

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：90101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20855

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎の発癌サーベイランスを目的とした分子病理学的解析

研究課題名(英文)Molecular analysis for carcinogenesis surveillance in ulcerative colitis

研究代表者

石井 貴大(Ishii, Takahiro)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・がん生物研究部・研究員

研究者番号：50911989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究同意が得られた23例について、外科切除材料及び生検材料を用いて組織学的異型度及びp53免疫染色の評価、大腸発癌に関連する9個のドライバー遺伝子についてターゲットシーケンス解析を行い、10例分について以下の結果を得た(13例は現在、遺伝子解析中)。1)癌症例では、外科切除材料を用いたTP53遺伝子解析がp53免疫染色よりも陽性率が高く、術前生検材料との一致率も高かった。また、遺伝子解析では約37%の症例でTP53以外にKRAS、BRAF、APC、FBXW7の変異を認めた。2)非癌症例では、術前生検材料を用いたp53免疫染色で陽性であるがTP53変異を認めない例があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎(UC)の長期罹患例ではcolitic cancerの発生リスクが高く、その初期発生に関わるp53異常は一般にp53免疫染色を参考に判定されている。本研究により、発癌症例ではターゲットシーケンス解析によるTP53変異の陽性率が高く、内視鏡生検との一致率も高いことがわかった。UC患者の発癌サーベイランスには、より精度の高いTP53変異解析の導入を検討すべきである。今後、生検材料でのデータを前向きに集積することで、早期の診断と治療介入による予後改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study using samples from 23 ulcerative colitis patients to evaluate the presence of abnormal cells and genetic mutations associated with colorectal cancer. We assessed histological atypia through HE staining and p53 immunostaining, and examined 9 driver genes associated with colorectal cancer. Our findings show that TP53 mutation detection using surgical resection material was more accurate than p53 immunostaining in detecting dysplasia and invasive cancer. We also found mutations in other genes such as KRAS, BRAF, APC, and FBXW7, in 37% of our participants. We are continuing to analyze more cases. However, some patients had positive p53 immunostaining in their biopsy specimens despite not having TP53 mutation, suggesting a possible uncertainty in histopathological assessment.

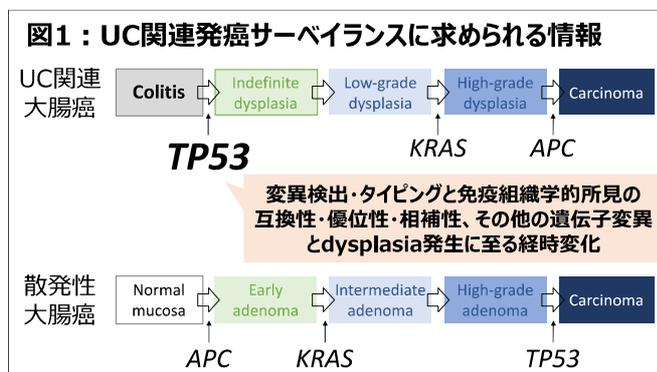
研究分野：がん生物研究

キーワード：TP53 p53 NGS IHC

1. 研究開始当初の背景

UCは大腸粘膜に慢性炎症を起こす疾患であり、長期罹患例では異形成 (dysplasia) が生じ発癌の高危険状態にある。UC関連発癌ではdysplasia-carcinoma sequenceを介し、散発性の大腸癌とは異なる遺伝子異常の蓄積パターンをとる (図1)。

UC関連大腸癌ではTP53変異が発癌の初期よりみられ、colitic cancerサーベイランスのマーカーとして重視される。しかし組織学的異型度やp53タンパク発現との関連や、その判定基準が曖昧である点が課題である。



2. 研究の目的

TP53変異をはじめとする分子情報を内視鏡像及び生検組織の異型度を基本とするUC患者の発癌サーベイランスに結びつけるうえで、以下の3点が明らかにすべきである。

- p53免疫染色像とTP53変異タイプ (ミスセンス、ナンセンス変異) との関連
- 慢性炎症を背景とする再生異型とdysplasiaの客観的判定に重要な分子
- TP53変異を有する異型粘膜がKRASやRNF43など他の遺伝子変異を獲得するまでの時間

これらの疑問に答えるためには、未だ発癌に至らない高危険群、即ち活動性炎症を長期にわたり有するUC患者の経時的な生検材料の徹底した再検証が必要である。また、UC関連発癌を来した例の過去の生検材料の詳細な解析を通じ、最適なサーベイランスに求められる新規情報が得られると期待される。本研究では、UC患者の生検アーカイブを用い、病理組織学的異型度とp53免疫染色結果を再評価し、TP53遺伝子変異の有無やパターンとの関連性を検証する。また、その他の代表的なドライバー変異の有無と組織学的異型度を比較し、生検の客観的な評価についての基準を得る。特に、UC関連大腸癌の発生や高度異型粘膜が確認され外科切除を行った症例を重点的に解析し、過去の生検材料と切除組織の粘膜異型度とドライバー変異解析結果を同様に調べ、将来の内視鏡サーベイランスの見直しの布石とする。

