

機関番号 :

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20590405

研究課題名 (和文)

陥凹平坦型大腸癌の前癌病変としての粘液枯渇病巣の形態学的及び分子病理学的研究

研究課題名 (英文)

Morphological and molecular pathological study of mucin-depleted foci as the preneoplastic lesion for depressed flat type on colon carcinogenesis

研究代表者

吉見 直己 (YOSHIMI NAOKI)

琉球大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 30166996

研究成果の概要 (和文) :

平坦陥凹型大腸癌の発生予知を目的に、手術摘出、病理組織学的診断された後の大腸癌症例において肉眼的に正常大腸粘膜と思われる部位を以下のように検討した。検討された 53 症例は平均 63.8 歳(男性 39 例, 女性 14 例), 全例, アルシアンブルー染色によるムチン枯渇巣 (mucin-depleted foci, MDF) とメチレンブルー染色による大腸陰窩変異巢 (aberrant crypt foci, ACF) を同定した。今回, MDF は平坦型 (flat-MDF) と ACF 様の陰窩を呈する隆起型 (protruded-MDF) の二つのカテゴリーを分類し、それぞれの数と出現部位を観察・測定した。結果:既に報告している齧歯動物同様に MDF が存在することは平坦型腫瘍の初期病変の可能性が示された。具体的には ACF の出現は合計 354 個, 頻度 46 症例 (86.8%), flat-MDF は合計 41 個, 頻度 20 症例 (37.7%) 及び protruded-MDF は合計 19 個, 頻度 13 症例 (24.5%) であり, 面積当たりの出現は, ACF は 0.048/平方センチ, flat-MDF が 0.0056/平方センチ, protruded-MDF が 0.0026/平方センチであった。組織学的観察の特徴として, MDF の病変は、齧歯類で見られる高度異型な腺管は乏しいものの、通常左結腸には認めないパネート顆粒を伴っていた。また、腺管周囲にリンパ球浸潤が目立つ傾向があった。protruded-MDF は flat-MDF と同様に異型腺管としては軽度ではあるが、一部異型を伴っていた。以上から, ACF とは別に粘液成分が減少ないし枯渇する腺管からなる前癌病変の存在し、その平坦型に増生することより、癌発生の母集団となる可能性を示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

Mucin-depleted foci (MDF), formed by dysplastic crypts devoid of mucin production, have identified in the colon of carcinogen-treated rodents. MDF are correlated with colon carcinogenesis and seemed to serve as precancerous lesion of flat-depressed colorectal cancer (CRC). We have, therefore, searched for MDF in sporadic CRC patients in larger sample size to reveal the histological characteristics of human MDF. **Methods:** Colonic samples from 53 patients of sporadic CRC were stained with Alcian blue and examined the presence of MDF. In the same samples, we also examined the presence of ACF and noticed that some MDF have ACF-like appearance. We defined these lesions as "protruded MDF" and analyzed histological features of these colonic mucosal lesions (ACF, MDF and protruded MDF). **Results:** We found a total of 354, 41 and 19 colonic mucosal lesions with a mean multiplicity of 44, 38.9 and 66.9 crypts (ACF, MDF and protruded MDF, respectively). The density of MDF like lesions (MDF and protruded MDF) was 0.0082 lesions/cm². ACF from sporadic CRC patients were corresponding to hyperplastic or nondysplastic lesions. On the other hand, MDF and protruded MDF were corresponding to low grade of dysplasia. We also found that Paneth cell metaplasia and infiltration of inflammatory cells were specific feature of MDF like lesions. **Conclusions:** This is the first report that investigating density and histological features of MDF like lesions from sporadic CRC patients in large sample size. MDF and protruded MDF which having both MDF and ACF appearance were suggested to serve as more advanced preneoplastic lesions in human colorectal carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：colon carcinogenesis, preneoplastic lesion, mucin

