

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08712

研究課題名(和文)5年以上追跡されたバレット食道例のテロメア長とバレット癌の発生予測

研究課題名(英文)Telomere length of the Barrett's esophagus followed up over 5 years, and outbreak prediction of cancers

研究代表者

相田 順子(Aida, Junko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長

研究者番号：80425678

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文):バレット食道は、欧米では腸上皮化生のある症例のみをフォローしているが、日本では噴門(C)型、腸(I)型いずれの上皮もフォローされている。我々はこれまでの研究でC型、I型のがん化しやすさに差がないことを示してきた。我々はがん化する症例を生検組織で予測したいと考え、正常生検組織の染色体不安定性について、数年以内のがん化した症例としなかった症例で各々のテロメア長を検討した。その結果、がん化症例と非がん化症例ではテロメア長に有意差がなく、生検部位でも差がなかった。また以前の研究で検討した担がん症例の背景上皮のテロメア長とも差がなく、バレット食道が既にテロメア長の短縮した前癌状態であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バレット食道について、生検の段階でがん化の危険性が予測可能であれば、フォローの頻度などを調整することで医療側も患者側も負担が軽減できる。しかし、残念ながらがん化の予測はランダムに採取された生検組織が正常の場合は不可能であると考えられた。また、バレット食道はバレット腺癌(食道腺癌)の前癌状態であることが推測された。従って、バレット食道の認められた患者はある程度定期的にフォローアップされることが望ましいと考えられた。それによってがん化しても早期発見、早期治療、治癒が可能となると思われる。

研究成果の概要(英文):The definitions of Barrett's esophagus in Western countries require intestinalized (I-type) epithelium, and the practitioners do not follow up whole cases. The Japanese definition does not require I-type and also accept cases with only cardiac (C)-type epithelium. To prospect its cancerization risk in the biopsy specimen, we estimated chromosomal instability due to telomere lengths of the biopsy specimens. We compared the biopsy cases from Barrett's esophagus with and without future cancerization in several years.

In our results, there was no significant difference between biopsy cases with or without future cancerization. There was also no difference by location (long- or short-segment Barrett's esophagus). Besides, we noticed that present results showed almost the same lengths of telomeres as our previous results from the background of Barrett's cancers. Therefore, we concluded that Barrett's esophagus shows shortened telomeres because they are already in pre-cancerous conditions.

研究分野：人体病理学

キーワード：バレット食道 前癌状態 染色体不安定性 テロメア FISH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)世界的に見て、特に欧米諸国では食道腺癌は扁平上皮癌よりも多くを占めている。その腺癌の発生母地はバレット食道である。日本では依然扁平上皮癌が大勢を占めるが、バレット食道の原因である逆流性食道炎やバレット食道が増加傾向にあり注目されている。また腺癌はバレット食道において見られる腸上皮化生上皮(腸型上皮)から発生すると考えられており、各国のバレット食道の定義には、しかし、これまで我々は早期のバレット腺癌に隣接する粘膜性状を検討した結果から、組織発生的に、腸型でなく噴門型の上皮から発生するバレット腺癌が存在することを報告してきた。

(2)テロメアは染色体の末端に存在するキャップ構造で、染色体を保護する役割を担っている。テロメアは加齢により短縮するが、テロメアの短縮は、染色体の不安定性を増し、癌化や細胞の機能低下を引き起こす。我々は組織標本上においてテロメアとセントロメアに対する PNA プローブを用いて FISH を行い、その輝度を計測することで、個々の細胞の相対的なテロメア長を計測する方法を開発した。この方法により、既にこの方法により種々の正常組織や前癌状態におけるテロメア長を計測し、その機序について報告してきた。当該組織のテロメア長が短縮していれば染色体が不安定性を増しており、癌になりやすい状態あるいは機能の低下した状態となっていることを知ることができる。

2. 研究の目的

バレット食道はバレット腺癌の背景病変であり、前癌状態と考えられており、既に既存の扁平上皮よりもテロメア長が短縮しているという報告もある。また、以前の研究で噴門型と腸型の上皮では有意なテロメア長の差は見られず、いずれも癌の発生母地になりうるということが推測されている。しかし、バレット食道の発癌率は高くても 1-2% で、低い。そこで、生検の時点でその後癌化する症例を予測できないかと考え、バレット癌が発症する前の生検組織についてテロメア長を計測することを試みた。

3. 研究の方法

日本国内においては、バレット食道が見られても直ちに精検することはなく、何らかの異常を認めた場合にのみ狙撃生検を行うのが慣例である。しかし、欧米においてはバレット食道を認めた症例においては、ランダムに生検を行い、腸上皮化生の有無を指標としてフォローアップなどの治療方針を決定している。そこで、ドイツの共同研究者 Vieth M 教授に依頼してバレット食道からの生検組織を用いて、後に癌の発生した症例と癌が発症せずに経過した症例とを比較することを思いついた。

