

氏 名	小 倉 健
(ふりがな)	(おぐら たけし)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 24 年 2 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Clinical impact of <i>K-ras</i> mutation analysis in EUS-guided FNA specimens from pancreatic masses (膵腫瘍性病変に対する EUS-FNA 検体における <i>K-ras</i> 遺伝子解析の有用性)
論文審査委員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 芝 山 雄 老 教授 大 道 正 英 教授 鳴 海 善 文

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背景と目的》

超音波内視鏡下穿刺吸引法(Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration: EUS-FNA)は、膵腫瘍に対する最も有用性の高い診断法として確立されつつある。しかし、その感度は65%から95%と幅広く報告され、診断能の向上には何らかの補完的な手段が必要であると考えられる。膵腫瘍の中で、通常型膵癌(Pancreatic Cancer: PC)の予後は極めて不良である。PCに特徴的な遺伝子変異としては、p-53、p-16、DPC4などが報告されているが、特に *K-ras* 遺伝子変異は約90%と高頻度に認められる。そこで、EUS-FNA 検体を用いた *K-ras* 遺伝子解析が、PC の診断能の向上および他腫瘍における除外診断に有用か否かを前向き登録試験として検討することを目的とした。なお、本研究は、愛知県がんセンター中央病院における倫理委員会で承認され、遺伝子解析における患者への説明も書

面での同意を得ている。

《対象と方法》

2003年3月から、2009年9月までで、膵腫瘍に対してEUS-FNAを施行し、かつ*K-ras*遺伝子解析を行った連続する394人の患者が登録された。新鮮検体もしくはセルブロックのパラフィンから切片を作成し、遺伝子解析を行った。全例、まずEUS-FNAで得られた検体の一部、つまり新鮮検体からTotal RNAを抽出し、RT-PCRでcDNAを増幅させ、シーケンスを行うDirect Sequence法を用いた。もしEUS-FNAの結果が、`Atypical Cell`や、`Suspicious of adenocarcinoma`、`Adenocarcinoma`であるにも関わらず、*K-ras*遺伝子変異が陰性であった場合には、更に感度の高いCycleave PCR法を併用した。Cycleave PCR法は、セルブロックのパラフィンからDNAを抽出し、これを増幅させてキメラプローベと反応させる方法で、Mutant DNAが5%含まれていれば検出可能な感度のよい手技である。

《結果》

疾患の内訳は、PC 307例、膵炎症性疾患 47例、他腫瘍 40例（膵内分泌腫瘍 20例、転移性膵腫瘍 8例、膵腺房細胞癌 3例、悪性リンパ腫 3例、Solid-pseudopapillary tumor 3例、漿液性嚢胞腺腫 2例、Lymphoepithelial cyst 1例）であった。*K-ras*遺伝子変異は、PCの87% (266例)に認められ、他腫瘍では7.5%(3例)、膵炎症性疾患では1例も検出されなかった。PCのうち、EUS-FNAで診断確定が不能であった症例は39例あり、その中で18例、46%が*K-ras*遺伝子変異が陽性であった。*K-ras*遺伝子変異陽性をPCとすると、診断能は*K-ras*遺伝子解析単独、EUS-FNA単独ともに、感度87%、特異度100%、陽性反応的中率(PPV)100%、陰性反応的中率(NPV)54%、正診度89%で、両者を併用すると、それぞれ93%、100%、100%、68%、94%であった。結果、*K-ras*遺伝子解析を併用することで、感度6%、正診度5%の上乗せ効果が得られた。

《結 論》

PC に対する Direct Sequence 法に Cycleave PCR 法を併用した、EUS-FNA 検体での *K-ras* 遺伝子解析は、既報の遺伝子変異の頻度と一致しており、EUS-FNA 小検体でも精度の高い解析が可能であった。EUS-FNA 検体における *K-ras* 遺伝子解析は、PC の診断において有用であり、良性疾患や、他腫瘍では *K-ras* 遺伝子変異は極めて稀であり、PC の除外診断の一助となりうる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

超音波内視鏡下穿刺吸引法(Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration: EUS-FNA)は、膵腫瘍に対する最も有用な診断法である。しかし、その感度は65~95%と幅広く報告されている。特に通常型膵癌(Pancreatic Cancer: PC)を正しく診断することは予後の観点からも極めて重要である。そこで申請者らは、PCにおいて特に高頻度に認められる *K-ras* 遺伝子変異を、EUS-FNA 検体を用いて解析を行うことで膵腫瘍の診断に有用か否かを検討した。本研究の対象数は394例と、極めて規模の大きい前向き臨床研究であり、PC以外の対象数も過去に例を見ず、信頼性は高いと考えられる。本研究では、一般に用いられる解析法である Direct Sequence 法で解析がなされているが、EUS-FNA 結果が `Atypical Cell` や `Suspicious of adenocarcinoma`、`Adenocarcinoma` であるにもかかわらず、*K-ras* 遺伝子変異が陰性であった場合は、偽陰性である可能性があるため、申請者らは更に感度の高い Cycleave PCR 法も併用している。結果、PC307例中266例(89%)に *K-ras* 遺伝子変異が見られたのに対し、他腫瘍では40例中3例(3%)、膵炎症性疾患においては1例も認められなかった。このPCにおける *K-ras* 遺伝子変異の頻度は既報とほぼ一致しており、EUS-FNA の小検体でも信頼性の高い解析が可能であることを証明した。また、良性疾患では *K-ras* 遺伝子変異が見られなかったことから、*K-ras* 遺伝子変異をPCとすると、診断能は *K-ras* 遺伝子解析単独、EUS-FNA 単独ともに、感度 87%、特異度 100%、陽性反応的中率(PPV) 100%、陰性反応的中率(NPV) 54%、正診度 89%で、両者を併用すると、それぞれ 93%、100%、100%、68%、94%であった。結果、*K-ras* 遺伝子解析を併用することで、感度 6%、正診度 5%の上乗せ効果が得られたとしている。PC の予後は不良であるため、EUS-FNA の診断に上乗せ効果がえられたことは極めて意義深いことである。加えて、膵炎症性疾患では1例も *K-ras* 遺伝子変異が認められないことから、PC の除外診断にも有用であると思われる。本研究において、EUS-FNA の小検体でも精度の高い遺伝子解析が可能であることが証明されたことは、今後の分子標的治療を併用するかもしれないといった個別化治療につながる貴重な研究結果であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第11条に定めるところの博士(医学)の学位を授

与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Gastrointestinal Endoscopy 2011, in press