3. 研究の方法

本研究は、UC長期罹患例における再生異型とdysplasiaの鑑別に求められる組織学的異型度、TP53遺伝子異常とp53免疫染色の互換性・優位性・相補性と、変異蓄積パターンの違いに基づいた散発性大腸癌とUC関連大腸癌の違いについて、経時的に採取したUC患者の生検組織及びUC関連大腸癌での外科切除組織 (計50症例程度) を用い、以下の解析を行う。

・**病理解析**: 複数の病理医が組織学的異型度をブラインド評価し、p53免疫染色所見はQuPathソフトウェアを用いて染色パターンと陽性細胞密度を定量評価する。

・**遺伝子解析**: 上記材料のFFPEブロックより未染スライドを作成し、異型度やp53発現の異なる領域よりゲノムDNAを抽出し、5' UTR変異を含むTP53遺伝子の変異情報を解析する。

・TP53以外の大腸癌関連ドライバー変異をカバーするカスタムパネルを用いて変異情報を取得する (表1)。本パネルを用いたプレリミナリーな検討により、変異検出が可能なのは検証されており、既に変異情報を取得している。

上記の方法で研究を進め、以下の目標を達成する。

- 1) TP53変異とp53免疫染色との対比及び組織学的異型度に関する機械学習データを蓄積する。
- 2) UC関連大腸癌の初期発生においてTP53遺伝子異常が生じてから、dysplasiaの形成、浸潤・転移に要する時間を推定する。

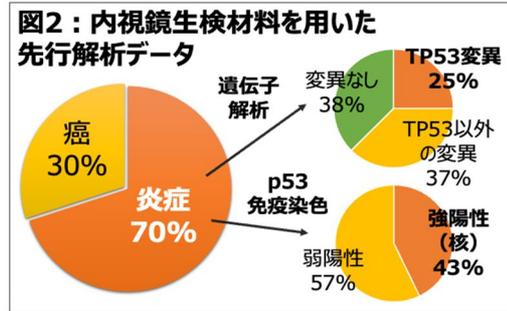
表1：本研究で変異解析に用いるターゲットシーケンスパネルの仕様 (検証済み)

gene list	target
TP53	common exonic mutations +5' UTR
KRAS	major hot spot; codon 12-13, 61, 146
APC	common exonic mutations
SMAD4	common exonic mutations
NRAS	major hot spot; codon 12-13, 61
BRAF	major hot spot; codon 600
PIK3CA	common exonic mutations

3) UC患者に発生した大腸癌において、炎症性発癌及び散発性発癌の特徴を明らかにし、UC患者における発癌パターンに関するデータベースの基盤を構築する。

4. 研究成果

当院で潰瘍性大腸炎（UC）の内視鏡サーベイランスを行っている長期罹患例 850 例の臨床データベースを調査のうえ、大腸癌や dysplasia の疑いにて外科的切除を施行した 30 例をリストアップした。そのうち研究同意が得られた 23 例について、組織学的異型度及び p53 免疫染色の再評価、大腸発癌に関連する 9 個のドライバー遺伝子に関するターゲットシーケンス解析を行い、10 例分について以下の結果を得ている（図 2）（13 例は現在、遺伝子解析中）。



1) 癌症例においては、外科切除材料を用いた遺伝子解析で、約 50%に TP53 ミスセンス変異及びナンセンス変異を認めたと、p53 免疫染色で陽性（強い核局在）と判定されたのは約 25%であった。術前の生検材料における変異解析と外科切除材料の解析結果は全例で一致していたが、p53 免疫染色では一致しない症例も含まれていた。

2) 非癌症例の生検材料を用いた p53 免疫染色で 43%に強陽性（核局在）を認めた。また、遺伝子解析では 25%に TP53 変異を認め、約 37%の症例に TP53 以外の KRAS、BRAF、APC、FBXW7 の変異を認めた。

3) 遺伝子解析によって小さな生検材料においても TP53 遺伝子を検出できており、免疫染色と比較しても遜色のない評価が可能であった。

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 0件）

1. 著者名 Maeda Chiho, Ono Yusuke, Hayashi Akihiro, Takahashi Kenji, Taniue Kenzui, Kakisaka Rika, Mori Miyuki, Ishii Takahiro, Sato Hiroki, Okada Tetsuhiro, Kawabata Hidemasa, Goto Takuma, Tamamura Nobue, Omori Yuko, Takahashi Kuniyuki, Katanuma Akio, Karasaki Hidenori, Liss Andrew Scott, Mizukami Yusuke	4. 巻 25
2. 論文標題 Multiplex Digital PCR Assay to Detect Multiple KRAS and GNAS Mutations Associated with Pancreatic Carcinogenesis from Minimal Specimen Amounts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Molecular Diagnostics	6. 最初と最後の頁 367 ~ 377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmoldx.2023.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	前本 篤男 (Maemoto Atsuo) (40400113)	医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・IBD・免疫研究部・研究所長 (90101)	
研究協力者	小野 裕介 (Ono Yusuke) (40742648)	医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・ゲノム診断研究部・副研究所長 (90101)	

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