

学位授与番号：甲 945 号

氏 名：土橋 昭

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 7 月 10 日

学位論文名：

内視鏡的逆行性胆管造影下生検・ブラッシングサンプルを用いた肝外胆管癌における VEGF-C mRNA の定量に関する検討

主論文名：

Quantitative analysis of VEGF-C mRNA of extrahepatic cholangiocarcinoma with real-time PCR using samples obtained during endoscopic retrograde cholangiopancreatography. (内視鏡的逆行性胆管造影下生検・ブラッシングサンプルを用いた肝外胆管癌における VEGF-C mRNA の定量に関する検討)

学位審査委員長：矢永勝彦教授

学位審査委員：本間定教授、相羽恵介教授

論文要旨

(2部提出)

論文提出者名 土橋 昭

指導教授名 田尻 久雄

Quantitative analysis of VEGF-C mRNA of extrahepatic
cholangiocarcinoma with real-time PCR using samples obtained
during endoscopic retrograde cholangiopancreatography

「内視鏡的逆行性胆管造影下生検・ブラッシングサンプルを用いた
肝外胆管癌における VEGF-C mRNA の定量に関する検討」

Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2013 in press (24-Apr-2013 accepted)

【目的】血管内皮増殖因子 (VEGF) ファミリーである VEGF-C タンパクの過剰発現は、肝外胆管癌のリンパ節転移と深く関係していると報告されている。これらの報告では、VEGF-C タンパク過剰発現のインデックスとして、手術標本の免疫組織染色の評価が用いられてきた。これまでに肝外胆管癌における VEGF-C タンパク過剰発現を術前の腫瘍組織を用いて評価を行った報告はみられない。本研究では、術前の内視鏡的逆行性膵胆管造影 (endoscopic retrograde cholangiopancreatography ; ERCP) 下に得られた微量サンプルを用いて肝外胆管癌の VEGF-C タンパクの過剰発現の評価が可能であるか、リアルタイム PCR 法にて VEGF-C mRNA を測定し検討した。

【方法】2011年4月から2013年2月に、肝外胆管癌が疑われ ERCP を施行する患者を対象とし、前向きに評価を行った。術前に ERCP 下生検またはブラシ擦過から得られたサンプルの VEGF-C mRNA をリアルタイム PCR 法にて定量した。肝外胆管癌の手術標本の免疫組織染色を用いた VEGF-C タンパクの過剰発現の程度を reference standard とし、内視鏡サンプルを用いて VEGF-C タンパクの過剰発現を評価することが可能であるか検討した。肝外胆管癌に対する有用な診断マーカーであると報告されている S100P mRNA の測定も同時に行い、ERCP 下に得たサンプルが肝外胆管癌細胞を含んでいるか否かの評価に用いた。

【結果】25例に対し、ERCP を行い生検またはブラシ擦過によってサンプリングを行った。18例が肝外胆管癌と診断され、7例は良性胆管狭窄であった。18例中、外科切除が施行され、かつ術前サンプルの S100P mRNA が陽性とされた肝外胆管癌症例は9例であり、それらに対して最終解析を行った。ROC 解析を用い、カットオフ値を 3.85 と設定した所、術前の ERCP 下サンプルの VEGF-C mRNA 発現量の VEGF-C タンパク (手術標本) の過剰発現に対する感度は 75.0%、特異度は 100%、診断精度は 90.9%であった。

【結論】ERCP 下に得られたサンプルを用いた肝外胆管癌の VEGF-C mRNA の定量は、術前の VEGF-C の過剰発現予測に有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

土橋 昭氏の大学院博士課程の学位請求論文は主論文 1 編 1 冊よりなり、題名は、Quantitative analysis of VEGF-C mRNA of extrahepaticcholangiocarcinoma with real-time PCR using samples obtained during endoscopic retrograde cholangiopancreatography. (内視鏡的逆行性胆管造影下生検・ブラッシングサンプルを用いた肝外胆管癌における VEGF-C mRNA の定量に関する検討)で、雑誌名 Scand J Gastroenterol 誌に in press となっております。同誌の Impact Factor は 2.019。指導教授は消化器内科学の田尻久雄教授です。ここでは主論文のみについてその要旨を説明いたします。

