

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24591029

研究課題名(和文) 大腸鋸歯状病変における内視鏡的・分子生物学的診断ツールの開発

研究課題名(英文) Investigation of endoscopic and molecular diagnosis of colorectal serrated polyps

研究代表者

小西 一男 (KONISHI, KAZUO)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：60307014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：色素内視鏡併用下で腺口形態所見及びNarrow Band Imagingによる微細血管所見による鋸歯状ポリープ診断に関する第二相試験を行い「黄色粘液付着」が鋸歯状腺腫(sessile serrated adenoma/polyp, SSA/P)診断における有用な内視鏡的鑑別所見となった。一方、分子生物学的解析では、左側病変に比べ右側大腸の鋸歯状病変でCpG island methylator phenotype陽性大腸癌の前駆病変である可能性を明らかにした。さらに、右側大腸のSSA/Pと過形成性ポリープについてDNAメチル化アレイ解析を行い、腫瘍発生過程に関与しうる新規候補遺伝子群を抽出した。

研究成果の概要(英文)：We performed the prospective study of differential endoscopic features of sessile serrated adenomas in the colorectum and concluded that the presence of mucus on the lesions may be a practicable finding for the differential diagnosis of sessile serrated adenoma/polyps (SSA/Ps) and hyperplastic polyps. Our molecular analysis suggested that distinct molecular features were observed between proximal and distal serrated polyps with hyperplastic crypt pattern and that proximal microvesicular hyperplastic polyps (MVHPs) may develop more frequently through SSA/Ps to CpG island methylator phenotype (CIMP) cancers than distal MVHPs. We performed methylated CpG island amplification microarrays in three paired proximal MVHPs and SSA/Ps with/without cytological dysplasia and found new candidate genes associated with the serrated pathway.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸鋸歯状腺腫 内視鏡診断 大腸癌 大腸発癌 大腸内視鏡検査

1. 研究開始当初の背景

近年、内視鏡診断機器の進歩に伴い、より精度の高い内視鏡検査が可能となり、従来の内視鏡検査では発見しづらかった大腸腫瘍性病変も発見される機会が増えた。これにより、大腸腺腫や早期癌の発見頻度も以前に比べ増加傾向にある。これらの病変に対する内視鏡的切除は大腸癌罹患の抑制効果があるものと考えられている。しかし、我が国における悪性新生物の部位別死亡率の年次推移において大腸癌の割合は増加傾向にあり、女性においては第一位となっている。このため、既知の大腸前癌病変あるいは発癌過程以外の存在を考える必要があり、これらに対する内視鏡治療はさらなる大腸癌罹患の抑制効果につながる可能性がある。

大腸発癌過程として、adenoma-carcinoma sequence が考えられている。すなわち正常大腸粘膜から低異型度腺腫が発生し、それが異型度を増して高異型度腺腫となり浸潤癌に至る pathway である。しかし、近年、過形成性ポリープ(hyperplastic polyp; HP)からの発癌の可能性が報告されており、serrated pathway と呼ばれている。従来、HP は発癌に関係のない良性非腫瘍性ポリープと考えられ、治療の必要はないものとされてきた。しかし、1990 年に Longacre らにより組織学的に HP と同様の鋸歯状構造をもちながら、腺腫にみられる細胞異型を示す病変として serrated adenoma (SA) が報告された¹⁾。さらに、2003 年に Torlakovic ら²⁾及び Goldstein ら³⁾により組織学的に細胞異型は認められないが、鋸歯状構造に加え腺管下部を中心とした構造異型をもつ sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) が報告された。また、SA や SSA/P に癌や腺腫を併存する病変も認められ、serrated pathway を介した発癌過程の存在が考えられた。

我々は、2000 年頃から鋸歯状病変に関する分子生物学的研究を行ってきた。B-カニン蛋白の発現態度や BRAF 変異あるいは DNA メチル化の解析結果から、SSA/P あるいは SA は通常型腺腫と異なる分子生物学的特徴をもつことを明らかにしてきた⁴⁻⁶⁾。DNA メチル化は、遺伝子 DNA のプロモーター領域の CpG アイランドに起こることで遺伝子不活化につながる。発癌過程においては、癌抑制遺伝子のメチル化を介した不活化が重要である。さらに、DNA メチル化制御機構の破綻により多くの遺伝子プロモーター領域で DNA メチル化が認められる腫瘍群は、CpG island methylator phenotype (CIMP) と定義される。CIMP 陽性の大腸癌では BRAF 変異を認めることが多く、右側大腸癌の頻度が高いといった特徴がある⁷⁾。このため、右側の鋸歯状病変、特に SSA/P は、BRAF 変異を高率に認めることから CIMP 陽性癌の前癌病変の一つと考えられている。しかし、SSA/P あるいは SA がどのように CIMP 陽性癌へ進展するかは明らかになっていないことが多

い。一方、鋸歯状病変の一部が前癌病変と考えると、鋸歯状病変を内視鏡的に鑑別診断し内視鏡切除の適応を決める必要がある。しかし、SSA/P では HP に類似した腺口形態パターンを示すことから HP と SSA の鑑別診断は難しいことも多い。

