められていない80例である．まず，原発巣からDNAを抽出し，原発巣におけるK-ras, p53遺伝子変異を検索した．K-rasの遺伝子変異はコドン12，13，61の部分をMutant Allele-Specific Amplification (MASA) 法[3]により検出，p53遺伝子変異に関しては，PCR法により増幅したエクソン5～8の部分を直接シークエンスすることにより検出した．原発巣にK-ras，p53遺伝子変異を認めた症例について，パラフィン包埋したリンパ節よりDNAを抽出し，原発巣と同一遺伝子変異の検出をMASA法により行った．リンパ節に遺伝子変異の認められた場合を分子遺伝学的リンパ節転移陽性［gn (+)］と判定した．

結　果

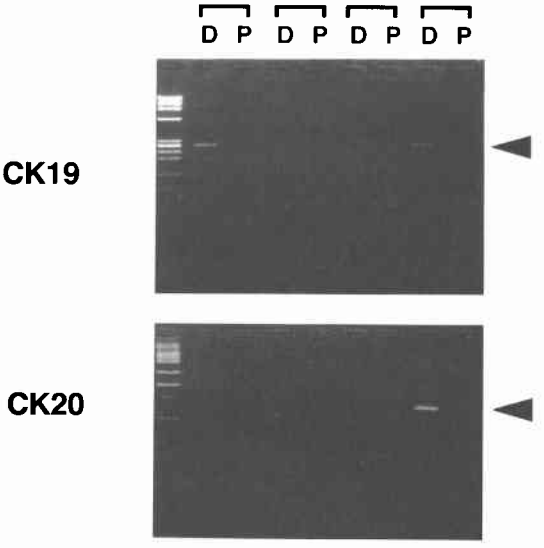
1．血液中癌細胞検出

健常人14例の末梢血中，第1回目の判定では3例にCK19のRT-PCR産物が検出された．しかし，RT-PCR反応を再度行うと，3例ではRT-PCR産物は検出されず，他の1例に検出された．しかし，duplicateにてCK19RT-PCR産物が検出された症例は認められなかった．CK20RT-PCR産物は，健常人において2回の反応とも検出されなかった（**Table 1**）．

Table 1　Detection of CK RT-PCR product in peripheral blood samples from 14 healthy controls

Assay	No. of CK RT-PCR product detected/ No. of samples tested	
	CK19	CK20
1st	3/14	0/14
2nd	1/14	0/14
Both［bc(+)］	0/14	0/14

Fig. 1　Profiles of the detection of CK RT-PCR product in blood sample obtained from drainage-vein (D) and peripheral-vein (P) of colorectal cancer patients. Arrows indicate the detected CK RT-PCR products. Upper: detection for CK19. Lowere: Detection for CK20. Right lane: Molecular size marker



大腸癌22症例の血液中のCK遺伝子RT-PCR産物の検出を行った（**Fig. 1**）．4例の腫瘍部位流出静脈血中においてduplicateでCK19RT-PCR産物が検出されbc(+)と判定され，うち1例は末梢血中でもCK19が検出された．また，4例中の2例はCK20もbc(+)であった．一方，22症例の血液細胞診は，抗サイトケラチン抗体による免疫染色細胞診では全例陰性であった（**Table 2**）．なお，腫瘍部位からの流出静脈血がbc(+)であった4例のうち，1例はstage II，3例はstage IVの症例であり，stage IVの1例は，末梢血もbc(+)と診断された症例であった（**Table 3**）．

Table 2 Detection of CK RT-PCR product in blood samples from 22 colorectal cancer patients

Assay	No. of RT-PCR product detected/ No. of samples tested				No. of positive/ No. of samples tested	
	CK19		CK20		Immunocytology[a]	
	Peripheral	Drainage[b]	Peripheral	Drainage[b]	Peripheral	Drainage
1st	5/22	6/19	0/22	2[c]/19	0/22	0/19
2nd	2/22	5/19	0/22	2[c]/19		
Both [bc(+)]	1/22	4/19	0/22	2[c]/19		

[a]: Single test
[b]: Three patients who underwent resection for distant metastasis were omitted
[c]: CK19 RT-PCR was also detected

Table 3 Results of CK RT-PCR assay according to the clinical stage

Srage[a]	No. of bc(+)/ No. of patients tested	
	Drainage	Peripheral
Stage I (n=1)	0/1	0/1
Stage II (n=7)	1/7	0/7
Srage III (n=4)	0/4	0/4
Stage IV (n=7)	3/7	1[b]/7
Distant metastasis (n=3)	n.t.	0/3

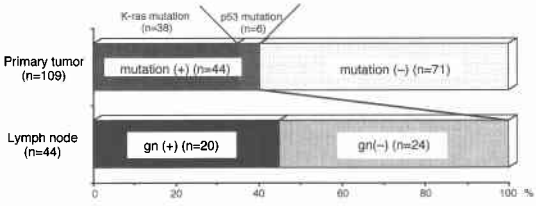
n.t.: Not tested
[a]: According to the criteria of the Japanese Research Society for Cancer of the Colon and Rectum
[b]: Drainage-vein was also bc(+).

