

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名:

末永 大介

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:

胆管狭窄の良悪性診断における胆汁 DNA を用いた遺伝子解析の検討

共著者:

山本 博幸、辻 顕介、森田 亮、路川 陽介、中原 一有、
相田 芳夫、松田 浩二、伊東 文生

緒言

胆道癌や膵癌は予後が悪い癌種の代表例である。胆道癌・膵癌は高頻度で胆道狭窄をきたす。悪性胆道狭窄の診断法として、胆汁細胞診や胆道擦過細胞診を行っているが、正診率は高くない。我々は BarH-like 2 homeobox protein (BARHL2)、cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)、MINT25、SRY-Box 17 (SOX17)、miR-34b/c 遺伝子の DNA メチル化が胃癌診断のマーカーとなりうることを報告している。これらが悪性胆道狭窄のバイオマーカーとして有用か、胆汁 DNA を用いて検討した。

方法・対象

胆道狭窄で直接胆道造影検査を施行した患者 28 例を対象とし、それぞれ胆汁を回収した。最終的な診断は、胆道癌患者が 9 例、膵癌患者が

9 例、非悪性疾患患者が 10 例であった。フェノールクロロホルム法を用いて、胆汁から DNA を抽出し、DNA 収量を比較した。パイロシーケンスにより KRAS 遺伝子コドン 12、13 の変異を定量解析した。胆汁 DNA 溶液 $5\mu\text{l}$ に対して BisulFlash DNA Modification Kit (Epigentek, NY, USA) を用いてバイサルファイト処理を行った。パイロシーケンスにより、BARHL2、CDKN2A、MINT25、SOX17、miR-34b/c 遺伝子の DNA メチル化を定量解析した。パイロシーケンスの結果は PyroMark® Q24 (Qiagen) および PyroMark® Q24 Software version 2.0.6 (Qiagen) を用いて解析した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会(承認 3646 号[遺 196]) の承認を得たものである。メチル化レベル(パーセンテージ)は、比較のため連続変数として分析した。2 群間の測定値の比較に Wilcoxon 検定を用いた。Dot plot 解析を行い、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を描き、area under the ROC curve (AUC) を求め、胆管狭窄における DNA メチル化レベルの診断能を検討した。全ての解析は、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

結果

DNA の収量は、悪性疾患と非悪性疾患で有意差を認めなかった。KRAS 遺伝子変異は、胆道癌 (n=9) の 6 例(67%)、膵癌 (n=9) の 5 例(56%)、非悪性疾患 (n=10) の 1 例(10%)で検出した。

BARHL2 遺伝子の DNA メチル化(%)の平均値(標準偏差)は、悪性疾患で 72 (16)、非悪性疾患で 35 (18)であり、悪性疾患で有意に高値であった ($P < 0.0001$)。また、胆道癌では 66 (20)、膵癌では 78 (10)と、それぞれの癌で非悪性疾患と比べ有意に高値であった ($P = 0.0025$ 、 $P =$

0.0002)。

一方、悪性疾患と非悪性疾患における CDKN2A、MINT25、SOX17、miR-34b/c 遺伝子の DNA メチル化は、有意差を認めなかった。

悪性疾患と非悪性疾患の診断能を判定するために BARHL2 メチル化レベルの ROC 曲線を作成した。ROC 解析から、BARHL2 メチル化レベルのカットオフ値は 61%とし、AUC は 0.95556 であった。悪性疾患と非悪性疾患の診断における BARHL2 メチル化レベルの感度は 88%、特異度は 100%であった。

考察

本研究では、胆道狭窄で直接胆道造影検査を施行した胆道癌患者 9 例、膵癌患者 9 例、非悪性疾患患者 10 例を対象とした。

KRAS 遺伝子変異は、胆道癌の 67%、膵癌の 56%、非悪性疾患の 11%で検出した。KRAS 遺伝子変異は、さまざまな頻度で報告されているが、検体の種類や解析方法が異なり、単純な比較は難しい。従って、胆汁 KRAS 遺伝子変異を胆道狭窄の良悪性診断の補助に用いるのは、困難であると考えられた。

次に、パイロシーケンスにより、BARHL2、CDKN2A、MINT25、SOX17、miR34b/c 遺伝子の DNA メチル化を解析した。CDKN2A、MINT25、SOX17、miR-34b/c 遺伝子の DNA メチル化は、悪性疾患と非悪性疾患で有意差を認めなかった。一方、BARHL2 遺伝子のメチル化は、悪性疾患患者において、非悪性疾患に比べ有意に高値であった。特に膵癌では、全例、DNA メチル化が高値であった。ROC 曲線解析では、AUC 0.95556 と診断能は優れており、BARHL2 遺伝子メチル化レベルにおける悪性疾患（胆道癌、膵癌）診断能は、感度 88%、特異度 100%と高値であった。胆汁を用いた

BARHL2 のメチル化レベルが胆道癌、膵臓癌の診断に有用であるという報告はこれまでにない。胆道狭窄の良悪性の補助診断マーカーとして有用であることが示唆された。