

【要約】

Molecular nodal staging using miRNA expression in
lung cancer by EBUS-TBNA

(microRNA 発現定量解析による高感度肺癌リンパ節転移検出法の開発)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：吉野 一郎 教授)

稲毛 輝長

序論

肺癌は世界的に腫瘍関連死の最たる原因であり、正確な病期診断が適切な治療の第一歩となる。正確な病期診断の為に、縦隔鏡をはじめとした侵襲的なリンパ節転移診断法が必要であった。超音波ガイド下経気管支針生検（EBUS-TBNA）は低侵襲かつ高精度な縦隔・肺門リンパ節転移診断法として世界的に普及しつつある。しかし、微小検体による病理診断や微小転移の検出など、陰性的中率の低下が診断精度においての課題であった。このような、病理診断の限界を補完するバイオマーカーが必要とされていた。MicroRNA (miRNA) は、21～25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、標的の mRNA に結合することで、遺伝子の転写後発現調節に関与している。また、短鎖 RNA であることから安定性が高く、パラフィン検体においても凍結保存検体と同様の検出や解析が可能であることが報告されている。先行研究より、肺癌転移リンパ節で高発現する 5 つの候補 miRNA（miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, let-7e）が特定された。これらを、リンパ節転移診断のバイオマーカーとして、リアルタイム PCR を用いた定量発現解析を用いた検討を行うこととした。

目的

microRNA 発現定量解析によるリンパ節転移診断法の確立を目的とする。

研究デザイン

①手術郭清リンパ節における検討：転移陽性/陰性リンパ節における miRNA 発現

定量解析(RT-PCR)および統計学的解析を行い、リンパ節転移検出の cut-off 値を設定する。②

EBUS-TBNA 検体における検討：研究①の cut-off 値を用いた、微小検体におけるリンパ節転移診

断精度の検証。③再生検 EBUS-TBNA 検体における検討：研究①の cut-off 値を用いた、再生検検体におけるリンパ節転移診断精度の検証。

対象

①手術郭清リンパ節：2015 年 1 月～2015 年 12 月に、当科で手術を施行した肺癌 30 症例、69 リンパ節を対象とした。②EBUS-TBNA 凍結検体：2010 年 1 月～2015 年 12 月に、当科で EBUS-TBNA を施行した肺癌 30 症例、30 リンパ節を対象とした。③再生検 EBUS-TBNA パラフィン検体：導入放射線化学療法後に、EBUS-TBNA による再生検が 施行され、手術加療を受けた肺癌 10 症例、12 リンパ節を対象とした。

RNA 抽出

パラフィン検体からは RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を、凍結検体からは miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用し、miRNA を含む RNA を抽出した。

miRNA 発現定量解析 (RT-PCR)

ExiLERATE LNATM qPCR cDNA Synthesis kit (EXIQON, Vedbaek, Denmark) を用いて cDNA を作成し、LightCycler 480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)と ExiLENT SYBR[®] Green master mix Kit (EXIQON, Vedbaek, Denmark) 、miRCURY LNATM PCR Primer Set (EXIQON) を用いて RT-PCR を施行した。内因性コントロールには U6 を採用し、発現定量解析は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いた。

統計解析

miRNA 発現とリンパ節転移の有無に関しては、JMP Pro12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いたウィルコックス検定を行い、 $p=0.05$ 未満を統計学的に有意とした。ROC/AUC 解析により、

感度・特異度およびカットオフ値を算出した。

結果

①手術郭清リンパ節：

miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, let-7e のすべてが、転移陽性リンパ節において統計学的に有意に高発現であった。ROC 解析からは、miR-200c が最も高精度であり AUC=0.949、カットオフ値 0.037 とした際に、感度 95.4%、特異度 100%、陽性的中率 100%、陰性的中率 88.9%、正診率 96.7% であった。

②EBUS-TBNA 凍結検体

miR-200c のみが、転移陽性リンパ節において統計学的に有意に高発現であった。カットオフ値 0.037 を適応した際に、感度 95.4%、特異度 60.0%、陽性的中率 91.3%、陰性的中率 85.7%、正診率 90.0% であった。

③再生検 EBUS-TBNA パラフィン検体

miR-200c は病理診断での偽陰性 4 例をすべて検出可能であり、再生検における正診率は、病理診断 66.6%に対し、miR-200c は 83.3%であった。また、郭清リンパ節は転移陰性であったが、術後リンパ節再発を認めた 2 リンパ節において、miR-200 では転移陽性と判別していた。

結論

miR-200 を含む miRNA 発現定量解析により、高精度な肺癌リンパ節転移診断が可能であると考えられた。