

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17049

研究課題名（和文）経口内視鏡的食道筋層生検術によるアカラシア発症機序の解明

研究課題名（英文）To identify the cause of achalasia, we conducted biopsies sampling from the circular muscle layer of LES during POEM.

研究代表者

池淵 雄一郎（IKEBUCHI, Yuichiro）

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20743280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：鳥取大学医学部附属病院、昭和大学江東豊洲病院、福岡大学病院、東京慈恵会医科大学附属病院、および東京大学の複数の施設において、倫理委員会の承認を経て研究が進行中である。当該研究は、食道アカラシアおよびアカラシア類縁疾患の患者を対象にPOEM治療を受けた患者からの検体採取を進めてきた。現時点ではアカラシア検体を合計110検体を採取している。非食道運動機能障害の患者で食道切除術を受けた患者を対照群とし、食道癌患者からLES部の検体を鳥取大学附属病院で採取し、これまでに16検体を得ている。現在解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はLES部の内輪筋生検試料を用いてマイクロRNAの網羅的な解析を行ったところ、アレイによる定性解析において有意な変動を示すヒト由来のマイクロRNAに加えて、複数のヘルペスウイルス由来のマイクロRNAを発見した。本研究では食道アカラシアとヘルペスウイルス由来のマイクロRNAとの関連性を明らかにし、食道アカラシアの病態解明、新たな診断法の確立、さらには将来の創薬への応用に繋げることを期待し、現在解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：Multiple medical institutions in Japan, including Tottori University Hospital, Showa University Koto Toyosu Hospital, Fukuoka University Hospital, The Jikei University Hospital, and affiliated institutions of the University of Tokyo, are conducting approved studies. The research focuses on patients who have undergone POEM for esophageal achalasia and achalasia-like diseases. Specimens have been collected total 110 specimens. These specimens are currently being analyzed. In addition, 16 specimens from the lower esophageal sphincter (LES) region of esophageal cancer patients at Tottori University Hospital are also undergoing analysis. The studies aim to enhance our understanding of esophageal achalasia and achalasia-like diseases by analyzing specimens from patients who received POEM treatment and comparing them with control groups.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道アカラシア

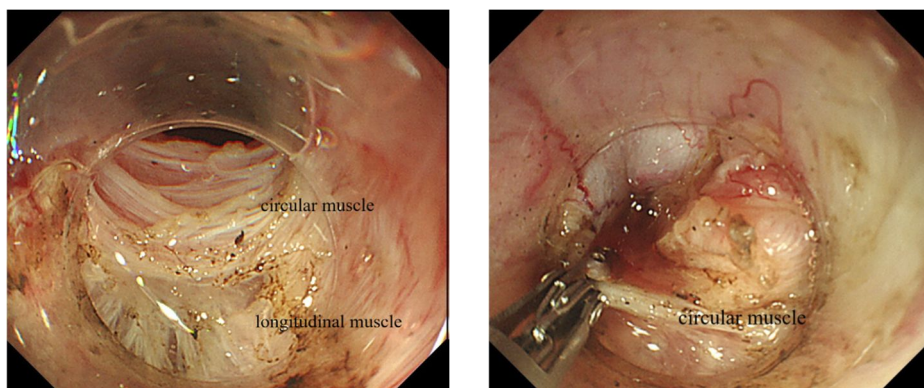
1. 研究開始当初の背景

食道アカラシアは LES 弛緩不全を主体とする希少疾患である。患者は年余に亘り嚥下障害、誤嚥性肺炎、食道痛、体重減少などに悩まされる。現時点では治療は対症的治療となり、内視鏡的バルーン拡張術や外科手術(Heller 手術など)、重度の進行例では外科的食道切除術をせざるを得なかった。2016 年に昭和大学江東豊洲病院の井上晴洋先生らの成果に基づき、食道アカラシアに対する POEM が保険収載された。POEM は従来に治療に比べて低侵襲で効果的な治療法として全世界に広がる一方で食道アカラシアの病因の解明は依然として進んでいない。食道アカラシアの原因としてはウイルス説が提唱されていたが横断的疫学研究の仮説の域を出ていなかった。しかし、現在は POEM の普及に伴い、技術開発とその手技を応用した生体試料を用いた網羅的システム生物学アプローチが可能となってきており、今回の研究の着想に至っている。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、我々は POEM 時に LES 部の内輪筋を生検し、擬似疾患や腫瘍などによる二次性アカラシアとの鑑別を行う経口内視鏡的食道筋層生検を考案した(図 1)。LES 部の筋層生検は従来の内視鏡的バルーン拡張術では得ることができなかった試料であり、また外科手術では LES 部の同定が難しかった。本技術は日本の内視鏡医が得意とする技術であり、独創性があると考えられる。その LES 部の内輪筋生検試料を用いてマイクロアレイによる解析を行い、マイクロ RNA の網羅的解析を行ったところ、アレイによる定性解析では有意な変動を示すヒト由来のマイクロ RNA に加えて、複数のヘルペスウイルス(単純ヘルペス: HSV・カポジ肉腫ウイルス) 由来のマイクロ RNA を発見した(図 2)。現在までの結果を次項の図に示す。本研究ではこの検証を進め、アカラシアの病勢、治療効果などの臨床病理学的因子との関連性を明らかにすることを目的とする。