Vieth M 教授(ドイツバイロイト大学)よりバレット食道より採取された生検組織のパラフィンブロックを貸与してもらい、H&E 標本および Ki-67、粘液について HGM, MAC2 の染色を行うため 2 μ m の切片を予備を含め 3 枚、3 μ m の切片 2 枚を薄切した後返却する。経過後に癌の発症の有無、また採取部位についても盲検とした。FISH 用の切片には TIG-1 (胎児肺由来培養線維芽細胞) 32PDL のセルブロック切片を同時に載せ、同時に FISH を行い、相対的テロメア長の解析を行った。

4. 研究成果

当初 100 例以上の検討を行う予定であったが、生検時に異常のない症例は日本と異なりほとんどフォローされておらず、癌を発症した症例の入手が困難を極め、結果的に合計 5 例のみの検討となった。また 5 年間経過した症例を選択する予定で、実際には発癌がなかった確証の得られた症例も、確認が困難であり、45 例の検討を行うこととなった。結果的に合計 50 例の貸与を受けた。また、以前の研究時よりもドイツにおける倫理審査が厳しくなっており、その審査に時間が掛かったことも研究開始までに時間の掛かった原因となった。

発癌症例は自家蛍光のため 1 例は計測不能で、4 例のみ集計した。発癌の確実になかった症例は 45 例で、実際に計測が可能であった症例は 42 例であった。従って合計 46 例の検討を行った。症例の内訳は表 1 参照。

標本上計測部位は、Ki-67 免疫染色標本で増殖帯を確認し、噴門型上皮では腺窩上皮最深部、(固有腺の直上) 腸型上皮では粘膜最深部ないしは腺窩上皮最深部の腺管で解析を行った(図 1)。FISH 標本上の解析は噴門型腺管および腸型腺管(図 3) 別に集計した。

計測した上皮の相対的テロメア長(Normalized Telomere to Centromere Ratio: NTCR)の分布を箱ひげグラフに表すと図 3 のようになった。癌の発症した群、発症しなかった群に差は見られず、各々で噴門腺上皮と腸型上皮のいずれの群も有意差は認められなかった。

また、以前の研究においてバレット食道上皮の噴門腺上皮と腸型上皮を比較した際に、Long segment Barrett's epithelium (LSBE) と Short segment Barrett's epithelium (SSBE) とで比較すると、SSBE は LSBE よりもテロメア長が短い傾向があり、特に噴門腺上皮は SSBE よりも LSBE で有意に短縮していた(投稿中)。

今回の検討結果を部位別に検討すると(図 4)、以前の研究と同様、LSBE から得られた生検組

織は SSBE から得られた組織よりもテロメア長が短い傾向があったが、全体でも、噴門型、腸型別でも、いずれも有意差は見られなかった。

以上の結果をまとめると、1) 数年以内にがんの発生した症例と発生のなかった症例ではテロメア長に有意差はなかった。2) 以前の研究で検討した癌の背景上皮と今回の癌のない検体ではほぼ同様のテロメア長を呈した。3) 噴門型と腸型では全体でも、部位によってもいずれも有意差はなかった。

以前の研究でがんを有するバレット食道のテロメア長を計測したとき、今回のまだがんを発症していないバレット食道のテロメア長とほぼ同様のテロメア長を示していた(投稿中)。また、さらに以前の研究では扁平上皮よりもテロメアが短縮していた(Shiraishi H, *Scand J Gastroenterol*, 2008)ことから、正常の上皮よりもテロメアが短縮しており、数年以内の発癌とは無関係に、既にテロメアが短縮している可能性が示されたと考えられる。

欧米でランダム生検を行う場合、正確に位置を把握していないので、その患者をフォローアップしていたとしてもがんのできた部位あるいはその付近が生検されているかどうかは確認できないことがリミテーションとして挙げられる。

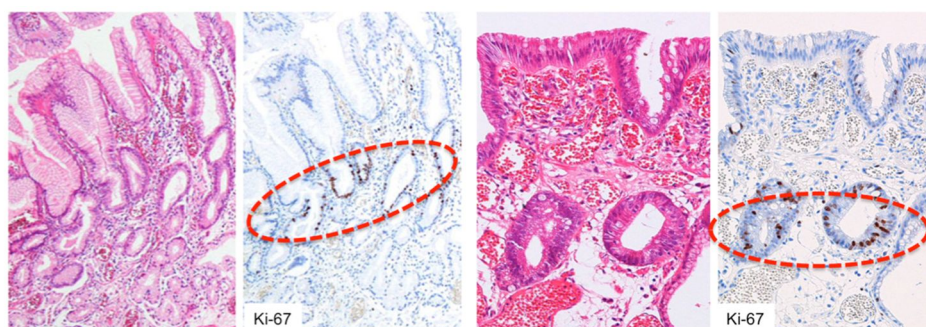
噴門型と腸型上皮は全体で比較しても、部位によって比較しても、いずれも有意差はなく、今回の結果からは噴門型上皮と腸型上皮ではテロメアによる染色体不安定性に差がなく、染色体不安定性による発癌のリスクとしてはいずれも差がないと考えられる。したがって、欧米において腸型上皮を有する症例のみがフォローアップされることは、今回の結果からは意義が薄いと考えられる。

