

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26460954  
研究課題名(和文) バレット食道におけるバレット腺癌リスクマーカーの検討  
  
研究課題名(英文) High risk markers for cancer in Barrett's esophagus  
  
研究代表者  
塩谷 昭子 (Shiotani, Akiko)  
  
川崎医科大学・医学部・教授  
  
研究者番号：80275354  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：米国人の検体を用いて、Long Segment Barrett's Esophagus (LSBE) および食道腺癌 (EAC) 発症に関連する遺伝子をマイクロアレイ解析により同定した。次に日本人の患者検体を用いて特定された遺伝子について遺伝子発現量を検討した。SERPINB7の過剰発現およびSCNN1Bの低発現が米国人同様、日本人のLSBEにおいても認められた。さらにEAC背景のBEにおいてもコントロール群のSSBEと比較して同様に遺伝子発現の差を認めた。日本人においてもSERPINB7がBEの伸長に関与しており、SCNN1Bが発癌の危険因子のバイオマーカーとして、有用である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the pilot study, microarray analysis indicated the possibility of SERPINB7 over expression as a biomarker for the risk of EAC in the previous case control study investigating brushing samples taken from targeted BE mucosa of USA patients by endoscopy. The validation study group consisted of 12 EAC patients (LSBE 2,) and 65 sex and age-matched patients with BE patients (LSBE 11, SSBE 54). The expression levels of TRHDE, PDZK1, SERPINB7 were higher and SCNN1B was significantly lower in the LSBE control group than those in the SSBE group. The expression levels of SCNN1B was lower, and SERPINB7 was higher in the BE of the EAC groups than those in the SSBE of the controls among the 3 groups. Overexpression of SERPINB7 and down-expression of SCNN1B in the LSBE patient were recognized in Japanese patients as well as USA patients. SCNN1B may be useful markers to select patients for surveillance for LSBE and EAC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：バレット食道腺癌 SERPINB7 SCNN1B

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、下部食道のバレット上皮から発生する腺癌(EAC)の発生は急激な増加を示し、海外において最も増加率が高い癌である<sup>1)</sup>。EACの大部分は食道胃接合部口側の扁平上皮が円柱上皮、特殊腸上皮化生(SIM)へと変化し、前癌病変そして最終的に癌へと発展する多段階の過程を経て発生すると考えられている<sup>2)</sup>。円柱上皮における腸型形質が腫瘍性変化に及ぼす影響を含め、バレット食道(BE)発生および発癌の分子学的機序は十分に解明されていないが、Goblet metaplasiaを伴うSIMとEACとの関連性が指摘されている。また、バレット上皮の長さが全周性に3cmを超えるバレット食道(LSBE)は3cm未満のバレット食道(SSBE)と比較して癌の合併率が高いことが知られている。

(2) これまでに申請者らは Narrow Band Imaging(NBI)拡大内視鏡観察下に、バレット上皮より侵襲の少ない簡便に行えるブラッシング法および生検法により検体を採取し、SIMはtubular/villous patternの上皮でより高頻度に認められることを報告した。またtubular/villous patternを呈するバレット上皮では他のpatternと比較して腸型形質MUC2、CDX2の遺伝子発現が有意に高いことを報告した。さらにEACリスクマーカーとなる遺伝子を同定する目的で、バレット上皮のNBI拡大観察下生検により、EAC患者バレット上皮部および癌部、さらに対照患者バレット上皮部から得られた検体を用い、マイクロアレイにより網羅的遺伝子解析を行った。p値0.005以下の有意差を認めた79遺伝子のうち、対照群と比較してEAC群のバレット上皮部および癌部でも同様に有意差を示す9遺伝子を特定した。ECA少数例のpreliminaryな検討からは、バレット上皮ブラッシングによるCD55発現量の検討はハイリスク群の絞り込みに有用である可能性が示唆された<sup>5)</sup>。

