

## RFL プロジェクトミライ

### 現状の進捗状況

#### 遺伝子解析、免疫染色を用いた革新的肺癌喀痰検診での癌発見率向上方法の開発

##### 研究の概要：

肺癌の罹患数は国立がん研究センターがん対策情報センターの報告では 2011 年時点で男性では第 3 位、女性では第 4 位であるにもかかわらず、2013 年時点の死亡数は男性第 1 位、女性第 2 位と未だ高い死亡率を示している。肺癌の罹患数は国立がん研究センターがん対策情報センターの報告では 2011 年時点で男性では第 3 位、女性では第 4 位であるにもかかわらず、2013 年時点の死亡数は男性第 1 位、女性第 2 位と高い死亡率を示している。日本においては名和らが Lung Cancer. 2012 Dec;78(3):225-8 で、また国外では The National Lung Screening Trial Research Team が N Engl J Med 2011; 365:395-409 で報告しているように、特に末梢発生の腺癌における CT 検診の有効性が、肺癌死亡率の低下という結果を示している。

これに対して、肺癌の喀痰検診は、肺門部肺癌の検診として昭和 50 年代より長年実施されているが、現在その有効性は問題視されている。この最も大きな原因としては、肺癌発見率が平均 0.1%程度しかないことがあげられる。また近年喫煙率は 26 年度で男性 30.3%、女性 9.8%(全年齢、JT 全国喫煙者率調査より)と低下はみられるものの、諸外国との比較では未だ高い喫煙率を示しており、全肺癌の中でも肺門部に発生し、喫煙との関係の深い扁平上皮癌の占める割合は未だ高い。しかしながら近年広く普及している肺がんの CT 検診は肺末梢に発生する腺癌の発見には適した機器であるが、肺門部の肺癌はみづかりにくい。

翻って喀痰中には癌細胞はもとより、その産物、破壊物などが含まれ、検診受診者の肺内の状態をよく表している貴重な試料であるにもかかわらず、現在行われている検査では癌細胞のみの細胞診断的なスクリーニングのみ行い、残余検体は廃棄されている。

この廃棄されている喀痰検診後の残余試料を用いて、細胞診断以外の方法論を利用した解析を行えば、肺癌の検診での発見率を革新的に向上させて、死亡率を減少させることができると考える。平均 0.1%程度の癌発見率を 1~2%のレ

ベルまで引き上げること、かつ適切な癌危険群の選別の可能性を検証することを目的とする。

我々は、以前より喀痰材料から細胞診断以外で癌をスクリーニングする方法論を研究してきた。1999年に喀痰に含まれる炭粉量の多寡を解析することで肺癌危険群を抽出出来る事を報告(Hou M et al. Int J Cancer, 1999)、2004年に喀痰材料から抽出した核酸を用いて、メチル化解析を行い、p16等のいくつかの癌抑制遺伝子が異常メチル化されていることを示した(Konno S et al. Cancer Cytopathology, 2004)。その後、早期肺癌マーカーとしてStratifin(SFN)やOCIAD2を明らかにし、さらに気管支洗浄標本について報告した肺癌マーカー(SFNやOCIAD2)を免疫染色することで細胞診断では見過ごされていたような異型の少ない癌細胞、あるいは極めて少数の癌細胞を発見する事が可能であることを示した(Shiba-Ishii A et al. Int J Cancer, 2011, Am J Pathol, 2012, Itoguchi N et al. Cytopathology, in press)。

廃棄される喀痰よりゲノムDNAを抽出して、p16, APC等の先の研究で抽出したがん抑制遺伝子のメチル化状態を解析する。そしてメチル化陽性例を抽出し、高危険群と判定して、その割合を明らかにする。将来的には検診協会とともに前向き介入臨床試験に発展させる。

## 目的

簡易な方法で採取できる細胞診でのがん発見率を向上させるため、診断後廃棄予定の喀痰検体を用いて、癌遺伝子、癌抑制遺伝子のゲノム解析、メチル化の変化、含有がん関連タンパク質の解析を行い、がん高危険群の抽出を行い、細胞形態による従来の肺癌発見率をさらに上昇させる。

## 方法

- 1) 筑波大学附属病院およびNH0茨城東病院で、患者の同意がえられている細胞診断後の喀痰検体を用いる。サコマノ法で提出された検体はサコマノ液にいれたまま4℃で保存をする。サコマノ法以外で提出された検体は残検体をメルティブル一液にいれ4℃で保存する。年間両施設を合わせて300例の検体を採取する予定である。研究期間中の検体採取は継続する。
- 2) 収集した検体のうち、肺癌と確定し、かつ形態学的に癌細胞が存在することが確認されている症例から4例、肺癌と確定し、かつ形態学的に癌細胞

- 胞が認められなかった症例から4例、さらに非癌症例から4例を抽出し各々の施設で形態学的に通常の細胞診断を行い、またカルテ上の臨床情報を得る。
- 3) 2) で使用した同じ症例から Precision Science system の全自動核酸抽出、精製システムで DNA 抽出、精製を行い、抽出された DNA は解析までの間-80°Cで保存する。
  - 4) 抽出された DNA に対して、網羅的メチル化解析キット (EpiTect Methyl II PCR Array Human Lung Cancer, Complete Panel) メチル化解析を行う  
□
  - 5) 明らかになったメチル化異常を他の肺癌患者、非癌患者間で比較し、異常が有意に腫瘍症例に多いことを検証する。
  - 6) 検証された異常メチル化については PCR 法を用いた簡単な検出ができるように適切なプライマーセットを設定する。
  - 7) 予後追跡を行い、非癌患者で肺癌の発生の有無を確認および肺癌患者の転帰を確認するため各々の施設でカルテ上ないしはがん登録システム上で確認する。
  - 8) 明らかになったメチル化異常を喀痰から検出するための方法論を実際の健診例に応用する。具体的には茨城健診協会との合同プロジェクトを立ち上げ、喀痰健診例の残余検体を用いて研究成果を検証する。年間 4000 から 5000 例の喀痰材料が見込まれるので細胞像による癌発見数と新たな方法論による癌発見率、あるいは喫煙指数との相関などを検証する。

#### 現在の状況

研究者は 2015 年 5 月に筑波大学から NH0 茨城東病院に異動した。

そのため、助成金の移動も行われ 2015 年 11 月に筑波大学から NH0 茨城東病院に移動が行われた。その間、助成金の使用は不可能であった。

筑波大学付属病院で 2015 年 3 月に倫理委員会にて研究の承認を得た。

現在 9 1 症例の喀痰を集積した。

茨城東病院では 2015 年 8 月に倫理委員会にて研究の承認を得た。

現在 7 症例の喀痰を集積した。

筑波大学の3症例で Precision Science system の全自動核酸抽出、精製システムで DNA 抽出、精製を行い、DNA を抽出した。

DNA con. (ng/μl)	A260/280
164	1.361
157	1.231
45.5	0.843

#### 展望

助成金の移動が行われたので今後正式に Precision Science system と契約を行い、DNA 抽出を開始し、メチル化検索を行っていく。