

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22590692

研究課題名（和文）日米共同研究によるバレット食道の発生ならびに抑制機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms involved in development and suppression of Barrett's esophagus: Results of joint Japan-U.S. research

研究代表者

渡 二郎 (WATARI JIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10311531

研究成果の概要（和文）：前癌病変と考えられる特殊腸上皮化生（SIM群）とSIMのない円柱上皮化生（CLE群）に発現する種々の分子異常を解析し、PPI治療に対する分子異常の変化について検討した。その結果、両群におけるmicrosatellite instability (MSI) および4遺伝子 (*hMLH1*、*p16*、*E-cadherin*、*APC*) のpromoter領域のメチル化異常の頻度に差を認めなかった。また、SIMと特異的に反応するDas-1抗体の反応性はCLE群に比べてSIM群で有意に高かった。PPI投与群ではMSIと*p16*、*E-cadherin*、*APC*遺伝子のメチル化異常は消失したが、PPI非投与群ではその傾向はなかった。すなわち、CLEにもSIMと同等の分子異常が存在することから、SIMのみならずCLEも前癌病変と考えられた。さらに、これらの分子異常の頻度は米国から報告とほぼ同等であったことから日本人と米国人のBEの性質は類似しており、分子マーカーの変化からPPI投与はBEの進展を抑制する可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We evaluated several molecular alterations including microsatellite instability (MSI); the CpG island methylation status of *hMLH1*, *p16*, *E-cadherin* and *APC* genes; and monoclonal antibody Das-1, which specifically reacts with BE in specialized intestinal metaplasia (SIM), as well as in columnar lined epithelium (CLE) without SIM in BE mucosa. Additionally, we investigated changes in the above molecular markers in a randomized control trial, comparing PPI administration versus PPI non-administration groups. Our results showed no significant differences in the frequency of MSI, or methylation at any genes investigated in SIM or CLE. In contrast, Das-1 reactivity was significantly higher in SIM versus CLE. The frequency of methylation and Das-1 reactivity among Japanese was similar to that of BE in the U.S. population, a finding which corroborates previous reports. In patients administered PPI, MSI and hypermethylation at *p16*, *E-cadherin*, and *APC* genes disappeared following intervention, while patients without PPI did not show this tendency. These results indicate that CLE may be a precancerous lesion as well as SIM, and there is no difference in the molecular characteristics of BE between Japanese and U.S. populations. Furthermore, PPI may promote regression of the molecular alterations involved in BE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道・胃・十二指腸）

1. 研究開始当初の背景

疫学的研究から日本人と欧米人のバレット食道 (BE) は、その発生頻度や BE 長が異なり、人種差があることがうかがえる。

(1) BE における特殊腸上皮化生 (SIM) は前癌病変と考えられ、米国では SIM を認める BE 粘膜のみを真の BE と定義している。一方で、SIM を認めない BE 粘膜 (CLE) にも分子異常を認めることから、SIM の有無にかかわらず、内視鏡的に BE 粘膜を認める場合に BE と定義するとする立場がある。

(2) BE の発生には、genetic および epigenetic 異常が関与している。また、プロトンポンプ阻害薬 (PPI) の内服が BE の進展を抑制することが報告され、さらに我々は *H. pylori* (*Hp*) 除菌治療が BE 粘膜の分子異常改善することを報告した。

2. 研究の目的

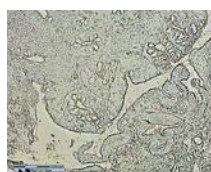
(1) SIM 腺管および SIM を認めない CLE 腺管から選択的に DNA を抽出し、種々の分子マーカーの発現を明らかにする。また、米国人の BE における SIM と特異的に反応する Das-1 抗体を用い、日本人における BE との反応性の相違を明らかにする。

(2) PPI 治療および *Hp* 治療を行った BE 例を対象に治療前と治療 1 年後での BE 粘膜での分子異常の変化について明らかにする。

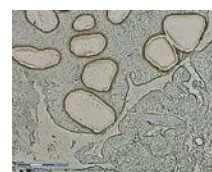
3. 研究の方法

(1) BE から生検を行い、SIM を認めた場合は SIM 腺管 (SIM 群) から、SIM を認めなかった場合には円柱上皮化生腺管 (CLE 群) から Laser capture microdissection system を用いて選択的に DNA を抽出した。

