

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590748

研究課題名(和文)

潰瘍性大腸炎合併大腸癌に対する p53 抗体を用いた新しいサーベイランス法の確立

研究課題名(英文) Establishment of cancer surveillance using serum anti-p53 antibody in patients with ulcerative colitis

研究代表者

岩男 泰 (IWAO YASUSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40168547

研究成果の概要(和文): 本研究は、血清抗 p53 抗体に着目し、潰瘍性大腸炎(UC)患者および大腸癌合併 UC 患者の血清抗 p53 抗体を ELISA 法により測定し、種々の臨床的因子との関連性について検討した。コントロールとしての健常人に対して、UC 患者群で血清抗 p53 抗体陽性率が有意に高く、また colitic cancer 群 8 例中 6 例(75.0%)、dysplasia 群 5 例中 2 例(40.0%)が抗 p53 抗体陽性であった。これらの結果より、ELISA 法を用いた血清中抗 p53 抗体の測定は、UC に伴う大腸癌の高危険率群の絞り込みに有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): Here we evaluated clinical usefulness of the measurement of anti-p53 antibodies (Abs) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using sera samples from ulcerative colitis (UC) patients. Serum p53 Ab was positive in 15.0% of UC, while it was positive only in 1.6% of HCs. Eight of 13 (61.5%) UC patients with CRC or dysplasia were positive for serum p53 Abs. This study revealed that p53 Ab developed in the progression of UC-associated CRC but not in all patients with neoplasia, suggesting that it is helpful in salvaging patients who drop from a surveillance program.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化管免疫

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：潰瘍性大腸炎、大腸癌、サーベイランス、ELISA、p53

## 1. 研究開始当初の背景

近年、治療の進歩によって潰瘍性大腸炎の死亡率はゼロに近くなり、重症例でも手術を回避できることが多くなった。一方、図のごとく患者数が着実に増加し続けるのに伴って、長期経過例が急速に増加し、予後を規定するのは大腸癌の合併といっても過言ではなく、早期発見のためのサーベイランスは極めて重要である。進行癌にて発見された場合は非常に予後不良であるが、すべての対象症

例に1年毎のランダム生検を行うサーベイランス内視鏡は、物理的にも対費用効果の面からも実効性は少なく(1例の癌を見つけるのに200万円かかるといわれている)分子生物学的手法を取り入れた効率の良いサーベイランス法の確立が望まれている。

潰瘍性大腸炎に伴う大腸癌、dysplasiaの分子生物学的特徴として、一般の大腸癌と比べ高率にp53遺伝子の変異あるいは同遺伝子の存在する第17番染色体短腕のLOHが報告

されており、免疫組織染色における検討でも癌は高率に p53 蛋白染色陽性で、さらに dysplasia の段階でもこれらの変化が既に高率に認められる。抗 p53 抗体は遺伝子変異を起こした p53 蛋白質の分解遅延による過剰な蓄積に伴い産生される抗体であり、p53 遺伝子変異あるいは発現亢進の間接的な指標として免疫組織染色よりも簡便であり、臨床的意義を持つと考えられる。癌化ステップの早期から p53 遺伝子の異常が関与する潰瘍性大腸炎に伴う大腸癌においては、血清の抗 p53 抗体測定が大腸癌の早期発見につながる可能性が高いと考え、サーベイランス対象症例の絞り込みにこの血清抗 p53 抗体測定を用いることを着想した。

## 2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎の長期経過例に大腸癌が高率に合併し、癌化例の早期発見のためにはサーベイランス内視鏡が必須である。高危険群とされるサーベイランス対象症例数は非常に多く、その絞り込みが可能となるマーカーが切望されている。今回の研究においては、(1) 潰瘍性大腸炎における血清抗 p53 抗体の測定が、大腸癌・dysplasia の発見における感度・特異度を検討する、(2) 血清抗 p53 抗体陽性が、罹患年数・罹患範囲とは独立した大腸癌・dysplasia の危険因子であるかどうかを検討する、(3) 血清抗 p53 抗体陽性という因子によってサーベイランス症例数の絞り込みおよび医療経済的にどの程度有効かを検討する、(4) 癌合併患者と癌非合併患者において p53 の遺伝子変異について解析し、p53 の遺伝子変異と血清抗 p53 抗体の関連性につき検討する、(5) さらに癌合併患者にみられる p53 の遺伝子変異を標的とした抗 p53 抗体検出法を開発する、(6) 遺伝子変異を標的とした抗 p53 抗体検出法と既存の抗 p53 抗体 ELISA 法を組み合わせることにより、より効率的かつ特異度の高い高危険群の絞り込み法を確立する、ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

