

論文審査結果の要旨

【目的】子宮筋腫に対し、LMを行うことが増加している。その時に術前 GnRHa 療法を用いることがある。筋腫縮小や術中出血量の低下などの長所がある反面、手術時間延長や再発率上昇などの短所の存在が指摘されている。今回われわれは、腹腔鏡下子宮筋腫核出術 (LM) の適応と術前 GnRHa 療法の有効性を検討した。

【方法】1995 年より 2007 年までに施行された LM の 161 例を対象とした。その中で、術前 GnRHa 療法を 4~6 クール使用した (A 群) 58 例と非使用群 (B 群) 103 例に分類した。当院で行われた LM 症例の手術成績から、適応についての検討を行った。また、術前 GnRHa 療法の有効性についての検討も行った。さらに、LM 後の再発率に関し、術前の MRI で確認できた筋腫個数と実際に核出した個数を比較した。その差がなく、数が一致していた一致群 (I 群) と予想筋腫個数より摘出筋腫個数が減少しており不一致群 (II 群) とに分類し、術後再発率を検討した。

【結果】LM の手術成績は最大筋腫径 10cm 以上の群で出血量、手術時間、開腹移行率が有意に増加し、個数に関してはすべての群で有意差はなかった。A 群の体積の縮小率は 43%であり、B 群との間に手術成績に関して差を認めなかった。また、4 年後の累積再発率は A 群 27.3%、B 群 25.8%と推定され、両者の間に差は認めなかった。再発率に関し、A 群の中で I 群 12.1%、II 群 44.4%と II 群で統計学的有意に術後再発率が増加した。一方、I 群の中では、A 群 12.1%、B 群 14.3%と術後再発率に統計学的有意差を認めなかった。

【考察】LM の適応は最大筋腫径 10cm 未満、個数に関しては制限がないと考えられた。また、術前 GnRHa 療法は手術成績、再発率を悪化させる因子とはならず、手術適応の拡大の観点からみても有効であると考えられた。その場合 MRI にて正確な術前の筋腫の状態を確認し、取り残すことなく手術を完遂することが、術後再発率低下に寄与すると考えられた。

小谷君は内視鏡チームに所属し、多数例の手術成績の詳細な解析により上記の結論を得た。この論文は近年増加した LM の術前、術後管理に一定の指針を与えてくれるものであり、学位に値すると思われる。

氏名	武本昌子			
学位の種類	博士 (医学)			
学位記番号	医第 1004 号			
学位授与の日付	平成 21 年 3 月 21 日			
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当			
学位論文題目	大腸癌原発組織の遺伝子発現プロファイル解析による異時性肝・肺転移の予測			
論文審査委員 (主査)	教授	塩	崎	均
(副主査)	教授	工	藤	正俊
(副主査)	教授	西	尾	和人

論文内容の要旨

【目的】

大腸癌は比較的予後良好であり、その生命予後は原発巣よりも肝・肺等の遠隔転移で規定されることが多い。従って、大腸癌異時性遠隔転移の予測因子が同定され、異時性遠隔転移の発現前に適切な補助療法を加えることが可能になれば、生命予後の改善が期待できる。

【方法】

2006年2月から2007年4月までに当院にて切除された原発性大腸癌症例のうち、同時性肝転移症例7例、異時性肝転移症例3例、肺転移を有し肝転移を有さない、即ち同時性肺転移症例5例、異時性肺転移2例と、対照群として年齢、性別、原発部位、壁浸達度、リンパ節転移、組織型などが類似した非転移症例5例を用いた。原発組織の一部を手術時に採取し、採取標本から total RNA を抽出し、遺伝子プロファイル解析を行った。これまでの我々の研究方法に改善を加え、より良質な RNA を抽出し、バイアスの少ない cDNA 増幅を行い、DNA チップには Affymetrix 社製の GeneChip® を用いた。

【結果】

大腸癌肝転移において、同時性肝転移群・非転移群間の differential expression analysis では異時性肝転移群・非転移群間の同解析と比較して、有意水準・発現変動倍率ともに高い遺伝子がみられた。階層的クラスター解析及び、主成分解析において、同時性・異時性を含めた肝転移群と、非転移群に明確に区別することができた。肺転移に関しては、differential expression analysis では肝転移同様の傾向が認められたものの、異時性肺転移を選択的に予測する候補遺伝子は抽出されなかった。また、同時性肝転移と同時性肺転移の遺伝子発現プロファイルでは各解析において、明らかに区別された。