Microdissection 前

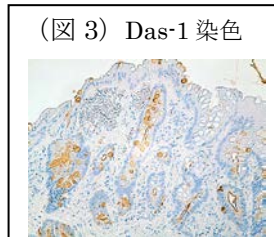
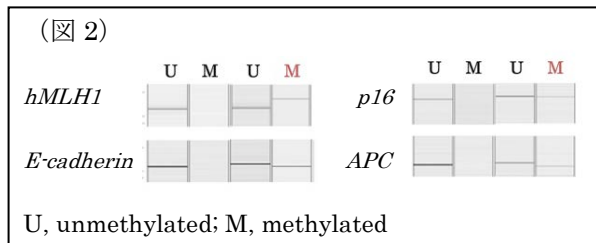
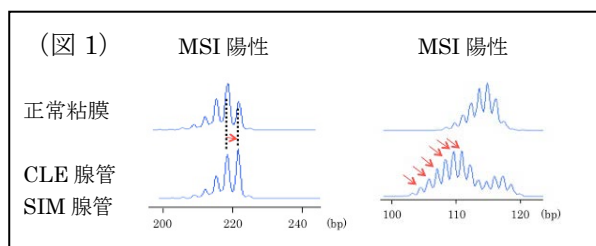


Microdissection 後



Bethesda 基準に準じ Microsatellite instability (MSI) を判定し (図 1)、また *hMLH1*、*p16*、*E-cadherin*、*APC* 遺伝子の promoter 領域のメチル化異常を methylation specific PCR にて解析した (図 2)。

Das-1 抗体は immunoperoxidase assay にて免疫染色した (図 3)。



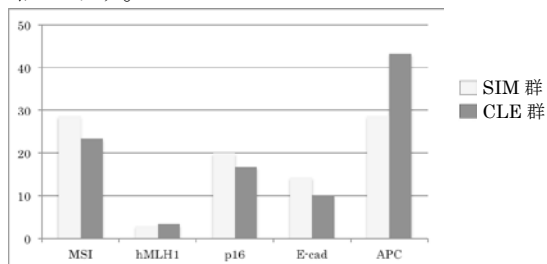
(2) *Hp* 陰性者には PPI 治療、*Hp* 陽性者には *Hp* 除菌治療を封筒法にて無作為介入試験を行い、介入前と介入 1 年後での BE 粘膜における上記分子異常の変化について検討した。

#### 4. 研究成果

65 名の BE 患者を対象とした。内訳は short segment BE 62 例、long segment BE 3 例で、男性 49 例、女性 16 例であった。

##### (1) BE 粘膜における分子異常

BE における分子マーカーの頻度について下記に示す。



MSI および何れの遺伝子のメチル化異常の頻度も SIM 群と CLE 群の間に有意差を認めなかった。

また、Das-1 抗体との反応性は、SIM 群では 77.1%、CLE 群では 16.7%であり SIM 群で有意に高かった ( $p < 0.0001$ )。

SIM 群と CLE 群で *Hp* 感染の有無別に各分子マーカーと Das-1 反応性を比較したが有意差を認めなかった。

##### (2) 介入試験による BE での分子マーカーの推移

無作為介入試験の登録例は、PPI 投与群 (n=5) vs PPI 非投与群 (n=3)、*Hp* 除菌群 (n=2) vs 非除菌群 (n=2) であった。

① PPI 投与群では、MSI 陽性 2 例は介入後何れも安定化した。また、*hMLH1* は 1 例がメチル化したが、投与前に *p16*、*E-cadherin*、*APC* 遺伝子の何れかにメチル化異常を認めた 2 例は、PPI 投与後には何れも非メチル化へと変化した。一方、PPI 非投与群では、介入前後で分子異常の頻度に差を認めなかった。Das-1 反応性は介入前後で変化を認めなかった。

② *Hp* 除菌群では、MSI 陽性 1 例が除菌後に安定化した。また、除菌前に *hMLH1*、*E-cadherin*、*APC* 遺伝子の何れかにメチル化を認めた 2 例は除菌後もメチル化が残存していた。非除菌例 2 例のうち 1 例において MSI が生じ *APC* 遺伝子がメチル化した。

