

膵臓癌、胆道癌における胆汁中 microRNA 定量解析

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系消化器内科学専攻

國吉 宣行

修了年 2023年

指導教員 木暮 宏史

# 膵臓癌、胆道癌における胆汁中 microRNA 定量解析

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系消化器内科学専攻

國吉 宣行

修了年 2023年

指導教員 木暮 宏史

## 目次

第1章 概要	1
第2章 緒言	3
第3章 対象と方法	7
第4章 結果	12
第5章 考察	16
第6章 まとめ	21
謝辞	23
表 Table	24
図 Figure	33
図説 Figure Legends	38
引用文献	40
研究業績目録	51

## 第1章 概要

膵臓癌および胆道癌は、しばしば胆道浸潤による悪性胆道狭窄を来し、その結果、閉塞性黄疸を引き起こす。このため、胆道ドレナージが必要となるが、その際得られる胆汁細胞診の診断精度は十分とは言えないのが現状である。近年、癌細胞において microRNA(miRNA)が抑制的に遺伝子発現を制御し、癌原遺伝子もしくは癌抑制遺伝子のような役割を持つことが報告され<sup>1</sup>、癌細胞における miRNA の役割が注目を集めている。また、miRNA は、その生物学的安定性と癌の病理生物学における役割から、癌のバイオマーカーとなり得る可能性についても報告されている<sup>2-5</sup>。そこで、われわれは、膵臓癌及び胆道癌による悪性胆道狭窄と良性胆道狭窄の鑑別における胆汁中 miRNA 定量解析の有用性について評価を行なった。当研究は 2019 年 4 月から 2021 年 12 月の間に日本大学医学部附属板橋病院にて診断目的、もしくは治療目的に内視鏡的逆行性胆管膵管造影(ERCP)が行われた際に保存された胆汁を用いた後ろ向き研究である。合計 113 症例（膵臓癌患者 40 例、胆道癌患者 38 例、良性コントロール 35 例）が登録された。まず、年齢、性別をマッチさせた膵臓癌、胆道癌、良性コントロールの各 3 例、合計 9 例の胆汁サンプルから 2578 個のヒト成熟 miRNA を含む miRNA マイクロアレイ解析により網羅的プロファイル解析し、定量対象となる miRNA の候補を絞り込んだ。マイクロアレイ解析により、膵臓癌と胆道癌において良性コントロールと比較して有意に増加している 4 つの miRNA (miR-1275, miR-6891-5p, miR-7107-5p, miR-3197) について、上記 113 例の胆汁サンプルにおいて定量的 real-time PCR を行い、i) 膵臓癌 vs コントロール、ii) 胆道癌 vs コントロール、iii) 膵臓癌 vs 胆道癌の 3 つのペア臨床条件における miRNA 発現プロファイルを比較検討した。その結果、miR-1275 は良性コントロールと比較して膵臓癌 (p=0.003) と胆道癌

( $p=0.049$ ) で、miR-6891-5p は良性コントロールと比較して膵臓癌 ( $p=0.025$ ) で、miR-3197 は胆道癌と比較して膵臓癌( $p=0.015$ )で有意に発現上昇していた。胆汁細胞診と胆汁中 miR-1275 定量解析を組み合わせた場合、膵臓癌診断の感度 77.5% (95%信頼区間 (CI) , 70.7-77.5%)、特異度 100% (95% CI, 92.2-100%) であり、胆道癌診断の感度 84.2%(95% CI, 75.7-87.9%)、特異度 94.3% (95% CI, 85.1-98.3%)であった。一方、胆汁細胞診と胆汁中 miR-6891-5p 定量解析を組み合わせた場合、膵臓癌診断の感度 77.5% (95% CI, 69.6-79.5)、特異度 97.1% (95% CI, 87.2-99.5)であった。特に miR-1275 定量解析は胆汁細胞診と組み合わせることで、細胞診単独と比較して膵臓癌診断における有意な上乗せ効果を認めた( $p=0.014$ )。miR-1275 及び miR-6891-5p は膵臓癌、胆道癌の新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

## 第2章 緒言

### 胆道狭窄の成因、診断

胆道狭窄は胆膵疾患診療でしばしば遭遇する病態であり、様々な良悪性疾患により生じうる。良性胆道狭窄の原因としては、慢性膵炎、原発性硬化性胆管炎、IgG4 関連硬化性胆管炎、術後胆管狭窄が多く占めるが、様々な原因による続発性硬化性胆管炎や原因不明の非特異的胆管炎も存在する。一方、悪性胆道狭窄の原因としては胆道癌、膵臓癌、肝細胞癌、リンパ節転移による狭窄、他臓器癌の胆管転移などがあるが、膵臓癌と胆道癌が大部分を占める。しかし早期の膵臓癌や胆道癌は画像上明らかな腫瘤として同定できない場合があり、腹部超音波やCT などの非侵襲的画像所見のみで良性胆管狭窄との鑑別が困難なことがある。これらの癌に対する外科手術は侵襲が大きく、確実な術前の良悪性診断が求められる。

胆道狭窄の診断には、非侵襲的検査法として腹部エコー・CT・MRI、侵襲的検査法として内視鏡を用いた ERCP・EUS がある。一般的に、これらの画像検査所見から胆道狭窄の存在が明らかになった場合、確定診断のために、引き続き病理学的検査を行う。悪性胆道狭窄の病理学的診断方法としては、胆汁細胞診、擦過細胞診、透視下胆管生検、胆道鏡直視下生検などが存在する。胆汁細胞診に関しては、併発する閉塞性黄疸や胆管炎の治療として施行される胆道ドレナージの際に得られる吸引胆汁を用いて行われるが、これまで報告されている胆汁細胞診の悪性腫瘍診断感度は6~32%と低く、これだけでは十分とは言えないのが現状である<sup>6-9</sup>。一方、Navaneethan ら<sup>10</sup>による meta-analysis(9 文献・730 例)では、擦過細胞診による悪性腫瘍診断感度 45%・特異度 99%、透視下胆管生検は感度 48%・特異度 99%と報告されており、これらも同様に診断感度は満足できるものではない。胆道鏡直視下生検は透視下生検や擦過細胞診に比べ有用であると

する報告が見られるが<sup>11</sup>、両者に差を認めないとする報告もあり<sup>12,13</sup>一定しておらず、また胆道鏡下で用いる生検鉗子は鉗子カップが小さく検体不十分となる可能性も指摘されている。近年、透視下胆管生検陰性胆管狭窄に対する超音波内視鏡下穿刺吸引生検術（EUS-FNAB）の有用性も報告されているが<sup>14</sup>、肝門部領域胆管癌の場合は EUS-FNAB による播種のリスクも報告されており<sup>15</sup>、現時点では手術可能な胆道癌に対しては経皮的に減黄されている場合を除き経乳頭的以外の生検・細胞診は推奨されていない。

### 悪性胆道狭窄の主要因である膵臓癌と胆道癌について

膵臓癌は5年生存率8.5%の難治癌であり、我が国の膵臓癌死亡患者数と罹患者数は37677人(2020年)と42361人(2018年)であり、年々増加傾向にある。一方、胆道癌の5年生存率は24.5%と膵癌について2番目に低く、我が国の胆道癌死亡患者数と罹患者数は17773人(2020年)と22201人(2018年)であり、今後増加することが予想される<sup>16</sup>。特に膵臓癌は本邦における臓器別癌死亡数では男女全体で肺癌、大腸癌、胃癌に次いで第4位であり、男性では第4位、女性では第3位であることから、我が国の公衆衛生上大きな問題となっている<sup>16</sup>。膵臓癌・胆道癌はいずれも外科切除術のみが根治を期待できる治療法であるが、発見時には多くの場合で腫瘍進行のために切除不能であり、膵臓癌の切除率は約20%<sup>17</sup>、胆道癌に関しては部位にもよるが特に肝内・肝門部領域胆管癌、胆嚢癌において切除率は低い<sup>18</sup>。これらの悪性腫瘍に対する診断のファーストステップは、危険因子や臨床症状を認める患者を対象とした腫瘍マーカーの測定や、腹部超音波検査、CTなどの非侵襲的画像検査である。具体的に危険因子として挙げられているのが、膵臓癌では家族歴、糖尿病、慢性膵炎、遺伝性膵炎、膵管内乳頭粘液性腫瘍、膵嚢胞、肥満、喫煙、大量飲酒、胆

道癌では膵・胆管合流異常、原発性硬化性胆管炎、肝内結石、肝吸虫、陶器様胆嚢などである。一方、臨床症状に関してはいずれも腹痛が最も多く、次いで黄疸、腰背部痛、体重減少などであるが初発症状がないことも多く、早期発見困難の要因となっている。膵臓癌や胆道癌の標準的な血清腫瘍マーカーは CEA や CA19-9 があり、NCCN ガイドラインでは CA19-9 の測定が推奨されている。しかしながら、CA19-9 の診断感度は膵臓癌で 56~81%<sup>19-21</sup>、胆道癌では 43~72%と報告されており<sup>22,23</sup>、他の悪性腫瘍と同様に鑑別診断に使用するには感度、特異度が十分ではない。したがって、膵臓癌および胆道癌の診断のための潜在的なバイオマーカーの発見が望まれている。

## microRNA

miRNA は、18-25 塩基配列からなる短い一本鎖 non-coding RNA である。

miRNA はヒトゲノムの約 1%を占め<sup>24</sup>、ヒトではこれまでに 2500 種類以上の miRNA が同定されており、様々な遺伝子の発現制御に関与している。miRNA の生合成についてであるが、核内でゲノム DNA から数百から数千塩基の長い転写産物 primary miRNA(pri-miRNA)が転写され、RNaseIIIである Drosha などの蛋白質により pre-miRNA へとプロセシングされる<sup>25</sup>。Pre-miRNA は exportin-5 によって細胞質へ輸送された後、細胞質において RNaseIIIである Dicer などの蛋白質により pre-miRNA が切断され mature 型の miRNA が産生される<sup>26</sup>。

miRNA は標的 mRNA に対して不完全な相同性をもって結合し、一般に標的遺伝子の 3'UTR を認識して、標的 mRNA を不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制している。それによって、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、代謝を含むいくつかの生命現象を調節している<sup>27-30</sup>。また、体液中での安定性も報告されており、たとえば血液中には RNA 分解酵素が豊富に存在するため RNA は不安定であると考えられていたが、Mitchell ら<sup>31</sup>



により miRNA が血漿中に安定的に存在することが報告された。その後 miRNA は血清/血漿のみならず、尿、唾液、糞便、脳脊髄液などにも存在することが報告された。そのような生物学的安定性や発癌との密接な関連性から近年、miRNA は癌のバイオマーカーとして応用されることが報告されている<sup>2-4, 32</sup>。

## 本研究の目的

胆道狭窄に対する胆道ドレナージの際に得られる胆汁中の miRNA が悪性胆道狭窄の主要因である膵臓癌及び胆道癌のバイオマーカーとなれば、これらの癌における新たな低侵襲診断の一助になることが期待される。これまでに胆汁における miRNA の定量解析を膵臓癌または胆道癌の診断に応用した報告は少なく、また胆汁からの miRNA 抽出に使用された手法も一定していない<sup>33-37</sup>。本研究では、膵臓癌と胆道癌診断における胆汁中 miRNA 定量的解析の有用性と、胆汁細胞診との併用でこれらの診断上乘せ効果に寄与するかを評価した。

## 第3章 対象と方法

### 研究デザイン

日本大学医学部附属板橋病院消化器肝臓内科では、胆道狭窄に対する ERCP を施行した症例に対して病理学的検索もしくは細菌学的検索目的で全例胆汁を吸引し採取している。そしてインフォームドコンセントが得られた患者の余剰胆汁は遠心分離を行なった後-80℃で冷凍保存しており、さらなる分子生物学的検査に備えている。本研究は、2019年4月から2021年12月の期間で、日本大学医学部附属板橋病院において診断もしくは治療目的で ERCP を施行された際に採取され冷凍保存されている膵臓癌、胆道癌、良性胆道狭窄患者の胆汁を用いた miRNA 定量解析の後ろ向き研究である。

対象は悪性胆道狭窄を疑い ERCP で胆汁を採取し、且つ内視鏡的に得られた検体もしくは外科手術後の検体にて膵臓癌または胆道癌と病理学的に診断された患者である。膵臓癌、胆道癌に対する特異的 miRNA の有用性を評価するためのコントロールとして、研究期間中に総胆管結石、自己免疫性膵炎 (AIP)、慢性膵炎 (CP) からなる良性胆道狭窄患者を、膵臓癌または胆道癌患者の数に応じて連続登録した。良性胆道狭窄では、内視鏡的に得られた検体の細胞組織学的検査が陰性であること、患者の臨床経過と CT、内視鏡検査、MRI などの複数のモダリティによる画像検査のコンセンサスに基づいて最終診断を行なった。

本研究では最初にマイクロアレイによる胆汁中 miRNA の発現スクリーニング解析を行い、コントロールと比較し膵臓癌と胆道癌において有意な変動を認める miRNA を絞り込んだ。次に、絞り込んだ複数の miRNA について定量的 Real-Time PCR による検証を行い、胆汁細胞診を組み合わせた膵臓癌及び胆道癌診断の有用性について評価を行なった。膵臓癌及び胆道癌に対する化学療法施行歴のある症例、または他臓器の癌を有する症例は、本研究から除外した。

