

令和 6 年 4 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07956

研究課題名(和文) バレット食道の発癌リスクの層別化を目指した内視鏡的生検組織の多面的検討

研究課題名(英文) Multifaceted Examination of Endoscopic Biopsy Tissues Aimed at Stratifying the Risk of Barrett's Esophagus-associated Carcinogenesis

研究代表者

徳長 鎮 (Tokunaga, Mamoru)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30866992

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)：併存EACのないBE患者24例、及びEAC患者9例(11病変:EMRC 3病変、ESD 8病変)の計33例を対象とし体細胞変異を同定した。検体毎のPutative driverの数(median, range) SSBE/LSBE/EAC/Surrounding BEでそれぞれ0(0-1)/0(0-1)/1(0-3)/1(0-2)であり、Surrounding BEはEACと差を認めない一方で、BEよりも多くのPutative driverを有していた(それぞれ $p=1.00$, $p<0.01$)。TP53のPutative driverは併存EACのないSSBE 2例(16.7%)でも認められた

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来発癌性の低いと思われてたSSBEにもTP53の変異が認められる事が判明した。内視鏡的にもSSBEのフォローの重要性が確認され、今後、検診の場において重要な要素となると考えられる。また本邦で増加傾向にある食道バレット腺癌は遺伝子背景が欧米の報告と近い事が判明した今後現状よりさらに症例が増えていくのか等、注視されるべき分野である。

研究成果の概要(英文)：We investigated somatic mutations in 24 cases of Barrett's esophagus (BE) without coexisting esophageal adenocarcinoma (EAC) and 9 cases of EAC (11 lesions: 3 lesions treated with endoscopic mucosal resection (EMRC) and 8 lesions treated with endoscopic submucosal dissection (ESD)), totaling 33 cases. The number of putative driver mutations per sample (median, range) was 0 (0-1) for short-segment BE (SSBE), 0 (0-1) for long-segment BE (LSBE), 1 (0-3) for EAC, and 1 (0-2) for surrounding BE. Notably, surrounding BE harbored a higher number of putative driver mutations compared to BE ($p < 0.01$), although no significant difference was observed between surrounding BE and EAC ($p = 1.00$). Putative driver mutations in TP53 were identified in 2 cases of SSBE without coexisting EAC (16.7%).

研究分野：消化器内科

キーワード：食道バレット腺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バレット食道(Barrett's esophagus: 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。食道腺癌(Esophageal adenocarcinoma: EAC)はBEを母地として発生するとされ、近年欧米で急激な増加を示している。本邦においてEACは比較的稀とされてきたが、近年では増加傾向にある。

EACは進行例では予後が悪いとされ、早期診断・治療が非常に重要であるにもかかわらず、平坦病変も多く、しばしば内視鏡診断が困難とされている。また、EACは背景粘膜にしばしば炎症を伴っているため、内視鏡診断のみならず病理診断をもってしても正確な診断が困難である。しかし依然として、EACの母地であるBEのフォローアップにおいては、欧米では定期的な内視鏡検査とSeattle protocolに準じたランダム生検、本邦においては画像強調内視鏡(Image-enhanced endoscopy: IEE)を併用した詳細な内視鏡観察と狙撃生検が一般的である。いずれも医療コスト、患者負担の面において望ましくないため、発癌リスクに応じた適切なフォローアップが求められているものの、どのようなBEが高い発癌ポテンシャルを有するのか、フォローアップ間隔をどうすべきか、などについては未だ明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、どのようなBE症例が高いEAC発癌リスクを有するのか追求する事である。そのために、BEおよびEAC症例に対し詳細な内視鏡観察を行い、生検や内視鏡切除により得られた検体に対して病理診断のみならず遺伝子学的解析を行う。さらには詳細な問診と、食道内圧検査などの機能検査の結果も併せて多面的な検討を行う

3. 研究の方法

・対象患者

年齢は20歳以上、BE患者40例(SSBE20例、LSBE20例)、EAC患者20例(早期癌10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。

・内視鏡の評価および検体採取

内視鏡検査は全て、十分に上部消化管内視鏡検査に習熟した当院医師(内視鏡経験年数>5年)により施行する。各症例において、通常観察および詳細なIEE併用観察を行い評価する。BE症例については、BE粘膜より狙撃生検を行う。EAC症例については、内視鏡上、癌部と考えられる部位(EAC)、近傍の非癌部(BE)と考えられる部位より生検を行う。また、内視鏡治療において切除されたEAC症例については、切除標本も検体として利用する。なお生検部位は、病理標本と照らし合わせし、必ず内視鏡所見と対比出来るようにする。

・臨床情報の収集

対象患者につき、EACの発癌リスクと報告されている因子を参考に、年齢や身長・体重、飲酒・喫煙歴を含む生活歴、内服薬や既往歴、酸逆流症状といった自覚症状の有無、家族歴など、20以上の項目につき詳細に聴取を行う。内視鏡所見については、BE粘膜の長径や、最大長を有する位置(食道の何時方向か)、食道裂孔ヘルニアの有無、逆流性食道炎の有無、萎縮性胃炎などの情報を収集する。さらには、実際の食道機能を評価するために、食道内圧検査やpH検査、アドミタンス検査などの生理機能検査も行う。

・病理学的評価

で得られた検体につき、HE染色を行い、複数の病理医により癌・非癌、腸上皮化生の有無、炎症の程度を評価する。併せてBEやEACと関連が報告されているp53の免疫化学染色(Younes M, et al. 2017 Histopathology)も行い、発現の程度を評価する。

・遺伝子学的解析

使用する試料等の種類

生検検体および内視鏡切除標本と、対象患者の末梢血を試料とする。全症例で病理所見を確認し、癌部と非癌部を確実に区別し、混在する場合にはLaser micro dissection(徳島分子病理研究所に外注)により処理する。末梢血は採取当日に遠心分離により血漿と白血球とに分ける。

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。生検検体および切除検体から得られた結果については、患者自身の白血球を対照とし、体細胞変異を検出する。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と比較する。

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

バレット食道(Barrett's esophagus:BE)と食道腺癌(Esophageal adenocarcinoma:EAC)の内視鏡検体を用いて次世代シーケンスを行い、2017年11月~2020年3月に当院で上部消化管内視鏡検査または治療を受けた、併存EACのないBE患者24例[Short segment BE(SSBE)12例, Long segment BE(LSBE)12例]、及びEAC患者9例(11病変:EMRC3病変, ESD8病変)の計33例を対象としターゲットシーケンスを施行、確認された体細胞変異に対しOncoKBを照会してPutative driver (Likely oncogenicあるいはoncogenic変異)を同定した。検体毎のPutative driverの数(median, range)SSBE/LSBE/EAC/Surrounding BEでそれぞれ0(0-1)/0(0-1)/1(0-3)/1(0-2)であり、Surrounding BEはEACと差を認めない一方で、BEよりも多くのPutative driverを有していた(それぞれ $p=1.00$, $p<0.01$)。EAC患者のSurrounding BE、EACのいずれにおいても、最も頻度の高い変異遺伝子はTP53(ともに66.7%)であった。TP53のPutative driverは併存EACのないSSBE2例(16.7%)でも認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tokunaga M, Okimoto K 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 sci rep	6. 最初と最後の頁 1 11
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0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
研究分担者	松村 倫明 (Matsumura Tomoaki) (00514530)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	沖元 謙一郎 (Okimoto Kenichiro) (30770739)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	

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
---------	---------