表 1

表1. Biopsy specimens (formalin-fixed paraffin embedded)

Total	46 cases
Cases with cancerization in several years	4 cases
Cases without cancerization	42 cases
Male / Female	26/16 cases
LSBE / SSBE / Uncertain	9/11/25 cases

図 1



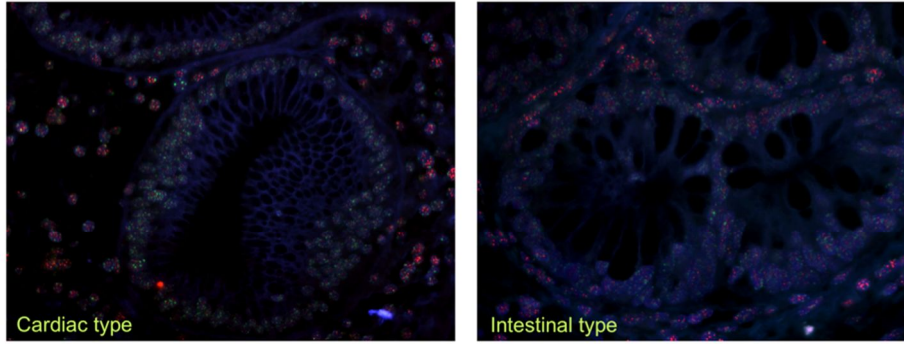
Cardiac (C) type epithelium:
Proliferating area is the bottom of the foveolar epithelium

Intestinal (I) type epithelium:
Proliferating area is the deepest gland of the intestinalized epithelium

6

Ki-67 免疫染色を行うと噴門腺上皮においては腺窩上皮の最深部、腸型上皮においては固有腺が残存している場合はその直上、固有腺が萎縮している場合は上皮の最深部が増殖帯となっている。

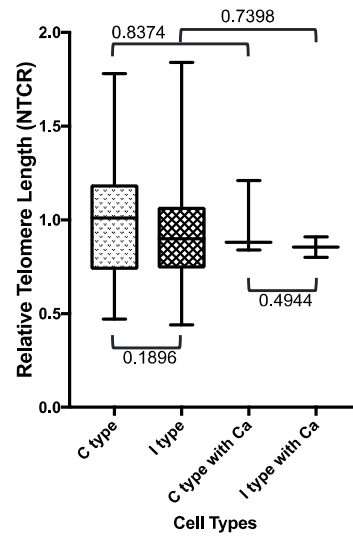
☒ 2



Red signal: telomere, Green signal: centromere, Blue: DNA
 NTCR = telomere/centromere = relative telomere length, analyzed with Tissue Telo ver.3.1

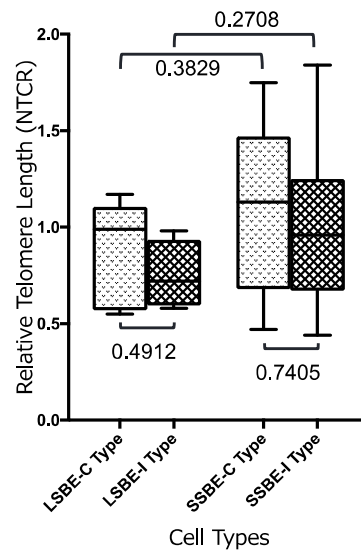
☒ 3

☒ 3 : C-type: Cardiac type, I-type: Intestinal type, Cardiac type with Ca: Cardiac type with carcinoma occurring within 5 years. I type with Ca: Intestinal type with carcinoma occurring with 5 years



☒ 4

☒ 4 : C-type: Cardiac type, I-type: Intestinal type, LSBE: long-segment Barrett's esophagus, SSBE: short-segment Barrett's esophagus. LSBE has the tendency of shorter telomeres than SSBE, but there was no significant difference.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相田順子、田久保海誉、野中敬介、井下尚子、新井富生、石渡俊行
2. 発表標題 前癌病変としてのバレット食道のテロメア長短縮と染色体不安定性について
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相田順子、田久保海誉、石渡俊行、井下尚子、新井富生
2. 発表標題 前癌病変としてのバレット食道のテロメア長短縮と染色体不安定性について
3. 学会等名 第74回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2020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
連携研究者	田久保 海誉 (Takubo Kaiyo) (00154956)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究所 (82674)	