本研究のプロトコールは 1975 年ヘルシンキ宣言の倫理指針に準拠し、日本大学医学部倫理委員会の承認を得ている (RK-200114-5)。すべての患者は、ERCP の前にさらに分子生物学的検査を行うために ERCP 中に胆汁を採取することについて、書面によるインフォームドコンセントが行われている。

## 胆汁採取と保存

全ての胆汁サンプルは診断、もしくは治療目的で行われた ERCP の際に採取された。胆管にカテーテルを挿管した後、造影剤を注入する前に胆汁を採取し、細胞診検査、もしくは細菌学的検査に使用した。さらに残った胆汁の約 1-5ml を採取し 10,000g、10 分間、4°C で遠心分離を行い、上清部分を -80°C で凍結保存した。

## microRNA の抽出

本研究では、miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen) を用いた。本キットは、mRNA と miRNA を抽出するキットであり、以下の手順で miRNA の抽出を行なった。まず、胆汁サンプル 1ml に対し、QIAzol Lysis Reagent 5ml 加え、vortex 後に 5 分間室温でインキュベーションを行なった。その後クロロホルム 1ml を加え vortex 後に室温で 3 分間のインキュベーションを行い、12,000g、15 分間、4°C で遠心分離の後、水層 (約 3ml) を新しいチューブに採取した。これ以下の処理は室温で行なった。ここで水層と同量の 70%エタノールを加え RNeasy MinElute spin column を flow-through させる処理を追加することで、mRNA をメンブレンに bind させ miRNA を flow-through させた。Flow-through させたライセートに miRNA が含まれるので、こちらに対して 1.5 倍量の 100%エタノールを加え、新しいカラムに移し 8,000g 15 秒で遠心を行いライセートがなくなるまで遠心を繰り返した。次に、カラムに Buffer RWT 700µl を注ぎ

8,000g 15 秒間 で遠心後、Buffer RPE 700 $\mu$ l を注ぎ 8,000g 15 秒間 で遠心、続けて 80%エタノール 500 $\mu$ l を注ぎ 8,000g 2 分間 で遠心後 column を、蓋を開けた状態で 15,000g 5 分間 で遠心を加えエタノールを蒸発させた。最後に 14 $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O をカラムに注ぎ、3 分間の室温でのインキュベーション後、15,000g 1 分間 で遠心分離し得られた溶液を回収して miRNA の精製とした。RNA 濃度は NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。

### microRNA マイクロアレイ

胆汁中 miRNA の発現スクリーニング解析を行うため、性別と年齢をマッチングさせた膵臓癌、胆道癌およびコントロールの各 3 症例（合計 9 症例）に対して 2578 種類のヒト成熟 miRNA を含む miRNA マイクロアレイシステム GeneChip™ miRNA 4.0 Array(Thermo Fisher Scientific) を用いた網羅的解析を実施した。選択した 9 症例においては、それぞれの群で交絡因子となり得る他の因子（病期分類、総ビリルビン値、CRP 値）についてもばらつきがないように対象者を設定し、またいずれも膵臓癌及び胆道癌に対する化学療法施行歴や、他臓器癌を有さない症例とした。まず、抽出した totalRNA(130ng)を FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit(Thermo Fisher Scientific) を用い、プロトコールに従ってラベル化し、GeneChip™ miRNA 4.0 Array にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションしたマイクロアレイはすべて GeneChip™ scanner(Thermo Fisher Scientific) にてシグナルの検出を行なった。検出したシグナルは ThermoFisher® Transcriptome Analysis Console Software を用いて解析を行なった。2578 種類のヒト成熟 miRNA の中から、コントロール群と比較して膵臓癌と胆道癌で発現量が 2 倍以上のアップレギュレートされている miRNA、もしくは 0.5 倍以下にダウンレギュレートされている miRNA を発現変動 miRNA とし、バイオマーカーの候補としてさ

らなる検証を行うこととした。

## cDNA 合成

miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) を用いて以下の手順で cDNA 合成を行なった。抽出した miRNA 8ng に対して 5×miRCURY RT Reaction Buffer 8  $\mu$ l と 10×miRCURY RT Enzyme Mix 4 $\mu$ l、RNase-free water 20  $\mu$ l を加え全量を 40  $\mu$ l とし、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて、cDNA を合成 (Reverse transcription step 60分 42°C/Inactivation of reaction 5分 95°C/Storage 4°C) した。

## Quantitative-PCR

miRCURY LNA SYBR Green PCR Kits (Qiagen) を用いて以下の手順で SYBR-Green ベースのリアルタイム PCR を行なった。30 倍希釈した cDNA 3  $\mu$ l に 2×miRCURY SYBR Green Master Mix 5  $\mu$ l、×10 ROX 0.5  $\mu$ l、各 miRNA に特異的な primer mix 1  $\mu$ l、dH<sub>2</sub>O 0.5  $\mu$ l を加え全量を 10  $\mu$ l とし、7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて 95°C 10 秒- 56°C 1 分 のサイクルを 40 回行った。1 サンプル 3 well で行なった。

細胞外に存在する miRNA の解析では適切なノーマライザーが未だ確立されていないのが現状ではあるが、本研究では過去の文献を参考に miRNA 解析のノーマライザーとして多く使用されている miR-16 を用いて正規化を行なった<sup>31,38</sup>。定量化には  $\Delta\Delta$ Ct 法を適用した。(各サンプルにおける対象 miRNA の Ct 値から miR-16 の Ct 値を差し引き、 $\Delta$ Ct を算出。また、対象サンプルの  $\Delta$ Ct からコントロール群の平均  $\Delta$ Ct を差し引き ( $\Delta\Delta$ Ct 値) miRNA の fold change は、 $2^{-\Delta\Delta$ Ct の式で算出)

## 統計解析

本研究では、i) 膵臓癌 vs コントロール、ii)胆道癌 vs コントロール、iii) 膵臓癌 vs 胆道癌の3つのペア臨床条件における miRNA 発現プロファイルを比較検討した。膵臓癌、胆道癌、コントロールの3群における患者背景や採血結果の比較については、正規性のある連続変数の検定には分散分析 (ANOVA) を、正規性のない場合はクラスカル-ウォリス検定 (Kruskal-Wallis test) を用いた。また、i)~iii)の各ペア条件における miRNA 発現量の比較など2群間の比較においては正規性のある連続変数の検定には対応のない t 検定 (unpaired t test) を、正規性のない場合はマン-ホイットニー検定(Mann-Whitney test)を用いた。カテゴリー変数についてはカイ 2 乗検定 (Chi-square test) を用いて比較された。すべてのデータは Shapiro-Wilk 検定を用いて正規性の検定を行った。各症例の Total Bilirubin の数値と miRNA 発現量の相関関係の解析については、Spearman の順位相関を使用した。それぞれの miRNA 発現の定量解析の診断性能の評価には、ROC 解析と曲線下面積 (AUC) を使用し、AUC の値に基づいて診断能を判断した (AUC 0.9-1.0 : High accuracy、AUC 0.7-0.9 : Moderate accuracy、AUC 0.5-0.7 : Low accuracy) <sup>39</sup>。また、胆汁細胞診に胆汁中 miRNA 定量解析を加えたときの診断能を、多変量ロジスティック解析を用いて比較した。カットオフ値は、ROC 曲線解析から感度と特異度の和が最も高くなる値 (Youden index) <sup>40</sup> により決定した。両側 P 値 < 0.05 は統計的に有意差ありとした。統計解析は GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, California) と R version 2.6.2 (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>) のソフトウェアを使用した。

## 第4章 結果

### 研究対象者

膵臓癌 40 例、胆道癌 38 例、コントロール 35 例の合計 113 例が本研究の対象となった。年齢、性別、嗜好、併存疾患、臨床病期分類（UICC 第 8 版）に関する患者集団の背景を表 1 に示す。膵臓癌群は胆道癌群と比較し女性の割合が有意に高く、喫煙率は低かったが、膵臓癌群とコントロールでは両者の割合に差を認めなかった。膵臓癌と胆道癌患者の 35% (27/78) は、胆汁採取時に臨床病期分類IVであった。検体採取時の各群の血液検査結果を表 2 に示す。コントロール群と比較して、膵臓癌群、胆道癌群において血清中 CA19-9 値と総ビリルビン値は有意に高値であった。CRP 値は胆道癌群においてコントロール群と比較して有意に高値であったが、他の項目に関しては 3 群間で有意差を認めなかった。

### マイクロアレイによる網羅的スクリーニング解析

膵臓癌と胆道癌において有意な変動を認める miRNA を同定するため、マイクロアレイによる網羅的スクリーニング解析を行なった。膵臓癌、胆道癌、コントロールの各群 3 症例（合計 9 症例）の胆汁サンプルにおいてマイクロアレイを行なった結果、2578 種類の miRNA のうち 36 種類の miRNA が発現変動 miRNA として同定された。そのうち 35 種類の miRNA が膵臓癌と胆道癌においてアップレギュレート、1 種類の miRNA がダウンレギュレートされていた ( $P < 0.05$ ) (図 1)。これらの発現変動 miRNA のうち、膵臓癌と胆道癌 6 症例の平均シグナル値が 100 以上かつ、その 6 症例内でシグナル値の変動が少ない 6 種類の miRNA (miR-1275, miR-6891-5p, miR-3162-5p, miR-7107-5p, miR-4532, miR-3197) に対してさらなる解析を行った(表 3)。

## 定量的 Real-time PCR

マイクロアレイによる網羅的解析結果で得られた 6 つの発現変動 miRNA (miR-1275, miR-6891-5p, miR-3162-5p, miR-7107-5p, miR-4532, miR-3197) について quantitative PCR(qPCR) を行なった。このうち miR-3162-5p と miR-4532 は、qPCR で得られた Ct 値がいずれも低く、さらなる解析から除外し、4 種類の miRNA (miR-1275,miR-6891-5p,miR-7107-5p,miR-3197) について、113 症例の胆汁検体 (膵臓癌 n=40、胆道癌 n=38、コントロール n=35) に対して qPCR を行なった。使用した primer の sequence を表 4 に示す。

113 症例における qPCR 結果を図 2 に示す。miR-1275 はコントロール群と比較して膵臓癌群 ( $p=0.003$ )、胆道癌群 ( $p=0.049$ ) で有意に増加していることが示された。miR-6891-5p については胆道癌群とコントロール群間で発現量に統計学的有意差を認めなかったが、膵臓癌群においてコントロール群と比較して有意に増加している結果であった ( $p=0.025$ )。miR-3197 は胆道癌群と比較して膵臓癌群で有意に増加していることが示された ( $p=0.015$ )。miR-7107-5p に関しては各群間で発現量に統計学的有意差は認められなかった。本研究では膵臓癌、胆道癌群はコントロール群と比較し黄疸を呈した症例が多い傾向にあったため、黄疸が miRNA 発現に与える影響を評価するために Spearman の順位相関解析を行ったところ、強い相関関係を認めなかった (図 3)。また、性別、喫煙の有無、病期分類に関しても同様に miRNA 定量値との強い関係性はなかった(図 4)。

## 胆汁中 miR-1275 および miR-6891-5p 定量解析と胆汁細胞診の併用による膵臓癌の診断能評価

4 つの miRNA のうち、最終的に 2 つの miRNA (miRNA-1275、miRNA-6891-5p)



が膵臓癌において、コントロール群と比較し有意に発現量が増加していた。これらの2つの胆汁中 miRNA 定量解析の診断能力を検証するために、ROC 解析を行った。膵臓癌における ROC 曲線の曲線下面積 (AUC) 値は、miR-1275 : 0.70 (95% 信頼区間 (CI) 0.58-0.82,  $p = 0.003$ ) , miR-6891-5p : 0.65 (95% CI 0.53-0.78  $p = 0.025$ ) であった。Youden index によるカットオフ値を用いた場合、miR-1275 のカットオフ値は 1.57 であり、それを用いた膵臓癌診断における感度、特異度、陽性適中率 (PPV)、陰性適中率 (NPV)、診断精度は 70.0%、60.0%、66.7%、63.6%、65.3%であった。また同様に miR-6891-5p のカットオフ値は 0.55 であり、それを用いた膵臓癌診断における感度、特異度、PPV、NPV、診断精度は 80.0%、40.0%、60.4%、63.6%、61.3%であった。(表 5-1)

本研究では、膵臓癌とコントロール 75 症例における胆汁細胞診単独での膵臓癌診断の感度、特異度、PPV、NPV、診断精度、AUC は 70.0%、100%、100%、74.5%、84.0%、0.85 であった。胆汁細胞診に胆汁中 miRNA 定量解析を加えることによる診断上乗せ効果を評価するために、多変量ロジスティック回帰モデルを用いた検証を行なった。胆汁細胞診に miR-1275 定量解析を組み合わせた場合の感度、特異度、PPV、NPV、診断精度、AUC は 77.5%、100%、100%、79.5%、88.0%、0.93 であり、胆汁中 miR-1275 定量解析を加えることで AUC は有意な上昇を認め、診断能の向上がみられた( $p=0.014$ )。一方、胆汁細胞診に miR-6891-5p 定量解析を組み合わせた場合の感度、特異度、PPV、NPV、診断精度、AUC は 77.5%、97.1%、96.9%、79.1%、86.7%、0.89 であり、診断能の向上は見られるものの胆汁細胞診単独の AUC との比較で有意な差はみられなかった( $p=0.21$ )(表 5-1,2 図 5)。

