

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19591559  
 研究課題名（和文） 右側大腸における鋸歯状腫瘍の癌化ポテンシャルについての研究  
 研究課題名（英文） A study on the malignant potential of serrated lesions in the right side of the colon  
 研究代表者 小西文雄（KONISHI FUMIO）  
 自治医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：20142242

研究成果の概要：

- 1)大腸の、sessile serrated adenoma:SSA、sessile serrated polyp:SSP（SSA/SSP）は、①腺管底部の上皮の鋸歯状変化、②表層上皮の絨毛状変化、③腺管分岐の増加、④腺管の水平方向への変形、⑤拡張腺管、⑥腺管上皮の核偽重層 / abnormal proliferationの6所見によっての病理組織診断がなされうると考えられた。
- 2)BRAF変異、フラグメント解析の結果からSSA/SSPはMSI陽性大腸癌と近い遺伝子背景を有することが示唆され、SSAがMSI陽性大腸癌の前癌病変である可能性が考えられた。SSA/SSPのBRAFF遺伝子変異は、正常粘膜や管状腺腫より明らかに高率であったが、右側結腸のMSI陽性大腸癌よりは低率であった。従って、SSA/SSPでBRAF mutation陽性の症例に特に癌化のポテンシャルが高い可能性が考えられた。
- 3)今後さらにメチル化異常について検討するため、メチル化アレイを行う予定である。メチル化アレイには、フラグメント解析で使用した、制限酵素処理済検体を用いる。マイクロアレイはより詳細なメチル化異常を検索することが可能であり、個別の遺伝子領域、非遺伝子領域でのメチル化、脱メチル化の程度が明らかとなる。それによって、これまでに報告されていない、新しいメチル化異常が明らかとなることが期待される

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学（No.7302）

キーワード：

大腸鋸歯状病変・鋸歯状腺腫・過形成性ポリープ・Sessile serrated adenoma・BRAF mutation・H-MLH1・MGMT・DNA methylation

## 1. 研究開始当初の背景

従来、大腸における組織発生の過程としては、adenoma-carcinoma sequenceが一般的に受け入れられている。一方、近年Jeremy Jassらにより大腸における異なった組織発生経路の仮説が提唱されている。すなわち、右側大腸における比較的大きな無茎性の過形成性ポリープ (sessile serrated adenoma:SSA、別名 sessile serrated polyp:SSP) と診断される組織像を呈する一連の病変が一部の右側大腸における大腸癌の前癌病変である可能性があるという説である。従来、hyperplastic polypに代表される大腸の鋸歯状病変には癌化のポテンシャルはないとされていた。上記のJassらによる仮説は临床上重要な問題を提起している。Jassらの仮説は、右側大腸のSSA/SSPが、右側大腸のMSIを呈する大腸癌と同様の遺伝子変化を示すというデータに基づくものである。

## 2. 研究の目的

臨床的には、右側大腸におけるSSA/SSPを内視鏡的に切除すべきか否か、ということは重大な問題であり、これらの病変が前癌病変として重要な位置を占めるか否かを追求することにより、今後臨床的にきわめて有用な情報を得ることができる。本研究では、SSA/SSPの病理組織診断の基準を検討することと、SSA/SSPの遺伝子変化の特徴について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸鋸歯状病変の病理組織学的分類

i) 組織分類に関する文献的検討：鋸歯状病変には、一般的にしばしば認められる5mm以下の小さな過形成性ポリープ、特に右側

大腸に認められる5mm-10mm以上の扁平なIIa病変(SSA/SSP)、ポリープ状隆起を示した腺腫様病変(鋸歯状腺腫)(traditional serrated adenoma:TSA)などがある。TorlakovicとSnoverら(2003, 2008)やCunningham and Riddellによる分類(2006)によると、大腸鋸歯状病変は基本的に3つのカテゴリーに分類されている。すなわち、従来の小さなhyperplastic polyp, 比較的大きな扁平な病変(SSA/SSP)、ポリープ状に隆起して腺腫様の組織所見を呈するtraditional serrated adenoma(TSA)である。また、追加すべきカテゴリーとして、Mixed polyp, hyperplastic polyposis, serrated carcinomaなどがCunningham and Riddellによって提唱されている。