検討した22症例は手術後1から3年の経過観察中であり，stage IV でbc（＋）となった3症例は遠隔転移巣が切除不可能であった根治度Cの症例で，化学療法の効果無く手術後1年以内に死亡した．なお，stage II でbc（＋）であった1例は，術後20カ月の現在も再発を認めていない．また，bc（－）であった15例（stage I～III：11例，stage IV 根治度B：1例，遠隔転移切除：3例）は現在まで無再発生存中であるが，bc（－）でも stage IV 根治度Bの1例は局所再発で，根治度Cの2例は，肝および肺転移で死亡した．

2．リンパ節内微小癌病巣検出

原発巣パラフィン包埋材料より腫瘍部分のみを採取し，DNA を抽出した．その DNA を用い，K-ras または p53遺伝子変異を検索した．K-ras に関しては，全例 PCR 法により遺伝子増幅が可能であり，38例に点突然変異が認められた．p53遺伝子変異は，K-ras 遺伝子変異が認められなかった71例に関して検索を行った．1/3程しか PCR 法による遺伝子増幅が可能ではなく，6例にエクソン5から8の間に遺伝子変異を認めた．K-ras または p53遺伝子に変異を認めた44症例に関して，パラフィン包埋したリンパより DNA を抽出し，原発巣と同一の遺伝子変異があるかを検索した．その結果20例のリンパ節において原発巣と同一遺伝子変異が見出され gn（＋）と診断された（**Fig. 2**）．

Fig. 2 Frequency of gene mutation in the primary tumors and lymph nodes.



K-ras 遺伝子または p53遺伝子に変異を認めた44症例について，gn の有無別の背景因子は年齢，性，原発腫瘍存在部位，組織分化度，深達度，脈管侵襲の有無，郭清したリンパ節の個数に差は無かったが，再発の有無に有意差を認め，gn（＋）の20例中13例（65%）に術後再発があったにも関わらず，gn（－）の24例には再発例を認めなかった（**Table 4**）．

また，gn（＋）の20例の各リンパ節群における遺伝子変異検出の程度は，1群にのみ認めたものが4症例であり，2群以上に遺伝子変異を認めたものは16例も存在した．再発した13例の再発部位は，11例が肝または肺の遠隔転移であり，2例が局所再発であった．1群リンパ節のみが gn（＋）であった症例の再発部位はすべて遠隔臓器であり，局所再発した2例は，2群以上のリンパ節が gn（＋）であった（**Table 5**）．

考　察

流血中の癌細胞を検出し，転移の予測や癌の転移機

Table 4　Clinicopathologic features according to gn status

Variables[a]	gn(+) [n=20]	gn(−) [n=24]	P value[b]
Sex (man/woman)	10/10	16/8	0.42
Age (years ; means±SD)	61.5±7.9	59.0±12.4	0.44
Tumor location (rt. colon/lt. colon/rectum)	9/3/8	8/9/7	0.25
Histology (well/mod, por)	13/7	19/5	0.48
T stage (t1, 2/t3, 4)	14/6	11/13	0.19
Lymphatic invasion [ly(−)/ly(+)]	14/6	15/9	0.84
venous invasion [v(−)/v(+)]	15/5	17/7	1.00
No. of lymph nodes dissected (mean±SD)	17.8±11.8	15.8±7.8	0.50
Disease recurrence (Yes/No)	13/7	0/24	0.00

[a] : According to the criteria of the Japanese Research Society for Cancer of the Colon and Rectum

[b] : Student's test or Chi square test

Table 5　Extent of gn positive lymph nodes and patterns of disease recurrence

Recurrence status	Extent of gn(+)[a]	
	≤Group 1 (n=4)	Group 2≤ (n=16)
No recurrence	1	6
Recurrence	3	10
Local	0	2
Distant	3	8

[a] : According to the criteria of the Japanese Research Society for Cancer of the Colon and Rectum