胆汁中 miR-1275 定量解析と胆汁細胞診の併用による胆道癌の診断能

## 評価

4つの miRNA のうち、miR-1275 のみが胆道癌群において、コントロール群と比較し有意に発現量が増加していた。胆汁中 miR-1275 定量解析の胆道癌診断能検証のため ROC 解析を行なったところ、AUC は 0.63 (95% CI 0.50-0.77 p=0.049) であった。Youden index によるカットオフ値を用いた場合、miR-1275 のカットオフ値は 3.28 であり、それを用いた胆道癌診断における感度、特異度、陽性適中率 (PPV)、陰性適中率 (NPV)、診断精度は 52.6%、80.0%、74.1%、60.9%、63.0%であった。(表 6)。

本研究では、胆道癌とコントロール 73 症例における胆汁細胞診単独での胆道癌診断の感度、特異度、PPV、NPV、診断精度、AUC は 65.8%、100%、100%、72.9%、82.2%、0.83 であった。胆汁細胞診に miR-1275 定量解析を組み合わせた場合の感度、特異度、PPV、NPV、診断精度、AUC は 84.2%、94.3%、94.1%、84.6%、89.0%、0.89 であり、診断能の向上は見られるものの胆汁細胞診単独の AUC との比較で有意な差はみられなかった(p=0.15)(表 6-1,2 図 6)。

## 血清腫瘍マーカーCA19-9 と胆汁中 miRNA 定量解析の胆汁細胞診併用による膵臓癌、胆道癌診断能の上乗せ効果の比較

膵臓癌及び胆道癌で有意に上昇を認めた miRNA の胆汁中定量解析と胆汁細胞診の併用が、血清腫瘍マーカーCA19-9 と胆汁細胞診の併用と比較し膵臓癌、胆道癌診断に有意性があるのか検証した結果を表 7-1,2 に示す。コントロール群 35 例のうち 10 例が腫瘍マーカー未測定であったためコントロールの合計は 25 例として検証した。ROC 解析で得られた CA19-9 と胆汁細胞診の組み合わせによる膵臓癌診断の AUC は 0.94 であり、miR-1275 と胆汁細胞診併用、及び miR-

6891-5p と胆汁細胞診併用した場合の膵臓癌診断能はいずれも CA19-9 と胆汁細胞診併用による膵臓癌診断能と比較して優位性を認めなかった ( $p=0.83$ 、 $0.43$ )。また同様に胆道癌診断においては ROC 解析で得られた CA19-9 と胆汁細胞診の組み合わせによる胆道癌診断の AUC は  $0.93$  であり miR-1275 と胆汁細胞診併用における診断能は CA19-9 と胆汁細胞診併用による胆道癌診断能と比較して優位性を認めなかった( $p=0.35$ )。

## 第 5 章 考察

膵臓癌、胆道癌は先進国において発生率、死亡率ともに増加傾向にある最も予後不良な悪性腫瘍の一つである<sup>41</sup>。これらの悪性腫瘍は、早期には特異的な臨床症状を伴わないため、早期発見が困難であり、また、解剖学的位置関係や炎症性変化などの影響により、超音波検査や CT 検査を用いても鑑別に苦慮する機会は少なくない。一方、これらの悪性腫瘍は胆道狭窄による閉塞性黄疸や胆管炎を伴うことが多く、しばしば胆道ドレナージ術が必要となる。胆汁サンプルは胆道ドレナージ治療の副産物であるため、胆汁における新しい膵臓癌、胆道癌のバイオマーカーが発見されれば、より低侵襲で効率的な膵臓癌、胆道癌の診断が可能になると考えられる。今回の研究において我々は膵臓癌、胆道癌による悪性胆道狭窄患者と良性胆道狭窄患者の胆汁中 miRNA 定量解析を行い比較することで、これらが膵臓癌、胆道癌の診断に有用である可能性が示唆された。

癌のバイオマーカーは、体液中で安定であること、アクセスしやすいこと、疾患特異的であること、体内での測定が容易であることなどが求められる。miRNA は様々な複合体を形成することにより RNA と比較し血液中でも安定して存在することができる<sup>21,42-47</sup>とされている。それゆえに癌のバイオマーカーとして近年

特に血液中 miRNA は注目されており、乳癌、大腸癌、胃癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌等、様々な癌種で有用性が既に報告されている<sup>48</sup>。また悪性胆道狭窄の主要因である膵臓癌や胆道癌のバイオマーカーとしても、異なるさまざまな miRNA が報告されている。Kim らは、膵臓癌、胆道癌および健常対照者の血清サンプルをそれぞれ検討し、mir-744-5p、mir-409-3p、mir-128-3p の 3 つの血清 miRNA が膵臓癌および胆道癌診断の潜在的バイオマーカーとして有用であると結論付けている<sup>49</sup>。Kojima らは複数の血清 miRNA を組み合わせることによる、膵臓癌および胆道癌診断の有用性について報告している<sup>50</sup>。一方、血清や血漿以外の体液である唾液や尿などから抽出された miRNA も、同様に膵臓癌、胆道癌の診断に有用であることが報告されており<sup>51,52</sup>、胆汁中 miRNA 定量解析を用いた報告も複数存在する。Shigehara<sup>36</sup> らは胆汁中の miR-9 定量解析が胆道癌の診断に、Voigtländer<sup>34</sup> らは健常者と比較し原発性硬化性胆管炎や胆道癌の患者において胆汁中 miR-412、miR-640、miR-1537、miR-3189 が有意に制御を受けていることを報告している。また Li<sup>5</sup> らは胆汁中のエクソソームとよばれる細胞外小胞に内包されている miRNA を解析し、miR-191 と miR-486-3p の組み合わせが胆道癌の診断に有用であることを述べている。胆汁中の miRNA 定量解析による膵臓癌診断の有用性に関する論文は一編のみ報告されており、miR-10b、miR-30c、miR-106b、miR-155、miR-212 が膵臓癌と慢性膵炎/健常者との鑑別に有用であるとされている<sup>37</sup>。一方、今回のようにマイクロアレイによる網羅的解析を併用した胆汁中 miRNA の、膵臓癌と胆道癌のリキッドバイオプシーとしての検討については未だ報告はない。胆汁は、肝細胞から毛細胆管に分泌され、胆道を通過して十二指腸に循環される過程で胆道上皮に直接暴露されており、血清と比較して胆道上皮が関与する病態をより早期に反映するのではないかと考えられる。そのため、悪性胆道狭窄診断のバイオマーカーを調べる上で胆汁は有用なサンプルであると言える。これまで様々な血中 miRNA が膵臓癌、胆道疾患のバイオマ

ーカーとして報告されてきているが、本研究結果はより信頼性の高い診断につながる可能性があると考えられる。

これまでに報告されている胆汁中 miRNA 定量解析に関する数編の報告では、胆汁そのものから miRNA 抽出を行なっている報告と、胆汁中のエクソソームに内包されている miRNA の解析を行なっている報告が存在する。本研究では胆汁そのものを miRNA プロファイリングのソースとして使用している。エクソソームとは細胞から分泌される直径 50-150nm の顆粒状の物質でありその表面は細胞膜由来の脂質、タンパク質を、内部には核酸やタンパク質などを含んでおり、がん微小環境での新たな細胞間シグナル伝達メカニズムに関与しているとされている<sup>53</sup>。遊離細胞由来の miRNA は不安定であるため、エクソソーム内の miRNA と比較してがんのバイオマーカーには適さないとしている報告がある一方で、エクソソームに内包されている miRNA は体液中に循環している miRNA のごく一部であると述べている報告も存在する<sup>5,54,55</sup>。Shigehara らは、胆汁サンプルを遠心分離により各分画に分離し、それぞれの分画における miRNA の発現量を検証しているが、その結果胆汁中 miRNA の多くは細胞外小胞を含む分画ではなく、全細胞や核に存在することを明らかにしている<sup>36</sup>。しかしながら、miRNA が胆汁中に到達する詳細なメカニズムや胆汁中の各分画における miRNA プロファイルについては十分な説明がなされていないのが現状である。本研究では、より臨床に近い形で胆汁そのものをサンプルとした miRNA 定量解析が可能であることを実証し、また miRNA 定量解析と胆汁細胞診を組み合わせることで、胆汁細胞診の上乗せ効果があることを示した。胆汁中 miRNA の各分画におけるプロファイルについては、さらなる検証が必要である。

本研究では miRBase に登録されている 2578 種類のヒト miRNA を同時に解析できる高感度マイクロアレイを用いて、胆汁内 miRNA 発現の網羅的スクリーニン

グ解析を行い、膵臓癌と胆道癌で特異的に上昇している 4 つの miRNA (miR-1275、miR-6891-5p、miR-7107-5p、miR-3197) について 113 症例の胆汁サンプルにおいて定量的 Real-time PCR による検討を行った。その結果コントロールと比較して miR-1275 は膵臓癌と胆道癌で、miR-6891-5p は膵臓癌で有意な発現上昇を示したが、miR-7107-5p と miR-3197 はいずれとの比較においても有意差を認めなかった。特に、miR-1275 の定量解析と胆汁細胞診の組み合わせによる膵臓癌の診断精度は優れた結果を示した。膵臓癌は胆道上皮由来の腫瘍である胆道癌よりもさらに胆汁細胞診の診断能は劣る傾向にあるため<sup>56</sup>、胆汁中の miRNA 定量解析は膵癌による胆道狭窄の診断においてより有用である可能性が考えられた。一方で、胆道癌診断における透視下胆道生検は技量を要し、特に肝門部胆管癌は EUS-FNAB 施行が困難のため、胆道癌の良悪性鑑別はしばしば難渋する。そのため、miR-1275 が胆道癌診断能上昇に寄与する可能性があることは、実臨床において重要な発見である。また、今回の研究では胆汁中 miRNA 定量解析と胆汁細胞診併用による膵臓癌、胆道癌診断能が、血清腫瘍マーカーである CA19-9 と胆汁細胞診併用による膵臓癌、胆道癌診断能と比較し優れているかの検証を行ったが、いずれも優位性は示されなかった。しかし CA19-9 は早期癌での陽性率は低いため、今後、より症例数を蓄積した検討により miR-1275 や miR-6891-5p が膵臓癌、胆道癌早期発見のスクリーニングとしての有用性が示されれば、これらの miRNA は CA19-9 以上の役割を担う可能性がある。

miR-1275 はこれまでに様々な臓器における促進的もしくは抑制的な腫瘍調節的役割について、複数の報告がなされている。例えば非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、慢性骨髄性白血病の患者において miR-1275 の発現上昇がみられるという報告がある一方で<sup>57-59</sup>、胃癌や咽頭癌では発現が低下しており腫瘍抑制因子として機能しているとする報告も存在する<sup>60-62</sup>。膵臓癌に関連した miR-1275 の役割については一編の報告があるのみであり、Lei らは 20 例の膵臓癌の癌部

組織と非癌部組織で miR-1275 の発現量を解析し癌部で有意な低下を認め、さらに膵臓癌細胞株で miR-1275 を過剰発現させることで癌細胞増殖、転移、浸潤が有意に抑制された結果を報告している<sup>63</sup>。組織と胆汁という、miRNA 抽出の対象となるサンプルの違いはあるが本研究とは異なった結果となっている。胆道癌と miR-1275 との関連性については、これまでに報告はされていない。miR-6891-5p は、選択的 IgA 欠損症で発現が上昇し<sup>64</sup>、冠動脈疾患で発現が低下していると報告されているが<sup>65</sup>、現時点で癌のバイオマーカーとしての報告はない。本研究において膵臓癌、胆道癌患者で miR-1275 および miR-6891-5p の発現異常が示されたメカニズムについては明らかではないが、既報との用いたサンプルの種類、ノーマライザー、miRNA 抽出試薬の種類およびサンプル保存方法なども影響している可能性が考えられる。

miRWalk オンラインデータベース(<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>)<sup>64-66</sup> と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway を用いて miR-1275 と miR-6891-5p の標的遺伝子の予測とパスウェイ解析を行なった。その結果、miR-1275 の標的遺伝子は Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) シグナル伝達経路、miR-6891-5p の標的遺伝子は phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) -Akt シグナル伝達経路に関連したものが多いたことが示された。MAPK シグナル伝達経路および PI3K-Akt シグナル伝達経路は KRAS 遺伝子の下流シグナルであると同時に KRAS 遺伝子変異は膵臓癌および胆道癌の発症に関与することが報告されているという事実は<sup>67-69</sup>、本研究における膵臓癌、胆道癌における miR-1275 および miR-6891-5p の発現上昇を支持するものと考えられる。

胆汁中の miR-3197 発現量は、胆道癌と比較して膵臓癌で有意な上昇を示したものの (p=0.015)、膵臓癌と胆道癌を識別するマーカーとしては不十分な結果であった (診断精度 65.4%、AUC 0.66)。miR-1275 と miR-6891-5p についても miRNA

定量解析単独の場合診断精度は高くはないが、胆道ドレナージの際に得られる胆汁を使用して実施できることから、胆汁細胞診と併用することで、悪性胆道狭窄診断における補助的な診断方法となり得ることが示唆された。今後は膵癌、胆道癌の早期発見に繋げるため、より低侵襲に採取可能な十二指腸液や血漿、便中の miR-1275 や miR6891-5p 定量化が、膵臓癌、胆道癌診断に有用かどうかの検証が必要である。