### Cunningham and Riddell 2006

Hyperplastic polyps

Goblet-cell variant

Microvesicular variant

Mucin-poor variant

Sessile serrated polyp : SSP (Sessile serrated adenoma:SSA)

Serrated adenoma(“traditional” serrated adenoma:TSA)

Mixed polyps (any of the above in combination)

Hyperplastic polyp and traditional adenoma

Hyperplastic polyp and serrated adenoma

Hyperplastic polyposis

Serrated carcinoma

組織分類・診断上の問題を内蔵しているのは鋸歯状腺腫(TSA)と診断されない鋸歯状病変(SSA/SSP)であり、TSAに比べて平坦である。しかし、SSA/SSPを腺腫ととらえるか否かについて、また、SSA/SSPとTSAの組

織形態上の相違を明確にすることには時に容易ではない。Jass と Burt (2000) は鋸歯状腫瘍が多発する Hyperplastic polyposis (HPP) という特殊な病態の分類 (WHO) で、「HPPに見られる病変では、比較的大きな hyperplastic polyp (後の SSA/SSP) と鋸歯状腺腫 (TSA) との組織学的な区別は一筋縄では行かず、恐らく両者の間に線を引けないであろう」と述べている。

ii) SSP/SSA の組織学的診断基準構築に向けての研究

欧米と比較して、本邦においては SSA/SSP の病理組織学的分類が明確になされていない。既に述べたように、これらの特異なタイプの鋸歯状病変は、癌化に関しては異なったポテンシャルを有している可能性がある。本研究の第一段階として多施設にて集積された SSA/SSP と判定される症例の病理組織像を retrospective に検討して大腸鋸歯状病変の組織分類を確立することを試みた。

他施設も含めて、文献上の所見から SSA/SSP と診断されたあるいは疑われた症例を含めて鋸歯状病変を集積し、retrospective に検討して大腸鋸歯状病変の組織分類を確立することを目指とした。文献報告における SSA/SSP の特徴を有すると判断される病変を含めて Hyperplastic polyp と判断される 10 病変の組織写真を blind にて 5 名の病理医に送付した。具体的には、①腺管底部の上皮の鋸歯状変化、②表層上皮の絨毛状変化、③腺管分岐の増加、④腺管の水平方向への変形、⑤拡張腺管、⑥腺管上皮の核偽重層 / abnormal proliferation の 6 所見について 5 段階に

grading してその結果を分析した。

(2) SSA/SSP の分子生物学的検討

i) 研究の概略：今までの報告によると、右側大腸における SSA/SSP は、microsatellite instability (MSI) が陽性 (MSI high)、hMLH1 のメチル化陽性、hMLH1 免疫染色にて陰性、BRAF mutation 陽性、KIRAS mutation 陰性などの特徴を有すると報告されている。これらの遺伝子変化は、MSI high の右側大腸癌の特徴と一致する。本研究では、Sessile serrated adenoma, traditional serrated adenoma、早期癌、進行癌 における組織学的特徴と同時にこれらの遺伝子的変化および網羅的メチル化の異常についても検索した。SSA/SSP の組織診断は、今回は欧米の文献上の所見に準拠した。

ii) SSP/SSA の組織学的診断基準構築に向けての研究

欧米と比較して、本邦においては SSA/SSP の病理組織学的分類が明確になされていない。既に述べたように、これらの特異なタイプの鋸歯状病変は、癌化に関しては異なったポテンシャルを有している可能性がある。本研究の第一段階として多施設にて集積された SSA/SSP と判定される症例の病理組織像を retrospective に検討して大腸鋸歯状病変の組織分類を確立することを試みた。

他施設も含めて、文献上の所見から SSA/SSP と診断されたあるいは疑われた症例を含めて鋸歯状病変を集積し、retrospective に検討して大腸鋸歯状病変の組織分類を確立することを目指とした。文献報告における SSA/SSP の特徴を有すると判断される病変を含めて Hyperplastic

polypと判断される10病変の組織写真をblindにて5名の病理医に送付した。具体的には、①腺管底部の上皮の鋸歯状変化、②表層上皮の絨毛状変化、③腺管分岐の増加、④腺管の水平方向への変形、⑤拡張腺管、⑥腺管上皮の核偽重層 / abnormal proliferationの6所見について5段階にgradingしてその結果を分析した。

