

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	荒木 佑亮
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1、2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	岡田 守人	印
審査委員	教授	檜山 英三	
審査委員	准教授	横崎 典哉	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【背景と目的】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。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り、非侵襲的で診断精度の高い検査法が望まれている。</p> <p>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。</p> <p>著者らは気管支鏡検査時の気管支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。</p>			
<p>【対象と方法】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異常陰影に対し気管支鏡検査を施行した肺癌症例 83 例と非肺癌症例 42 例の細胞診検体を対象とし、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、RNAlater®溶液中に -20℃ 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。</p>			
<p>【結果】</p> <p>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: $P=0.001$)。</p> <p>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 microRNA 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あるいは鑑別困難と判定された検体のみに層別化しても、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: $P<0.001$)。</p> <p>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 単独と比較して正診率が向上した (miR-21: AUC =0.676、miR-31: AUC =0.683、miR-182: AUC</p>			

=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あるい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。これら4つの microRNA は腫瘍形成や細胞増殖との関連が報告されており、洗浄細胞診検体から抽出した microRNA は肺癌細胞由来の microRNA を反映している可能性がある。また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。良性あるい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うけた非癌性細胞から抽出された microRNA が結果に影響していたと考えられる。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。

以上の結果から、本論文は気管支鏡検査により得られた洗浄細胞診検体中の4つの microRNA (miR-21、 miR-31、 miR-182、 miR-183) の発現解析が肺癌の補助診断にあることを示したものであり、実臨床への応用までにはより深い研究が必要であるが、臨床応用への可能性を提供した重要な研究と考える。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。