本研究の限界として、次の3点が挙げられる。第一に、本研究は単施設での後ろ向き研究のためバイアスが存在する可能性があり、他施設における十分な検証はされていないことである。第二に、本研究のコントロールは総胆管結石などの良性疾患を罹患した患者であり、疾患を罹患しない健常な症例ではないことである。胆道ドレナージは侵襲を伴うため疾患を持たない健常者の胆汁サンプル取得は困難であったためである。そのため、健常者との比較は行えていない。第三に、胆汁からの miRNA 抽出方法は一定化されておらず既報と使用した試薬やノーマライザーが異なるが、その点についての検証が為されていない点である。

## 第6章 まとめ

本研究は、膵臓癌、胆道癌、良性コントロールの各3例の胆汁サンプルからマイクロアレイによる網羅的スクリーニング解析を行い、膵臓癌と胆道癌においてコントロールと比較して有意に増加している4つの miRNA (miR-1275, miR-6891-5p, miR-7107-5p, miR-3197) を絞り込んだ。続けて113例(膵臓癌40例、胆道癌38例、コントロール35例)の胆汁サンプルにおいて上記4つの miRNA に対する定量的 real-time PCR を行なった。その結果、コントロールと比較して胆汁中の miR-1275 は膵臓癌と胆道癌で、miR-6891-5p は膵臓癌で有意に発現上昇しており、特に miR-1275 の定量解析は胆汁細胞診と組み合わせることで、膵



臓癌を鑑別する上で良好な感度、特異度、診断精度が得られた。以上より、胆汁細胞診に胆汁中 miR-1275 定量解析を上乗せすることにより膵臓癌の診断能力が向上する可能性が示唆された。今後はこれらの miRNA について、より大規模なコホートで検証し、膵臓癌・胆道癌の予後や治療への反応と相関するマーカーとしての有用性を評価する必要がある。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導いただきました消化器内科学分野主任教授の木暮宏史先生、准教授の今津博雄先生、前主任教授の森山光彦先生、助教の増崎亮太先生には多大な助言を賜りました。厚く感謝を申し上げます。また実験・論文作成をサポートしていただきました山崎元美先生にも感謝の意を評します。臨床面から研究にサポートいただきました消化器内科学分野胆膵グループの先生方にも厚く御礼を申し上げ、感謝の意を評します。

## 表 Table

表 1. Patient characteristics.

Variable	PC (N=40)	BTC (N=38)	Control (N=35)	P value	PC vs Control	BTC vs Control	PC vs BTC
Age,mean(s.d.)	74.8(8.8)	73.9(10.4)	70.5(12.9)	0.185			
Female sex,n(%)	24(60%)	12(32%)	14(40%)	0.034	0.08	0.452	0.0118
Smoking status, n (%)							
Never	22(55%)	10(26.3%)	19(54.3%)	0.0167	0.95	0.0147	0.010
Ever/Current	18(45%)	28(73.7%)	16(45.7%)				
Alcohol status, n (%)							
Never	12(30%)	10(26.3%)	11(31.4%)	0.883			
Current	28(70%)	28(73.7%)	24(68.6%)				
CKD, n (%)	3(7.5%)	2(5.26%)	4(11.4%)	0.618			
Diabetes, n (%)	10(25%)	11(28.9%)	8(22.9%)	0.832			
Tumor Clinical Stage							
I~III	25(62.5%)	26(68.4%)		0.583			
IV	15(37.5%)	12(31.6%)					

Clinical features of the patient. PC: pancreatic cancer, BTC: Biliary-tract cancer, CKD: Chronic Kidney Disease,

表 2. Laboratory characteristics

	PC (N=40)	BTC (N=38)	Control (N=35)	P value	PC vs Control	BTC vs Control	PC vs BTC
CA19-9 U/ml median (IQR)	425(1,536)	102(361)	12(17.4)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.4645
T-Bil mg/dl median (IQR)	7.5(6.3)	5.4(12.3)	0.8(1.0)	0.0001	<0.0001	<0.0001	>0.9999
WBC, $\times 10^3/\mu\text{l}$ median (IQR)	5.3(2.9)	6.0(2.6)	5.9(5.0)	0.155			
TP,g/dl mean (s.d.)	6.4(0.9)	6.5(0.8)	6.4(0.8)	0.809			
CRP,mg/dl median (IQR)	0.5(1.3)	0.7(2.8)	0.1(1.6)	0.0235	0.2133	0.0206	>0.9999

Laboratory characteristics of the patient. PC: pancreatic cancer, BTC: Biliary tract cancer; CA19-9: carbohydrate

antigen 19-9, T-Bil: total bilirubin, WBC: white blood cells, TP: total protein, CRP: C-reactive protein.

表 3. Selected miRNA over-expressed in sets of pooled bile from patients with pancreatic cancer and bile tract cancer compared to those from healthy controls.

	Average signal		Fold-change	P-value
	control	PC+BTC		
miR-3197	29.4	179.8	6.11	0.004
miR-6891-5p	4.7	222.9	47.5	0.008
miR-3162-5p	8.1	154.3	19.2	0.008
miR-1275	6.2	119.4	19.4	0.009
miR-4532	89.9	744.4	8.31	0.010
miR-7107-5p	65.3	398.9	6.13	0.013

PC: pancreatic cancer, BTC: Biliary tract cancer;

表 4. Sequence of primers for quantitative PCR

---

hsa-miR- 1275

5' - GUGGGGGAGAGGCUGUC- 3'

hsa-miR-6891-5p

5' - UAAGGAGGGGGAUGAGGGG-3'

hsa-miR-7107-5p

5' - UCGGCCUGGGGAGGAGGAAGGG- 3'

has-miR-3197

5' - GGAGGCGCAGGCUCGGAAAGGCG- 3'

---

表 5-1. Diagnostic value of quantitative analysis of miR-1275 and miR-6891-5p combined with bile cytology to diagnose biliary stricture with pancreatic cancer (pancreatic cancer: n=40, control: n=35)

	miR-1275 (%)	miR -6891-5p (%)	ERCP cytology (%)	miR1275 or Cytology (%)	miR6891-5p or Cytology (%)
Sensitivity	70.0	80.0	70.0	77.5	77.5
(95% CI)	(59.5-79.1)	(70.4-88.2)	(63.1-70.0)	(70.7-77.5)	(69.7-79.5)
Specificity	60.0	40.0	100	100	97.1
(95% CI)	(48.0-70.4)	(29.0-49.4)	(92.1-100)	(92.2-100)	(88.2-99.5)
PPV	66.7	60.4	100	100	96.9
(95% CI)	(56.7-75.4)	(53.1-66.6)	(90.1-100)	(91.2-100)	(87.1-99.4)
NPV	63.6	63.6	74.5	79.5	79.1
(95% CI)	(50.9-74.7)	(46.1-78.6)	(68.6-58.3)	(73.4-79.5)	(71.8-81.0)
Accuracy	65.3	61.3	84.0	88.0	86.7
(95% CI)	(54.1-75.1)	(51.1-70.1)	(76.6-84.0)	(80.7-88.0)	(78.3-88.9)
AUC	0.70	0.65	0.85	0.93	0.89
(95% CI)	(0.58-0.82)	(0.53-0.78)	(0.78-0.92)	(0.87-0.99)	(0.81-0.97)

PPV: Positive predictive value, NPV: Negative predictive value, AUC: Area under the curve

表 5-2. Number of cases by cytology and miRNA quantitative analysis

cytology	miR-1275	PC(N=40)	Control(N=35)	Total
I/II/III	(-)	9	35	44
	(+)	3	0	3
IV/V	(-)	22	0	22
	(+)	6	0	6

cytology	miR-6891-5p	PC(N=40)	Control(N=35)	Total
I/II/III	(-)	9	34	43
	(+)	3	1	4
IV/V	(-)	22	0	22
	(+)	6	0	6

**PC: pancreatic cancer.**



表 6-1. Diagnostic value of quantitative analysis of miR-1275 combined with bile cytology to diagnose biliary tract cancer (biliary tract cancer: n=38, control: n=35)

	miR-1275 (%)	ERCPC cytology (%)	miR1275 or Cytology (%)
Sensitivity (95% CI)	52.6 (37.3-67.5)	65.8 (58.5-65.8)	84.2 (75.7-87.9)
Specificity (95% CI)	80.0 (64.1-90.0)	100 (92.1-100)	94.3 (85.1-98.3)
PPV (95% CI)	74.1 (59.3-85.6)	100 (88.9-100)	94.1 (84.6-98.2)
NPV (95% CI)	60.9 (52.2-67.6)	72.9 (67.1-72.9)	84.6 (76.3-88.2)
Accuracy (95% CI)	65.8 (54.8-74.3)	82.2 (74.6-82.2)	89.0 (80.2-92.9)
AUC (95% CI)	0.63 (0.50-0.77)	0.83 (0.75-0.91)	0.89 (0.80-0.97)

PPV: Positive predictive value, NPV: Negative predictive value, AUC: Area under the curve

表 6-2. Number of cases by cytology and miRNA quantitative analysis

cytology	miR-1275	BTC(N=38)	Control(N=35)	Total
I/II/III	(-)	6	33	39
	(+)	7	2	9
IV/V	(-)	16	0	16
	(+)	9	0	9

**BTC: Biliary-tract cancer**

表 7-1. Comparison of the diagnostic value of quantitative analysis of miR-1275 and miR-6891-5p combined with bile cytology and serum CA19-9 combined with bile cytology to diagnose biliary stricture with pancreatic cancer (pancreatic cancer: n=39, control: n=25)

	ERCP cytology (%)	CA19-9 (%)	CA19-9 or cytology (%)	miR1275 or Cytology (%)	miR6891-5p or Cytology (%)
Sensitivity	71.8	79.5	92.3	82.1	79.5
(95% CI)	(64.9-71.8)	(70.5-85.1)	(84.3-96.7)	(75.4-82.1)	(72.7-79.5)
Specificity	100	84.0	84.0	100	100
(95% CI)	(89.2-100)	(70.0-92.8)	(71.4-90.9)	(89.6-100)	(89.5-100)
PPV	100	88.6	90.0	100	100
(95% CI)	(89.2-100)	(78.6-94.8)	(82.1-94.3)	(91.9-100)	(91.5-100)
NPV	69.4	72.4	87.5	78.1	75.8
(95% CI)	(62.0-69.4)	(60.3-80.0)	(74.4-94.7)	(70.0-78.1)	(67.8-75.8)
Accuracy	82.8	81.3	89.1	89.1	87.5
(95% CI)	(74.4-82.8)	(70.3-88.1)	(79.2-94.4)	(80.9-89.1)	(79.3-87.5)
AUC	0.86	0.82	0.94	0.93	0.90
(95% CI)	(0.79-0.93)	(0.72-0.92)	(0.89-0.99)	(0.87-0.99)	(0.82-0.98)

PPV: Positive predictive value, NPV: Negative predictive value, AUC: Area under the curve

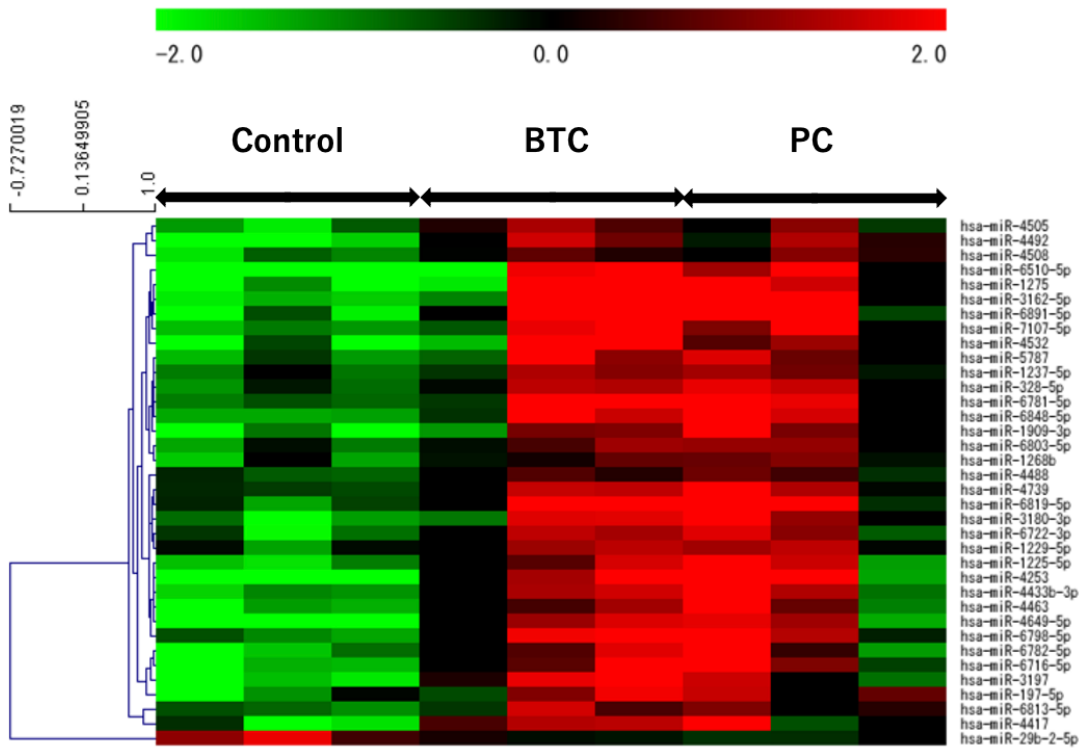
表 7-2. Comparison of the diagnostic value of quantitative analysis of miR-1275 combined with bile cytology and serum CA19-9 combined with bile cytology to diagnose biliary stricture with biliary tract cancer (biliary tract cancer: n=38, control: n=25)