## (2) SSA/SSPの分子生物学的検討

- i) 研究の概略：今までの報告によると、右側大腸におけるSSA/SSPは、microsatellite instability (MSI) が陽性 (MSI high)、hMLH1のメチル化陽性、hMLH1免疫染色にて陰性、BRAF mutation陽性、KiRAS mutation陰性などの特徴を有すると報告されている。これらの遺伝子変化は、MSI highの右側大腸癌の特徴と一致する。本研究では、Sessile serrated adenoma, traditional serrated adenoma、早期癌、進行癌における組織学的特徴と同時にこれらの遺伝子学的変化および網羅的メチル化の異常についても検索した。SSA/SSPの組織診断は、今回は欧米の文献上の所見に準拠した。
- ii) 対象症例および方法：SSA/SSPに加えて、検討の比較対照として、正常大腸粘膜、管状腺腫、MSI陽性大腸癌、MSI陰性 (MSS) 大腸癌を使用した。正常大腸粘膜はスクリーニング目的で大腸内視鏡検査を受けた患者で、内視鏡的に異常を認めなかった場合、上行結腸の粘膜を採取して使用した。また、マイクロサテライト不安定性の判定には、BAT25, BAT26を使用し、両者に不安定性を認めたものをMSI陽性と判定した。全ての検体の提供は患者から書面によるインフォームドコンセントを得られた場合にのみ使用し、患者の拒否によって速や

かに検討から除外することとした。また本研究は自治医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会で承諾を受けている (遺07-44；大腸鋸歯状ポリープの網羅的遺伝子解析)。遺伝子異常検索として、genetic、epigeneticな異常をそれぞれ検討した。geneticな異常検索として、BRAF遺伝子のexon15におけるpoint mutation検索を行った。

## 4. 研究成果

### 1) SSA/SSPの病理組織学的診断基準

①腺管底部の上皮の鋸歯状変化、②表層上皮の絨毛状変化、③腺管分岐の増加、④腺管の水平方向への変形、⑤拡張腺管、⑥腺管上皮の核偽重層 / abnormal proliferationの6所見について5段階にgradingしてその結果を分析した結果、個々の所見のgradingについては、病理医の間で差を認めた病変もあったが、SSA/SSPとhyperplastic polypの鑑別診断については、5名の間での一致率は比較的良好であった。今後、①から⑥の所見を重視して、さらに、SSA/SSPの病理所見について検討を進め、SSA/SSPの病理組織学的特徴および病理所見の多様性を明確にする必要があると考えられた。

2) BRAF変異の解析とその結果：従来の報告から、BRAF遺伝子の1796T→Aへの変異が鋸歯状腺腫に認められることが明らかとなっている。われわれはダイレクトシーケンス法によってBRAF変異を検索した。その結果、変異は正常大腸粘膜、管状腺腫で0%、SSA/SSPで16.7%、MSI陽性大腸癌で50%、MSS大腸癌で7.1%に認められ、従来の報告と同じくSSAおよびMSI陽性大腸癌で高率にBRAF変異を認めた。しか

し、SSA/SSPにおける頻度は、MSI陽性大腸癌より低率であったことから、SSA/SSPの特にBRAF変異陽性症例に癌化のポテンシャルが高いことの可能性も考えられた。今後、さらに症例数を増やし、adenoma-carcinoma sequence型大腸癌で高率に変異しているKRAS遺伝子の変異の有無についても検討する予定である。

