

主論文の要旨

**The levels of SYT13 and CEA mRNAs in peritoneal lavages predict the peritoneal recurrence of gastric cancer**

〔 腹腔洗浄液中 SYT13 mRNA と CEA mRNA 発現解析による  
胃癌腹膜再発予測法 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小池 聖彦 特命教授)

中西 香企

## 【背景】

胃癌腹膜再発は胃癌再発の約 40%を占める頻度の高い再発形式である。早期診断の難しさに加え、抗腫瘍薬の治療効果も限定的であることから予後不良な病態である。腹膜播種形成は、微小遊離癌細胞が腹腔内に散在することが初期段階とされており、病理学的細胞診がその存在診断に汎用されている。しかしながら、胃切除手術時に腹腔洗浄細胞診陰性であった症例においても、18.9%に術後腹膜再発が発生するとの報告もあり、感度という点で改善の余地を残している。この問題を解決するべく、これまで腹腔洗浄液検体を用いた免疫組織化学的、分子生物学的手法による微小遊離癌細胞検出法の開発研究が行われてきた。その中で、**real-time reverse transcription PCR** 法により検出される **carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA** が有望な手法の一つに挙げられているものの、特異度が十分とは言えないことが問題となっている。**CEA mRNA** と他の分子マーカーを組み合わせることによる性能向上が試みられてきたが、感度と特異度とを両立させることはできず、臨床応用されるに至っていない。本研究の目的は、分子生物学的手法による新しい腹腔内遊離癌細胞検出法を提案することである。

## 【対象と方法】

187 例の胃癌開腹手術症例から開腹直後にダグラス窩での腹腔洗浄液検体を採取した。mRNA 発現量の測定は検体から total RNA を抽出後、分光光度計による品質確認を経て、定量的 **real-time reverse transcription PCR** 法で行った。候補マーカーは過去の報告で有望とされている 3 種類のマーカー (**CEA**, **cytokeratin 20 [CK20]**, **cytokeratin 19 [CK19]**) に、我々が先行研究において胃癌腹膜播種例の原発巣で有意な発現亢進を見出した 6 種類のマーカー (**synaptotagmin VIII [SYT8]**, **synaptotagmin XIII [SYT13]**, **sushi domain containing 2 [SUSD2]**, **melanoma-associated gene family member D4 [MAGED4]**, **dihydropyrimidinase-like 3 [DPYSL3]**, **anosmin-1 [ANOS1]**) を加えた、計 9 種類とした。また、癌細胞の存在を示唆する客観的なカットオフ値を設定するため、30 例の非担癌良性疾患患者から得た腹腔洗浄液検体を対照として用いた。非担癌良性疾患患者群における各マーカーの発現上限値をカットオフ値とし、カットオフ値より高い場合を発現陽性、低いものを発現陰性と定義した。

## 【結果】

候補マーカーそれぞれにおいて、**Receiver operating characteristic** 曲線解析により腹腔洗浄液中の発現量と腹膜再発もしくは洗浄細胞診陽性との相関性を評価した結果、**SYT13** と **CEA** の mRNA 発現量が高い **area under the curve** 値 (0.771, 0.775) を示したことから、これら 2 つのマーカーを詳細な検討に用いることとした。

臨床病理学的因子との相関解析において、腹腔洗浄液中 **SYT13** mRNA 発現陽性は肉眼型 4/5 型、腫瘍径 60mm 以上、深達度 T3/4、病理学的リンパ節転移陽性、腹腔洗浄細胞診陽性、血清 CA19-9 高値と有意に相関しており、**CEA** mRNA 発現陽性は深達度 T3/4、病理学的リンパ節転移陽性、腹腔洗浄細胞診陽性、血清 **CEA** 高値、血清 **CA19-**

9 高値と有意に相関していた。

*SYT13*、*CEA* ともに mRNA 発現陽性群は陰性群と比較して有意に術後無腹再発生存期間が短縮していた (3 年無腹膜再発率. *SYT13*, 69.5% vs 95.5%,  $P < 0.0001$ ; Figure 1a, *CEA*, 64.8% vs 92.0%,  $P < 0.0001$ ; Figure 1b)。さらにこの 2 つのマーカーを組み合わせることにより、腹膜再発リスクが明瞭に層別化された (3 年無腹膜再発率. ともに mRNA 発現陽性, いずれか mRNA 発現陽性, ともに mRNA 発現陰性, 52.4% vs 80.4% vs 97.4%,  $P < 0.0001$ ; Figure 1c)。一方で、腹腔洗浄細胞診陰性であっても両マーカーとも mRNA 発現陽性であった場合は、腹腔洗浄細胞診陽性例と同程度の術後無腹膜再発生存期間であった (Figure 2)。