血管内皮増殖因子 (VEGF) ファミリーに属する VEGF-C タンパクの過剰発現は、肝外胆管癌のリンパ節転移と深く関係していると報告されています。これらの報告では、VEGF-C タンパク過剰発現の指標として、手術標本の免疫組織染色による評価が用いられています。土橋氏は内視鏡的に VEGF-C タンパク過剰発現が評価可能であれば有用な臨床経過の指標が術前に予見できると考え、また過去に肝外胆管癌における VEGF-C タンパク過剰発現を術前の腫瘍組織で評価した報告がないことから、術前の内視鏡的逆行性膵胆管造影 (endoscopic retrograde cholangiopancreatography ; ERCP) 下に生検で得られた微量の組織サンプルの分子生物学的手法による評価で、肝外胆管癌の VEGF-C タンパクの過剰発現の評価が可能か否かを検討しました。

研究対象は 2011 年 4 月から 2013 年 2 月に、肝外胆管癌が疑われ ERCP を施行された患者で、前向きに術前に ERCP 下生検またはブラシ擦過で得られた組織サンプルの VEGF-C mRNA をリアルタイム PCR 法にて定量しました。コントロールは肝外胆管癌の手術標本とし、免疫組織染色を用いた VEGF-C タンパクの過剰発現の程度につき、内視鏡サンプルを用いて VEGF-C タンパクの過剰発現を評価できるか検討しました。肝外胆管癌に対する有用な診断マーカーでと報告されている S100P mRNA も同時に測定し、ERCP 下に得たサンプルが肝外胆管癌細胞を含んでいるか否かの評価に用いました。

結果ですが、25 例に対し ERCP を行い、生検またはブラシ擦過によってサンプリングを行いました。18 例が肝外胆管癌と診断され、残る 7 例は良性胆管狭窄の診断でした。検体採取法は、生検が 15 例、ブラシ擦過が 10 例でした。従来通りの生検組織またはブラシ擦過細胞診による肝外胆管癌の診断能は、感度 55.6%、特異度 100%、精度 60.0%でした。S100P mRNA 値の中央値は、肝外胆管癌症例で 0.10 (0.02 - 0.74)であったのに対し、良性胆管狭窄症例では、0.03(0.004 - 0.08)であり、統計学的有意差 ($p<0.01$) を認めました。ROC 曲線を用いて、S100P mRNA のカットオフ値を 0.04 とすると、感度 88.9%、特異度 71.4%、陽性的中率 88.9%、陰性的中率 ; 71.4%、診断精度 72.0%でした。

18 例中、外科切除が施行され、かつ術前サンプルの S100P mRNA が 0.04 以上であった肝外胆管癌症例は 9 例、50%であり、それらに対して最終解析を行いました。ROC 解析を用い、

カットオフ値を 3.85 と設定した所、術前の ERCP 下サンプルの VEGF-C mRNA 発現量の手術標本から得られた VEGF-C タンパクの過剰発現に対する感度は 75.0%、特異度は 100%、診断精度は 90.9%でした。

以上より、ERCP 下に得られたサンプルを用いた肝外胆管癌の VEGF-C mRNA の定量は、術前の VEGF-C の過剰発現予測に有用性が示唆されました。

以上の趣旨の研究結果の主論文に対し、平成 25 年 6 月 17 日に田尻久雄教授ご臨席の下、本間 定教授、相羽恵介教授と共に公開審査会を開催いたしました。審査では土橋氏のプレゼンテーションの後、各審査委員より、検体採取法による total RNA 抽出状況の違いの有無、良性疾患症例での VEGF-C mRNA のデータの有無、VEGF-C mRNA とリンパ節転移の関連の有無、胆管癌細胞株での基礎検討を行ったか否か、腫瘍マーカーとの関連、肝外胆管と肝内胆管の発生的相違点、性差との関連、ly 因子、v 因子などの病理所見との関連、S-100 タンパクと VEGF-C の相関の有無、サンプル量の多寡、VEGF-D の検討の有無、多臓器癌での評価が行われているか、など多くの質問がなされましたが、これらに対し土橋氏は適切に回答いたしました。本間、相羽両教授と慎重審議の結果、本委員会としては学位請求論文として十分な価値があるものと認定いたしました。