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は近年益々その罹患率の高まりとともに、死亡率も本邦では増加傾向にあることは周知の事実である。大腸癌は生物学的な悪性度は胃癌と比べると、比較的マイルドのようではあるが、やはり早期癌での発見は、重要な予後因子と考えられる。このため、早期での微小病変を如何に効率的な見つけ出すことが重要な点である。一方、そのヒト大腸発癌過程の変化は古くは Morson ら、それに分子生物学的な変化を加味した Vogelstein らが提唱した adenoma-carcinoma sequence 仮説が最も普及した考え方である。しかるに、ほぼ同時期の 1980 年代には工藤らによる陥凹型早期大腸癌の内視鏡での発見が日本から提唱され、隆起型の腺腫形成を来さず、平坦型ないし微小陥凹型での高度異型腺腫ないし上皮内腺癌類似の病変が認められてきた。一方、動物大腸発癌モデルでは、化学発癌物質の投与により発生する腫瘍には異型腺管が目立ち de novo 発癌説が強く支持されていたが、1987 年 Bird は大腸陰窩変異巣 (aberrant crypt foci; ACF) を化学物質 azoxymethane 投与ラット粘膜を直接メチレンブルー染色した粘膜表面を低倍率で観察する方法により前癌病変を新たに発見して報告した。その後 ACF は多くの論文に採用され、前癌病変として短期発癌実験での代表的なバイオマーカーとして利用されている。この ACF の名称はその後、腫瘍の病理組織診断のバイブルの一つで Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) の最新の第 3 シリーズの 32 巻「Tumors of The Intestines」(2002) の中にヒト大腸の病変の名称として掲載されるに到った。しかしながら、ラットでの ACF はヒト大腸での過形成性ポリープの組織像に類似している。このため、鋸歯状腺腫 (serrated adenoma) の前駆病変とも考えられている。一方、我々はラット大腸化学発癌モ

デルにおける大腸発癌機序の解明を分子病理学的に検討し、新たなラット大腸発癌モデルの前癌性病変 (β -catenin accumulated crypt; BCAC) を見つけ、 β カテニン遺伝子の異常が引き続く Wnt シグナルの活性化にもたらすことで前癌性病変の細胞増殖を来す可能性を示し、ヒト大腸発生の初期遺伝子変異が Apc 遺伝子戸考えられることから、この病変の重要性が示唆された。その後、イタリアのグループがラット実験大腸癌モデルにおける前癌病変として杯細胞が消失する粘液枯渇病巣 (mucin-depleted foci; MDF) を提唱した。我々はこの病変と上記 BCAC が同一であることを見つけ出して来た。しかしながら、ヒト大腸では ACF 病変は大腸ファイバーでの生体染色を利用して、その発生頻度から、前癌病変として予後因子などに利用されているものの、MDF 病変は未だ報告がない。上に示す両病変はラット大腸粘膜で見出し得たものであるが、前者の ACF は病理組織学的な素養がある者であれば、容易に通常の腺腫および癌腫の病変とは異なることを感じざるを得ない。実際、当初報告された 1987 年から数年間はヒトにおける過形成ポリープ病変に類似することから反応性と考えられたが、特に化学予防に関する実験において前癌病変として利用されるようになってから市民権を得られ、ヒト大腸においても利用されるに到った。しかし、上の両者の組織像を比べると後者の核異型はやや弱いものの微小腺腫に類する像と思われ、 β カテニン遺伝子の変異を有することを考慮すれば、MDF は、より前癌病変の可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では動物化学発癌大腸癌モデルで見いだされていた大腸陰窩変異巣 (aberrant crypt foci; ACF) が現在ヒト大腸粘膜前癌病変としても認識されて来たが、同様に動物化

学発癌大腸癌モデルで見いだされてきた β カテニン蓄積巣 (β -catenin accumulation crypt; BCAC) も前癌病変として注目され、ヒトでの大腸腺腫や大腸癌での同蛋白の異常蓄積が見られている。BCAC は新規の前癌病変である粘液枯渇病巣 (mucin-depleted foci; MDF) とよく相関しており、今回、MDF に関するヒト大腸粘膜での存在確認とその組織病理学的特徴と分子病理学的特性解析を目的とする。

3. 研究の方法

① 正常大腸粘膜の準備

- 1) 大腸癌手術後残存・廃棄用の正常部分の大腸を利用するために、残存する腫瘍部から約 5-10cm を離れた正常粘膜と思われる部分のみを利用する。
- 2) 上記大腸癌の全ては分担研究者 (佐村博範) の所属する消化器外科分野から提出されているが、廃棄用臓器等の使用に関しては、学内倫理委員会での許可を既に取得している。

② 組織塊の粘液染色

- 1) 既に当教室で施行している方法で粘液染色特にアルシアンブルー染色にて MDF の実体顕微鏡下で観察計測を行う。
- 2) MDF 観察後、再度水道水で洗浄後、ACF 同定にはメチレンブルー染色を行い、同様に実体顕微鏡下で観察する。
- 3) 上記同定した病変については MDF と ADF の位置の比較のため、デジタルカメラで保存する。その後、粘膜面に対して水平方向および垂直方向に切り出しを行い、パラフィン包埋標本作製する。

