

論 文 要 旨

Sentinel Node Micrometastases Have High Proliferative Potential in Gastric Cancer

胃癌におけるセンチネルリンパ節の微小転移は
高い増殖活性を有する

柳田 茂寛

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

近年、早期胃癌の割合が増加しており、内視鏡的粘膜切除術、腹腔鏡下胃切除術などの治療法が開発されている。また、Sentinel node (SN) conceptに基づいたリンパ節郭清範囲の省略による縮小手術が考案されている。SNは、“腫瘍から最初にリンパ流を受けるセンチネルリンパ節 (SN) が存在し、癌の微小転移はまずこのリンパ節より生じる”という概念であり、すでに乳癌やメラノーマでSN navigation surgery (SNNS)の臨床応用が行われている。リンパ節転移に関してTNM分類第6版では、0.2mmより大きく2mm以下のリンパ節転移巣をmicrometastasis (MM)、0.2mm以下のリンパ節転移巣をisolated tumor cells (ITC)と定義されている。胃癌におけるリンパ節転移は重要な予後因子であるが、MMやITCのリンパ節微小転移の臨床的意義に関しては未だに不明である。また、MMやITCがリンパ節内で生着し、増殖する過程は明らかにされていない。本研究はSNのMMやITCを含めた微小転移巣が増殖活性を有するか否かについてKi-67の発現を調べることにより検討した。

【材料および方法】

臨床研究倫理委員会の承認後、インフォームド・コンセントの得られた2001年から2005年までの術前診断cT1-2, N0の胃癌切除133例(cT1 N0; 104例, cT2 N0; 29例)を対象とした。

SNの同定については、手術前日に^{99m}Tc-Tinコロイドを内視鏡下に腫瘍周囲の粘膜下層4カ所へ0.5mlずつ注入した。手術中にGPS NavigatorによりSNの検索を行い、RI活性をもつリンパ節をSNとした。術後は郭清した全ての摘出リンパ節をマッピング後、再度RI活性の測定を行った。

腫瘍部におけるKi-67の発現を免疫組織学的染色により評価し、臨床病理学的因子との関係を検討した。リンパ節転移や微小転移はHematoxylin-Eosin (HE)染色、抗サイトケラチン抗体(AE1/AE3)を用いた免疫染色により診断し、転移巣の大きさはTNM分類の第6版に基づき、macrometastasis, MM, ITCに分類した。リンパ節内の転移巣における増殖活性は、抗サイトケラチン抗体とKi-67抗体による二重免疫染色を行い評価した。統計学的評価は χ^2 検定で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結 果】

1) 胃癌切除症例133例中、131例にSNが同定され、同定率は98.5%であった。cT1, N0の全例でSNは同定され、cT2, N0では29例中27例(93%)で同定された。cT1, N0の10例に転移がみられたが、すべてSNに転移が含まれていた(転移検出感度: 100%)。

また、cT2, N0の10例中9例ではSNに転移を認めた(転移検出感度: 90%)。

における増殖活性は、抗サイトケラチン抗体と Ki-67 抗体による二重免疫染色を行い評価した。統計学的評価は χ^2 検定で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

- 1) 胃癌切除症例 133 例中、131 例に SN が同定され、同定率は 98.5%であった。cT1, N0 の全例で SN は同定され、cT2, N0 では 29 例中 27 例(93%)で同定された。cT1, N0 の 10 例に転移がみられたが、すべて SN に転移が含まれていた(転移検出感度: 100%)。また、cT2, N0 の 10 例中 9 例では SN に転移を認めた(転移検出感度: 90%)。
- 2) リンパ節転移は 19 例、52 個の SN に認められたが、HE 染色で診断できたのは 14 例 22 個であった。HE 染色にて転移なしと診断された残る 112 例のうち、免疫染色で 5 例 30 個の SN に転移を認めた。転移形態では Macrometastasis は 25 個(48%)、MM は 13 個(25%)、ITC は 14 個(25%)であった。HE 染色で診断された症例は macrometastasis の 64%、MM の 23%、ITC の 21%であった。
- 3) 腫瘍の Ki-67 発現は、腫瘍深達度($p=0.0119$)、リンパ管侵襲($p=0.0001$)、静脈侵襲($p < 0.0001$)、リンパ節転移($p < 0.0001$)と有意な相関がみられた。
- 4) リンパ節転移の Ki-67 発現は、Macrometastasis, MM, ITC で各々 96%、92%、29%で認められた。