#### 【考察】

米国と日本・英国では BE の定義は異なる。すなわち、米国では前癌病変とされる SIM の

存在が必須であるが、本邦と英国では内視鏡的に BE を認めるだけで BE と定義してもよい。

今回の結果では、SIM 群と CLE 群では MSI および 4 つの遺伝子のメチル化異常の頻度に有意差を認めなかった。この結果は必ずしも SIM だけが前癌病変とは言えず、CLE にも同様に分子異常の蓄積があることが明らかとなった。最近の米国からのデータをみると (Wang JS, et al. Am J Gastroenterol 2009;104: 2153-60)、*p16* と *APC* の promoter 領域のメチル化異常はそれぞれ 30% と 60% であった。この研究での DNA の抽出には、我々のような microdissection system を用いて SIM や CLE 腺管から選択的な抽出を行っていない。しかし、メチル化異常の頻度は今回の我々の結果と差を認めなかった。また、Das-1 抗体の反応性は SIM 群では 77.1%、CLE 群では 16.7% であった。Dasらの報告 (Das KM, et al. Ann Intern Med 1994;120:753-6, Glickman JN, et al. Am J Surg Pathol 2001;25:87-94.) によると SIM では 88-95%、CLE では 29-44% の反応性であり、我々の結果は日本人の BE での Das-1 反応性は米国での頻度と差はなかった。

PPI は BE の進展や腫瘍化を抑制することが報告されている。今回の検討では、症例数は少なかったが、PPI 投与群では MSI やメチル化異常は改善していた。この事実を検証するために、今後、更に多くの症例で検討していく必要がある。

当初、米国ニュージャージー医科大学との共同研究により米国人の BE からの生検材料を用いて分子病理学的解析も行う予定であった。しかし、同大学病理学教室から病理組織検体を海外に提供することの許可が下りず施行できなかった。また、同様の理由でバレット食道細胞株 (BAR-T) の提供を受けることが困難となったのが本研究の limitation である。

#### 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 渡 二郎、富田寿彦、大島忠之、他、わが国の GERD とバレット食道の関わり、THE GI FOREFRONT、査読無、8 巻、2012、36-39
- ② 渡 二郎、浅野晴紀、近藤隆、他、Barrett 食道の分子病理学、消化器内科、査読無、54 巻、2012、202-208
- ③ Watari J、Moriichi K、Tanabe H、et al. Biomarkers predicting development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection: An analysis of molecular pathology of *Helicobacter*

*pylori* eradication, 査読有、Int J Cancer、  
130、2012、2349-2358  
DOI: 10.1002/ijc.26275

- ④ Moriichi K, Watari J, Das KM, et al.  
Effects of *Helicobacter pylori* infection  
on genetic instability, the aberrant CpG  
island methylation status and the  
cellular phenotype in Barrett's  
esophagus in a Japanese population, 査  
読無、Recent advances and research  
updates、12、2011、213-226

[学会発表] (計4件)

- ① 渡 二郎、堀 和敏、豊島史彦、他、日本  
人のBarrett食道の発生に肥満は関連する  
か? 第3回肥満と消化器疾患研究会、2013  
年3月23日、鹿児島
- ② Tamura A, Watari J, Hara K, et al.  
Abdominal obesity and risk of Barrett's  
esophagus: a pilot study in Japanese  
referral centers、13th World Congress of  
the International Society for the Diseases  
of the Esophagus (ISDE)、2012年10月15  
~17日、Venice/Italy
- ③ 渡 二郎、盛一健太郎、三輪洋人、Short  
segment Barrett食道での分子異常と内視鏡  
診断の対応、第83回日本消化器内視鏡学会  
総会、2012年5月12~14日、東京
- ④ 渡 二郎、浅野晴紀、近藤隆、他、肥満と  
Barrett食道に関する疫学調査-pilot研究、第  
2回肥満と消化器疾患研究会、2012年4月  
12日、東京

[図書] (計1件)

- ① Watari J, Moriichi K, Tanabe H, et al.  
Chapter 6: Intestinal metaplasia related to  
gastric cancer: an outcome analysis of  
biomarkers for early detection. Current  
Topics in Gastritis - 2012, edited by Gyula  
Mozsik, Published by InTech, Croatia, pp  
97-111, 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡 二郎 (WATARI JIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10311531

### (2) 研究分担者

三輪 洋人 (MIWA HIROTO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 80190833

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: