



Title	膵管/胆管狭窄病変の診断ための膵液および胆汁中cell-free DNAを用いたliquid biopsyに関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	永井, 孝輔
Description	配架番号 : 2774
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15458号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90001
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NAGAI_Kosuke_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 永井 孝輔

主査 教授 武富 紹信
審査担当者 副査 教授 谷口 浩二
副査 准教授 加藤 徳雄

学位論文題名

膵管/胆管狭窄病変の診断のための膵液および胆汁中 cell-free DNA を用いた liquid biopsy に関する研究

(Genetic analyses of cell-free DNA in pancreatic juice or bile for diagnosing pancreatic duct and biliary tract strictures)

膵臓癌および胆道癌は予後不良で早期発見が困難な疾患である。内視鏡的逆行性胆管膵管造影検査(以下 ERCP)による生検および細胞診は膵胆道病変に対する標準的な診断方法であるが、診断能は決して高くはない。本研究では、次世代シーケンサーを用いて膵液および胆汁中に含まれる cell-free DNA の遺伝子解析を行い、膵胆道病変に対する新たなリキッドバイオプシーとして、その診断能を検討した。良性疾患を含む 50 症例の膵液、胆汁から cell-free DNA を抽出し、膵癌や胆道癌に関連した既知の遺伝子を含む 50 個の癌関連遺伝子 panel を用いて targeted amplicon sequencing を行った。膵液および胆汁中の cell-free DNA 解析による膵・胆道癌の感度は、細胞診の感度に比べて高い成績を示し、診断能の向上のための新規診断ツールとなり得ることが示された。

審査にあたり、まず副査の谷口教授から、cell-free DNA 解析により良悪性疾患を鑑別するには、本研究のリキッドバイオプシーの感度では、検査で陰性であった場合でも良性疾患と言い切れないのではという質問があった。申請者は、サンプルサイズが不十分であり、特に良性疾患のサンプルが集まりづらかったこと、mutant allele frequency の下限が高いことで感度を十分に上げられなかったことを挙げ、その点を克服すれば感度がさらに上がることが期待できると回答した。また、悪性疾患と病変のない状態の膵液および胆汁中の cell-free DNA 濃度の違いはあるのかという質問に対しては、正常な膵管、胆管に対して ERCP を行うことはほとんどないため比較が難しいが、正常の膵液、胆汁中にも上皮細胞由来の cell-free DNA が含まれていると考えられ、悪性腫瘍では腫瘍由来の cell-free DNA がそれに加えて含まれることになるため、悪性疾患で濃度や検出率が高くなると考えられると回答した。

続いて、副査の加藤准教授から、膵液・胆汁 liquid biopsy の今後の臨床応用についての質問があった。申請者は、良悪性疾患の診断ツールとして利用できると考えているが、今回の研究では ERCP を必要とする症例のみの検討となったため、その手法が確立されれば、より簡便にサンプルを回収するために、スクリーニングの上部消化管内視鏡検査で胆汁や膵液が含まれる十二指腸液を回収し、cell-free DNA を解析することで膵癌、胆道癌に特異的な遺伝子変異を同定できると考えていることを回答した。さらに、治療面では、胆道癌において検出される遺伝子変異のうちの 40%

程度に分子標的薬が使用できる可能性があることから、標準化学療法中に胆管ステント交換を行う際に回収できる胆汁中 cell-free DNA 解析を行うことで、使用可能な分子標的薬を同定できれば、標準化学療法終了後の治療選択肢が増える可能性もあることを回答した。また、細胞診検査ができなかった症例があった理由についての質問には、検体不十分症例があったためであると回答した。

主査の武富教授からは、血漿中の cell-free DNA では癌の病期が進行するにつれて遺伝子変異の検出率が上昇するが、胆汁中の cell-free DNA の解析では病期が進行しても検出率は変わらなかったという結果になった理由はあるのかという質問があり、申請者は、胆管癌や膵癌は進行するにつれて胆管内や膵管内に進展するのではなく、管外への垂直方向への浸潤形式を来することが多く、栄養血管に浸潤する腫瘍量が増えることで血中の腫瘍由来の cell-free DNA は増加し、血中では検出率が上がる一方で、膵液、および胆管内の cell-free DNA 量、すなわち検出率は変わらないのではないかと考察していると回答した。また、今回経鼻膵管・胆管ドレナージチューブを留置した症例で、通常のカテーテルから採取するサンプルと比べて cfDNA の濃度差や遺伝子変異の検出率の違いがあったかという質問には、今回比較検討はしておらず今後サンプル数が増えれば検討したい項目であり、さらに黄疸がない症例の胆汁で cell-free DNA が高い傾向にあった結果を踏まえて、経鼻胆管ドレナージの留置前後での濃度差と検出率の差異についても今後検討していきたいと回答した。

この論文は、早期診断が困難な膵臓癌、胆道癌において膵液や胆汁中の cell-free DNA を対象とした liquid biopsy を応用するという点において高く評価され、今後の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。