潰瘍性大腸炎患者の血清およびサンプル文書にて同意を得た潰瘍性大腸炎患者 286 例、陽性コントロールとしての一般大腸癌患者 82 例、健常人 63 例より末梢血を採取した。その際、大腸癌術後の潰瘍性大腸炎患者は除外した。潰瘍性大腸炎の診断は臨床所見、1 年以内の大腸内視鏡もしくは注腸検査、病理検査に基づき、潰瘍性大腸炎診断基準の確診例とし、診断の際、感染性腸炎、放射線性腸炎、虚血性腸炎、クローン病、腸管ペーチェット病を除外した。散発性大腸癌患者は全例進行癌であり手術が施行された。健常人はいずれも癌や潰瘍性大腸炎の既往のないもので便潜血検査や一般血液検査で異常を認め

ないものとした。

潰瘍性大腸炎患者群は採血時のカルテより、喫煙歴、大腸がんの家族歴、罹病期間、罹患範囲、臨床活動度や腸管外合併症の有無、治療内容を評価した。

286 例の潰瘍性大腸炎患者のうち、内視鏡検査による病理学的診断により 8 例の colitic cancer、1 例の high-grade dysplasia(HGD)、4 例の low-grade dysplasia(LGD)が判明した。Colitic cancer 例は手術が施行され、術後の p53 抗体の抗体価を評価した。全ての血液は 1200 g で 10 分間遠心分離を行い血清を採取した。採取されたサンプルは測定時まで -80 に保存した。

ELISA 法による血清中抗 P53 抗体の測定抗 p53 抗体の測定は、ヒト Wild-type p53 組み換え蛋白を固層化した Anti-p53 ELISA kit (DIANOVA 社) を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法)にて測定した。基準範囲は健常人の平均 +2SD 以内として得られた 5.854 U/100  $\mu$ L をカットオフ値とし、本研究においては 5.854 U/100  $\mu$ L より上を陽性とした。

### ・免疫組織化学

内視鏡にて dysplasia や colitic cancer の判明した潰瘍性大腸炎患者は生検組織を使用し、免疫染色による P53 蛋白の異常蓄積を評価した。

## 4. 研究成果

### ・血清抗 p53 抗体陽性率

健常人では 63 例中 1 例(1.6%)のみが血清抗 p53 抗体陽性であった。一般大腸癌では 82 例中 43 例(52.4%)が陽性であった。286 例の潰瘍性大腸炎患者群では 43 例(15.0%)が陽性で、陽性率では健常人に比し有意に高く、dysplasia や colitic cancer 例を除いた評価でも有意に陽性率は高かった。

### ・潰瘍性大腸炎患者群における抗 p53 抗体と臨床病理学的評価

潰瘍性大腸炎患者群において抗 p53 抗体陽性と性や年齢、罹病範囲、臨床活動度との間に相関は認められなかった。しかし、罹病期間 8 年未満の 142 例中 13 例(9.2%)に対し 8 年以上では 144 例中 30 例(20.8%)と有意に高かった。しかし colitic cancer 例を除外した場合有意差は認められなかった。Colitic cancer 群 8 例中 6 例(75.0%)、dysplasia 群 5 例中 2 例(40.0%)が抗 p53 抗体陽性であった。Colitic cancer 群における抗 p53 抗体陽性率はそれ以外の潰瘍性大腸炎患者群の陽性率とくらべて有意に高かった。また抗体価においても同様に有意な上昇を認めた。Colitic cancer 群における抗 p53 抗体陽性率(75.0%)は一般大腸癌の陽性率(52.4%)よりも高かったが、有意差は認めなかった。

・抗 p53 抗体と p53 蛋白発現の免疫組織化学による検討

Colitic cancer 例と dysplasia 例全例の生検組織や手術検体における p53 蛋白の発現を免疫組織染色により評価した。Colitic cancer 例 5 例全例で p53 蛋白の異常発現を認めた。そのうち肝転移を認める進行例を含む 2 例は抗 p53 抗体は陰性であった。