	ERCP cytology (%)	CA19-9 or cytology (%)	miR1275 or Cytology (%)
Sensitivity (95% CI)	65.8 (58.7-65.8)	92.1 (83.9-96.6)	84.2 (77.5-84.2)
Specificity (95% CI)	100 (89.1-100)	84.0 (71.5-90.9)	100 (89.8-100)
PPV (95% CI)	100 (89.1-100)	89.7 (81.7-94.2)	100 (92.0-100)
NPV (95% CI)	65.8 (58.7-65.8)	87.5 (74.4-94.7)	80.6 (72.4-80.6)
Accuracy (95% CI)	79.4 (70.8-79.4)	88.9 (78.9-94.4)	90.5(82.3-90.5)
AUC (95% CI)	0.83 (0.75-0.91)	0.93 (0.88-0.99)	0.90 (0.81-0.98)

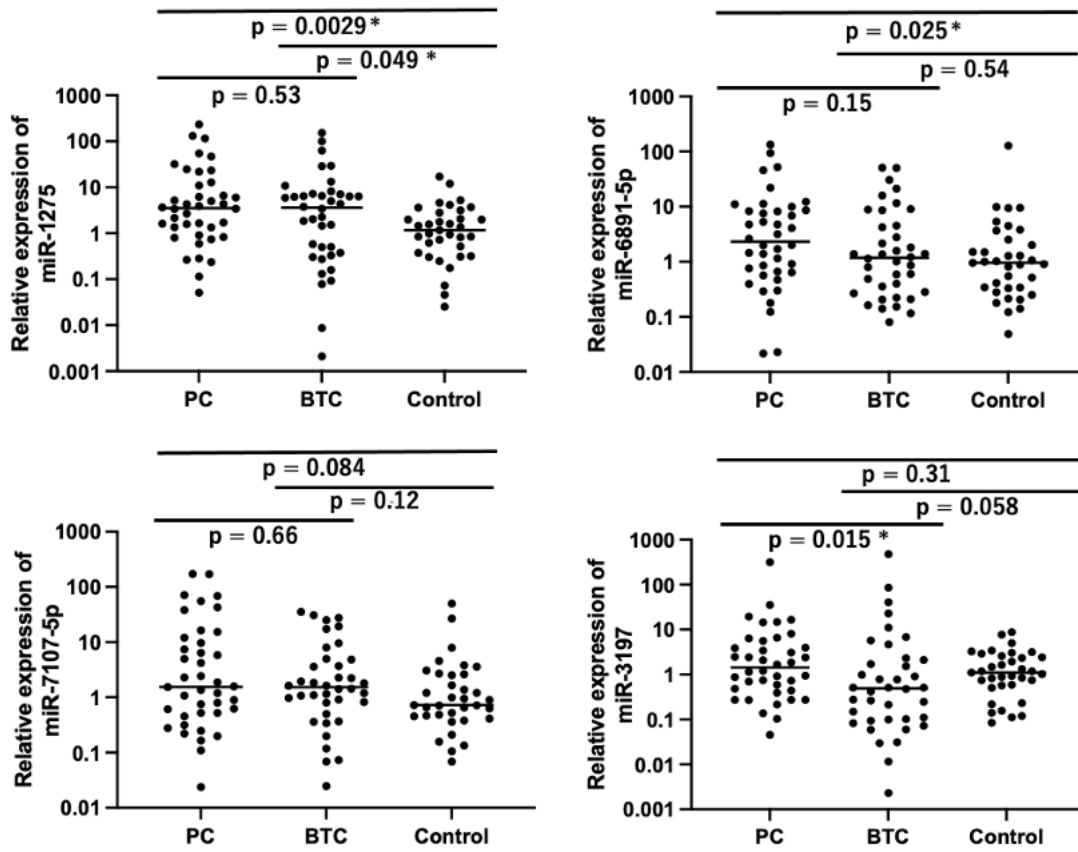
PPV: Positive predictive value, NPV: Negative predictive value, AUC: Area under the curve

Figure

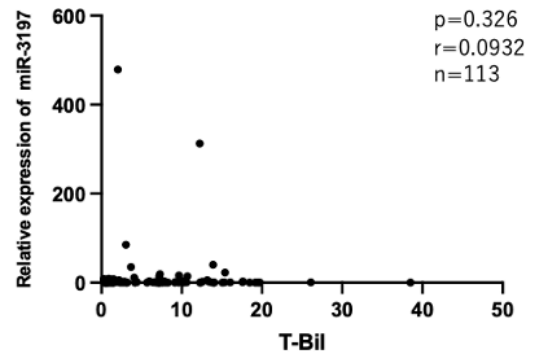
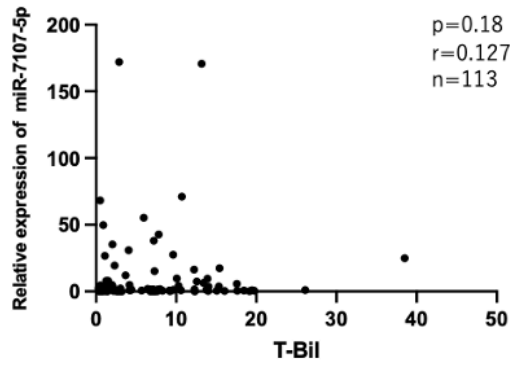
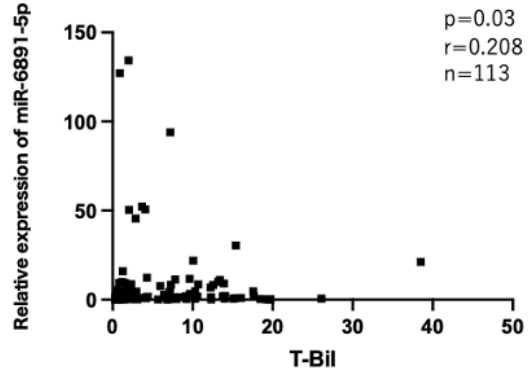
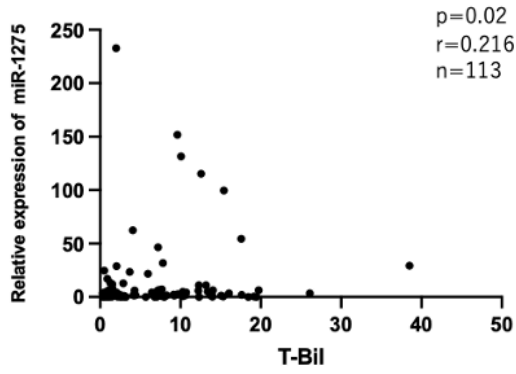
1.



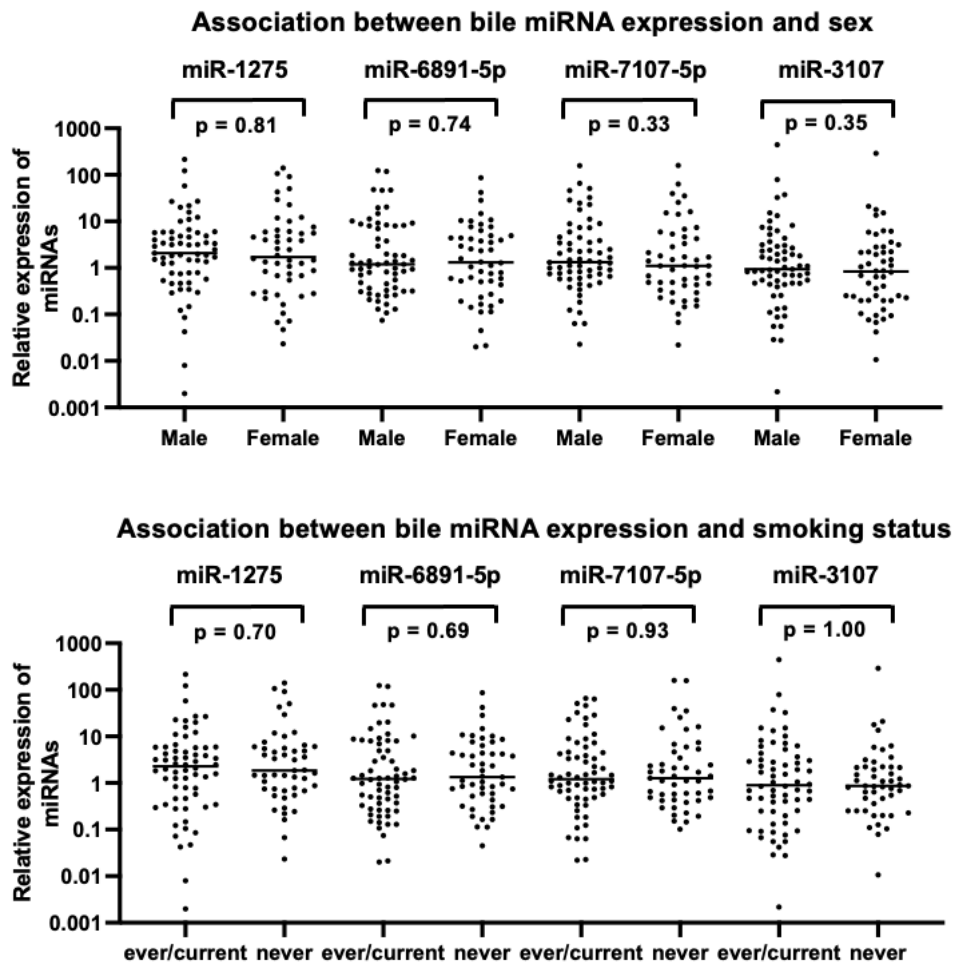
☒ 2.

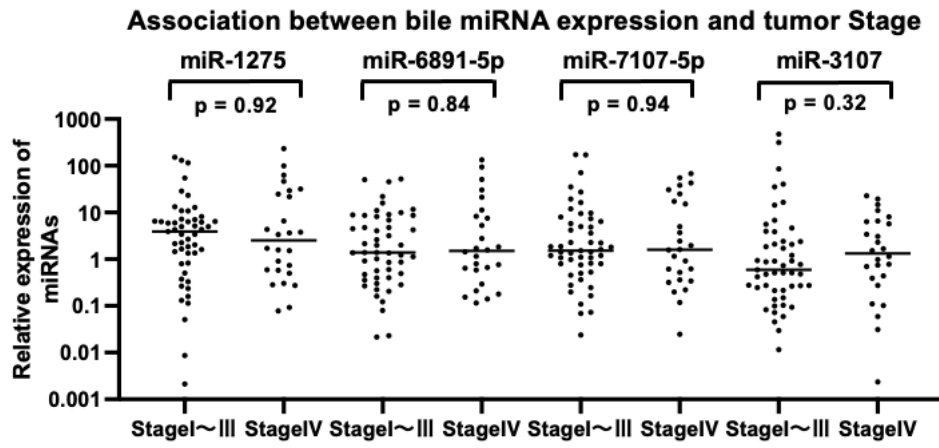


3.



☒ 4.





5.