③ 病変部の組織診断と免疫組織化学解析

- 1) 上記で作成された組織標本の形態学的特徴を抽出する。
- 2) 粘液性状を組織化学および免疫組織化学法を利用して検索する。

4. 研究成果

① 検討した症例

2006 から 2009 年に琉球大学医学部附属病院で摘出された大腸癌 53 例に関して検討した。平均年齢は 63.8 ± 12.3 (33-88) で、男/女比は 39/14 であった。腫瘍の発生部位別に

は右結腸が 17 例、直腸を含む左結腸が 36 例である。観察面積は平均 139.1 ± 81.7 (42-363) 平方センチを対象とした。

② 結果

- 1) ヒトでの MDF の病変が確かに存在することが観察された。MDF は平坦型 (flat-MDF) と ACF 様の陰窩を呈する隆起型 (protruded-MDF) の二つのカテゴリーを分類できた。後者は齧歯類モデルで報告した ACF と MDF がオーバーラップしているとして報告したものと類似すると思われた。図 1 に ACF との対比と共に、その組織像の代表的なものを提示した。MDF では軽度の杯細胞の減少ないし消失を認め、細胞質に粘液は乏しく、核はやや腫大を伴います。腺管周囲に小円形細胞浸潤が目立つ。I では、一部パネート顆粒を伴っていた。

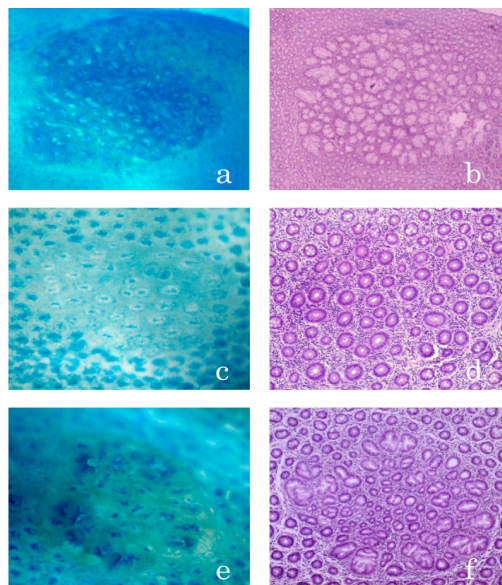


図1. 検討した表層画像と組織像。a, b: ACFのアルシアンブルー染色とその水平断の組織像。c, d: flat-MDF。e, f: Protruded-MDF。MDFでは軽度の杯細胞の減少ないし消失を認め、細胞質に粘液は乏しく、核はやや腫大を伴います。腺管周囲に小円形細胞浸潤が目立つ。

- 2) 表 1 に、それぞれの観察された数と頻度をまとめた。ACF の出現は合計 354 個、頻度 46 症例 (86.8%)、flat-MDF は合計 41 個、頻度 20 症例 (37.7%) 及び protruded-MDF は合計 19 個、頻度 13 症例 (24.5%) であり、面積当たりの出現は、ACF は 0.048/平方センチ、flat-MDF が 0.0056/平方センチ、protruded-MDF が 0.0026/平方センチであった。
- 3) 組織学的観察の特徴として、MDF の病変には、齧歯類で見られる高度異型な腺管

は乏しいものの、上述のように通常小腸粘膜に特有であるパネート顆粒が散見された(MDF の約 40%)。また、腺管周囲にリンパ球浸潤が目立つ傾向があった。protruded-MDF は flat-MDF と同様に異型腺管としては軽度ではあるが、一部異型を伴っていた。

表1. 観察された微小・前癌病変の頻度

	ACF	MDF	protruded MDF
Total number	354	41	19
Number /patient	6.7±6.9	0.8±1.5	0.4±0.9
Crypts /lesion	44.0±55.7	38.9±62.7	66.9±82.6*
Lesion /cm ²	0.048	0.0056	0.0026

*P <0.05 versus ACF or MDF with Mann-Whitney U test

③ 考察

以上から、ACF とは別に粘液成分が減少しないし枯渇する腺管からなる前癌病変(MDF)の存在を担癌患者の正常粘膜様にみられる部位に存在することが示すことができた。研究計画と実施当初、世界ではヒトでのMDFの報告はなかったが、残念ながら、昨年2010年に(本研究は2009年より)、イタリアのグループが家族性大小腺腫症と今回まとめたと同様に自然発生大腸癌周辺粘膜のそれぞれ1例において、ヒトでの存在を報告した。しかし、今回の研究はより多くの患者から得られた世界で初めての報告となる。既に日本癌学会では報告しているが、現在、この結果を投稿中である。

その平坦型増生する粘液枯渇した細胞集塊が、癌発生の母集団となる可能性を示唆された。今後、微小病変における分子病理学的検索とその進展機構の解明が、現在、内視鏡による大腸癌検診の主流になっているにも拘わらず、死亡率の低下に繋がらない事に対する答えがえられることを期待できる。

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 6件)

- ① Chiba I., Yoshimi N. et al. (9, ⑧), Clinical significance of GLUT-1 expression in patients with esophageal cancer treated with concurrent chemoradiotherapy,

Oncology Letter, 査読有, 2: 2011, 21-28.

