

博士(医学) 濱屋 寧

論文題目

Factors that contribute to faecal cyclooxygenase-2 mRNA expression in subjects with colorectal cancer

(大腸癌患者における糞便シクロオキシゲナーゼ 2 mRNA 発現に影響を与える因子)

論文の内容の要旨

[はじめに]

日本では大腸癌の患者数が増加している。効果的なスクリーニング法により死亡率の減少が期待されるが、便潜血法の有効性は十分ではない。便潜血検査と同様に糞便をもちいたスクリーニング法として糞便からヒト核酸を抽出し DNA の変異やメチル化を評価する方法、そして mRNA の発現を評価する方法が知られている。

我々は糞便シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) mRNA 発現を指標にした大腸癌診断法を開発し、その有効性を報告してきた。糞便中の COX-2 mRNA 発現は大腸癌組織から剥脱した細胞の数、剥脱した細胞の COX-2 mRNA 発現に影響をうけていることが予想される。剥脱する細胞の数は腫瘍の大きさと関連し、また大腸癌に浸潤している炎症細胞が糞便中に剥脱することも報告されている。盲腸や上行結腸の病変ではヘモグロビンが分解され、便潜血検査が偽陰性となることがあり、剥脱した細胞や mRNA にも同様に分解が起こり糞便 mRNA 発現が低下する。

そこで、糞便中の細胞数、糞便中の炎症細胞数、腫瘍組織における COX-2 mRNA 発現、腫瘍の大きさおよび腫瘍の部位が糞便 COX-2 mRNA に影響を与えているか検討した。

[患者ならびに方法]

下部消化管内視鏡を行い、病理学的に診断された大腸癌患者 78 人と、大腸に病変を認めないコントロール患者 36 人を対象とした。進行度は TNM 分類を用い、脾彎曲部より口側の癌を近位大腸癌、肛門側の癌を遠位大腸癌とした。コントロール患者の年齢中央値は 65 歳、女性が 14 人、男性が 22 人であった。大腸癌患者の年齢中央値は 68 歳、女性が 24 人、男性が 54 人であり、コントロール患者と差はなかった。ステージ 0 が 5 人、I が 14 人、II が 31 人、III が 15 人、IV が 13 人であった。腫瘍の表面積は長径と短径を乗じて算出した。糞便検体は下部消化管内視鏡検査後 2 から 4 週間以内に採取した。本研究は浜松医科大学の倫理委員会の承認に基づき、全ての患者に十分な説明を行った上で、患者の自由意志による文書同意を得た上で実施した。

生検組織と糞便検体から RNA 抽出を行い、ランダムヘキサマーを用いて逆転写反応を行い cDNA を作成した。

TaqMan 法による Real-Time PCR を行い、糞便の COX-2、beta-2-microglobulin (B2M)、CD45、carcinoembryonic antigen (CEA)、E-cadherin (E-cad) の mRNA 発現、および腫瘍組織における

COX-2、B2M、CEA の mRNA 発現を検討した。なお各マーカーの PCR 産物をサブクローニングし、得られたプラスミド DNA で検量線を作成する定量的 PCR を行い、mRNA 発現を評価した。

糞便 B2M、CD45、CEA および E-cad mRNA 発現を糞便中のそれぞれヒト細胞数、炎症細胞数、上皮細胞数の目安とした。

[結果]

大腸癌患者の糞便 COX-2、B2M、CEA、E-cad、CD45 mRNA 発現はコントロール患者のそれらより有意に高かった。大腸癌患者では糞便 COX-2 mRNA 発現は糞便 B2M、CEA、E-cad、CD45 mRNA 発現にそれぞれ正の相関を認めた($r=0.70$; $P < 0.001$ 、 $r=0.54$; $P < 0.001$ 、 $r=0.61$; $P < 0.001$ 、 $r=0.89$; $P < 0.001$)。また糞便 COX-2、B2M、CEA、CD45 mRNA 発現は腫瘍の表面積に正の相関を認めた($r=0.33$; $P = 0.011$ 、 $r=0.29$; $P = 0.027$ 、 $r=0.32$; $P = 0.014$ 、 $r=0.37$; $P = 0.004$)。

