

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

清川 博史

専攻分野：内科学

コース：消化器・肝臓内科

指導教授：伊東 文生

主論文の題目：

大腸癌における新規バイオマーカーとしての血清ラミニン $\gamma 2$ 単鎖測定法の開発

共著者：

安田 宏、及川 律子、石井 俊哉、山本 博幸、月川 賢、
大坪 毅人、峰岸 知子、越川 直彦、清木 元治、伊東 文生

緒言

大腸癌の診断および術後管理において腫瘍マーカーの臨床的意義は大きい。ラミニン $\gamma 2$ 単鎖 (Ln- $\gamma 2$) の発現は様々な腫瘍浸潤先進部において著しく亢進することが報告されており、これは Ln- $\gamma 2$ が浸潤性の腫瘍マーカーとして有用である可能性を強く示唆している。我々は、Ln- $\gamma 2$ を選択的に認識するモノクローナル抗体を用いて Ln- $\gamma 2$ の定量 ELISA 法を開発した。

方法・対象

2013年1月から2015年4月に聖マリアンナ医科大学病院消化器・肝臓内科および消化器・一般外科にて診断、加療された大腸癌19例および良性疾患8例（逆流性食道炎1例、胃過形成性ポリープ1例、胃潰瘍2例、小腸

潰瘍1例、潰瘍性大腸炎1例、結腸憩室炎1例、憩室出血1例)を対象とし、書面による同意を得た上で採血を行った。健常者は少なくとも2年以内に加療を要するいかなる疾患も有さない者を対象とし、ボランティアを当院スタッフより募った。

共同研究者である越川らが作製したLn- γ 2を認識するモノクローナル抗体(2H2)と、Ln- γ 2を認識するウサギポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法を構築し、本ELISA法を用いて78症例(健常者51例、良性疾患8例、大腸癌19例)における血清中のLn- γ 2の定量を行った。同時に、化学発光免疫測定法(chemiluminescent immunoassay: CLIA)を用いてcarcinoembryonic antigen (CEA)とcarbohydrate antigen 19-9 (CA19-9)を測定し診断能について比較検討を行った。また、外科的切除を行った7例の大腸癌切除標本を用いてLn- γ 2の免疫組織化学染色を行った。

なお、本研究は聖マリアンナ医科大学病院(承認2302号)、東京大学医科学研究所(承認24-44-1017号)、神奈川県立がんセンター(承認24号)の倫理委員会にて承認されたものである。統計はMann-Whitney法を用いた。 $p < 0.05$ を有意と判定した。全ての解析はGraphPad Prism 6 software(GraphPad Software社、CA、USA)を用いて行った。

結果

外科的切除を行った7例の切除標本におけるLn- γ 2の免疫組織化学染色では、6例において粘膜下層以深の腫瘍浸潤先進部分における一部の腫瘍細胞にLn- γ 2陽性細胞を認めた。

定量ELISA法によるLn- γ 2の中央値は、健常者241.9 pg/mL、良性疾患138.8 pg/mLであり、一方大腸癌においては323.0 pg/mLと非癌症例より有意に高値であった($p = 0.0134$)。一方、健常者におけるLn- γ 2測定値は良性疾患症例と比較してやや値が高くなる傾向がみられた($p = 0.259$)。

大腸癌症例と非癌症例とを区別するLn- γ 2のカットオフ値を315.8 pg/mLとすると大腸癌症例の57.9%に陽性であった。Ln- γ 2とCEA併用における大腸癌陽性率は78.9%であり、CEAとCA19-9併用での陽性率57.9%よりも高率であった。

大腸癌の各病期における陽性率では、いずれのマーカーにおいても進行期は高率であったが、CEA、CA19-9におけるStage I/IIの陽性率は

低率であった。一方、Ln- γ 2 は Stage I / II において陽性率 50.0% とより高率であった。

考察

本研究において、サンドイッチ ELISA 法を用いた大腸癌血清中の Ln- γ 2 測定値は非癌症例と比較して有意に高値であり、CEA および CA19-9 の大腸癌陽性率がそれぞれ 52.6%、31.6%であったのに対し、Ln- γ 2 は 57.9%と高い陽性率を示していた。免疫組織化学染色では、大腸癌の外科切除標本における腫瘍浸潤先進部において Ln- γ 2 の発現が高率に認められた。これらの結果は Ln- γ 2 が大腸癌診断において有用な測定法になる可能性を示唆している。また、Ln- γ 2 を CEA および CA19-9 と併用することで、既存マーカー単独および併用での測定よりも高率に大腸癌を検出可能であることが示された。一方で、カットオフ値を 315.8 pg/mL とすると、健常者における Ln- γ 2 陽性率は 25.5%と高い傾向を認めた。Ln- γ 2 の偽陽性率がやや高率となった原因として本 ELISA 法の非特異的な反応が生じている可能性も考慮し、非特異的反応を抑制するブロッカーの検討や免疫測定試薬の改善を図り、測定系の改良を行っていく必要がある。本研究の健常者における Ln- γ 2 高値群において、既存の検査法では検出不能な微小癌組織を検出している可能性も否定はできないことから経過観察が望まれる。

また、本研究において Ln- γ 2 は大腸癌 Stage I / II 症例の 50.0% に陽性であった。本研究における大腸癌症例数は極めて少なく、結果より Ln- γ 2 が大腸癌の早期診断に寄与する可能性を論ずることは困難であるが、今後さらなる大規模臨床研究を行い、Ln- γ 2 における大腸癌の早期診断能を検証する必要がある。

結論

Ln- γ 2 の CEA および CA19-9 との併用における大腸癌陽性率は、それら単独および併用での陽性率を上回っていた。この結果より、Ln- γ 2 は大腸癌診断において既存の腫瘍マーカーを補助可能なバイオマーカーとなる可能性がある。