【考察】

胃癌の外科治療において SNNS を施行する場合、正確なリンパ節転移診断が必要である。今回の検討ではほとんどの症例において SN 内に MM を含め転移が認められた。MM, ITC における臨床的意義は現時点で統一した見解は得られていない。とくに微小転移が潜在的な増殖能を有するか否かも明確ではなかった。本研究において、2mm より大きな転移や MM では 90%以上において増殖活性があることが明らかとなった。さらに、ITC においても約 30%に増殖活性が認められた。SN のこれら転移巣はリンパ節転移内において生着増殖し、臨床的に意義をもったリンパ節転移となる可能性が示唆された。したがって、現時点では MM や ITC は治療上無視できないと考えられた。また、リンパ節転移診断では Macrometastasis の 36%、MM の 77%、ITC の 79%は通常組織診断では診断できず、免疫染色でのみ診断されていた。したがって、正確な転移診断には免疫染色の必要性が示唆された。

現在、リンパ節転移の組織学的診断は最大断面のみで行われているが、SNNS による安全な縮小手術を行うためには、リンパ節全体の転移診断が必要である。将来的には組織診断に加え、RT-PCR 法によるリンパ節転移検索が必要と考えられる。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 24 号	学位申請者	柳田 茂寛
審査委員	主査	米澤 傑	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	高松 英夫	副査 金蔵 拓郎
	副査	松根 彰志	副査 中別府良昭

Sentinel Node Micrometastases Have High Proliferative Potential in Gastric Cancer
 (胃癌におけるセンチネルリンパ節の微小転移は高い増殖活性を有する)

検診の普及により早期胃癌の割合が増加しており、低侵襲性治療として内視鏡的粘膜切除術、腹腔鏡下胃切除術などが施行されている。また、近年最初に転移が起こるリンパ節である Sentinel node (SN)を検出する試みが行われており、SN concept に基づいたリンパ節郭清の縮小も考案されている。リンパ節転移は胃癌の重要な予後因子のひとつである。TNM 分類第 6 版では、0.2mm~2mm 以下のリンパ節転移を Micrometastasis(MM)、0.2mm 以下のリンパ節転移を Isolated tumor cell (ITC) と定義している。しかし、その臨床的意義は未だ不明であり、微小転移がリンパ節内で生着・増殖するかは明らかにされていない。今回、学位申請者らは Radio isotope 法により SN mapping を施行した胃癌 133 例(cT1:104 例、cT2:29 例)について、原発巣の腫瘍増殖活性を Ki67 の発現で評価するとともに、SN の微小転移巣の増殖活性を抗サイトケラチン抗体(AE1/AE3)と、Ki67 抗体(MIB1)による二重免疫染色により評価した。

その結果、本研究においては以下の知見が明らかにされた。

- 1) 133 例中 131 例に SN が同定され、深達度別同定率は clinical (c) T1 : 100%、cT2 : 93%であった。
- 2) cT1 の 10 例と cT2 の 9 例の計 52 個の SN に転移を認めた。
- 3) SN に転移を認めた 19 例、52 個の SN で、HE 染色で診断されたのは 14 例 22 個であった。残りの 5 例、30 個の SN 転移は免疫染色で発見された転移であった。
- 4) TNM 分類に基づいた転移形態は、2mm 以上の Macrometastasis が 25 個(48%)、MM が 13 個(25%)、ITC が 14 個(27%)であった。Macrometastasis の 64%、MM の 23%、ITC の 21%が HE 染色で診断されていた。
- 5) 原発巣の Ki67 発現は腫瘍深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移と有意な相関が認められた。
- 6) SN 転移巣における Ki67 発現は、Macrometastasis で 96%、MM で 92%、ITC で 29%であった。