【考察】

同時性転移群・非転移群間の differential expression analysis にて異時性転移群・非転移群間の同解析と比較して、より有意水準・発現変動倍率共に高い遺伝子がみられたことより遺伝子変異の蓄積が大きいことが示唆された。さらに、本研究結果と既報論文の比較から、異時性肝転移の予測因子となりうる 17 遺伝子を同定した。肺転移に関しては、現段階では症例数が少ないためのバイアスであることが否定できず、今後の症例の蓄積を待ち、再検を予定している。また、同時性肝転移と同時性肺転移における遺伝子発現プロファイルの比較から、両者が単なる転移経路の違いだけではなく、遺伝子学的に異なる発現パターンを示す集団であることが示唆された。

【結論】

大腸癌原発組織の遺伝子プロファイル解析より、異時性転移の予測因子抽出を試みた。肝転移に関しては、予測因子となりうる遺伝子を抽出することができた。また、肝転移群と肺転移群では転移経路のちがいでなく、遺伝子学的に異なることが示唆された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成 21 年 月 日 公表予定	出版物名
	公 表 内 容	近畿大学医学雑誌 第 34 卷 第 1 号
	全 文	平成 21 年 月 日 発行予定

【目的】

大腸癌は比較的予後良好であり、その生命予後は原発巣よりも肝・肺等の遠隔転移で規定されることが多い。従って、大腸癌異時性遠隔転移の予測因子が同定され、異時性遠隔転移の発現前に適切な補助療法を加えることが可能になれば、生命予後の改善が期待できる。

【方法】

2006年2月から2007年4月までに当院にて切除された原発性大腸癌症例のうち、同時性肝転移症例7例、異時性肝転移症例3例、肺転移を有し肝転移を有さない、即ち同時性肺転移症例5例、異時性肺転移2例と、対照群として年齢、性別、原発部位、壁進達度、リンパ節転移、組織型などが類似した非転移症例5例を用いた。原発組織の一部を手術時に採取し、採取標本からtotal RNAを抽出し、遺伝子プロファイル解析を行った。これまでの我々の研究方法に改善を加え、より良質なRNAを抽出し、バイアスの少ないcDNA増幅を行い、DNAチップにはAffymetrix社製のGeneChip®を用いた。

【結果】

大腸癌肝転移において、同時性肝転移群・非転移群間の differential expression analysis では異時性肝転移群・非転移群間の同解析と比較して、有意水準・発現変動倍率ともに高い遺伝子がみられた。階層的クラスター分析及び、主成分分析において、同時性・異時性を含めた肝転移群と、非転移群に明確に区別することができた。肺転移に関しては、differential expression analysis では肝転移同様の傾向が認められたものの、異時性肺転移を選択的に予測する候補遺伝子は抽出されなかった。また、同時性肝転移と同時性肺転移の遺伝子発現プロファイルでは各解析において、明らかに区別された。

【考察】

同時性転移群・非転移群間の differential expression analysis にて異時性転移群・非転移群間の同解析と比較して、より有意水準・発現変動倍率共に高い遺伝子がみ

られたことより遺伝子変異の蓄積が大きいことが示唆された。さらに、本研究結果と既報論文の比較から、異時性肝転移の予測因子となりうる17遺伝子を同定し、fold change 及び合致した文献数の多いもの4遺伝子を絞り込んだ。この4遺伝子に関して今後、さらなる定性的・定量的発現確認を予定している。肺転移に関しては、現段階では症例数が少ないためのバイアスであることが否定できず、今後の症例の蓄積を待ち、再検を予定している。また、同時性肝転移と同時性肺転移における遺伝子発現プロファイルの比較から、両者が単なる転移経路の違いだけではなく、遺伝子学的に異なる発現パターンを示す集団であることが示唆された。

【結論】

大腸癌原発組織の遺伝子プロファイル解析より、異時性転移の予測因子抽出を試みた。肝転移に関しては、予測因子となりうる遺伝子を抽出することができた。また、肝転移群と肺転移群では転移経路のちがいでだけではなく、遺伝子学的に異なることが示唆された。

発表後の質疑応答は下記の如くであった。

1. 異時性肝転移予測のバイオマーカーとなり得るものとして、4遺伝子を挙げているが、その4つが関わりあってバイオマーカーとなり得ると考えているのか、それともそのうちの一つをそう考えているのか？