しかし、本邦においてEACは食道癌の4.7%と頻度が低く症例の集積が困難であった。

## 2. 研究の目的

米国人のEACのバレット粘膜を用いて網羅的遺伝子解析により特定した遺伝子について日本人の検体を用いて定量解析を行うことにより、日本において増加する可能性が高いと考えられるEACあるいはlong segment Barrett esophagus (LSBE)の分子マーカーを同定する。

## 3. 研究の方法

対象は、米国人および日本人の内視鏡治療前早期EAC患者および対照BE患者。

米国の検体を用い、臨床背景を一致させた対照群のLSBE 5例とSSBE 5例のバレット上皮およびSSBEを有するECA 5例のバレット上皮部および癌部のブラッシングの検体計20検体を用いて網羅的遺伝子解析を再度行い、LSBEとSSBEの2群間で有意差が得られ遺伝子およびSSBE対照群のバレット上皮、ECAバレット上皮部および癌部の3群間で有意差が得られた遺伝子を特定する。特定した遺伝子について米国および日本の検体を用いさらにvalidationを行い比較検討する。これらの遺伝子発現および臨床背景について、癌患者と非癌患者、LSBEとSSBE、日本人と米国人と比較することにより、その相違および共通点を明らかにし、ECAと関連するバレット食道における分子生物学的リスクマーカーを同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 米国人BEの検討

申請者らはEAC、LSBEの頻度が高い米国Mayo Clinicの協力により集積を行った検体で、本邦の検体と同様に網羅的遺伝子解析を行った。対照群13例(LSBE7例、SSBE6例)とEAC群(LSBEの癌部5例、BE部3例、SSBEの癌部3例、BE部4例)の28検体を用いて検討を行い、両群のバレット上皮部の遺伝子発現でp値0.0005以下の有意差を認めた13遺伝子を特定しvalidationを行った。多重比較

(Dunnett's test)でEAC群とコントロール群のバレット上皮で有意差が得られたのは *SERPINB7* で、mRNA 平均発現量は、EAC群LSBE部において最も高く、次いでEAC群SSBE部、対照群LSBE部にも高く発現を認め、対照群SSBE部と比較して有意に高発現していた(図1)。蛋白分解酵素阻害因子である *SERPINB7* がバレットの伸展および発癌に関与している可能性が示唆された。

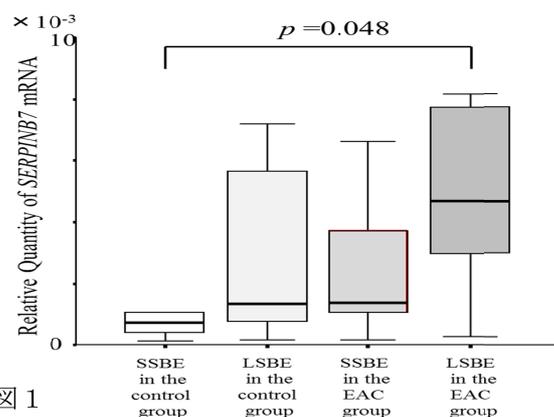


図1

SCNN1B 発現量はLSBE群でSSBEより低く、対照群のSSBEと比較してEAC群のLSBEで有意に低発現であった(図2)。

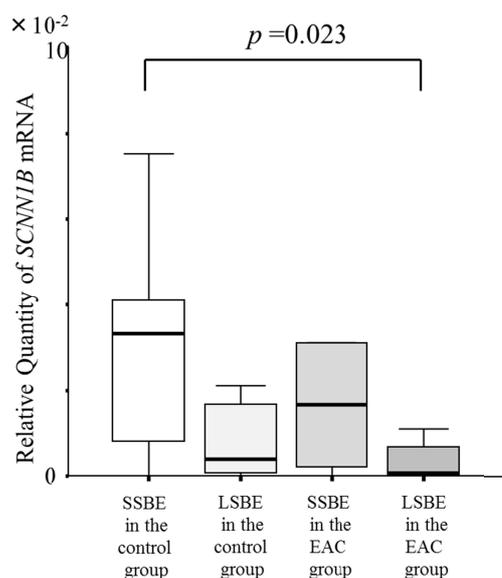


図2

## (2) 日本人BEの検討

対照群65例(LSBE11例、SSBE54例)とEAC群12例(LSBE2例、SSBE10例)の検体を用いて前述の特定された13遺伝子について発現量を検討した。対照群とEAC群の2群間で有意差