構を解明しようとする試みはかなり以前から行われていたが，形態的特徴を指標とする細胞診による診断のため，診断基準のあいまいさから客観性に問題があった．さらに，近年，従来の形態学的手法と異なるアプローチとして，RT-PCR 法を用いた特異性および感度のより高い手法での血液中の癌細胞検出が可能となったが[4)5)]，臨床的意義はいまだ定まっておらず，検出方法や判定法に関してはまだ解決されるべき点は多く残っている．今回の検討でも，かなり進行した大腸癌症例に bc（+）例が多く，化学療法などの治療効果の判定に利用できる可能性が認められた．しかし，bc（+）で転移再発を来さない症例やすでに遠隔転移を認める進行癌で bc（−）例もあり，血液中の癌細胞検出を臨床応用するためには，今後さらに多くの症例で臨床経過との対比を行い，臨床的意義を検討していく必要がある．

今回は RT-PCR 法を利用した血中の大腸癌細胞の検出マーカーとして，大腸癌に特異的に発現する有用なマーカーはないことから，乳癌[4)]や肺癌[5)]での報告に準じて上皮系細胞の指標である CK19を用いた．また，最近 CK20が上皮細胞の中でも大腸上皮にかなり特異的に発現することが報告され[6)]，CK19と併せて検出マーカーとなりえるか検討した．

大腸癌培養細胞を健常人血液に加えて行った検出感度実験で CK19および CK20ともに末梢血単核球細胞 10^6個あたり 1 個（ほぼ血液数 ml あたり 1 個に相当）癌細胞を検出可能となるような PCR 反応の増幅回数を今回の検討では選択したが，この感度では，一部に健常人末梢血中に CK19増幅産物が検出された．線維芽細胞や血管内皮細胞での CK19の発現の報告もあり，RT-PCR 法のような感度の高い検出法を用いる限り，採血時混入した線維芽細胞や血管内皮細胞からや血液系細胞からのごくわずかな CK19を検出する可能性も完全に否定できない．また，今回の検出感度では，同一サンプルで CK19が検出されたりされなかったりすることから，混入程度はアッセイ法の検出感度限界にあるものと考えられる．したがって，われわれが今回行ったように duplicate で RT-PCR 反応を行いともに検出された場合を陽性と診断したり，CK20は健常人では検出されなかったことから，CK20の検出も同時に行い，どちらも検出された場合を陽性と判定するなど，擬陽性例を減らし特異性を上げる工夫が，今後本法を臨床応用していく上では必要であろう．

なお，CK19, 20ともに PCR 増幅回数を増すことで，さらに10倍ほど検出感度を上げることが可能であったが，健常人血液における CK 増幅産物の検出率も同時に上がり特異性に問題が生じた．さらに，高感度となることにより，採取した血液中の癌細胞の割合がよく

わずかでも検出が可能となるが，当然，採取血液量も増やさなければならない．したがって，臨床応用のためには，われわれが用いたアッセイ法程度の感度が至適なのかもしれない．また，これまでのRT-PCR法を利用した血液中癌細胞の検出は定性的な判定であり，今後判定法に客観性を持たすよう定量的な検討も必要となると思われる．現在，competition PCR法を用いたCK増幅産物検出の定量化の検討も行っているが，CKmRNA発現細胞が血液数mlに1個程度存在を定量するまでのところには至っていない．

このほか，検出法の工夫として，大腸癌に特異的なマーカーが無い現段階において，リンパ節中の癌細胞検出に用いたようにK-ras, p53遺伝子変異を利用することも可能と考えられる．しかし，全DNAに占めるこれら遺伝子の大きさを考慮すると，DNAを用いた場合の検出率は計算上極端に低くなる．検出率を上げるためには，血液中の癌細胞を検出した際と同様にmRNAを利用したRT-PCRを行う必要があり，現在その条件を検討中である．

これまで，リンパ節転移の微小な癌病巣を見出すには，連続切片の作製や免疫染色による検索が行われてきたが，多くの労力と時間が必要であった．今回，われわれは，大腸癌において高頻度に認められるK-ras, p53遺伝子変異を指標とすることで，リンパ節中の微小癌病巣の検出が可能であることを報告した．Retrospective検討であることから，保存したパラフィン包埋した材料から薄切を行いDNAを抽出したが，実際に臨床応用する場合は，摘出したリンパ節から直接DNAを抽出し，PCR法で増幅し電気泳動後染色して判定すればよいことになる．PCR法や電気泳動は容易に行える簡便手法であり，手術前に生検材料を用いて原発腫瘍の遺伝子変異が判明している限り，PCR法の条件の設定さえ確立していれば，特別な経験や技術無しでリンパ節転移を診断できる可能性がある．DNAを用いることからRNAのように取り扱いに注意する必要もなく，最も手間のかかるDNA抽出の段階も自動DNA抽出装置の使用が可能となっており，現在のような病理標本作製システムと同様な規格化されたシステムが整備されれば，より迅速で効率化した診断が可能であろう．

