

## 〔結果〕

高度線維化と相関する因子は、多変量解析から4型コラーゲン7S、ヒアルロン酸と算出され、AUCはそれぞれ0.87, 0.97で、ヒアルロン酸を予測因子とした。ヒアルロン酸のカットオフ値を42 $\mu$ g/Lと設定すると、感度(100%, 95%信頼区間[90, 100]), 特異度(89%, 95%信頼区間[80, 94]), 陽性反応適中度77%, 陰性反応適中度100%であった。一方、肝硬変と相関する因子は、多変量解析で血小板のみが独立因子で、AUCは0.98で、カットオフ値を $16 \times 10^4/\mu$ Lと設定すると、感度(100%, 95%信頼区間[82, 100]), 特異度(95%, 95%信頼区間[90, 98]), 陽性反応適中度76%, 陰性反応適中度100%であった。

## 〔考察〕

NAFLDの高度線維化以上の重症例では、肝不全や肝細胞癌発癌を視野に入れた経過観察が必要であるが、NAFLDでは非代償期肝硬変に進行するまで自覚症状に乏しく早期診断が困難である。NAFLDにおける高度線維化はヒアルロン酸値、肝硬変は血小板値で、十分な信頼性を持って予測されることが明らかとなった。これらの線維化重症度診断マーカーが、肝生検に代わる重症例の早期診断に有用と考えられた。

## 〔結論〕

NAFLDにおける線維化の重症度診断マーカーとして、高度線維化例ではヒアルロン酸が、肝硬変では血小板値が有用であることが示された。

## 論文審査の要旨

非アルコール性脂肪性肝疾患の病態は単純脂肪肝から脂肪肝炎まで幅広く、肝線維化の程度で重症度が判定されるが、自覚症状に乏しく、進行すると肝不全や肝癌に至ることもある。そこで、侵襲的な肝生検に代わる重症度診断マーカーの確立が急務となっている。

本研究では、非アルコール性脂肪性肝疾患148例を高度線維化と肝硬変例の2群に分け、性、年齢、BMI、合併症、血液検査、4型コラーゲン7S、ヒアルロン酸を比較検討した。その結果、ヒアルロン酸が高度線維化と最も良く相関し、cut-off値42 $\mu$ g/Lで感度100%、特異度89%であった。一方、肝硬変と相関したのは血小板のみで、cut-off値 $16 \times 10^4/\mu$ Lで感度100%、特異度95%であった。以上より、高度線維化ではヒアルロン酸値が、肝硬変では血小板値が、それぞれ高い信頼性をもって重症度を反映することが明らかとなった。

非アルコール性脂肪性肝疾患の線維化の重症度診断に、ヒアルロン酸と血小板値が有用であることが示され、臨床的かつ学術的に価値ある論文である。

氏名(生年月日)	キン 金	タツ 達	ヒロ 浩
本 籍			
学位の種類	博士(医学)		
学位授与の番号	乙第2473号		
学位授与の日付	平成20年1月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)		
学位論文題目	<b>Array-based comparative genomic hybridization of circulating esophageal tumor cells</b> (食道癌循環腫瘍細胞における遺伝子変異のアレイCGH解析)		
主論文公表誌	Oncology Reports 第16巻 第5号 1053-1059頁 2006年		
論文審査委員	(主査)教授 丸 義朗		
	(副査)教授 山本 雅一, 立元 敬子		

## 論文内容の要旨

### 〔背景と目的〕

食道扁平上皮癌は、比較的早期から遠隔転移を生じる。遠隔転移に関わる遺伝子変化の研究は重要であるが、遠隔転移巣は切除対象でなく、研究に用いる検体は入手困難である。入手可能な検体として血管やリンパ管内の循環腫瘍細胞があるが、ごく微量で遺伝子変化の網羅的解析は難しい。そのため、本研究では食道癌手術例の胸管内循環腫瘍細胞から移植腫瘍を樹立し、その遺伝子変化を検索した。

