

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17451

研究課題名(和文)食道バレット腺癌の遺伝子的、及び機能的側面から見た病態解析

研究課題名(英文) Pathogenetic analysis of esophageal Barrett's adenocarcinoma from genetic and functional aspects.

研究代表者

沖元 謙一郎 (Okimoto, Kenichiro)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30770739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SSBE群12症例12病変, Long segment BE(LSBE)群12症例12病変, 及び内視鏡治療を行ったEAC群9症例11病変(EMRC3例, ESD8例), 計33症例35病変を対象とした。EACは治療後のFFPE検体からLaser micro dissectionにより癌部のみを切り出した。各検体からDNAを抽出後体細胞変異を同定した。【結論】TP53のputative driverがSSBE2例(16.7%)においても認められた。内視鏡による通常観察で異型を疑わないSSBEも発癌ポテンシャルを有する可能性が示唆され、慎重な経過観察を要する必要があると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記研究内容を論文化しGenetic profiles of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in Japanese patientsとして報告した(Sci Rep. 2021 Sep 3;11(1):17671)

本研究により比較的有病率が低いとされてきた本邦におけるバレット食道腺癌の遺伝学的背景がある程度明らかにされた。欧米と類似したプロファイルを呈する事が分かり、今後さらに増加していく傾向になるかもしれない事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The SSBE group consisted of 12 patients and 12 lesions, the Long segment BE (LSBE) group consisted of 12 patients and 12 lesions, and the EAC group consisted of 9 patients and 11 lesions (3 EMRC and 8 ESD), for a total of 33 patients and 35 lesions treated endoscopically. Only the cancerous area was cut out by dissection. Somatic mutations were identified after DNA extraction from each sample. Conclusion: A putative driver of TP53 was found in two SSBEs (16.7%). It is suggested that SSBEs that are not suspected to be atypical by conventional endoscopic observation may have carcinogenic potential, and require careful follow-up. The results of this study suggest the need for further investigation.

研究分野：消化管ゲノム研究

キーワード：食道バレット腺癌 NGS

1. 研究開始当初の背景

1). 本研究の学術的背景

BE、EAC について

BE は病理学的には下部食道の粘膜が扁平上皮から円柱上皮に変化したものであると定義され、長径が 3cm 未満の Short Segment Barrett's Esophagus (SSBE)と、3cm 以上の Long Segment Barrett's Esophagus (LSBE)に大別される。しかし、BE の内視鏡上の定義は本邦では「食道柵状血管の下端」、欧米では「胃粘膜襞の上縁」と定義が異なるのが現状であり、それぞれの診断基準の妥当性は明らかになっていない。BE を母地として発生する EAC は本邦では比較的稀とされてきたが、近年では増加傾向にあり、LSBE のみならず、SSBE からの発癌も多く報告されている。しかしながら、その遺伝子学的プロファイルの詳細は明らかではない。

BE、EAC と胃逆流、食道粘膜バリア機能について

BE、EAC の発生に胃酸や胆汁酸などの胃逆流が関与している可能性が動物モデルで報告されているが、胃逆流、及び食道粘膜バリア機能が生体内で BE、EAC にもたらす影響に関しては十分に検討されていない。

2) 研究課題の核心をなす学術的問い

本研究では、1) EAC の遺伝子変異の詳細、及び SSBE と LSBE からの発癌でどのような違いがあるのか。2) EAC を有さない BE の遺伝子的変異の詳細。3) 遺伝子変異、胃逆流や粘膜バリア機能の異常が BE、EAC に及ぼす影響の詳細。4) 本邦における内視鏡的診断基準に妥当性はあるかを学術的問いとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は BE、EAC の遺伝子プロファイル、並びに胃逆流、食道粘膜バリア機能の関与を解析することで、EAC の病態を解明する事とした。

3. 研究の方法

1) BE、EAC の遺伝子的解析

対象患者

年齢は 20 歳以上、BE 患者 50 例 (SSBE 患者 40 例、LSBE 患者 10 例)、EAC 患者 50 例 (早期癌 40 例、進行癌 10 例) を目標とする。本研究の趣旨を説明し、書面で同意が得られた症例のみ解析を行う。

使用する試料等の種類

EAC 症例に対して癌部/非癌部(周囲 BE 粘膜)、BE 患者に対して BE 粘膜、全例に末梢静脈血。

EAC 患者は内視鏡的に癌部、周囲 BE 粘膜を採取する。BE 患者は BE 粘膜から組織を採取するが、柵状血管を有する部位、有さない部位から組織を採取する。通常の生検も施行する。末梢血は遠心分離により血漿、白血球に分ける。EAC 症例に対しては切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋組織があるものは癌成分と周囲の BE 粘膜を、micro dissection により切り分けて同定する。