“答弁” 件の4遺伝子に関しては、今後定性的・定量的検討を予定しており、その結果も踏まえた上で今後さらなる絞込みをかける方向で進めてゆきたいと考えている。

2. 前述の4遺伝子において、up regulationの遺伝子が3つとdown regulationの遺伝子が1つとなっているが、どちらの遺伝子により興味を持っているのか、また、up regulationのものはoncogeneの候補であり、down regulationのものは suppressor geneと考えられるのか？

“答弁” いわゆるoncogeneや suppressor geneとしてメジャーな遺伝子は含まれておらず、既報論文の報告によっても20や30といった複数の候補遺伝子を挙げている

現状からすると、現段階では絞込み難いと考え。また、例えば DCN は up regulation されているが、腫瘍細胞の成長を抑制するとする報告もなされている。

3. 今回の主成分分析の結果において、第一成分、第二成分を基にした結果をしめしているが、第三成分以降の結果に興味深いところはなかったか。

“答弁” 本研究では第二成分までしか計算しておらず、今後第三成分以降の計算を検討しようとする。

4. 同時性肝転移と異時性肝転移で遺伝子発現に差異があったとのことだが、それはどの解析による結果によるものか。

“答弁” differential expression analysis にて同時性肝転移群 vs 対照群と、異時性肝転移群 vs 対照群で発現に差異のあった遺伝子のうち、異時性肝転移群 vs 対照群でのみ発現に差異の認められた遺伝子のことを示している。双方の differential expression analysis にて  $p < 0.05$ , fold change  $> 1.1$  のものをリストアップし、重複した遺伝子は 62 遺伝子であり、残りのものに重複は認められなかった。

5. 既報論文の報告と一致した 17 遺伝子のうち、4 遺伝子をピックアップした根拠は？

“答弁” HNRPA1, DCN, IGFBP5 に関しては fold change が 2.0 以上であった為であり、CALR は今回対象とした 7 つの既報論文の内、2 つの文献と結果が合致した為に含めた。また、CALR には既に大腸癌と関連する報告も成されている。

6. 現在のところ異時性転移の症例数が少なく、今後も追跡を続けるものと考えが、症例数が増えてくると結果が異なる可能性はないか。

“答弁” 解析結果が異なってくる可能性は充分にあるが、後々症例数を増やしていくように、再現性の高い DNA チップを用いているので、今後出現した異時性転移も解析してゆきたいと考えている。

7. 異時性転移を発現した症例に、脈間浸潤・リンパ管浸潤など、対照群より進展した部分はあったか。

“答弁” 今回の症例に関して、明らかな差はなかった。

8. 異時性肺転移に関しては、予測因子が抽出できていないが、どう考えるか？

“答弁” 大腸癌の肺転移単独症例数がそもそも少ないので、本研究においては、同時性肺転移 3 例と異時性肺転移 2 例を解析したに過ぎなかった。今回は症例数が少ないことにより、結果が出なかったものと考えている。

9. 具体的に異時性肝転移の危険因子が高い症例に対しては、どのような adjuvant therapy を考えているのか。

“答弁” 現在大腸癌 stage III で適応となっている内服の化学療法を加えたり、より危険因子が強いということであれば、点滴投与による systemic therapy も適応となるかもしれない。また、異時性の肝転移のみが予測されるのであれば、転移巣の出現前に、肝動注を加えるというのも一つの選択肢となるかもしれない。

10. 具体的に腫瘍のどの部分の total RNA を抽出したのか、またその組織はどうであったのか。

“答弁” 今回は LCM 等の手法は用いておらず、大腸癌原発組織の周堤隆起の部分より、5mm 角の標本を採取した。組織学的な癌組織の占める割合に関しては検証していない。

11. 異時性肝転移予測遺伝子として挙げた 4 遺伝子のそれぞれの役割について、どのような推測をしているのか。

“答弁” 現在のところ、これらの遺伝子の癌に対する役割、特に転移に関する作用は明らかにはなっておらず、今回はそこまでの仮説は立てていない。本来ならば、こういった結果に対し、定量的 PCR 等にて検証するべきと考えるが、今回は prospective study であったため、異時性転移症例の出現までに時間を要し、今の段階ではそこまでの検証はできていない。