・Colitic cancer 術後の抗 p53 抗体

Colitic cancer 例の術前抗 p53 抗体陽性の 4 例において術後の抗 p53 抗体価を測定した。4 例中 4 例とも術後 4 から 9 ヶ月後には抗体価の低下を認め、うち 2 例においては陰性化を認めた。

今回の研究により、ELISA 法を用いた血清中抗 P53 抗体の測定は、陽性適中率の低さや感度の低さから、内視鏡によるサーベイランスの第一選択にとってかわるものではないが、組織検体を必要とせず多数の検体を簡便に測定でき、潰瘍性大腸炎に伴う大腸癌の高危険率群の絞り込みに有用であるかを評価するに値するものであった。さらに内視鏡によるサーベイランスから脱落したり、拒否された高危険群の患者の拾い上げを促すことによりサーベイランス計画をより有効なものとするに寄与することができるものと考えられた。

#### 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. Kawamata S, Matsuzaki K, Murata M, Seki T, Matsuoka K, Iwao Y, Hibi T, Okazaki K: Oncogenic Smad3 signaling induced by chronic inflammation is an early event in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. Inflamm Bowel Dis 2011; 17 (3): 683-95. 査読有

2. Watanabe T, Ajioka Y, Matsumoto T, Tomotsugu N, Takebayashi T, Inoue E, Iizuka B, Igarashi M, Iwao Y, Ohtsuka K, Kudo SE, Kobayashi K, Sada M, Matsumoto T, Hirata I, Murakami K, Nagahori M, Watanabe K, Hida N, Ueno F, Tanaka S, Watanabe M, Hibi T: Target biopsy or step biopsy? Optimal surveillance for ulcerative colitis: a Japanese nationwide randomized controlled trial. J Gastroenterol 2011; 46 Suppl 1: 11-6. 査読有

3. Kobayashi T, Naganuma M, Okamoto S, Hisamatsu T, Inoue N, Ichikawa H, Takayama T, Saito R, Sujino T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T: Rapid endoscopic improvement is important for 1-year avoidance of colectomy but not for the long-term

prognosis in cyclosporine A treatment for ulcerative colitis. J Gastroenterol 2010; 45 (11): 1129-37. 査読有

4. Naganuma M, Ichikawa H, Inoue N, Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T: Novel endoscopic activity index is useful for choosing treatment in severe active ulcerative colitis patients. J Gastroenterol 2010; 45 (9): 936-43. 査読有

5. Matsumoto T, Iwao Y, Igarashi M, Watanabe K, Otsuka K, Watanabe T, Iizuka B, Hida N, Sada M, Chiba T, Kudo SE, Oshitani N, Nagawa H, Ajioka Y, Hibi T: Endoscopic and chromoendoscopic atlas featuring dysplastic lesions in surveillance colonoscopy for patients with long-standing ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2008; 14 (2): 259-64. 査読有

6. Komiyama T, Yajima T, Kubota R, Iwao Y, Sakuraba A, Funakoshi S, Negishi K, Minami I, Tanaka Y, Mae H, Hibi T: Lower doses of 6-mercaptopurine/azathioprine bring enough clinical efficacy and therapeutic concentration of erythrocyte 6-mercaptopurine metabolite in Japanese IBD patients. J Crohns Colitis 2008; 2 (4): 315-21. 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. 今枝博之、細江直樹、中溝裕雅、別所理恵子、齋藤理子、小池祐司、井上詠、石井良幸、長谷川博俊、岩男泰、緒方晴彦、北川雄光、日比紀文: 大腸腫瘍性病変に対する ESD の工夫。第 79 回日本消化器内視鏡学会総会 2010 年 5 月 15 日 東京

2. 井田陽介、今枝博之、細江直樹、中溝裕雅、別所理恵子、齋藤理子、小池祐司、井上詠、長谷川博俊、岩男泰、緒方晴彦、杉野吉則、北川雄光、日比紀文: 早期大腸癌の内視鏡摘除後における大腸内視鏡サーベイランスの検討 第 27 回日本大腸検査学会総会 2009 年 11 月 28 日 東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩男 泰 (IWAO YASUSHI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：40168547

(2) 研究分担者

日比 紀文 (HIBI TOSHIFUMI)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：50129623

(3) 連携研究者

井上 詠 (INOUE NAGAMU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：00232546