

氏 名	上 田 博 文
(ふりがな)	(うえだ ひろふみ)
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27年1月14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	Immunohistochemical analysis of the DNA methyltransferase 3b expression is associated with significant improvements in the discrimination of ulcerative colitis-associated neoplastic lesions (DNMT3bの免疫組織学的解析は、潰瘍性大腸炎患者における腫瘍の診断に有用である)
論文審査委員	(主) 教授 樋 口 和 秀 教授 廣 瀬 善 信 教授 林 道 廣

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

潰瘍性大腸炎の長期罹患及び広範囲罹患患者には、潰瘍性大腸炎関連癌が高率に発生することが知られている。潰瘍性大腸炎関連癌は、進行した状態で発見されることが多く、これらの臨床像を改善するにはより早期の診断が重要である。しかし、内視鏡学的にも病理組織学的にも早期病変を見つけることは難しい。これらの前癌病変として異形成が注目されており、組織診断として Riddell らの分類があるが、実際のところ、再生上皮から異形成を識別することも難しい。そこで我々は、これらの鑑別に DNMT3b (DNA methyltransferase 3b) の免疫染色が有用かどうかについて検討した。

《対 象》

本研究で対象とした症例は、潰瘍性大腸炎関連の腫瘍性病変を合併し、大腸全摘術を施行された潰瘍性大腸炎 31 人である。31 患者の特性は、年齢 49.0 ± 10.8 、性別(男/女) 16/15、罹患期間 17.2 ± 6.3 年、罹患範囲 (全結腸型/左側結腸型) 27/4、治療方法 (Salicylazosulfapyridine/Prednisolone/Immunosuppressive drug) 20/9/2 であった。それら 31 症例は、20 症例が高度浸潤癌(Carcinoma)、10 症例が High grade dysplasia (HGD)、1 症例が Low grade dysplasia (LGD)と診断されていた。

《方 法》

切除標本の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色標本で非腫瘍性直腸粘膜及び腫瘍性粘膜を Riddell classification of gastrointestinal epithelial neoplasia に準じて評価した。その結果、31 症例に見られた Carcinoma・HGD・LGD は全部で 77 病変あり、それらすべてを腫瘍性粘膜として検討対象とした。また 31 症例の直腸粘膜で腫瘍がないと確認された部位を陰性コントロールとして用いた。それらの検体での DNMT3b の発現を免疫組織化学的に検討し、ホットスポットでの腫瘍細胞(あるいは粘膜上皮細胞)すべてにおける DNMT3b 陽性細胞の割合を DNMT3b 発現率として評価した。組織学的評価は外科医及び消化器病理医で診断した。今回のプロトコールについては施設の倫理委員会で承認され、すべての患者から組織採取についてのインフォームドコンセントを施行し同意を得た。

《結 果》

検討対象である 31 例、77 病変(LGD, HGD, Carcinoma, n=23, 20, 34)の腫瘍性粘膜、直腸非腫瘍性粘膜(n=31)を免疫染色した結果、評価可能であったのは、24 例、68 病変(n=22, 17, 29)の腫瘍性粘膜、15 症例の直腸非腫瘍性粘膜であった。潰瘍性大腸炎患者の癌を合併した非腫瘍性直腸粘膜、腫瘍性粘膜における DNMT3b の発現率は、非腫瘍性直腸粘膜で $0.32 [0.18-0.67]$ であったが、腫瘍性粘膜では $0.76 [0.59-0.84]$ と高値を示し、それらには統計学的有意差を認めた($P < 0.001$)。さらに統計学的に解析したところ、潰瘍性大腸炎

関連腫瘍と非腫瘍性変化の鑑別には 0.68 が適切なカットオフ値と考えられ（曲線下面積 0.810）、それを腫瘍と非腫瘍の鑑別診断に適用した場合の感度：66.2%、特異度：86.7%、陽性適中度：95.7%、陰性適中度：36.1%、陽性尤度比：4.95、陰性尤度比：0.20、正診率：69.9%となった。また、腫瘍性粘膜を LGD, HGD, Carcinoma に細分類すると、DNMT3b 蛋白発現率の中央値はそれぞれで 0.70 [0.50–0.75]、0.76 [0.63–0.86]、0.80 [0.58–0.85] であった。LGD に比べて Carcinoma の DNMT3b 蛋白発現率は高く、統計学的有意差を認めたが(P=0.008), LGD と HGD 及び HGD と Carcinoma における DNMT3b 発現率には統計学的有意差はなかった。