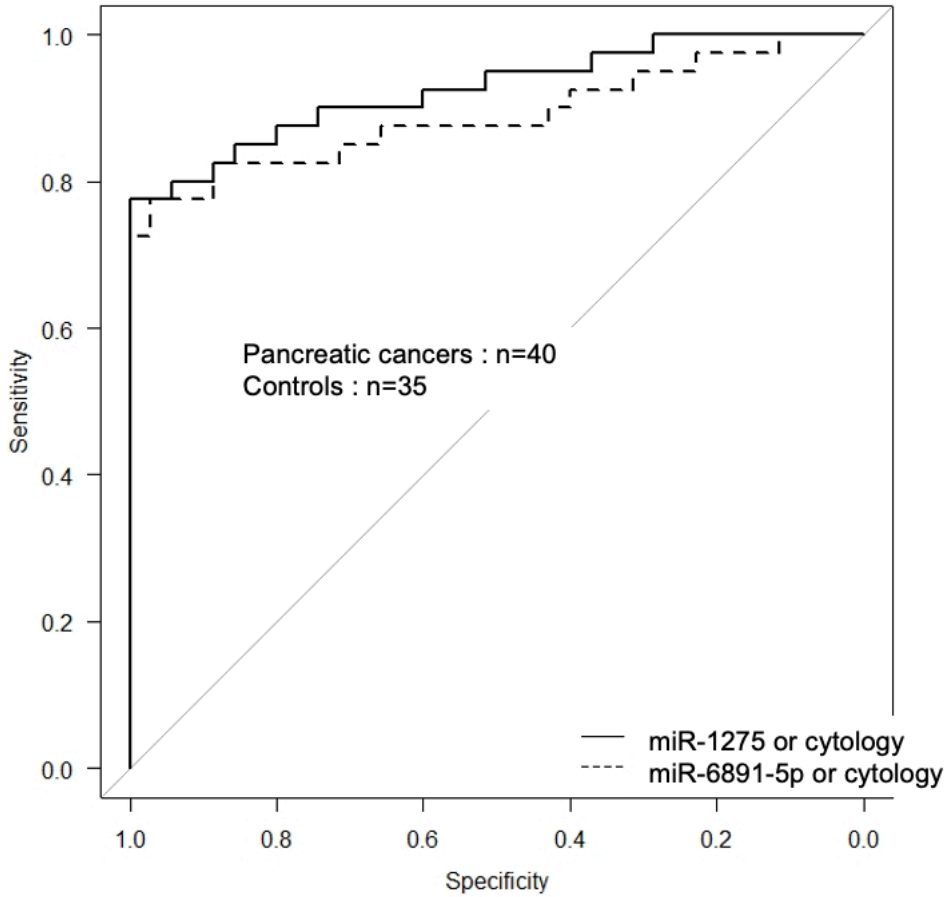
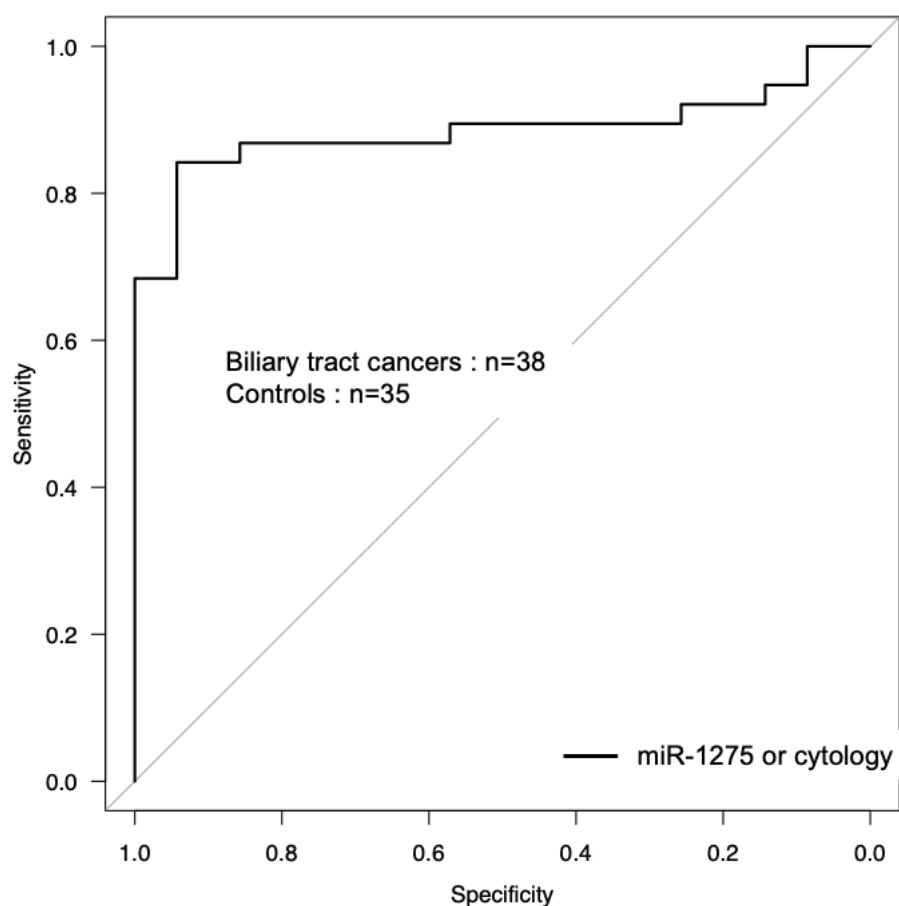




図 6.



## 図説 Figure Legends

図 1. 9 症例（膵臓癌 3 例、胆道癌 3 例、コントロール 3 例）の胆汁サンプルにおける miRNA 発現量を表すヒートマップ。2578 種類の miRNA のうち 36 種類の miRNA が発現変動 microRNA として同定された。

図 2. 膵臓癌 (n=40)、胆道癌 (n=38) およびコントロール (n=35) の胆汁中の miRNA 相対発現量。横線は各 miRNA の中央値を表す。MiR-1275 は、膵臓癌お

よび胆道癌でコントロールと比較し有意に上昇していた。MiR-6891-5p は、膵臓癌でコントロールと比較し有意に上昇していた。MiR-3197 は、胆道癌と比較し膵臓癌で有意に上昇していた。

図 3. 黄疸の数値と各 miRNA 発現量の関係性 (Spearman の順位相関係数)。いずれの miRNA においても黄疸との強い相関関係を認めなかった

図 4. 性別、喫煙の有無、病期分類と miRNA 発現量の関係について (マン-ホイットニー検定)。いずれも項目も miRNA 発現量との間に強い関係性はないようであった。

図 5 胆汁細胞診に胆汁中 miR-1275、及び miR6891-5p 定量解析を組み合わせた場合の診断能を示す ROC 曲線 (膵臓癌による胆道狭窄と良性胆道狭窄の鑑別)

図 6. 胆汁細胞診に胆汁中 miR-1275 定量解析を組み合わせた場合の診断能を示す ROC 曲線 (胆道癌による胆道狭窄と良性胆道狭窄の鑑別)

## 引用文献

- (1) Wiemer, E. A. C. The Role of MicroRNAs in Cancer: No Small Matter. *Eur J Cancer* **2007**, *43* (10), 1529–1544. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.04.002>.
- (2) Iorio, M. V.; Croce, C. M. MicroRNAs in Cancer: Small Molecules with a Huge Impact. *J Clin Oncol* **2009**, *27* (34), 5848–5856. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.0317>.
- (3) Valencia-Sanchez, M. A.; Liu, J.; Hannon, G. J.; Parker, R. Control of Translation and mRNA Degradation by MiRNAs and SiRNAs. *Genes Dev* **2006**, *20* (5), 515–524. <https://doi.org/10.1101/gad.1399806>.
- (4) Iorio, M. V.; Croce, C. M. MicroRNA Dysregulation in Cancer: Diagnostics, Monitoring and Therapeutics. A Comprehensive Review. *EMBO Mol Med* **2012**, *4* (3), 143–159. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100209>.
- (5) Li, L.; Masica, D.; Ishida, M.; Tomuleasa, C.; Umegaki, S.; Kalloo, N.; Georgiades, C.; Singh, V. K.; Khashab, M.; Amateau, S.; Li, Z.; Okolo, P.; Lennon, A.-M.; Saxena, P.; Schlachter, T.; Hong, K.; Pawlik, T. M.; Canto, M.; Sharaiha, R.; Weiss, C. R.; Thuluvath, P.; Goggins, M.; Ji, E.; Peng, H.; Kumbhari, V.; Hutfless, S.; Zhou, L.; Mezey, E.; Meltzer, S. J.; Karchin, R.; Selaru, F. M. Human Bile Contains MicroRNA-Laden Extracellular Vesicles That Can Be Used for Cholangiocarcinoma Diagnosis. **2015**, *26*.
- (6) Foutch, P. G.; Kerr, D. M.; Harlan, J. R.; Kummet, T. D. A Prospective, Controlled Analysis of Endoscopic Cytotechniques for Diagnosis of Malignant Biliary Strictures. *Am J Gastroenterol* **1991**, *86* (5), 577–580.
- (7) Davidson, B.; Varsamidakis, N.; Dooley, J.; Deery, A.; Dick, R.; Kurzawinski,

T.; Hobbs, K. Value of Exfoliative Cytology for Investigating Bile Duct Strictures. *Gut* **1992**, *33* (10), 1408–1411. <https://doi.org/10.1136/gut.33.10.1408>.

(8) Sugiyama, M.; Atomi, Y.; Wada, N.; Kuroda, A.; Muto, T. Endoscopic Transpapillary Bile Duct Biopsy without Sphincterotomy for Diagnosing Biliary Strictures: A Prospective Comparative Study with Bile and Brush Cytology. *Am J Gastroenterol* **1996**, *91* (3), 465–467.

(9) Mansfield, J. C.; Griffin, S. M.; Wadehra, V.; Matthewson, K. A Prospective Evaluation of Cytology from Biliary Strictures. *Gut* **1997**, *40* (5), 671–677. <https://doi.org/10.1136/gut.40.5.671>.

(10) Navaneethan, U.; Njei, B.; Lourdasamy, V.; Konjeti, R.; Vargo, J. J.; Parsi, M. A. Comparative Effectiveness of Biliary Brush Cytology and Intraductal Biopsy for Detection of Malignant Biliary Strictures: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastrointest Endosc* **2015**, *81* (1), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2014.09.017>.

(11) Draganov, P. V.; Chauhan, S.; Wagh, M. S.; Gupte, A. R.; Lin, T.; Hou, W.; Forsmark, C. E. Diagnostic Accuracy of Conventional and Cholangioscopy-Guided Sampling of Indeterminate Biliary Lesions at the Time of ERCP: A Prospective, Long-Term Follow-up Study. *Gastrointest Endosc* **2012**, *75* (2), 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2011.09.020>.

(12) Walter, D.; Peveling-Oberhag, J.; Schulze, F.; Bon, D.; Zeuzem, S.; Friedrich-Rust, M.; Albert, J. G. Intraductal Biopsies in Indeterminate Biliary Stricture: Evaluation of Histopathological Criteria in Fluoroscopy- vs. Cholangioscopy Guided Technique. *Dig Liver Dis* **2016**, *48* (7), 765–770. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.03.013>.

(13) Sekine, K.; Yasuda, I.; Doi, S.; Kuniyoshi, N.; Tsujikawa, T.; Takano, Y.; Mabuchi, M.; Takahashi, K.; Kawamoto, M.; Takahashi, M.; Aso, T.; Miyazaki, T.;

- Iwashita, T. Peroral Cholangioscopy-Guided Targeted Biopsy versus Conventional Endoscopic Transpapillary Forceps Biopsy for Biliary Stricture with Suspected Bile Duct Cancer. *J Clin Med* **2022**, *11* (2), 289. <https://doi.org/10.3390/jcm11020289>.
- (14) Ohshima, Y.; Yasuda, I.; Kawakami, H.; Kuwatani, M.; Mukai, T.; Iwashita, T.; Doi, S.; Nakashima, M.; Hirose, Y.; Asaka, M.; Moriwaki, H. EUS-FNA for Suspected Malignant Biliary Strictures after Negative Endoscopic Transpapillary Brush Cytology and Forceps Biopsy. *J Gastroenterol* **2011**, *46* (7), 921–928. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0404-z>.
- (15) Khashab, M. A.; Fockens, P.; Al-Haddad, M. A. Utility of EUS in Patients with Indeterminate Biliary Strictures and Suspected Extrahepatic Cholangiocarcinoma (with Videos). *Gastrointest Endosc* **2012**, *76* (5), 1024–1033. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2012.04.451>.
- (16) Kuniyoshi, N.; Miyakawa, H.; Matsumoto, K.; Tsunashima, H.; Sekine, K.; Tsujikawa, T.; Mabuchi, M.; Doi, S.; Kikuchi, K. Detection of Anti-Mitochondrial Antibodies Accompanied by Drug-Induced Hepatic Injury Due to Atorvastatin. *Intern Med* **2019**, *58* (18), 2663–2667. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2708-19>.
- (17) Vincent, A.; Herman, J.; Schulick, R.; Hruban, R. H.; Goggins, M. Pancreatic Cancer. *Lancet* **2011**, *378* (9791), 607–620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0).
- (18) Ishihara, S.; Horiguchi, A.; Miyakawa, S.; Endo, I.; Miyazaki, M.; Takada, T. Biliary Tract Cancer Registry in Japan from 2008 to 2013. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **2016**, *23* (3), 149–157. <https://doi.org/10.1002/jhbp.314>.
- (19) Huang, Z.; Liu, F. Diagnostic Value of Serum Carbohydrate Antigen 19-9 in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Tumour Biol* **2014**, *35* (8), 7459–7465. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1995-9>.

- (20) Su, S.-B.; Qin, S.-Y.; Chen, W.; Luo, W.; Jiang, H.-X. Carbohydrate Antigen 19-9 for Differential Diagnosis of Pancreatic Carcinoma and Chronic Pancreatitis. *World J Gastroenterol* **2015**, *21* (14), 4323–4333.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i14.4323>.
- (21) Brand, R. E.; Nolen, B. M.; Zeh, H. J.; Allen, P. J.; Eloubeidi, M. A.; Goldberg, M.; Elton, E.; Arnoletti, J. P.; Christein, J. D.; Vickers, S. M.; Langmead, C. J.; Landsittel, D. P.; Whitcomb, D. C.; Grizzle, W. E.; Lokshin, A. E. Serum Biomarker Panels for the Detection of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* **2011**, *17* (4), 805–816.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0248>.
- (22) Liang, B.; Zhong, L.; He, Q.; Wang, S.; Pan, Z.; Wang, T.; Zhao, Y. Diagnostic Accuracy of Serum CA19-9 in Patients with Cholangiocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Med Sci Monit* **2015**, *21*, 3555–3563.  
<https://doi.org/10.12659/msm.895040>.
- (23) Wang, Y.-F.; Feng, F.-L.; Zhao, X.-H.; Ye, Z.-X.; Zeng, H.-P.; Li, Z.; Jiang, X.-Q.; Peng, Z.-H. Combined Detection Tumor Markers for Diagnosis and Prognosis of Gallbladder Cancer. *World J Gastroenterol* **2014**, *20* (14), 4085–4092.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i14.4085>.
- (24) Lee, R. C.; Ambros, V. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis Elegans*. *Science* **2001**, *294* (5543), 862–864. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>.
- (25) Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Rådmark, O.; Kim, S.; Kim, V. N. The Nuclear RNase III Droscha Initiates MicroRNA Processing. *Nature* **2003**, *425* (6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>.
- (26) Lund, E.; Güttinger, S.; Calado, A.; Dahlberg, J. E.; Kutay, U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* **2004**, *303* (5654), 95–98.  
<https://doi.org/10.1126/science.1090599>.