を認めなかった(表1)。

表1. 対照群とバレット腺癌群のバレット上

|                      | EAC<br>(n=12)    | control<br>(n=65)  | p    |
|----------------------|------------------|--------------------|------|
| <i>TOP2A</i>         | 0.79<br>(±1.1)   | 0.42<br>(±0.4)     | 0.24 |
| <i>MMP1</i>          | 0.81<br>(±0.7)   | 2.46<br>(±9.9)     | 0.31 |
| <i>MMP9</i>          | 0.91<br>(±1.4)   | 0.56<br>(±1.0)     | 0.96 |
| <i>PCK1</i>          | 9.54<br>(±11.9)  | 8.18<br>(±16.1)    | 0.67 |
| <i>TRHDE</i>         | 0.33<br>(±0.4)   | 0.73<br>(±1.7)     | 0.74 |
| <i>PDZK1</i>         | 1.89<br>(±2.4)   | 3.84<br>(±9.0)     | 0.78 |
| <i>SERPIN<br/>B7</i> | 1.22<br>(±1.7)   | 0.88<br>(±0.8)     | 0.58 |
| <i>BASP1</i>         | 11.25<br>(±11.3) | 11.16<br>(±13.7)   | 0.95 |
| <i>SCNN1<br/>B</i>   | 26.61<br>(±28.7) | 50.23<br>(±43.8)   | 0.14 |
| <i>CTXL</i>          | 97.79<br>(±60.0) | 174.33<br>(±147.9) | 0.16 |
| <i>MMP3</i>          | 0.08<br>(±0.07)  | 0.67<br>(±2.2)     | 0.48 |
| <i>MMP10</i>         | 0.08<br>(±0.1)   | 0.34<br>(±1.0)     | 1.0  |
| <i>MMP12</i>         | 0.76<br>(±0.9)   | 0.76<br>(±1.5)     | 0.85 |

## 皮膚の遺伝子発現量の比較

対照BE患者におけるSSBEとLSBEのブラッシングサンプルの遺伝子発現量の比較ではLSBEにおいて *PCK1* ( $2.9 \times 10^{-2}$  vs.  $1.4 \times 10^{-2}$ ,  $p=0.044$ ), *PDZK1* ( $1.1 \times 10^{-2}$  vs.  $0.56 \times 10^{-2}$ ,  $p=0.024$ ), and *SERPINB7* ( $3.7 \times 10^{-3}$  vs.  $1.7 \times 10^{-3}$ ,  $p=0.016$ ) は高発現であり、*BASP1* ( $0.72 \times 10^{-2}$  vs.  $1.4 \times 10^{-2}$ ,  $p=0.015$ ), *SCNN1B* ( $0.98 \times 10^{-2}$  vs.  $4.0 \times 10^{-2}$ ,  $p=0.001$ ), *MMP12* ( $2.8 \times 10^{-4}$  vs.  $8.8 \times 10^{-4}$ ,  $p=0.038$ ) は有意に低発現であった。

SSBEを有する対照群、LSBEを有する対照群およびEAC群の3群におけるバレット上皮

からブラッシングにより得られた遺伝子発現量の比較では、SSBE対照群と比較してLSBE対照群およびEAC群でSCNN1B発現量は有意に低値で会った(図3)。SERPINB7はLSBE対照群でSSBE対照群と比較して有意に高発現していた(図4)。