しかしながら，K-rasやp53遺伝子変異は大腸癌80%程度にしか見いだせないので，すべての大腸癌に本法が利用できるわけではない．また，K-rasやp53遺伝子変異の低い胃癌や乳癌には応用することには問題がある．さらに，リンパ節中にK-rasやp53遺伝子変異が検出されても，すべてが転移巣を生じているのではなく，リンパ節中の血液細胞に呑食された癌細胞のDNA断片を検出している可能性もある．決して，リンパ節中の遺伝子変異検出イコールリンパ節転移という公式にならないことを理解しておくべきである．

リンパ節中の遺伝子変異検出については，retrospective検討中ではあるが，gn（＋）例の一部に再発例が見られ，gn（－）例には再発が認められなかった．したがって，リンパ節における遺伝子変異の検出が必ずしもリンパ節転移を示していなくとも，gnの判定結果が癌細胞の拡がりの程度をある程度反映していると考えられる．今後，n（－）大腸癌の術後補助療法などの決定を選択する上での指標となりえる可能性は高い．

最後に，今回報告したような遺伝子診断は，現在行われつつあるprospective検討によりその臨床的意義は最終的に決定されるべきものと考える．しかしながら，少なくとも現行の病理診断に基づいた癌の進展度判定を補助するものであることは確実であろう．消化器癌の領域においては，遺伝子を扱うことはいまだ特別なことのように考えられ実験室レベルでの研究の域を越えていない．モノクロナール抗体の技術が腫瘍マーカーのように一般的な検査室レベルのものになったように，また，PCRの技術が細菌検査に応用されるようになった現在，今後，癌の遺伝子診断のより実用的な技術やシステムの構築を臨床の場で進めていく必要があろう．

なお，本論文の要旨は第48回日本消化器外科学会総会シンポジウム1－消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開－において発表した．

文　献

1) Nakamori S, Tamura S, Arai I et al: Detection of rare circulating colorectal cancer cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction using cytokeratin gene. Edited by Tahara E. Proceeding of the First International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis. Monduzzi Editore, Bologna, 1996 p1051—1054
2) Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A et al: Genetic diagnosis of lymphnode metastasis in colorectal cancer. Lancet **345**: 1257—1259, 1995
3) Takeda S, Ichii S, Nakamura Y: Detection of K-ras mutation in sputum by mutant -allele-specification (MASA). Human Mut **2**: 112—

117, 1993
4) Datta YH, Adams PT, Drobyski WR et al: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Oncol 12 : 475—482, 1994
5) Krismann M, Todt B, Schroder J et al: Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis for detection of hematogenous lung cancer dissemination. J Clin Oncol 13 : 2769—2775, 1995
6) Moll R, Lowe A, Lauffer J et al: Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol 140 : 427—427, 1992

Genetic Detection of Circulating Cancer Cells and Micrometastasis in the Lymph Node

Shoji Nakamori, Masao Kameyama, Shingi Imaoka, Takushi Yasuda, Toshiyuki Kabuto, Masahiro Hiratsuka, Hiroshi Furukawa, Hiroaki Ohigashi, Osamu Ishikawa, Tomohiko Aihara, Hiroshi Nakano, Yo Sasaki, Takeshi Iwanaga, Osamu Takeda[1] and Yusuke Nakamura[2]
The First Department of Surgery, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases
Takara Advanced Biomedical Center[1], Laboratory of Molecular Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo, and Division of Clinical Genetics, Department of Medical Genetics, Biomedical Research Center, Osaka University Medical School[2]

We investigated the possibility of genetically detecting the rare colorectal cancer cells in blood and lymph nodes histologically negative for metastasis. Using an RT-PCR assay system for the detection of rare circulating colorectal cancer cells, employing cytokeratin (CK) mRNA expression as a marker, four of 22 samples were found to be positive for CK. One stage II patient and three stage IV patients were positive for CK in drainage-vein blood. One of the three stage IV patients was positive for CK in both drainage-vein and peripheral blood. None of the d22 samples examined were immunocytologically negative for anti-CK antibody. We also screened 109 colorectal cancers from patients without histologically detectable lymph node metastasis for mutations of the K-ras or p53 oncogene and identified 44 tumors as being positive for one of the two mutations. Among the 44 patients with mutation positive tumors, 20 had the same mutation in lymph nodes as in the primary tumors. Furthermore, among the 20 patients with genetically positive lymph nodes, 13 had recurrences within 5 years after surgery, while none of the patients with genetically negative lymph nodes developed recurrence. These data indicate that the rare colorectal cancer cells in blood or lymph nodes, histologically negative for metastasis, are geneticaly detectable. This genetic detection system may be clinically applicable for stratifying patients who are at high versus low risk for recurrence.

Reprint requests: Shoji Nakamori The First Department of Surgery, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases
1-3-3 Nakamichi, Higashinari, Osaka, 537 JAPAN