

論文内容要旨

Analysis of microRNA expression in liquid-based cytological samples may be useful for primary lung cancer diagnosis

(液状化細胞診検体の microRNA 発現解析は
肺癌診断に有用かもしれない)

American Journal of Clinical Pathology, in press.

主指導教員：服部 登教授
(医系科学研究科 分子内科学)
副指導教員：有廣 光司教授
(広島大学病院 病理診断学)
副指導教員：藤高 一慶講師
(医系科学研究科 分子内科学)

荒木 佑亮

(医歯薬学研究科 医歯薬学専攻)

背景：肺癌は癌死の主要な原因である。肺癌の診断に気管支鏡検査が有用であるが、腫瘍の位置や大きさによっては適切な検体が採取できないことがある。細胞診検体が診断の手掛かりとなることがあるが、異型細胞との区別が困難な場合、細胞診で鑑別困難と判定される。その場合、手術などの侵襲的な検査が追加され、良性病変に対して不必要な検査が施行されることがある。

microRNA(miR)とは 22 塩基程度のノンコーディング RNA であり、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている、多くの悪性腫瘍において発現量の変化が知られており、肺癌においても腫瘍組織と非腫瘍組織での発現の違いや血液中の microRNA の発現と肺癌の診断に関する報告は多数あるが、細胞診検体に関する報告はほとんどない。

我々は気管支鏡検査時の洗浄細胞診検体中の microRNA の発現解析が肺癌診断に有用かどうかについて検討を行った。

方法：肺癌で高発現すると報告されている microRNA の中から miR-21, miR-31, miR-182, miR-183 の 4 つの microRNA を選択し、検討を行った。組織検体、細胞診検体から total RNA を抽出し、RT-qPCR 法を用いて各 microRNA の発現の比較検討を行った。組織検体は当院でサンプリングされた肺癌手術検体 18 例の腫瘍部組織と非腫瘍部組織を対象とした。細胞診検体は当院で気管支鏡検査時に提出された洗浄細胞診検体 136 例を対象とし、各 microRNA の発現と最終的な診断との関連について検討を行った。組織検体は手術後すぐに組織サンプリングを行い、RNeasy[®] 溶液中に -20°C で保存し、手動抽出キットである mirVANA isolation kit[®] を使用して RNA を抽出した。細胞診検体はホルマリンフリーの Cellprep[®] 溶液で固定したものから 24 時間以内に全自動抽出キットである Magcore[®] を用いて RNA を抽出した。

結果：検討に用いた miR-21, miR-31, miR-182, miR-183 の 4 つの microRNA は組織検体 18 例において、いずれも腫瘍部において非腫瘍部よりも有意に高発現であった (miR-21: $P=0.004$, miR-31: $P=0.020$, miR-182: $P < 0.001$, miR-183: $P=0.001$) 。

次に RNA 抽出を行った細胞診検体 136 例のうち 11 例を除いた 125 例について各 miRNA の発現を検討したところいずれも肺癌患者において非肺癌患者よりも有意に高発現であった (miR-21: $P=0.012$, miR-31: $P=0.019$, miR-182: $P < 0.001$, miR-183: $P < 0.001$)。さらに細胞診で良性もしくは鑑別困難と判定された検体のみに限定しても、各 microRNA は肺癌患者において非肺癌患者よりも有意に高発現であった (miR-21: $P=0.002$, miR-31: $P=0.003$, miR-182: $P=0.002$, miR-183: $P < 0.001$)。

4 つの miRNA 全ての発現が認められた症例のうち細胞診で良性と判定された 54 例における ROC 解析では 4 つの microRNA を組み合わせることでそれぞれの microRNA 単独と比較して診断率が向上した (miR-21: AUC =0.676, miR-31: AUC =0.683, miR-182: AUC =0.688, miR-183: AUC =0.772, 4miRs: AUC =0.810)。

考察：本研究では洗浄細胞診検体中の miR-21, miR-31, miR-182, miR-183 の発現が肺癌患者に

において非肺癌患者より有意に高いこと,そして細胞診で良性もしくは鑑別困難と判定された症例でも同様の傾向が認められたことを示した.洗浄細胞診検体には標的となる病変の細胞以外に周囲の正常の気管支上皮細胞,肺胞上皮細胞,あるいは血液成分なども含まれている.良性もしくは鑑別困難と判定されるような明らかな癌細胞が含まれていない検体においても肺癌患者と非肺癌患者において **microRNA** の発現に有意な差がみられたことは,癌細胞中の **microRNA** だけでなく,癌が存在することにより影響を受けた周囲の正常細胞や血液中の **microRNA** が影響していたものと考えられる.細胞診標本中に明らかな癌細胞が含まれていない症例でも,本研究で検討した4つの **microRNA** を検索することで肺癌の補助診断の1つとして応用できる可能性がある.

本研究では内因性コントロールとして **RNU6B** を選択した.**RNU6B** は既報で汎用される内因性コントロールの一つであり,本研究で用いた検体中には上皮細胞成分が血液成分より多いと考え,**RNU6B** を選択したが,血液を用いた研究では **RNU6B** を内因性コントロールとして選択することについては議論の余地があるところである.本研究のように上皮細胞以外に血液など雑多な細胞が含まれている場合に内因性コントロールとして適していない可能性もあり,より適切な内因性コントロールについての検討を考慮する必要がある.

本研究では固定後の残余検体を用いている点や細胞診検体からの **RNA** 抽出に全自動の抽出キットを用いている点において実臨床への簡便な診断キットとしての応用が期待される.本研究で用いた全自動の抽出キットにより **RNA** 抽出し,発現の比較検討を行った報告はこれまでにないが,手動の抽出と比較して各 **microRNA** の発現量が低下する傾向があり,検体によって発現が認められない **microRNA** が存在した.手動による抽出に劣らない全自動抽出法の開発が課題である.