腫瘍の COX-2 mRNA 発現は糞便 COX-2 mRNA 発現に正の相関を認めていたが($r=0.38$; $P = 0.012$)、これに表面積を乗じると正の相関が強くなった($r=0.60$; $P < 0.001$)。しかし CEA においてはいずれも相関がなく、血清 CEA 値と糞便 CEA mRNA 発現にも相関は認めなかった。近位大腸癌と遠位大腸癌で糞便 mRNA 発現に差は認めなかった。

[考察]

糞便 B2M、CEA、E-cad、CD45 mRNA の検討から、コントロール患者では大腸粘膜から上皮細胞が剥脱し、大腸癌患者では上皮細胞や炎症細胞を含めた総細胞数が増加していた。腫瘍の表面積と糞便の各マーカー発現の相関と糞便の COX-2 mRNA と他のマーカー発現の相関から、腫瘍が大きくなると糞便への剥離細胞数が増加し、糞便中の上皮細胞、炎症細胞と総細胞数の増加とともに糞便の COX-2 mRNA 発現は上昇すると考えられた。

大腸上皮細胞に発現している CEA mRNA は、糞便における発現と腫瘍部の発現に相関を認めなかった。しかし、COX-2 mRNA は糞便の発現が腫瘍の COX-2 mRNA 発現、表面積とそれらに乗じたものに良く相関することから、糞便 COX-2 mRNA 発現は癌部の COX-2 mRNA 発現に強く影響されていた。なお糞便 B2M mRNA と CEA mRNA は癌部以外の大腸粘膜にも影響を受けるが、糞便 COX-2 mRNA と CD45 mRNA は癌部以外の影響をあまり受けないため両マーカーは強い相関を認めていると考えられた。ただし炎症細胞は COX-2 mRNA を強く発現しているため炎症細胞自体が糞便 COX-2 mRNA 発現の上昇に関与している可能性がある。

近位大腸癌と遠位大腸癌で糞便 COX-2 mRNA 発現に差はなく、癌の部位により影響を受ける便潜血検査に対して優位性が期待できる。

[結論]

大腸癌患者の糞便 COX-2 mRNA 発現は、腫瘍と腫瘍近傍粘膜から剥脱する細胞に由来していることが示唆された。糞便 COX-2 mRNA 発現は、腫瘍から剥脱し糞便に落下した炎症細胞を含む様々な細胞増加、腫瘍部の COX-2 mRNA 発現、腫瘍の大きさなどにより影響さ

れ、腫瘍の部位には影響を受けなかった。

論文審査の結果の要旨

日本では大腸癌の患者数が増加している。効果的なスクリーニング法により死亡率の減少が期待されるが、便潜血法の有効性は十分ではない。便潜血検査と同様に糞便を用いたスクリーニング法として糞便からヒト核酸を抽出しDNAの変異やメチル化を評価する方法、そして mRNA の発現を評価する方法が知られている。

申請者は糞便シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) mRNA 発現を指標にした大腸癌診断法を開発し、その有効性を報告してきたが、今回、糞便中の細胞数、糞便中の炎症細胞数、腫瘍組織における COX-2 mRNA 発現、腫瘍の大きさおよび腫瘍の部位が糞便 COX-2 mRNA に影響を与えているか検討した。

大腸癌患者の糞便 COX-2、B2M、CEA、E-cad、CD45 mRNA 発現はコントロール患者のそれらより有意に高く、COX-2 mRNA 発現は糞便 B2M、CEA、E-cad、CD45 mRNA 発現にそれぞれ正の相関を認めた。また糞便 COX-2、B2M、CEA、CD45 mRNA 発現は腫瘍の表面積に正の相関を認めた。腫瘍の COX-2 mRNA 発現は糞便 COX-2 mRNA 発現に正の相関を認めていたが、これに表面積を乗じると正の相関が強くなった。しかし CEA においてはいずれも相関がなく、血清 CEA 値と糞便 CEA mRNA 発現にも相関は認めなかった。近位大腸癌と遠位大腸癌で糞便 COX-2 mRNA 発現に差は認めなかった。

大腸癌患者の糞便 COX-2 mRNA 発現は、腫瘍と腫瘍近傍粘膜から剥脱する細胞に由来していることが示唆された。糞便 COX-2 mRNA 発現は、腫瘍から剥脱し糞便に落下した炎症細胞を含む様々な細胞増加、腫瘍部の COX-2 mRNA 発現、腫瘍の大きさなどにより影響され、腫瘍の部位には影響を受けなかった。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶村 春彦
副査 前川 真人 副査 中村 利夫