胃癌で SN navigation surgery (SNNS)を応用した縮小手術を施行する場合、正確なリンパ節転移診断が重要である。本研究の結果より Macrometastasis や MM では高い増殖活性がみられたが、ITC の 29%でも増殖活性が認められた。これらの転移巣はリンパ節内で生着・増殖する可能性が示唆された。したがって、増殖活性を有する MM や ITC は治療の際には無視できないと考えられた。リンパ節転移診断では、Macrometastasis の 36%、MM の 77%、ITC の 79%は HE 染色だけでは診断されず、免疫染色を加えることで検出された。今後、SN navigation surgery による縮小手術を臨床応用していく際には、術中の HE 染色に加え、免疫染色や RT-PCR による微小転移検索が必須と考えられる。

消化器癌の微小転移の臨床的意義は未だ不明である。本研究は胃癌 SN の微小転移巣の増殖活性について検討し、Micrometastasis の 92%、ITC の 29%で増殖活性を有することを明らかにした。胃癌のリンパ節微小転移も現時点では治療対象となることを明らかにした点で非常に興味深く、臨床的意義も大きい。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 24 号	学位申請者	柳田 茂寛
審査委員	主査	米澤 傑	学位 博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	高松 英夫	副査 金蔵 拓郎
	副査	松根 彰志	副査 中別府良昭

主査および副査の5名は、平成19年10月25日、学位申請者 柳田 茂寛 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) センチネルリンパ節 (SN) をどのように判断するのか。

(回答) 本研究の対象は通常の胃切除およびリンパ節郭清がなされた症例である。SNは理論上で存在するリンパ節で、我々が見ているのはRIの取り込まれたリンパ節(hot node)である。本研究では、RIの取り込みがbackgroundの10倍であるリンパ節をSNと定義して検討を行った。

質問2) RIの取り込みが最も高いリンパ節をSNと考えてよいのか。

(回答) RIの取り込み量はリンパ流を反映していると考えられる。少量でもRIの取り込みがあるリンパ節はリンパ流があるためSNと考える。

質問3) SNに転移を認めたら認めないかで、リンパ節郭清範囲は異なるか。

(回答) 本研究では全例で標準郭清を行っている。本研究を基に将来的にはSNに1個でも転移を認める症例では、標準郭清(D2郭清)を行うべきである。一方、SNに転移を認めない症例は縮小手術の対象になると考えられる。

質問4) Table 2で、ITCにおけるKi67の発現が29%であるが、Table1においてもKi67の発現に関するデータを示されている。Table1の意味するところは何か。

(回答) Table1は、原発巣のKi67の発現を、Table2は転移リンパ節巣のKi-67の発現を評価した。評価方法はKi67 labeling indexを用いて評価した。リンパ節転移巣では癌細胞が1個でもKi67発現を認めれば陽性と評価した。Table1は、Ki67発現が腫瘍進行度と相関があることを示している。Table2のリンパ節転移巣のKi67発現は転移巣の癌細胞が増殖活性を有するか評価している。

質問5) AE1/AE3はサイトケラチンの何番を染色するのか。

(回答) AE1はサイトケラチンの10、13、14、15、16、19番を、AE3は1、2、3、4、5、6、7、8番を染色している。

質問6) 胃上皮におけるサイトケラチンは何番が多いのか。

(回答) 8、18、19、20番が陽性になると報告されている。

質問7) detection rateの定義は。

(回答) ResultのDetection of Sentinel node and Lymph Node Metastasesの文においては、前半のdetection rateはSN同定率を意味し、後半のdetection rateはSNに転移を認めた症例の割合(転移検出感度: sensitivity)を意味する。本研究ではcT1症例で転移を認めた10例全例のSNに転移が認められたので転移検出感度は100%であった。