- 3) フラグメント解析による網羅的DNAメチル化の検索：epigeneticな変化の検索として、メチル化感受性制限酵素（Not I）を使用し、キャピラリー電気泳動を用いるフラグメント解析を行った。この検討ではゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素であるNot Iと、ゲノム中に100万箇所存在するMse Iで処理した。処理したDNAをPCRで増幅させる際にNot Iプライマーを蛍光標識した。増幅された産物をキャピラリー電気泳動で蛍光強度測定することによってメチル化、脱メチル化の程度が評価可能となる。すなわち、Not Iで処理された部位（脱メチル化している部位）は蛍光強度が強く、メチル化している部位では蛍光強度は低くなる。これを利用して正常大腸粘膜と比較したSSAのメチル化異常の有無を検討した。制限酵素処理、PCRを経た産物をABI3100で蛍光測定し、その産物の塩基長ごとにそれぞれの蛍光強度が表示される。検討した正常大腸粘膜13検体のうち、過半数の検体で認めた部位についてその平均を測定した。その平均値の1.5倍以上のピークをもつものを脱メチル化あり、0.67倍以下のピークであるものをメチル化ありと判定することとし、他の臨床検体のメチル化異常について検討した。その結果、正常大腸粘膜と比べ、SSA、管状腺腫のいずれにも有意なメチル化異常を認めた。一方、脱メチル化は管状腺腫、MSS大腸癌と比較

してSSA、MSI陽性大腸癌では軽度であった。今回の検索では、SSA/SSPのBRAF遺伝子変異は、正常粘膜や管状腺腫より明らかに高率であったが、右側結腸のMSI陽性大腸癌よりは低率であった。従って、SSA/SSPでBRAF mutation陽性の症例に特に癌化のポテンシャルが高い可能性が考えられた

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計4件）

- ① Noda H, Mashima R, Kamiyama H, Okada S, Kawamura YJ, Konishi F: Promoter hypermethylation of tumor-related genes in sporadic colorectal cancer in young patients, J Exp Clin Cancer Res 26 521-526 2008 査読有
- ② Togashi K, Shimura K, Konishi F, Miyakura Y, Koinuma K, Horie H, Yasuda Y: Prospective observation of small adenomas in patients after colorectal cancer surgery through magnification chromocolonoscopy Dis Colon Rectum 51 196-201 2008 査読有
- ③ Noda H, Mashima R, Kamiyama H, Okada S, Kawamura Y.J, Konishi F: Promoter Hypermethylation of Tumor-related Genes in Sporadic Colorectal Cancer in Young Patients, J. Exp. Clin. Cancer Res. 26 521-526 2007 査読有
- ④ Konishi F: Morphologic and Genetic Pathways in the Development of Colorectal Cancer, Annals of The ACTM 8 39-42 2007 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 神山英範, 鈴木浩一, 岡田晋一郎, 野田弘志,  
河村裕, 小西文雄  
「大腸多発癌発生に関わる DNA 化メチル化異常の  
同定」  
第 19 回日本消化器癌発生学会総会 (別府)  
2008. 8. 28-29
- ② 神山英範, 野田弘志, 高田 理, 鈴木浩一,  
河村裕, 小西文雄  
「大腸癌腹腔洗浄液中の DNA メチル化異常を標  
的とした微小腹膜転移診断と意義」  
第 108 回日本外科学会定期学術集会 (長崎)  
2008. 5. 15-17
- ③ Konishi F  
「Morphological and Genetic Pathway in the  
Development of Colorectal Cancer」  
Yonsei Colorectal Cancer Internathinal  
Symposium 2007. 5. 26 (Seoul)
- ④ 野田弘志, 岡田晋一郎, 神山英範, 小西文雄  
「若年発症散発性大腸癌における癌抑制遺伝子,  
癌関連遺伝子群の DNA 以上メチル化の特徴」  
第 107 回日本外科学会定期学術集 2007. 4. 11  
(大阪)  
日本外科学会雑誌臨時増刊号
- ⑤ 前田孝文, 野田弘志, 加藤洋, 小西文雄  
「Serrated Polyps における形質発現と遺  
伝子異常の関係」  
第 66 回大腸癌研究会 2007. 1. 19 (埼玉)  
日本大腸肛門病学会雑誌

[図書] (計 1 件)

- ① 小西文雄  
「大腸癌のすべて」永井書店 2007 369 p

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小西文雄 (KONISHI FUMIO)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20142242

### (2) 研究分担者

野田弘志 (NODA HIROSHI)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00382937  
土橋 洋 (DOBASHI YOU)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90231456