

機関番号：34519

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590356

研究課題名 (和文) 炎症性腸疾患に合併するがんの早期診断法の開発：粘液形質の解析

研究課題名 (英文) Development of early diagnosis of cancer occurring in association with inflammatory bowel disease: Analysis of mucus phenotype

研究代表者

西上 隆之 (NISHIGAMI TAKASHI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70131589

研究成果の概要 (和文)：潰瘍性大腸炎 (UC) では、罹患期間の長い炎症粘膜および UV に合併した大腸癌に MUC1 と MUC5AC の発現を高頻度に認めた。これらのムチンは UC 合併大腸癌の有用なサーベイランスマーカーになると考えられる。クローン病の痔瘻に発生した腺癌の免疫学的表現型は、肛門管上皮ではなく直腸粘膜の特性を有していたので、このような腺癌は主として直腸粘膜から発生したと考えられる。UC 合併大腸癌には *MSH6* 遺伝子の変異、*CDKN2A/p16* 遺伝子のメチル化、遺伝子の不安定性を認めた。一方、UC 合併悪性リンパ腫ではこれらの遺伝子変化は見られず、EB ウイルスの感染を検出した。UC 合併大腸癌の発生にはこれらの遺伝子変化が重要な役割を果たし、悪性リンパ腫では EB ウイルスの感染した B リンパ球が長期の炎症を背景に腫瘍化した可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：MUC1 and MUC5AC were frequently found in inflammatory mucosa in patients with long-standing ulcerative colitis (UC) and large intestinal cancer associated with UC. These mucins may serve as useful surveillance markers for large intestinal cancers associated with UC. The immunohistological phenotype of adenocarcinoma which arises in the anal fistula of Crohn's disease (CD) reflected characteristics of rectal mucosa, not of anal ductal epithelium, suggesting that adenocarcinoma in the anal fistula originates from rectal mucosa. Mutation of the *MSH6* gene, methylation of the *CDKN2A/p16* gene, and microsatellite instability were found in large intestinal cancers associated with UC, whereas these gene abnormalities were not detected in malignant lymphoma associated with UC. In the case of malignant lymphoma, EB virus infection was found in lymphoma cells. These results suggest that gene abnormalities may be involved in the development of large intestinal cancers associated with UC, while infection of B lymphocytes with EB virus may cause malignant lymphoma in UC patients against the background of long-standing inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：消化器・唾液腺

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎およびクローン病は年々増加傾向にある。潰瘍性大腸炎では、その長期にわたる炎症を背景にして高頻度で大腸癌が発生する。これまでクローン病では癌をほとんど合併しないと考えられてきたが、最近クローン病の難治性痔瘻に粘液癌の発生が報告されている。

粘膜では、ムチンと総称される糖蛋白質と糖類、無機塩類などからなる粘液が臓器特異的に産生され、このようなムチンと粘液は生体を外界刺激から防御している。また、癌部では、癌が発生した臓器の粘膜上皮に比較して、ムチンの種類や局在が異なることが報告されている。我々は、この現象に着目して、予備研究として潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌におけるムチンの発現パターンを免疫染色により調べた。その結果、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌では、本来の大腸粘膜では発現していない胃腺窩上皮ムチン(MUC5AC)が高頻度に発現していることを見出した。また、これらの潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌は、胃幽門腺ムチン(MUC6)も発現していた。これらの知見は、潰瘍性大腸炎における持続性炎症が、大腸粘膜に存在する幹細胞に胃型形質(MUC5ACやMUC6の発現)を促し、胃型へ形質転換した細胞から癌が発生している可能性を示唆する。一方、発症後の経過年数(罹患期間)により症例を分類して経時的に胃型形質の出現率を調べ、潰瘍性大腸炎に関連して発生する大腸癌の発癌機序を検証する課題が残されている。

最近、我々は、クローン病に随伴する難治性痔瘻に発生した粘液癌においても、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌の場合と同じように、MUC5ACが発現することを見出した。クローン病に随伴する痔瘻においても、慢性炎症の侵襲から免れるように大腸や肛門管の粘膜上皮細胞が胃の粘液形質(MUC5ACやMUC6の発現)を獲得し、胃型へ形質転換した細胞から癌が発生している可能性が考えられるが、その発生母地については解明されていない。

通常の大腸癌では高分化型腺癌が多いのに対して、潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌では、胃癌の場合と同じように、その約50%に低分化腺癌を認める。この事実も「潰瘍性大腸炎では、炎症による組織侵襲を免れるよう