《考 察》

今回の研究の目的は、潰瘍性大腸炎関連腫瘍における DNMT3b の蛋白発現を免疫組織化学的に解析し、腫瘍性変化と非腫瘍性粘膜の鑑別における DNMT3b 免疫組織化学の有用性を検討することである。潰瘍性大腸炎関連癌を伴った患者での腫瘍性粘膜は非腫瘍性粘膜に比べ DNMT3b の蛋白発現が有意に高く、DNMT3b の発現率 0.68 以上を陽性と判断した場合の腫瘍診断精度は中等度であった。また、腫瘍性粘膜を再分類した場合、Carcinoma (invasive cancer) と前癌病変である LGD では DNMT3b 蛋白の発現に有意差が認められた。これらの結果から、正常粘膜から前癌病変、浸潤癌になるに伴って、DNMT3b の蛋白発現が漸次増加する可能性が示唆された。潰瘍性大腸炎における非腫瘍性粘膜と腫瘍性粘膜の鑑別についてのこれまでの報告では、*p53* 遺伝子 exon5-8 における PCR-SSCP 法や *p53* 免疫染色による核内異常集積像が補助診断として有用とされており、簡便性などの実用面から特に免疫染色の活用が推奨されている。今回の研究では、発癌への直接関与を示唆する報告があり、また方法として免疫組織化学的アプローチが可能のため、遺伝子のメチル化修飾に関わる酵素である DNMT3b に着目した。結果として、DNMT3b は潰瘍性大腸炎関連の腫瘍/非腫瘍の組織学的鑑別に有用なマーカーになる可能性が示唆されたが、さらなる症例蓄積による検討と適切な評価法の模索が必要と考えられた。

《結 論》

DNMT3b の免疫組織学的解析は潰瘍性大腸炎患者における腫瘍の診断に有用である可能性が示唆された。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

7年以上の長期罹患、広範囲罹患の潰瘍性大腸炎患者には、潰瘍性大腸炎関連癌が発生することがある。潰瘍性大腸炎関連癌における前癌病変である異形成の診断精度は治療選択に関わるため重要であるが、その病理診断は難しい。申請者は本研究において、潰瘍性大腸炎関連癌合併例の腫瘍性粘膜と非腫瘍性粘膜を対象とし、DNAメチル化修飾に関わる酵素 DNMT3b 蛋白発現を免疫組織化学的に解析し、それが病変の鑑別に有用か否かを検討している。

その結果、DNMT3b 蛋白発現率は非腫瘍直腸粘膜と比較して腫瘍性粘膜では有意に高かった。その DNMT3b 蛋白発現率を腫瘍性粘膜と非腫瘍性粘膜の鑑別に用いる際は 0.68 が最適なカットオフ値と考えられ、その場合の感度：66.2%、特異度：86.7%、陽性適中度：95.7%、陰性適中度：36.1%、陽性尤度比：4.95、陰性尤度比：0.20、正診率：69.9%であり、総じて診断精度は中等度と考えた。また、DNMT3b の蛋白発現は非腫瘍性粘膜と腫瘍粘膜、あるいは前癌病変である LGD と Carcinoma (invasive cancer) との間で有意差が認められたことから、前癌病変から浸潤癌になるに従って、DNMT3b 発現が漸次増加する可能性が示唆された。潰瘍性大腸炎における非腫瘍性粘膜と腫瘍性粘膜の鑑別法として *P53* の PCR-SSCP 法による変異検出や免疫染色による核内異常集積像が補助診断とされているが、新たな補助診断として DNMT3b の免疫染色も有用である可能性が考えられた。

以上のことから、さらなる症例蓄積による検討と適切な評価法の模索が必要ではあるが、DNMT3b の免疫組織学的解析は、潰瘍性大腸炎関連の腫瘍/非腫瘍の組織学的鑑別に有用である可能性が考えられた。この知見は癌化の問題が潜在する潰瘍性大腸炎の病理診断における補助ツールとしての応用性につながるものと期待され、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項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)

Surgery today 43(11): 1275-1280, 2013