2. 研究の目的

我々は、大腸鋸歯状病変の内視鏡的所見と分子生物学的所見について解析し、その解析結果を内視鏡診断へフィードバックすることで、鋸歯状病変における鑑別診断法を開発し、大腸鋸歯状病変の内視鏡治療ストラテジーを確立する。

3. 研究の方法

【臨床的データの集積・解析】

(1) 大腸鋸歯状病変について内視鏡的通常観察所見、腺口形態所見及び Narrow Band Imaging による微細血管所見による鋸歯状ポリープ診断に関する第二相試験を多施設共同試験で計画する。鋸歯状腺腫に特徴的な内視鏡所見を探索する。

【分子生物学的データの集積・解析】

(2) 臨床研究に関して同意のえられた患者群について、鋸歯状病変を疑う病変に対して色素内視鏡・画像強調内視鏡を含めた詳細な内視鏡観察の後、内視鏡的に HP の腺口形態あるいは HP と腫瘍の腺口形態の混在パターンを示す病変から生検により組織採取を行い、凍結保存した後に遺伝子解析を行う。

(3) 遺伝子解析として、次に示す二つの解析法を用いる。a) 定量的メチル化解析法である bisulfite-pyrosequencing 法を用いて既知の遺伝子について遺伝子変異およびメチル化解析を行う。b) Methylated CpG island amplification microarray (MCAM) を用いてゲノムワイドに DNA メチル化遺伝子のプロファイリングを行う。この解析法では、2種類の制限酵素を用いて処理した後 PCR を行い、遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドを抽出し、プロモーターアレイを用いて約 6500 遺伝子のプロモーター領域について解析する方法である⁸⁾。

4. 研究成果

I. 臨床的データの集積・解析

(1) 「色素内視鏡併用下で腺口形態所見及び Narrow Band Imaging による微細血管所見による鋸歯状ポリープ診断に関する第二相試験」多施設共同試験として計画した。参加施設は、昭和大学消化器内科、NTT 関東病院、山鹿中央病院の3施設とし、H25年6月より試験登録を開始した。鋸歯状ポリープ150例151病変をもって登録終了となった。病理医2名による病理中央判定を行い、データ解析を行った。

(2) 鋸歯状ポリープ鑑別診断に関する内視鏡的所見として、病変表面の黄色粘液付着、Varicose Microvascular vessel (VMV)、開II型pit、表面分葉溝の有無を検討項目として解析した。SSA/PとSSA/P以外の鑑別診断能について

みると「黄色粘液付着」が有用な内視鏡的鑑別所見であった。

	開 II 型 pit	VMV	黄色粘 液付着	表面分 葉溝
感度	60%	51%	90%	57%
特異度	65%	71%	52%	52%
正診率	61%	56%	80%	55%

さらに、臨床病理学的所見も加えた SSA/P と SSA/P 以外の病変の鑑別診断能についての単変量解析では、病変径、肉眼型に加えて「黄色粘液付着」が有意な内視鏡的鑑別所見であった。多変量解析でも病変径、肉眼型、黄色粘液付着が有意な内視鏡的鑑別所見であった。

II. 分子生物学的データの集積・解析

(1) 内視鏡的に鋸歯状病変を疑い、かつ 6mm 以上病変から内視鏡下生検により組織サンプル採取を行った 114 病変 86 症例について臨床病理学的所見及び分子生物学的所見と内視鏡所見との関連について解析した。なお、HP は、microvesicular hyperplastic polyp (MVHP) と goblet-rich cell (GCHP) に亜分類し検討した。SSA/P with/without cytological dysplasia、SSA/P 及び MVHP において BRAF 変異は高率であり、SSA/P with/without cytological dysplasia と SSA/P において CIMP 陽性率が高かった。この傾向は右側病変で強かった。鋸歯状病変、特に SSA/P は、BRAF 変異を高率に認めることから CIMP 陽性癌の前癌病変の一つと考えられていることから、CIMP の関連因子について臨床病理学的・分子生物学的に解析すると下記の表のように、右側大腸と BRAF 変異が独立した危険因子であり、右側大腸の鋸歯状病変は左側病変に比べ CIMP 陽性大腸癌の前癌病変である可能性が考えられた。

		CIMP		P value	Odds ratio	P value
		Presence	Absence		95%CI	
		(n = 51)	(n = 62)			
Tumor location	Proximal	45 (85%)	30 (48%)	<0.001	18.6	<0.001
	Distal	6 (12%)	32 (52%)		(5.1-68.3)	
BRAF	Mut+	33 (65%)	15 (24%)	<0.001	13.0	<0.001
	Mut-	18 (35%)	47 (76%)		(4.1-41.3)	

(2) 鋸歯状ポリープのうち右側大腸の SSA/P と MVHP について MCAM を用いたアレイ解析を行った。検討(1)の研究結果から HP、特に MVHP から SSA/P へ進展する可能性があり、この進展にかかわる新規遺伝子異常を調査した。右側大腸の MVHP と SSA/P の 3 症例を対象とした。なお、年齢、性をマッチさせ、SSA/P の 2 症例は cytological dysplasia 合併症例とした。解