に、大腸粘膜の粘液形質は胃の粘液形質に転換し生体を防御する。しかし、長期に渡って炎症が繰り返されると、その防御機構が破綻して、胃の粘液形質を獲得した細胞を母地として癌が発生する」という仮説を支持する。

潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌の遺伝子解析を行うと、これらの大腸癌では遺伝子の不安性(microsatellite instability)、*CDKN2A/p16*癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化ならびに点突然変異やLOHなどの構造異常が発生していた。潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌の発生には、ミスマッチ修復機構の破綻、*CDKN2A/p16*癌抑制遺伝子の不活化などが関与すると考えられる。

本研究は、このような背景のもとに着想された。

2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎では、炎症を背景にして高頻度で大腸癌が発生する。クローン病の難治性痔瘻においても癌の合併が報告されている。しかし、これらの疾患では強い炎症を背景に持つために、その早期発見は困難で有用な検出法は確立されていない。一方、我々は、潰瘍性大腸炎に合併する癌では、MUC5ACとMUC6が発現することを示すとともに、クローン病に合併する癌においてもMUC5ACが発現することを明らかにした。本研究では、潰瘍性大腸炎およびクローン病に発生する前癌病変や早期癌の有用な診断法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 潰瘍性大腸炎の手術37症例を経過年数別に0~5年間、6~10年間、11~15年間、15~20年間、21年以上の5群に分類した。これらの症例の手術標本を用いて、潰瘍性大腸炎の炎症粘膜および潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌におけるMUC5AC, MUC1, MUC6, CK7などの発現を免疫染色で調べ、経時的な粘液の変化(形質転換)について検討した。

(2) クローン病の痔瘻に発生した腺癌7例の手術標本を用いて、MUC2, CK20などの免疫染色を行った。標本中に存在する直腸粘膜、肛門管上皮および腺癌の免疫学的表現型(染色性)を比較し、クローン病の難治性痔瘻に発生した腺癌の発生母地について検討した。

(3) 潰瘍性大腸炎に大腸癌と悪性リンパ腫

を合併した症例の手術標本を用いて、PCR法により増幅された種々の遺伝子 (*MSH6*, *APC*, *TP53*, *CTNNB1/β-catenin*, *KRAS2*, *CDKN2A/p16*)・DNA断片の塩基配列をDNAシークエンス法により調べ、突然変異などの遺伝子異常について検討した。また、methylation specific PCR法を行い、*CDKN2A/p16*遺伝子と *MLH1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を解析した。更に、7種類 (D2S123, BAT25, BAT26, BAT40, D5S346, D9S171, D17S250)のマイクロサテライトマーカーを用いて、遺伝子の不安定性 (microsatellite instability) について調べ、ミスマッチ修復機構の関与を検討した。

Epstein-Barr virus 感染の有無についても調べた。

尚、得られた材料は、連結可能にした匿名化を行い、個人識別情報は、病理組織情報やゲノム情報とは、独立して厳重に保管した。

4. 研究成果

(1) MUC6の発現は、潰瘍性大腸炎の非癌粘膜において発症後経過年数が増すにつれ増加傾向がみられたが、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌における発現頻度は25%と低かった。MUC6は潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌の有用なサーベイランスマーカーにはならないと考えられる。

CK7の発現は、通常の大腸癌では約10%に認められたのに対して、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌では70%に認められた。また、潰瘍性大腸炎の幼若な再生上皮にもCK7は発現していた。これらの結果は、潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌は幼若な再生上皮から発生することを示すものであるが、背景粘膜の再生上皮にCK7の発現がみられるために、CK7を潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌のサーベイランスマーカーとして用いることは難しいと考えられる。

MUC1の発現は、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌で80%、潰瘍性大腸炎の発症11年以降の非癌部の炎症粘膜で42%に認められた。また、MUC5ACの発現は、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌では70%に認められた。MUC5ACの発現頻度は、潰瘍性大腸炎の非癌炎症粘膜において発症後の経過年数が長くなるにつれて増加していた。潰瘍性大腸炎のサーベイランスでは、MUC1とMUC5ACが有用であり、内視鏡的に癌が発見されなくても、背景粘膜の生検でMUC5ACまたはMUC1の発現を認めた場合、緊密なフォローアップが不可欠である。