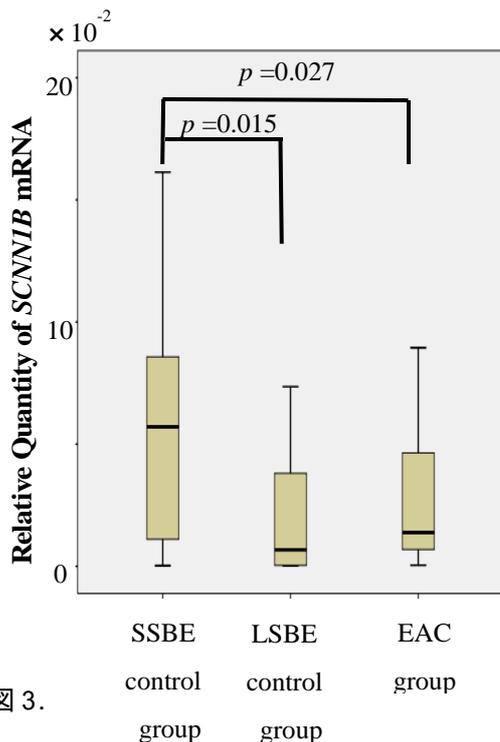


図3.

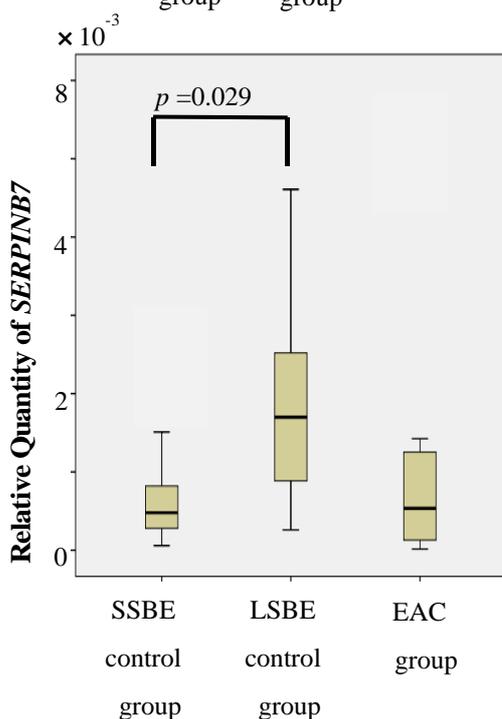


図4.

日本人においてもSERPINB7がBEの伸長に関与しており、SCNN1Bが発癌の危険因子のバイオマーカーとして、有用である可能

性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 13件)

1. 村尾高久, 藤田穰, 塩谷昭子. *Helicobacter pylori* 感染陰性時代の消化管疾患 Barrett 腺癌日本内科学会雑誌 106(1): 52-57, 2017 査読無
2. Shiotani Akiko, Lu H, Dore MP, Graham DY. Treating *Helicobacter pylori* effectively while minimizing misuse of antibiotics. *Cleve Clin J Med* 84(4): 310-318, 2017 査読有 doi: 10.3949/ccjm.84a.14110
3. Murao T, Shiotani A,(他 7 名 1,2 番目) Overexpression of CD55 from Barrett's esophagus is associated with esophageal adenocarcinoma risk. *J Gastroenterol Hepatol* 31(1): 99-106, 2016 査読有 doi: 10.1111/jgh.13055.
4. Matsumoto H, Shiotani A(他 8 名 2 番目). *Helicobacter pylori* eradication with proton pump inhibitors or potassium-competitive acid blockers: The effect of clarithromycin resistance. *Dig Dis Sci*. 査読有
5. Matsumoto H, Shiotani A,(他 8 名 2 番目). Molecular detection of *H. pylori* using adherent gastric mucous to biopsy forceps. *Helicobacter*. 2016 21(6): 548-553 査読有 doi: 10.1111/hel.12310
6. Molina-Infante J, Shiotani A Practical Aspects in Choosing a *Helicobacter pylori* Therapy. *Gastroenterol Clin North Am* 44(3): 519-535, 2015 査読有 doi: 10.1016/j.gtc.2015.05.004.
7. Fujita M, Shiotani A, Murao T, Safety of gastrointestinal endoscopic biopsy in patients taking antithrombotics. (他 9 名). *Dig Endosc* 27(1): 25-29, 2015 査読有 doi: 10.1111/den.12303.
8. Shiotani A, Kusunoki H,(他 6 名). Pilot study of Biomarkers for predicting effectiveness of ramosetron in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: expression of S100A10 and polymorphisms of TPH1. *Neurogastroenterol Motil* 27(1): 82-91, 2015 査読有 doi: 10.1111/nmo.12473
9. Shiotani A, Fujita Y, Nishio K. Low-dose aspirin-associated upper and mid gastrointestinal tract damage and gene polymorphism. *Curr Pharm Des* 21(35): 5066-5072, 2015 査読有
10. Shiotani A, Murao T, (他 5 名). Single nucleotide polymorphism markers for low-dose aspirin-associated peptic ulcer and ulcer bleeding. *J Gastroenterol Hepatol* 29(Suppl 4): 47-52, 2014 査読有 doi: 10.1111/jgh.12770.
11. Shiotani A, Haruma K, Graham DY. Metachronous gastric cancer after successful *Helicobacter pylori* eradication. *World J Gastroenterol* 20(33): 11552-11559, 2014 査読有 doi: 10.3748/wjg.v20.i33.11552.