質問8) リンパ節転移を認めた19症例のうち、non-SNにも転移を認めた症例は存在したか。

(回答) cT1の1例、cT2の1例にnon-SNの転移が認められた。

最終試験の結果の要旨

質問 9) Table 2 で増殖活性を認めた ITC は 29% と示されているが、原発巣とリンパ節で発現を比較すると増殖活性はどうかであったか。

(回答) ITC で Ki67 陽性 4 例の原発巣の Ki67 index は、3 例で 40% 以上と Ki67 の高発現がみられた。

質問 10) 胃癌の SN navigation surgery において、術前にシンチグラフィーなどの画像で、SN を同定するのは難しいか、それでも同定できる症例があるか。

(回答) 胃癌では SN が腫瘍に近い場合が多いため、shine through により SN を術前シンチグラフィーで同定できないことが多い。しかし、術中は腫瘍部を遮蔽することにより、GPS ナビゲーターを用いて RI カウントを測定することで容易に SN の同定が可能である。

質問 11) 消化器内科で、EMR の適応拡大の傾向があるが、その場合、SN の転移の有無を確認する必要があるのか。

(回答) 早期癌に対して安易な EMR の適応拡大は問題がある。当科の微小転移検索の結果でも未分化の粘膜内癌、分化型の粘膜下層浸潤癌では微小転移が存在する。したがって適応拡大する場合には SN に転移がないことを確認する必要があると考える。

質問 12) ITC の Ki67 発現が 29% ということは、取り残せば、臨床的に意義のある転移巣に増大することの可能性を意味するのか。

(回答) 免疫担当細胞により死滅する可能性もあり、ITC の全てが、生着・増殖するか否かは不明であるが、本研究の結果から、ITC においても増殖活性が 29% で存在することが確認された。再発の危険性を考えると、現時点では郭清すべきと考える。

質問 13) なぜ、Ki67 で増殖活性評価を行ったのか。VEGF-A、VEGF-C は考慮しなかったのか。

(回答) 増殖活性をみる目的では Ki67 が最も適当と考える。Ki67 は細胞周期において G0 期以外常に発現しているため、増殖活性を評価できる。VEGF-A、VEGF-C は、血管やリンパ管新生因子であり、増殖活性そのものを評価していない。ただし教室の食道癌の研究で VEGF-C と微小転移の関連は認められている。

質問 14) 術野で検出した SN の位置と、術後マッピングで検出された SN とは一致するのか。

(回答) RI count は半減期の関係で減少するが、SN は術中と術後で一致する。主病変とリンパ節郭清後に残存する SN がないことを確認することにより、SN は全て摘出可能である。

質問 15) HE 染色で転移陽性と診断された 22 個のうち免疫染色で転移陰性と診断されたリンパ節は存在したか。

(回答) 今回の検討では HE 陽性、免疫染色陰性の転移リンパ節はなかった。

質問 16) リンパ節転移診断では、HE 染色よりも免疫染色の方が良いか。

(回答) 転移個数の少ない転移巣は HE 染色で見逃されることもあり、免疫染色の方が有用であると考ええる。

質問 17) 25 個の macrometastasis のうち、免疫染色で陽性となった 9 個は見逃されたのか。

(回答) 同一切片で免疫染色を行っていないので明確なことは言えないが、未分化型癌で ITC の症例では HE 染色のみでは非常に診断が難しいと考えられる。

質問 18) 腺癌と食道扁平上皮癌では ITC の頻度に差があるか。

(回答) 扁平上皮癌に比べて腺癌は多くの組織型があり、特に未分化型ではび慢性に転移するものが見られる傾向がある。したがって食道扁平上皮癌に比べて、胃癌では ITC の頻度が高い。

質問 19) SN における Ki-67 と予後の関係はあるか。

(回答) 今回の対象では予後は検討しなかったが、これまでの文献報告では Ki67 陽性例は陰性例に比べ予後不良である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。