術後無腹膜再発生存期間に対する多変量解析において、*CEA* mRNA 発現陽性 (hazard ratio [HR] 5.50, 95% confidence interval [CI] 2.36-13.23;  $P < 0.0001$ )、*SYT13* mRNA 発現陽性 (HR 8.00, 95% CI 3.13-24.68;  $P < 0.0001$ ) は独立予後不良因子であった。

腹腔洗浄細胞診陽性症例のみを対象としたサブグループ解析を行ったところ、*SYT13* mRNA 発現陽性群は陰性群と比較して有意に術後無腹再発生存期間が短縮していたが (3 年無腹膜再発率. 38.3% vs 100%,  $P = 0.0316$ )、*CEA* においては有意差を認めなかった (42.2% vs 71.3%;  $P = 0.1606$ , Figure 3)。

腹腔洗浄液中の *SYT13* mRNA 発現量と、同一症例から得た胃癌原発巣組織中での発現量は正の相関関係を認めた (Spearman's rank correlation coefficient = 0.4148, Figure 4)。

## 【考察】

*SYT13* はシナプス小胞上に存在する N 末端側に膜貫通領域を持つ 1 回膜貫通型のタンパク質であり神経系、消化管、内分泌臓器に発現している。我々の研究グループでは先行研究で、*SYT13* が腹膜播種を伴う胃癌症例の原発巣で特異的に高発現していること、*SYT13* が胃癌腹膜播種形成において重要な癌細胞機能である遊走能と浸潤能を調節していることを見出した。胃癌治癒切除術後の腹膜再発例で、*SYT13* が腹腔洗浄液中から検出されれば腹腔内遊離癌細胞の存在を検知できるとの仮説のもと、腹腔洗浄液中の *SYT13* mRNA 発現量を測定した。

これまで、胃癌腹膜再発予測マーカーとしての感度を高めるために *CEA* mRNA と複数の分子マーカーを組み合わせる研究が多く行われてきたが、感度と特異度を高いレベルで両立させることはできなかった。本研究では、*SYT13* mRNA が *CEA* mRNA と同等の腹膜再発予測能を示し、これら 2 つの分子マーカーを組み合わせることで感度・特異度ともに向上した。

本手法の臨床的有用性を検討すると、腹腔洗浄細胞診陰性症例の中での腹膜再発ハイリスク群選別法として有望であると考えられた。現行の胃癌診療において、病理形態学的所見に上乗せ可能な、洗浄細胞診陰性症例の腹膜再発リスクを正確に評価する方法はなく、そのゆえに腹膜再発ハイリスク群に対する治療開発も進んでいない。本研究では、たとえ腹腔洗浄細胞診陰性であっても *CEA*、*SYT13* ともに mRNA 発現陽性であれば、洗浄細胞診陽性と同程度の腹膜再発リスクがあることが示されたため、本マ

一カーを適格基準とした腹膜再発ハイリスク群に対する積極的治療開発が期待される。近年、腹腔洗浄細胞診陽性や肉眼的腹膜播種を有する症例に対して化学療法を行い、化学療法が奏功してそれらが陰転化したのちに行う手術 (conversion surgery) によって、長期生存を得る症例の報告が増加している。一方で、conversion surgery 後に腹膜再発を起こす症例があることも事実であり、洗浄細胞診偽陰性例がここでも問題となっている。本分子マーカーの特異度の高さを活用することで、洗浄細胞診偽陰性例を減少させることが期待される。

今回、腹腔洗浄液中と同一症例での胃癌原発巣組織中での *SYT13* mRNA 発現量に正の相関関係を認めた。測定方法の選択肢を増やすためには、さらなる症例数の集積と、腹腔洗浄液中と胃癌原発巣組織中発現の経時的変化に関する検討が必要である。

### 【結語】

胃癌腹膜再発予測マーカーとして、腹腔洗浄液中 *SYT13* mRNA、*CEA* mRNA 発現量測定の有用性が示唆された。これら2つのマーカーを組み合わせることにより、より精緻な術後腹膜再発リスクの層別化が可能となるものと考えられた。