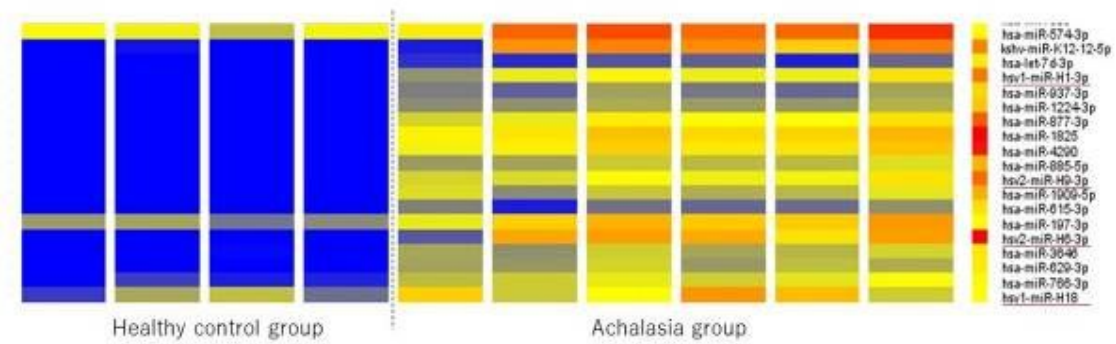
図1. POEMの際の筋層生検



写真左: POEMの際、LES部の筋層を同定することが可能となった。

写真右: 同部の筋層生検

図2. 筋層生検で得られた検体のマイクロアレイによる解析



3. 研究の方法

患者群（食道アカラシア及びアカラシア類縁疾患の診断がつき、POEM 治療を受ける患者）： 問診・臨床検査所見・画像検査所見・食道内圧検査所見による食道アカラシア（Type 、 Type 、 Type ）、またはアカラシア類縁疾患の診断

↓

治療法の選択（バルーン拡張術、POEM、外科的治療）

↓（POEM が選択された場合）

POEM での食道内輪筋層切開時に生検鉗子を用いて食道筋層サンプルと血清採取

対照群（食道癌などで食道切除術を施行される非食道運動障害の患者）： 問診・臨床検査所見・画像検査所見で食道運動障害を認めない群

↓

食道切除術施行後、切除標本よりコントロールの筋層組織と血清採取

[研究サンプルの流れ]

- (1) 鳥取大学医学部附属病院では、対照群の筋層生検サンプルと血清を上記方法で採取し、連結可能匿名化を行う。
- (2) 昭和大学江東豊洲病院、福岡大学病院、東京慈恵会医科大学附属病院では、患者群の食道筋層生検サンプルと血清を上記方法で採取する。採取したサンプルは連結可能匿名化を行った上で、鳥取大学医学部附属病院に郵送する。
- (3) 匿名化されたサンプルの内、筋層生検サンプルは鳥取大学医学部附属病院でウイルスマイクロ RNA の解析や網羅的ウイルス検索を行い、食道アカラシアまたはアカラシア類縁疾患における臨床病理学的病理学因子との相関性を解析する。

4. 研究成果

鳥取大学医学部附属病院、昭和大学江東豊洲病院、福岡大学病院、東京慈恵会医科大学附属病院、および東京大学の複数の施設において、倫理委員会の承認を経て研究が進行中である。

当該研究は、食道アカラシアおよびアカラシア類縁疾患の患者を対象に POEM 治療を受けた患者からの検体採取を進めてきた。現時点では、昭和大学江東豊洲病院消化器センターから 60 検体、福岡大学病院消化器外科から 30 検体、東京慈恵会医科大学附属病院から 20 検体の合計 110 検体を採取している。また、非食道運動機能障害の患者で食道切除術を受けた患者を対照群とし、食道癌患者から LES 部の検体を鳥取大学附属病院で採取し、これまでに 16 検体を得ている。こ

これらの検体採取は引き続き進行中である。

現在、採取された検体は東京大学の衛生学分野で解析を行っている。トランスクリプトーム解析を通じて、アカラシアとウイルス感染の関与、特にヘルペスウイルス (HSV-1、HSV-2 など) のマイクロ RNA 発現解析およびその制御分子解析を行っている。