### 〔方法〕

食道癌手術例の胸管内リンパ液をヌードマウスに皮下注射し、移植腫瘍を樹立した。移植腫瘍のゲノム DNA を抽出し、アレイ CGH 解析で増幅や欠失などの変異が存在する領域を抽出した。抽出したゲノム領域にある代表的な 2 つの遺伝子 (*CCND1*, *p16*) の増幅や欠失の頻度をサザンプロット解析、ゲノム PCR で確認した。*p16* 遺伝子の欠失について、食道癌手術 26 例の原発腫瘍と転移リンパ節で定量的サザンプロット解析し、その頻度を移植腫瘍と比較した。*p16* 欠失食道癌細胞株に野生型 *p16* を遺伝子導入し、matrigel invasion assay を行った。

### 〔結果〕

移植腫瘍は食道癌手術 13 例中 8 例より樹立した。移植腫瘍のアレイ CGH 解析で、遺伝子増幅領域として *CCND1* のある 11q13 など 5 領域、ホモ欠失領域として *p16* がある 9p21 など 24 領域を見出した。*CCND1* 遺伝子のサザンプロット解析では 62.5% (5/8) に増幅を、*p16* 遺伝子のゲノム PCR では 75% (6/8) にホモ欠失を認めた。切除標本の *p16* 遺伝子の定量的サザンプロット解析では、原発腫瘍で 30.8% (8/26)、転位リンパ節で 50% (4/8) にホモ欠失を認めた。Matrigel invasion assay では、*p16* 欠失食道癌細胞株へ野生型 *p16* を遺伝子導入することで癌細胞の浸潤が抑制された。

### 〔考察〕

移植腫瘍 (= 循環腫瘍細胞) のアレイ CGH 解析で、29 の増幅・欠失領域を見出した。移植腫瘍での *CCND1* 遺伝子増幅の頻度は 62.5% と従来の食道癌原発腫瘍や細胞株での報告より高率で、*CCND1* 遺伝子増幅が食道癌の進展に関わることが示唆された。*p16* 遺伝子のホモ欠損の頻度も原発腫瘍で 30.8%、転移リンパ節で 50%、移植腫瘍で 75% と癌の進展に伴って上昇した。Matrigel invasion assay の成績と併せて、*p16* の不活化は食道癌の浸潤を促進すると考えられた。

### 〔結論〕

本研究は食道癌の循環腫瘍細胞の遺伝子変化を、移植腫瘍を検体としてアレイ CGH により網羅的に解析し、29 の増幅・欠失領域を見出し、*CCND1* 遺伝子の増幅、*p16* 遺伝子のホモ欠損を高率に認めることを初めて明らかにした。

この手法による遺伝子変化の解析は、食道癌の遠隔転移に関わる新たな遺伝子の同定と機能解析、それをターゲットにした新薬の開発に繋がると期待される。

## 論文審査の要旨

本論文は食道癌の転移浸潤に関する解析であるが、その方法論や論理の進め方に優れたものがある。食道癌は原則として転移巣を除去する手術はしないので、患者の胸管内循環腫瘍細胞に注目し、この数少ない貴重な臨床検体をマウスに移植して第一段階として担癌マウスを作製する。このマウス由来ヒト腫瘍の遺伝子のコピー数をアレイ CGH 解析した。このスクリーニングで抽出された増幅遺伝子としてサイクリン D1、欠損遺伝子としてサイクリン依存性キナーゼの抑制分子である *p16* に焦点をあてた。この概念を実際の臨床サンプルにもどって適応し見合う解析結果を得ている。さらに *p16* と浸潤の関係を *in vitro* で細胞生物学的に解析しさらに証拠を積んだ。*p16* の発現低下は癌細胞の増殖浸潤を促進することは以前からいわれているが、実際の食道癌の検体での証明はその意義が大きいと思われる。