- ② Naoi K., Yoshimi N. et al. (11, ⑩), Enhancement of tongue carcinogenesis in Hras128 transgenic rats treated with 4-nitroquinoline 1-oxide, Oncology Report, 査読有, 23: 2010, 337-344
- ③ Sunagawa N, Yoshimi N. et al. (8 ⑧), Inhibitory effect of rice bran-derived crude glycosphingolipid on colon preneoplastic biomarker lesions induced by azoxymethane in male F344 rats. Molecular Medicine Reports, 査読有, 2: 2009, 45-49.
- ④ 松崎晶子、河内由布子、新垣淳也、西巻正、吉見直己 Micropapillary carcinoma 成分を伴う早期大腸癌の1例。査読有、診断病理, 26: 2009, 242-244.
- ⑤ Takasuka N, Yoshimi, N et al. (9, ⑦), Tumor promoting ability of diacylglycerol-rich edible oil on mouse two-stage skin carcinogenesis. Cancer Lett, 査読有, 275: 2009, 150-157.
- ⑥ Morita N., Yoshimi N. (8, ⑧), Effects of synthetic and natural *in vivo* inhibitors of β -glucuronidase on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. Mol. Med. Reports, 査読有, 1: 2008, 741-746.

[学会発表] (計 4件)

- ① 崔長旭, Mucin-depleted foci is strongly related to develop the neoplasms in rat colon carcinogenesis by 1,2-dimethylhydrazine, 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月23日, 大阪国際会議場(大阪)
- ② 森岡孝満, Histological examination and distributional analysis of mucin-depleted foci (MDF) in the human colon mucosa, 第68回日本癌学会総会, 2009年10月2日, 横浜国際会議場(横浜)
- ③ 森岡孝満, ラット大腸腫瘍における Notch1 及び Klf4 遺伝子の mRNA 発現に関する検討, 第24回日本発癌研究会, 2009年8月26日, 石川和倉
- ④ 森田早苗, 沖縄市販健康飲料の 4-NQO 誘発ラット舌癌モデルにおける腫瘍抑制効果の検討. 第15回日本がん予防学会, 2008年5月23日, 九州大学医学部百年講堂(福岡)

[図書] (計 1件)

腫瘍 (9-6 腫瘍の疫学、発癌理論とその予防、9-7 腫瘍随伴症候群) NEW エッセンシ

ヤル病理学（第6版）（長村義之他編）、
pp221-237, 医歯薬出版、東京、2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：レーザーマイクロダイセクション用資
料載置板

発明者：森岡孝満・吉見直己

権利者：同上

種類：実願

番号：2008-009009

出願年月日：平成19年12月24日

国内外の別：国内

名称：ナノ粒子の生成・吐出器具およびこれ
を用いるナノ粒子の放出方法

発明者：玉城喜章，岩崎公典，近藤義和，波

平宣敬，吉見直己，富田真理子，屋我実

権利者：同上

種類：特願

番号：2008-226321

出願年月日：平成20年9月3日

国内外の別：国内

○取得状況（計2件）

名称：レーザーマイクロダイセクション用資
料載置板

発明者：森岡孝満・吉見直己

権利者：同上

種類：実用新案

番号：第3148974号

取得年月日：平成21年2月12日登録

国内外の別：国内

名称：医薬およびこれに使用する抽出物

発明者：森直樹・吉見直己

権利者：同上

種類：特許

番号：第4649617号

取得年月日：平成22年12月24日登録

国内外の別：国内

〔その他〕

特記すべき事なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉見 直己 (YOSHIMI NAOKI)

琉球大学 医学研究科・教授

研究者番号：'S%*--*

(2) 研究分担者

森岡 孝満 (MORIOKA TAKAMITSU)

琉球大学 医学研究科・助教

研究者番号：70253961

(H22：連携研究者)

佐村 博範 (S5AIF5'<=FCBCF=)

琉球大学 医学部附属病院・助教

研究者番号：30315478

(H22：連携研究者)