- (27) Croce, C. M. Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Cancer. *Nat Rev Genet* **2009**, *10* (10), 704–714. <https://doi.org/10.1038/nrg2634>.
- (28) Hoffman, A. E.; Liu, R.; Fu, A.; Zheng, T.; Slack, F.; Zhu, Y. Targetome Profiling, Pathway Analysis and Genetic Association Study Implicate MiR-202 in Lymphomagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2013**, *22* (3), 327–336. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-1131-T>.
- (29) Pizzini, S.; Bisognin, A.; Mandruzzato, S.; Biasiolo, M.; Faccioli, A.; Perilli, L.; Rossi, E.; Esposito, G.; Rugge, M.; Pilati, P.; Mocellin, S.; Nitti, D.; Bortoluzzi, S.; Zanovello, P. Impact of MicroRNAs on Regulatory Networks and Pathways in Human Colorectal Carcinogenesis and Development of Metastasis. *BMC Genomics* **2013**, *14*, 589. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-589>.
- (30) Xia, H.; Hui, K. M. MicroRNAs Involved in Regulating Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells as Molecular Targets for Cancer Therapeutics. *Cancer Gene Ther* **2012**, *19* (11), 723–730. <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.58>.
- (31) Mitchell, P. S.; Parkin, R. K.; Kroh, E. M.; Fritz, B. R.; Wyman, S. K.; Pogosova-Agadjanyan, E. L.; Peterson, A.; Noteboom, J.; O'Briant, K. C.; Allen, A.; Lin, D. W.; Urban, N.; Drescher, C. W.; Knudsen, B. S.; Stirewalt, D. L.; Gentleman, R.; Vessella, R. L.; Nelson, P. S.; Martin, D. B.; Tewari, M. Circulating MicroRNAs as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (30), 10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>.
- (32) Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J. Oncomirs - MicroRNAs with a Role in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6* (4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>.
- (33) Li, L.; Masica, D.; Ishida, M.; Tomuleasa, C.; Umegaki, S.; Kalloo, A. N.; Georgiades, C.; Singh, V. K.; Khashab, M.; Amateau, S.; Li, Z.; Okolo, P.; Lennon, A.-

M.; Saxena, P.; Geschwind, J.-F.; Schlachter, T.; Hong, K.; Pawlik, T. M.; Canto, M.; Law, J.; Sharaiha, R.; Weiss, C. R.; Thuluvath, P.; Goggins, M.; Shin, E. J.; Peng, H.; Kumbhari, V.; Hutfless, S.; Zhou, L.; Mezey, E.; Meltzer, S. J.; Karchin, R.; Selaru, F. M. Human Bile Contains MicroRNA-Laden Extracellular Vesicles That Can Be Used for Cholangiocarcinoma Diagnosis. *Hepatology* **2014**, *60* (3), 896–907.

<https://doi.org/10.1002/hep.27050>.

(34) Voigtländer, T.; Gupta, S. K.; Thum, S.; Fendrich, J.; Manns, M. P.; Lankisch, T. O.; Thum, T. MicroRNAs in Serum and Bile of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis and/or Cholangiocarcinoma. *PLoS ONE* **2015**, *10* (10), e0139305.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139305>.

(35) Lankisch, T. O.; Voigtla, T.; Dangwal, S.; Thum, T. MicroRNAs in the Bile of Patients with Biliary Strictures after Liver Transplantation. *LIVER TRANSPLANTATION* **2014**, *6*.

(36) Shigehara, K.; Yokomuro, S.; Ishibashi, O.; Mizuguchi, Y.; Arima, Y.; Kawahigashi, Y.; Kanda, T.; Akagi, I.; Tajiri, T.; Yoshida, H.; Takizawa, T.; Uchida, E. Real-Time PCR-Based Analysis of the Human Bile MicroRNAome Identifies MiR-9 as a Potential Diagnostic Biomarker for Biliary Tract Cancer. *PLoS ONE* **2011**, *6* (8), e23584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023584>.

(37) Cote, G. A.; Gore, J. A.; McElyea, S. D.; Heathers, L. E.; Xu, H.; Sherman, S.; Korc, M. A Pilot Study to Develop a Diagnostic Test for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Differential Expression of Select MiRNA in Plasma and Bile. *American Journal of Gastroenterology* **2014**, *109* (12), 1942–1952.

<https://doi.org/10.1038/ajg.2014.331>.

(38) Liang, Y.; Ridzon, D.; Wong, L.; Chen, C. Characterization of MicroRNA Expression Profiles in Normal Human Tissues. *BMC Genomics* **2007**, *8*, 166.



<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-166>.

(39) Akobeng, A. K. Understanding Diagnostic Tests 3: Receiver Operating Characteristic Curves. *Acta Paediatr* **2007**, *96* (5), 644–647.

<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2006.00178.x>.

(40) Samawi, H. M.; Yin, J.; Rochani, H.; Panchal, V. Notes on the Overlap Measure as an Alternative to the Youden Index: How Are They Related? *Stat Med* **2017**, *36* (26), 4230–4240. <https://doi.org/10.1002/sim.7435>.

(41) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**, *68* (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

(42) Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J. J.; Lötvall, J. O. Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells. *Nat Cell Biol* **2007**, *9* (6), 654–659.

<https://doi.org/10.1038/ncb1596>.

(43) Hunter, M. P.; Ismail, N.; Zhang, X.; Aguda, B. D.; Lee, E. J.; Yu, L.; Xiao, T.; Schafer, J.; Lee, M.-L. T.; Schmittgen, T. D.; Nana-Sinkam, S. P.; Jarjoura, D.; Marsh, C. B. Detection of MicroRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS One* **2008**, *3* (11), e3694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694>.

(44) Kosaka, N.; Iguchi, H.; Yoshioka, Y.; Takeshita, F.; Matsuki, Y.; Ochiya, T. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *J Biol Chem* **2010**, *285* (23), 17442–17452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821>.

(45) Arroyo, J. D.; Chevillet, J. R.; Kroh, E. M.; Ruf, I. K.; Pritchard, C. C.; Gibson, D. F.; Mitchell, P. S.; Bennett, C. F.; Pogosova-Agadjanyan, E. L.; Stirewalt, D. L.; Tait, J. F.; Tewari, M. Argonaute2 Complexes Carry a Population of Circulating

- MicroRNAs Independent of Vesicles in Human Plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (12), 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>.
- (46) Turchinovich, A.; Weiz, L.; Langheinz, A.; Burwinkel, B. Characterization of Extracellular Circulating MicroRNA. *Nucleic Acids Res* **2011**, *39* (16), 7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>.
- (47) Wang, K.; Zhang, S.; Weber, J.; Baxter, D.; Galas, D. J. Export of MicroRNAs and MicroRNA-Protective Protein by Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38* (20), 7248–7259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq601>.
- (48) Brase, J. C.; Wuttig, D.; Kuner, R.; Sülthmann, H. Serum MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Cancer. *Mol Cancer* **2010**, *9*, 306. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-306>.
- (49) Kim, K.; Yoo, D.; Lee, H. S.; Lee, K. J.; Park, S. B.; Kim, C.; Jo, J. H.; Jung, D. E.; Song, S. Y. Identification of Potential Biomarkers for Diagnosis of Pancreatic and Biliary Tract Cancers by Sequencing of Serum MicroRNAs. *BMC Med Genomics* **2019**, *12* (1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0521-8>.
- (50) Kojima, M.; Sudo, H.; Kawauchi, J.; Takizawa, S.; Kondou, S.; Nobumasa, H.; Ochiai, A. MicroRNA Markers for the Diagnosis of Pancreatic and Biliary-Tract Cancers. *PLoS ONE* **2015**, *10* (2), e0118220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118220>.
- (51) Machida, T.; Tomofuji, T.; Maruyama, T.; Yoneda, T.; Ekuni, D.; Azuma, T.; Miyai, H.; Mizuno, H.; Kato, H.; Tsutsumi, K.; Uchida, D.; Takaki, A.; Okada, H.; Morita, M. MiR-1246 and MiR-4644 in Salivary Exosome as Potential Biomarkers for Pancreatobiliary Tract Cancer. *Oncology Reports* **2016**, *36* (4), 2375–2381. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5021>.
- (52) Ishige, F.; Hoshino, I.; Iwatate, Y.; Chiba, S.; Arimitsu, H.; Yanagibashi, H.;

- Nagase, H.; Takayama, W. MIR1246 in Body Fluids as a Biomarker for Pancreatic Cancer. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 8723. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65695-6>.
- (53) Silverman, J. M.; Reiner, N. E. Exosomes and Other Microvesicles in Infection Biology: Organelles with Unanticipated Phenotypes. *Cell Microbiol* **2011**, *13* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x>.
- (54) Turchinovich, A.; Weiz, L.; Burwinkel, B. Extracellular MiRNAs: The Mystery of Their Origin and Function. *Trends Biochem Sci* **2012**, *37* (11), 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.08.003>.
- (55) Roest, H. P.; Verhoeven, C. J.; van der Laan, L. J. W. MicroRNAs in Bile Vesicles: Finding a Trade-off for Biomarker Discovery. *Hepatology* **2015**, *61* (3), 1094–1095. <https://doi.org/10.1002/hep.27325>.
- (56) Noda, Y.; Fujita, N.; Kobayashi, G.; Ito, K.; Horaguchi, J.; Hashimoto, S.; Koshita, S.; Ishii, S.; Kanno, Y.; Ogawa, T.; Masu, K.; Tsuchiya, T.; Oikawa, M.; Honda, H.; Sawai, T.; Uzuki, M.; Fujishima, F. Prospective Randomized Controlled Study Comparing Cell Block Method and Conventional Smear Method for Bile Cytology. *Dig Endosc* **2013**, *25* (4), 444–452. <https://doi.org/10.1111/j.1443-1661.2012.01404.x>.
- (57) He, J.; Yu, L.; Wang, C.-M.; Zhou, X.-F. MiR-1275 Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation and Metastasis by Regulating LZTS3 Expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2018**, *22* (9), 2680–2687. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201805\\_14964](https://doi.org/10.26355/eurrev_201805_14964).
- (58) Liu, M.-D.; Wu, H.; Wang, S.; Pang, P.; Jin, S.; Sun, C.-F.; Liu, F.-Y. MiR-1275 Promotes Cell Migration, Invasion and Proliferation in Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck via up-Regulating IGF-1R and CCR7. *Gene* **2018**, *646*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.049>.

- (59) Yang, J.-R.; Shi, M.-X.; Zeng, Y. LncRNA HAND2-AS1 Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of Chronic Myeloid Leukemia Cells by Sponging with MicRNA-1275. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2019**, *23* (5), 2103–2111. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201903\\_17254](https://doi.org/10.26355/eurrev_201903_17254).
- (60) Wang, Y.-W.; Zhang, W.; Ma, R. Bioinformatic Identification of Chemoresistance-Associated MicroRNAs in Breast Cancer Based on Microarray Data. *Oncol Rep* **2018**, *39* (3), 1003–1010. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6205>.
- (61) Mei, J.-W.; Yang, Z.-Y.; Xiang, H.-G.; Bao, R.; Ye, Y.-Y.; Ren, T.; Wang, X.-F.; Shu, Y.-J. MicroRNA-1275 Inhibits Cell Migration and Invasion in Gastric Cancer by Regulating Vimentin and E-Cadherin via JAZF1. *BMC Cancer* **2019**, *19* (1), 740. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5929-1>.
- (62) Sun, K.-Y.; Peng, T.; Chen, Z.; Huang, J.; Zhou, X.-H. MicroRNA-1275 Suppresses Cell Growth, and Retards G1/S Transition in Human Nasopharyngeal Carcinoma by down-Regulation of HOXB5. *J Cell Commun Signal* **2016**, *10* (4), 305–314. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0351-9>.
- (63) Yuan, L.; Ji, M.-Y.; Lu, C.; Huang, P.; Dong, W.-G. MicroRNA-1275 Targets PKC $\alpha$  to Depress Proliferation and the Invasion of Pancreatic Cancer Cells. *Transl. Cancer Res* **2018**, *7* (6), 1577–1585. <https://doi.org/10.21037/tcr.2018.11.32>.
- (64) Chitnis, N.; Clark, P. M.; Kamoun, M.; Stolle, C.; Brad Johnson, F.; Monos, D. S. An Expanded Role for HLA Genes: HLA-B Encodes a MicroRNA That Regulates IgA and Other Immune Response Transcripts. *Front Immunol* **2017**, *8*, 583. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00583>.
- (65) Zhong, Z.; Zhong, W.; Zhang, Q.; Zhang, Q.; Yu, Z.; Wu, H. Circulating MicroRNA Expression Profiling and Bioinformatics Analysis of Patients with Coronary Artery Disease by RNA Sequencing. *J Clin Lab Anal* **2020**, *34* (1), e23020.

<https://doi.org/10.1002/jcla.23020>.

(66) Sticht, C.; De La Torre, C.; Parveen, A.; Gretz, N. MiRWalk: An Online Resource for Prediction of MicroRNA Binding Sites. *PLoS One* **2018**, *13* (10), e0206239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>.

(67) Bardeesy, N.; DePinho, R. A. Pancreatic Cancer Biology and Genetics. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2* (12), 897–909. <https://doi.org/10.1038/nrc949>.

(68) Wood, L. D.; Hruban, R. H. Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms. *Cancer J* **2012**, *18* (6), 492–501. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31827459b6>.