(2) クロウン病の痔瘻に発生した腺癌7例について、ムチン蛋白質やサイトケラチンなどの免疫染色を行った。全ての症例において、直腸粘膜ではMUC2とCK20の発現を認めたが、肛門管上皮ではMUC2とCK20の発現を認めなかった。また、全症例において、クロウン病の難治性痔瘻に発生した腺癌ではMUC2とCK20の発現を認めた。クロウン病の難治性痔瘻に発生した腺癌の免疫学的表現型は、肛門管上皮ではなく直腸粘膜の特性を有することより、難治性痔瘻に発生した腺癌の起原は主として直腸粘膜であると考えられる。

(3) 潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌と悪性リンパ腫について、これらの腫瘍の発癌メカニズムを検討した。潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌には、*MSH6* 遺伝子の変異、*CDKN2A/p16* 遺伝子のメチル化、microsatellite instabilityを認めた。一方、悪性リンパ腫には、これらの遺伝子変化は見られず、Epstein-Barr virus感染を検出した。潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌の発生には、*MSH6* 遺伝子や *CDKN2A/p16* 遺伝子の異常および microsatellite instabilityが重要な役割を果たしていると考えられるが、悪性リンパ腫ではEpstein-Barr virusに感染したBリンパ球が外因性の炎症環境を背景にして腫瘍化した可能性がある。

Genetic changes in adenocarcinoma and malignant lymphoma occurring in association with ulcerative colitis

	AC	Dysplasia	DLBCL	Non-neoplastic mucosa
Mutation of the <i>MSH6</i> gene	+	-	-	-
MSI test using 7 markers	7/7	0/7	0/7	0/7
Methylation of the <i>CDKN2A/p16</i> gene	+	-	-	-

MSI test: microsatellite instability

AC: adenocarcinoma

DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma (malignant lymphoma)

Mutation of the *MSH6* gene, methylation of the *CDKN2A/p16* gene, and microsatellite instability were found in colonic adenocarcinoma developing in an UC patient, whereas these gene abnormalities were not detected in dysplasia and non-neoplastic mucosa in the UC patient and malignant lymphoma associated with UC.

Mutations of the *APC*, *TP53*, *CTNNB1/β-catenin*, *KRAS2*, and *CDKN2A/p16* genes were not observed in adenocarcinoma, dysplasia, and DLBCL.

MSI test was performed using 7 fluorescence-labeled markers (D2S123, BAT25, BAT26, BAT40, D5S346, D9S171, and D17S250). Methylation of the *MLH1* gene was not observed in adenocarcinoma, dysplasia, and DLBCL.

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 Nishigami T, Kataoka TR, Tsujimura T et al (全7名,1番目) Adenocarcinomas associated with perianal fistulae in Crohn's disease have a rectal, not an anal, immunophenotype, Pathology, 査読有, 43, 2011, 36-39.
- ② Nishigami T, Kataoka TR, Tsujimura T et al (全9名,1番目) Concomitant adenocarcinoma and colonic non-Hodgkin's lymphoma in a patient with ulcerative colitis: a case report and molecular analysis, Pathol Res Pract, 査読有, 206, 2010, 846-850.
- ③ Nishigami T, Onodera M, Tsujimura T et al (全16名,1番目) Comparison between mucinous cystic neoplasm and intraductal papillary mucinous neoplasm of the branch duct type of the pancreas with respect to expression of CD10 and cytokeratin 20, Pancreas, 査読有, 38, 2009, 558-64.
- ④ Onodera M, Nishigami T, Tsujimura T et al (全8名,2番目) Comparison between colorectal low- and high-grade mucinous adenocarcinoma with MUC1 and MUC5AC. World J Gastrointest Oncol, 査読有, 1, 2009, 69-73.

〔学会発表〕（計3件）

- ① 久野隆史、西上隆之、富田尚裕（全11名、8番目）散発性ならびに多発性大腸腫瘍発生における塩基除去修復遺伝子MYHの関与、第16回日本家族性腫瘍学会学術集会、2010年7月9日、朱鷺メッセ（新潟）
- ② 西上隆之、辻村亨（全6名、1番目）クローン病の痔瘻内に発生した腺癌7例の免疫組織学的検討、第99回日本病理学会総会、2010年4月27日、京王プラザホテル（東京）
- ③ 西上隆之、辻村亨、他
粘液の形質転換に着目した潰瘍性大腸炎合併大腸癌の早期発見、第97回日本病理学会総会、2008年5月15日、金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西上 隆之 (NISHIGAMI TAKASHI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70131589

(2) 研究分担者

辻村 亨 (TSUJIMURA TOHRU)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20227408