12. Shiotani A, Tarumi K, Honda K, Fujita M, (他 5 名 ). Application of fecal hemoglobin-haptoglobin complex testing for small bowel lesions. Scand J Gastroenterol 49(5): 539-544, 2014 査読有 doi: 10.3109/00365521.2014.891260
13. Shiotani A, Hata J, Manabe N, (他 7 名). Clinical relevance of patency capsule combined with abdominal ultrasonography to detect small bowel strictures. Eur J Gastroenterol Hepatol 26(12): 1434-1438, 2014 査読有 doi: 10.1097/MEG.0000000000000225.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Shiotani A, Fujita M, Murao T, Haruma K. Aspirin induced intestinal injury -a review of recent studies. ANMA & JSNM Joint Meeting 2017 2017.3.23-3.24 Osaka (Japan)
2. 合田杏佑, 村尾高久, 塩谷昭子. 内視鏡下ブラッシング法を用いたバレット食道に関連する分子バイオマーカーについての検討。第 93 回日本消化器内視鏡学会総会 ワークショップ 2017.5.11-5.13 大阪
3. 松本啓志, 黒木靖敏, 塩谷昭子. 内視鏡を用いた腸内微生物叢へのアプローチ 大腸内視鏡下ブラッシング法を用いた腸内粘膜細菌叢の検討。第 93 回日本消化器内視鏡学会総会 ワークショップ 2017.5.11-5.13 大阪
4. Goda K, Shiotani A, Murao T, Fujita M, Matsumoto H, Haruma K, Fujita Y, Nishio K, Wallace TM, Wallace BM. Molecular biomarkers of high risk for cancer in Barrett's esophagus. APDW2016 2016. 11.2-11.6 Kobe (Japan)
5. Murao T, Shiotani A, Fujita M, Manabe N, Haruma K, Fujita Y, Nishio K, Wallace TM, Gomez ER, Manuel B, Wolfsen CH, Michael B. Digestive Disease Week 2016 (AGA) 2016.5.21-5.24 San Diego (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

UMIN-ICDR 臨床試験登録情報の閲覧

[https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr\\_view.cgi?recptno=R000004384](https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000004384)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩谷昭子 (SHIOTANI AKIKO)

川崎医科大学 医学部消化管内科学 教

授

研究者番号 : 80275354

(2) 研究分担者 : なし

(3) 連携研究者 : なし

(4) 研究協力者

西尾和人 (Kazuto Nisho)

近畿大学 医学部ゲノム生物学教室 教授

藤田至彦 (Yoshihiko Fujita)

近畿大学医学部ゲノム生物学教講 講師

村尾高久 (Takahisa Murao)

川崎医科大学 消化管内科講師

Michael B Wallace

Mayo Clinic (米国ジャクソンビル) 消化器・肝臓病学部門部長

Herbert Wolfsen, Manuel Berzosa Mayo

Clinic (米国ジャクソンビル) 消化器・肝臓病学部医師