ゲノム DNA の抽出、quality check

各検体より DNA を抽出する。吸光度計により、採取された DNA 量の定量、A260/A280 を確認する。

食道癌パネルによるライブラリ作成

独自に作成した食道癌パネル(全 70 遺伝子座、4410amplicon)を用いて multiplex PCR に
より、標的遺伝子部位を amplicon 別に増幅する。Real time PCR 法により精製したライブラリ
の定量を行う。

次世代シーケンサーの運用

ライブラリを、次世代シーケンサー(Ion PGM™)にて変異を同定する。白血球から得られた
結果は、生殖細胞系列の変異同定のためヒトゲノムの reference である hg19 と、それ以外の
検体から得られた結果に関しては白血球と比較し、体細胞変異を検出する。

EAC、BE 組織検体の免疫組織学的染色

で明らかとなった主要遺伝子の実際の発現の程度、発現の分布様式を生検組織、切除
検体を用いて免疫組織学的染色にて確認する。

2)次世代シーケンサーで得られた結果の in silico analysis

各検体に検出された変異の相互関係の解析

ソフト(Ion reporter™、IGV™)を用いて、検体間の変異の相互関係を解析する。変異の allele
頻度、コピーナンバーを組み合わせることで、driver mutation を同定する。

アミノ酸変異の機能解析

Polyphen™、shift™、OncoKB を運用し、アミノ酸変異の病的意義を解析する。

生殖細胞系列の病的変異解析

白血球から得られた DNA のシーケンシングの結果から生殖細胞系列の病的変異の有無
を確認する。病的変異が同定された場合は変異部位のターゲットシーケンスを行うことで変
異の有無を再確認する。

TCGA との比較

得られた結果を TCGA の EAC の big data と比較する。より症例数の多い国際共同研究に
よるデータベースと比較検討することで、本邦に特徴的な変異を同定する。

4 . 研究成果

2017 年 4 月 ~ 2020 年 4 月までに当院で上部消化管内視鏡を施行し BE と診断された 24 症
例 24 病変[SSBE 群 12 症例 12 病変,Long segment BE(LSBE)群 12 症例 12 病変],及び内
視鏡治療を行った EAC 群 9 症例 11 病変(EMRC3 例,ESD8 例),計 33 症例 35 病変を対象と
した.EAC は治療後の FFPE 検体から Laser micro dissection により癌部のみを切り出した.
各検体から DNA を抽出後,in house で作成した食道癌 panel (69 遺伝子)を用いて次世代シ
ークエンス解析を施行し,体細胞変異を同定した.【結果】患者背景[性別(M:F),年齢(median,
range)]は,SSBE/LSBE/EAC でそれぞれ 7:5/10:2/8:1,62 (52-78)/ 65 (48-80)/ 69 (58-
87)であり,バレット粘膜長(cm)は 1 (1-2)/ 5 (3-17)/ 1.5 (1-4)であった. EAC では TP53 が最
も頻度の高い putative driver であり 8 病変 72.7%で認められた.TP53 の putative driver は
SSBE 群の 2 例[coverage/allele frequency(%)はそれぞれ 234/41.9,147/ 3.4]でも認められ
たが,LSBE では1例も認められなかった.【結論】TP53 の putativedriver が SSBE2 例(16.7%)
においても認められた.内視鏡による通常観察で異型を疑わない SSBE も発癌ポテンシャル
を有する可能性が示唆され,慎重な経過観察を要する必要があると思われた.上記研究内容
を論文化し Genetic profiles of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in
Japanese patients として報告した(Sci Rep. 2021 Sep 3;11(1):17671)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kentaro Ishikawa , Kenichiro Okimoto, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Comprehensive Analysis of Barrett's Esophagus: Focused on Carcinogenic Potential for Barrett's Cancer in Japanese Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-020-06563-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mamoru Tokunaga, Kenichiro Okimoto , et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic profiles of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in Japanese patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific report	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97249-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 徳長鎮, 沖元謙一郎, 加藤直也
2. 発表標題 本邦におけるSSBEの発癌ポテンシャルに対する遺伝学的検討(LSBE, EACとの比較)uate risk factors of carcinogenesis?
3. 学会等名 内視鏡学会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kentaro Ishikawa, Tomoaki Matsumura, Kenichiro Okimoto, Yushi Imai, Tsubasa Oike, Yuya Yokoyama, Naoki Akizue, Yuki Ohta, Takashi Taida, Keiko Saito, Daisuke Maruoka, Tomoo Nakagawa, Makoto Arai, Naoya Kato
2. 発表標題 Does the the western Barrett's esophageal diagnostic definition correctly evaluate risk factors of carcinogenesis?
3. 学会等名 第27回 消化器関連週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentaro Ishikawa, Tomoaki Matsumura, Kenichiro Okimoto et al
2. 発表標題 COMPREHENSIVE ANALYSIS OF PALISADE VESSELS IN BARRETT'S ESOPHAGUS
3. 学会等名 Disestive Disease week 2019 San diego (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳長鎮, 沖元謙一郎, 加藤直也
2. 発表標題 本邦のバレット食道及び食道腺癌における欧米との遺伝学的類似・相違点
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021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