析結果から 3 つの遺伝子群 (CENTRAL NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT, GROWTH, ION CHANNEL ACTIVITY)における新規候補遺伝子を抽出した。

<引用文献>

- 1) Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. Am J Surg Pathol 14, 1990, 524-37.
- 2) Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC et al. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. Am J Surg Pathol 27, 2003, 65 - 81.
- 3) Goldstein NS, Bhanot P, Odish E et al. Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. Am J Clin Pathol 119, 2003, 778 - 96.
- 4) Konishi K, Yamochi T, Makino R, et al. Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas. Clin Cancer Res. 10, 2004, 3082-90.
- 5) Yamamoto T, Konishi K, Yamochi T, et al. No major tumorigenic role for beta-catenin in serrated as opposed to conventional colorectal adenomas. Br J Cancer. 89, 2003, 152-7.
- 6) Yano Y, Konishi K, Yamochi T, et al. Clinicopathological and molecular features of colorectal serrated neoplasias with different mucosal crypt patterns. Am J Gastroenterol 106, 2011, 1351-8.
- 7) Konishi K and Issa JP. Targeting aberrant chromatin structure in colorectal carcinomas. Cancer J. 2007; 13: 49-55.
- 8) Konishi K, Watanabe Y, Shen L, et al. DNA methylation profiles of primary colorectal carcinoma and matched liver metastasis. PLoS ONE 6: 2011;e27889.

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 3 件)

Kihara T, Kubota Y, Konishi K, et al. (他 14 名) Magnifying colonoscopic findings for differential diagnosis of sessile serrated adenoma/polyps and hyperplastic polyps. Showa Univ J Med, (査読有), 28, 2016, 147-54
http://www10.showa-u.ac.jp

Shinmura K, Konishi K, Yamochi T, Kubota Y, et al (他 12 名). Molecular features of colorectal polyps presenting

Kudo's type II mucosal crypt pattern: are they based on the same mechanism of tumorigenesis? Endosc Int Open, (査読有), 2, 2014, E171-7

DOI: 10.1055/s-0034-1377518

Konda K, Konishi K, Yamochi T, Kubota Y, et al. (他 15 名) Distinct molecular features of different macroscopic subtypes of colorectal neoplasms. PLoS ONE, (査読有), 9, 2014, e103822

DOI: 10.1371/journal.pone.0103822.t003

〔学会発表〕(計 8 件)

新村健介, 小西一男, 吉田 仁. 内視鏡的 II 型腺口形態を示す大腸鋸歯状病変における臨床病理学的・分子生物学的の所見に関する検討. 第 60 回昭和大学学士会総会. 2013 年 11 月, 東京.

新村健介, 小西一男, 矢野雄一郎, 片桐 敦, 久保田祐太郎, (他 8 名). 内視鏡的 II 型腺口形態を示す大腸鋸歯状病変における臨床病理学的・分子生物学的の所見に関する検討. 第 86 回日本消化器内視鏡学会総会. 2013 年 10 月, 東京.

Shinmura K, Konishi K, Kubota Y, et al (他 10 名). Molecular features of colorectal polyps presenting Kudo's type II pit pattern. 21th United European Gastroenterology Week. Oct 2013; Berlin, Germany (Mini symposium).

Kihara T, Kubota Y, Konishi K, et al (他 9 名). Endoscopic pit pattern for differential diagnosis of colorectal serrated polyps: Can it distinguish sessile serrated adenoma from hyperplastic polyp? 21th United European Gastroenterology Week. Oct 2013; Berlin, Germany.

Shinmura K, Konishi K, Kubota Y, et al (他 12 名). Molecular features of colorectal polyps presenting Kudo's type II mucosal crypt pattern. Digestive Disease Week2013. May 2013; Orland, FL, U.S.A.

Tojo M, Konishi K, Kubota Y, et al (他 11 名). Endoscopic features for differential diagnosis of colorectal serrated polyps: A prospective study. Digestive Disease Week2013. May 2013; Orland, FL, U.S.A.

Konda K, Konishi K, Kubota Y, et al (他 12 名). Five different subclasses of colorectal neoplasias identified by integrated genetic and epigenetic analysis: Association with polypoid and nonpolypoid carcinogenesis. Digestive Disease Week2013. May 2013; Orland, FL, U.S.A.

紺田健一, 小西一男, 吉田 仁. 大腸上皮性腫瘍におけるエピジェノタイプと

臨床病理学的特徴. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会 (パネルディスカッション). 2013 年 5 月, 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 一男 (KONISHI, Kazuo)

昭和大学・医学部内科学講座消化器内科学

部門・講師

研究者番号: 10234567

(2) 研究分担者

久保田 祐太郎 (KUBOTA, Yutaro)

昭和大学・医学部内科学講座腫瘍内科学部

門・講師

研究者番号: 80465103

(3) 研究協力者

木庭 郁郎 (Koba, Ikuro)

大園 研 (Ohata, Ken)

松山 恭士 (MATSUYAMA, Kyoji)

矢持 淑子 (YAMOCHI, Toshiko)

二村 聡 (FUTAMURA, Satoshi)