現時点では、特定のウイルス感染の兆候はまだ確認されていない。引き続き残りの検体について検討を進める予定である。また、検体採取においては、採取された検体の中には RNA の分解が進み、解析が不可能となるものも多く見受けられ、POEM 治療時のトンネル作成時に使用されるスプレーによる熱がその一因である可能性を考え、検体採取方法の改善を検討している。具体的には熱凝固が及ぶ前の鈍的剥離を多用し、その鈍的剥離部より生検 (ジャンボ鉗子で大きく採取) することを考えている。また、遺伝子内には ubiquitin に関連する遺伝子を何個か認めている。ただ、GO 解析や KEGG では、遺伝子セットとして取り出せておらず、cutoff 値によって、これらを取り出せないか現在試行錯誤中である。その他には CYBERSORT を用いて、免疫細胞の比率を検討している。免疫細胞の比率では、アカラシアとコントロールの間で B cell と樹状細胞がアカラシアの方が多く発現していた (図 3、4)。

上記の解析を進め、成果物は学会での発表および論文の予定である。

図 3. CIBERSORTx (機械的学習法による免疫解析)

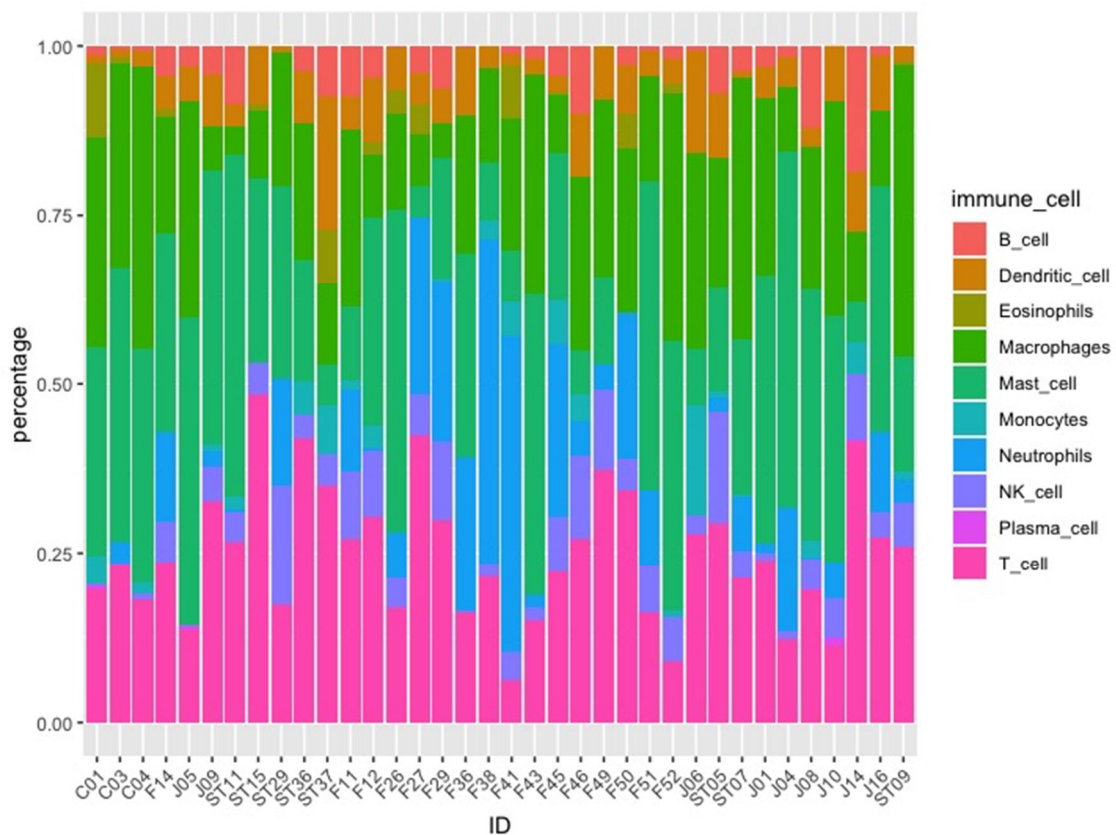


図 4. 免疫細胞の割合 (achalasia vs control)

cell	achalasia	control	p-value
B cell	0.05	0.02	0.006
Plasma cell	0.00	0.00	0.649
T cell	0.25	0.24	0.668
NK cell	0.04	0.04	0.440
Monocyte	0.04	0.02	0.375
Macrophage	0.10	0.13	0.081
Dendritic cell	0.05	0.02	0.020
Mast cell	0.36	0.45	0.290
Eosinophils	0.02	0.04	0.371
Neutrophils	0.03	0.01	0.076

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂口 琢紀、炭山 和毅、井上 晴洋、塩飽 洋生、池淵 雄一郎、磯本 一
2. 発表標題 食道アカラシアにおける下部食道括約筋におけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------