(69) Chen, X.; Wang, D.; Liu, J.; Qiu, J.; Zhou, J.; Ying, J.; Shi, Y.; Wang, Z.; Lou, H.; Cui, J.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhao, F.; Pan, L.; Zhao, J.; Zhu, D.; Chen, S.; Li, X.; Li, X.; Zhu, L.; Shao, Y.; Shu, Y. Genomic Alterations in Biliary Tract Cancer Predict Prognosis and Immunotherapy Outcomes. *J Immunother Cancer* **2021**, *9* (11), e003214. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003214>.

## 研究業績

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科学系消化器肝臓内科学専攻

國吉 宣行

I 発表	①一般発表	15	
	②特別発表	6	
II 論文	①原著論文	4	(共 4)
	②症例報告	3	(共 3)
	③総説	2	(共 2)
III 著書		0	

以上

I-① 一般発表

1. 綱島弘道, 土井晋平, 恩田 毅, 國吉宣行, 松本光太郎, 梶山はな恵, 関根一智, 辻川尊之, 馬淵正敏, 梶山祐介, 佐藤浩一郎, 菊池健太郎, 安田一朗, 神津慶太, 藤田正博, 内藤善久, 谷口桂三, 山川達郎, 高橋美紀子, 川本雅司: 大量新鮮血便を小腸カプセル内視鏡で推察し、側視鏡で同定し治療を行った Dieulafoy 潰瘍の一例. 第 354 回日本消化器病学会関東支部例会: 東京, 2019. 4.
  
2. Katsunori Sekine, Shinpei Doi, Ichiro Yasuda, Noriyuki Kuniyoshi, Takayuki Tsujikawa, Masatoshi Mabuchi: Influencing factors on sedated condition under the midazolam-based regimen during endoscopic ultrasonography. DDW2019(ASGE): San Diego, CA, USA, 2019. 5.
  
3. 野村舟三, 今津博雄, 森山光彦, 葉山 讓, 香川敦宣, 濱名 傑, 國吉宣行, 藤澤真理子: 悪性胆道狭窄に対する細径チューブを用いた内視鏡的ドレナージ術の有用性について. 第 97 回日本消化器内視鏡学会総会: 東京, 2019. 5.
  
4. 綱島弘道, 佐藤浩一郎, 恩田 毅, 國吉宣行, 松本光太郎, 関根一智, 辻川尊之, 梶山はな恵, 馬淵正敏, 梶山祐介, 土井晋平, 菊池健太郎, 安田一朗, 内藤善久, 谷口桂三, 山川達郎, 高橋美紀子, 川本雅司: 直腸カルチノイドの病理組織検査を含めた ESD の有効性の検討. 第 97 回日本消化器内視鏡学会総会: 東京, 2019. 5.
  
5. 綱島弘道, 佐藤浩一郎, 恩田 毅, 國吉宣行, 梶山はな恵, 松本光太郎, 関根一智, 辻川尊之, 馬淵正敏, 梶山祐介, 土井晋平, 菊池健太郎, 安田一朗, 神津慶多, 内藤善久, 谷口桂三, 山川達郎, 阿曾達也, 高橋美紀子, 川本雅司: 十二指腸カルチノイドを EUS にて粘膜内病変を確認後、under water にて EMR-L を施行し完全切除し得た一例. 第 108 回日

本消化器内視鏡学会関東支部例会：東京，2019. 6.

6. 五月女拓弥，今津博雄，濱名 傑，野村舟三，大澤朗太，葉山 讓，國吉宣行，藤澤真理子，松岡俊一，森山光彦：集学的治療により治癒し得た重症急性胆管炎の一例．第 559 回日大医学会例会：東京，2019. 9.
7. 板谷朋亮，今津博雄，葉山 讓，大澤朗太，濱名 傑，國吉宣行，野村舟三，藤澤真理子，松岡俊一，森山光彦：経口胆道鏡で診断し得た胆道癌の一例．第 559 回日大医学会例会：東京，2019. 9.
8. 青木 央，國吉宣行，葉山 讓，今津博雄，大木庸子，大澤朗太，濱名 傑，武井章矩，藤澤真理子，神田達郎，松岡俊一，森山光彦，西巻はるな，大荷澄江：超音波内視鏡及び胆道内視鏡にて術前診断し得た intracystic papillary neoplasm(ICPN) with anassociated adenocarcinoma の 1 例．第 358 回日本消化器病学会関東支部例会：東京，2020. 2.
9. 香川敦宣，今津博雄，森山光彦，藤澤真理子，葉山 讓，野村舟三，濱名 傑，武井章矩，大澤朗太，大木庸子，國吉宣行：ERCP 後膵炎(PEP)を起こさないカニューレーション法：造影ガイド下カニューレーション．第 99 回日本消化器内視鏡学会総会：京都，誌上发表，2020. 9.
10. 國吉宣行，今津博雄，森山光彦，葉山 讓，濱名 傑，野村舟三，香川敦宣，藤澤真理子，武井章矩，大澤朗太，大木庸子：術後再建腸管 ERCP 関連手技における  $\alpha$ -view を用いた選択的胆管挿管ストラテジー．第 99 回日本消化器内視鏡学会総会：京都，誌上发表，2020. 9.



11. Rota Osawa, Hiroo Imazu, Jo Hayama, Suguru Hamana, Noriyuki Kuniyoshi, Shuzo Nomura, Atsunori Kagawa, Mariko Fujisawa, Akinori Takei, Yoko Oki, Mitsuhiko Moriyama : Novel direct endoscopic lavage method using the Endoshower combined with direct endoscopic necrosectomy for infected walled-off necrosis(会長特別企画2 : 英語にチャレンジ 下部・胆膵). 第99回日本消化器内視鏡学会総会 : 京都, 2020. 9.
12. Yoko Oki, Hiroo Imazu, Shuzo Nomura, Jo Hayama, Suguru Hamana, Atsunori Kagawa, Noriyuki Kuniyoshi, Mariko Fujisawa, Akinori Takei, Rota Osawa, Mitsuhiko Moriyama : Simultaneous gallbladder and bile duct cancer with widespread extension diagnosed by cholangioscopy(会長特別企画2 : 英語にチャレンジ 下部・胆膵). 第99回日本消化器内視鏡学会総会 : 京都, 2020. 9.
13. 山田康嗣, 今津博雄, 森山光彦, 葉山 讓, 香川敦宣, 濱名 傑, 國吉宣行, 野村舟三, 藤澤真理子 : 胆管カニューレション困難例に対する先端斜め型パピロトームの有用性について. 第101回日本消化器内視鏡学会総会 : 広島, 2021. 5
14. 藤澤真理子, 今津博雄, 森山光彦, 葉山 讓, 香川敦宣, 濱名 傑, 國吉宣行, 山田康嗣, 野村舟三 : ERCP 後膵炎(PEP)の危険因子からみた PEP 予防について. 第101回日本消化器内視鏡学会総会 : 広島, 2021. 5
15. 國吉宣行, 今津博雄, 森山光彦, 濱名 傑, 山田康嗣, 藤澤真理子, 野村舟三, 大澤朗太 : 内視鏡的胆道ドレナージが困難な胆管狭窄例に対する細径チューブを用いた EBD/ENBD の有用性. 第57回日本胆道学会学術集会 : 東京, 2021. 10.

## I-② 特別発表

1. 國吉宣行, 今津博雄, 葉山 讓, 森山光彦: 内視鏡的胆管ドレナージが困難な胆管狭窄例に対する細径チューブを用いたトラブルシューティング(ビデオワークショップ 2: ERCP, EUS のトラブルシューティング). 第 108 回日本消化器内視鏡学会関東支部例会: 東京, 2019. 6.
2. 國吉 宣行, 今津 博雄, 葉山 讓: 胆膵疾患における緊急内視鏡の現状と課題 急性胆管炎に対する緊急 EUS-first strategy の有用性について, 第 101 回日本消化器内視鏡学会総会, 広島, 2021 年 5 月
3. 濱名 傑, 今津 博雄, 國吉 宣行: 内視鏡医学と基礎医学の融合 内視鏡的胆道癌診断における胆汁中 S100P 遺伝子発現解析の有用性について, 第 101 回日本消化器内視鏡学会総会, 広島, 2021 年 5 月
4. 國吉 宣行, 今津 博雄, 濱名 傑, 山田 康嗣, 森山 光彦: 胆膵領域の内視鏡診断の最前線 スクレーパーデバイスを用いた胆道狭窄の経乳頭的病理組織学的診断における工夫, 第 112 回日本消化器内視鏡学会関東支部例会, 東京, 2021 年 6 月
5. 野村 舟三, 今津 博雄, 葉山 讓, 香川 敦宣, 濱名 傑, 國吉 宣行, 藤澤 真理子, 森山 光彦: 慢性膵炎の戦略 慢性膵炎診断における超音波内視鏡画像定量化解析の試み, 第 50 回日本膵臓学会大会, 東京, 2019 年 7 月

6. 大澤朗太, 今津博雄, 國吉宣行, 濱名 傑, 森山光彦 : Walled-off necrosis (WON) に対する Endoshoweer による内視鏡的直接的洗浄を併用した内視鏡的ネクロゼクトミー(ビデオワークショップ 2 : 胆膵内視鏡治療の工夫). 第 112 回日本消化器内視鏡学会関東支部例会 : WEB 開催, 2021. 6.

## II-① 原著論文

1. 國吉宣行, 土井晋平, 足立貴子, 関根一智, 馬淵正敏, 安田一朗 : 急性胆嚢炎におけるドレナージ胆汁の臭気レベルに関連する因子の検討. 胆道 33 巻 5 号 : pp. 817-823, 2019. 12.
2. Atsuko Takai, Kentaro Kikuchi, Mayuko Ichimura, Koichi Tsuneyama, Yuki Moritoki, Kotaro Matsumoto, Hiromichi Tsunashima, Takeshi Onda, Noriyuki Kuniyoshi, Tomoyuki Nariyama, Sho Ohyatsu, Juri Kubota, Kozue Nagumo, Shinpei Sato, Masumi Hara, Hiroshi Miyakawa : Fructo-oligosaccharides ameliorate steatohepatitis, visceral adiposity, and associated chronic inflammation via increased production of short-chain fatty acids in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. BMC Gastroenterology; 20(1) : 46, 2020. 2.
3. Katsunori Sekine, Ichiro Yasuda, Shinpei Doi, Noriyuki Kuniyoshi, Takayuki Tsujikawa, Yuichi Takano, Masatoshi Mabuchi, Kosuke Takahashi, Masashi Kawamoto, Mikiko Takahashi, Tatsuya Aso, Tatsuhiko Miyazaki, Takuji Iwashita : Peroral Cholangioscopy-Guided Targeted Biopsy versus Conventional Endoscopic Transpapillary Forceps Biopsy for Biliary Stricture with Suspected Bile Duct Cancer. Journal of Clinical Medicine; 11(2) : 289, 2022. 1.
4. Noriyuki Kuniyoshi, Hiroo Imazu, Shuzo Nomura, Suguru Hamana, Rota Osawa, Kouji

Yamada, Mariko Fujisawa, Mitsuhiro Moriyama : Endoscopic biliary drainage using a 4-Fr catheter for biliary obstruction: a pilot study. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*; 2022 Jun 22;1-6. doi: 10.1080/13645706.2022.2090004.  
Online ahead of print.

## II-② 症例報告

1. Noriyuki Kuniyoshi, Hiroshi Miyakawa, Kotaro Matsumoto, Hiromichi Tsunashima, Katsunori Sekine, Takayuki Tsujikawa, Masatoshi Mabuchi, Shinpei Doi, Kentaro Kikuchi : Detection of Anti-mitochondrial Antibodies Accompanied by Drug-induced Hepatic Injury due to Atorvastatin. *Internal Medicine*; 58(18) : pp.2663-2667, 2019. 9.
2. Kotaro Matsumoto, Kentaro Kikuchi, Noriyuki Kuniyoshi, Hiromichi Tsunashima, Katsunori Sekine, Masatoshi Mabuchi, Shinpei Doi, Yoh Zen, Hiroshi Miyakawa : Immunoglobulin G4-related Liver Disease Overlapping with Non-alcoholic Steatohepatitis That Was Diagnosed Simultaneously with Autoimmune Pancreatitis: A Case Report and Review of the Literature. *Internal Medicine*; 58(24) : pp.3537-3543, 2019. 12.
3. Noriyuki Kuniyoshi, Hiroo Imazu, Jo Hayama, Shuzo Nomura, Atsunori Kagawa, Suguru Hamana, Rota Osawa, Yoko Oki, Mariko Fujisawa, Hiroshi Aoki, Tokio Higaki, Tadatoshi Takayama, Sumie Ohni, Mitsuhiro Moriyama : Intracholecystic Papillary Neoplasm of the Gallbladder Preoperatively Diagnosed by Endoscopic Ultrasonography and Peroral Cholangioscopy. *ACG*

## II-③ 総説

1. 今津博雄, 葉山 讓, 香川敦宣, 濱名 傑, 國吉宣行: 知っておきたい新たな処置具—特徴とその開発意図 ERCP 関連 Small-J ワイヤ— 消化器内視鏡 32 巻 6 号 : pp. 865-867, 2020. 6.
2. 今津 博雄, 葉山 讓, 香川 敦宣, 野村 舟三, 武井 章矩, 濱名 傑, 國吉 宣行, 藤澤 真理子, 大澤 朗太, 山田 康嗣, 山崎 慎太郎, 森山 光彦: 【肝胆膵外科手術合併症と IVR】胆膵術後合併症に対する内視鏡的アプローチ、日本インターベンショナルラジオロジー学会雑誌(1340-4520)35 巻 2 号 Page105-112(2020. 11)