

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461031

研究課題名(和文) 生検検体を用いた小腸上皮性腫瘍の網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文) Comprehensive gene analysis of small intestinal cancer tumor

研究代表者

大塚 和朗 (Ohtsuka, Kazuo)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特別診療教授

研究者番号：00338443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年小腸内視鏡技術が大変進歩し、想定されていたよりも多くの疾患が小腸で報告されていることを背景に、小腸腺癌の早期診断例も報告されるようになってきたが、その原因は不明である。本申請研究では、小腸腺癌の自然史を把握し、その初期段階から進行癌に至る発育段階での細胞生物学的特性の全容を幹細胞レベルで明らかにすることを目的とする。

倫理審査委員会の承認を得て、当院のデータベースより過去当院で小腸がん手術をされた患者を同定した。インフォームド・コンセントのもと、手術検体による網羅的遺伝子解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In late years, a small intestinal endoscope technology has been developed, resulting in a lot of diseases being reported in the small intestine than it was assumed. The early checkup example of the small intestine adenocarcinoma came to be reported, but, as for the cause, it is unknown.

In this study, we grasp the natural history of the small intestine adenocarcinoma and am intended that we clarify the whole aspect of the cell biochemical character during carcinogenesis in small intestine at a stem cell level. With the approval of the ethic screening committee, we identified the patient with a small intestine cancer in the database of our hospital. We performed the cause of the informed consent, the exhaustive gene analysis by the resected samples of small intestinal cancer.

研究分野：内視鏡学

キーワード：小腸がん 網羅的遺伝子解析 バルーン内視鏡

1. 研究開始当初の背景

小腸は全消化管の75%を占める。直接的な内視鏡による観察が困難であったため、疾患の種類とその頻度の全体像が長い間不明であった。近年になり、ダブルバルーン内視鏡検査やカプセル内視鏡検査により直接的に小腸内部を観察することが可能となった。この先進的な内視鏡技術は疾患の早期診断を可能とし、経過に不明な点の多い小腸腺癌の自然経過を早期の腺腫から追って把握することが可能となった。腸閉塞に対する外科手術時に診断が確定した症例報告などに基づいた統計からは悪性疾患が少ないことや小腸悪性腫瘍のおよそ半分は上皮由来の腺癌であることが知られている。また家族性腺腫性大腸ポリポージス患者の経過からは小腸腺癌の発生過程は大腸腺癌に類似し腺腫からの発生が中心的機序であると考えられている。病理学的・細胞生物学的に酷似する一方で、発生頻度は大腸癌に比較すると格段に低いという事実は大きな疑問でもある。大腸よりも圧倒的に長く、発症機序が類似しているのであればなおさら、より多くの癌が小腸にできて然るべきであることが推測されるためである。

大腸がんと比較し小腸には腺癌の発症が少ないことに関しては、文献的に小腸には腺腫や早期癌が積極的に排除される機序が存在する可能性や逆に大腸ではこれら早期の病変が進行癌に進展しやすい機構が存在する可能性などが想定されている (Oncology, 1997)。この機序の背景にある細胞生物学的現象を遺伝子レベルで包括的に理解することができれば、小腸腺癌の自然史を把握するのみならず、大腸癌の予防や新規治療の開発にとって有意義であることが予想される。

このような詳細な解析を行うためには基礎研究レベルの進歩が重要である。腺癌や腺腫の発生に関する基礎的知見や、上皮幹細胞を純化し精度の高い解析を行う基礎となる幹細胞培養技術などである。2007年に小腸上皮・大腸上幹細胞がLgr5遺伝子を発現していることが報告 (Nature 2007) され、腺腫やこれに続発する腺癌はこのLgr5+腸管上皮幹細胞に由来することが報告 (Nature 2010) された。もう一つは、マウスおよびヒトの腸管上皮幹細胞を体外で培養する技術が報告された (Nat. Med. 2009, Nature 2009, Cell Stem Cell 2010, Nat. Med. 2011, Gastroenterology 2011)。同時期に我々も独自にマウス大腸上皮細胞を体外で球状嚢状構造 (オルガノイド) として培養するI型コラーゲンをを用いた3次元培養法を確立し、本法においては培養開始1週間のうちにLgr5+上皮幹細胞が旺盛に増殖しオルガノイドを自己組織化し、このオルガノイドの実に40%程度が上皮幹細胞であることを報告した (Nat. Med. 2012)。その後この培養法をヒト大腸上皮にも応用し、病変部・健常部粘膜由来の大腸内視鏡生検検体を培養し腫

瘍ないしは正常上皮幹細胞を体外で培養増幅する基盤技術を確立している。

2. 研究の目的

片方では小腸腺腫・早期小腸癌を診断し病変部から直接に生検検体を採取できるという内視鏡技術を有し、また片方ではこれら病変部に由来する腫瘍幹細胞を純化し高い精度で腫瘍幹細胞の遺伝子レベルでの解析を行う技術を有している背景を踏まえ、疾患部からの生検検体に由来する純化した腫瘍幹細胞を対象としたゲノム・転写レベルで網羅的に遺伝子解析を行い、小腸における腺腫や早期腺癌から進行癌に至る過程の詳細を幹細胞レベルで把握し本疾患に対する有効な診断技術および治療法開発に役立てること、さらにはこれらの解析を大腸腺腫・腺癌でも行い双方の結果を比較することで両者の幹細胞レベルでの相違点を抽出し、大腸癌の予防法・新規治療法の開発にも役立てるために本研究を企画した。本申請研究ではダブルバルーン内視鏡技術によってはじめて入手可能となった小腸腺腫や早期腺癌からの生検検体を用いて、

- (1) これら小腸腺癌病変部位からの生検検体に含まれる腫瘍上皮細胞を培養し、腫瘍幹細胞を純化した上で、網羅的遺伝子解析をゲノム・転写レベルで行い、
- (2) 小腸腺癌の自然経過を腫瘍幹細胞の遺伝子レベルで把握し、本疾患の効果的な診断法・治療法を提唱するとともに、
- (3) 大腸腺癌に関しても同様の解析を行い、
- (4) その相違点、すなわち大腸癌がより高頻度に生じる遺伝的分子メカニズムを明らかにして、大腸癌予防法・治療法に関して新しい提唱を行うことを目的とし、これらの研究を期間3年で遂行する予定である。

小腸内視鏡検査の中でもカプセル内視鏡は低侵襲性・簡便性などから、ダブルバルーン内視鏡検査より広く普及し、当院のみならず当院の関連諸施設においても利用され始めている。このカプセル内視鏡検査を初回スクリーニング検査と位置づけ、腫瘍性疾患疑い症例を当院に集約し、実際に病変部より検体を採取可能なダブルバルーン小腸内視鏡検査により病変部より検体を採取、一部を病理学的に診断し一部からは上皮を単離し腫瘍幹細胞を純化精製したのちに遺伝子学的に詳細な解析を行うというのが研究計画の体網である。

本申請研究では、網羅的遺伝子解析として全ゲノムシーケンズとマイクロアレイ解析を合わせて解析することで、小腸腺癌・大腸腺癌の腫瘍幹細胞における特徴的な遺伝子変異パターンや新規癌遺伝子などを同定することを目的としている。

3. 研究の方法

平成25年度には本研究遂行にあたって重要

となる社会的基盤を整備する。すなわち多くの小腸腺腫・腺癌を効率よく診断するための当院・関連諸施設を含めた社会基盤の整備を行う。またダブルバルーン内視鏡検査時の生検検体からの上皮単離法およびその後の培養を行うために必要な倫理申請を行う。既に社会基盤の整っている大腸腺腫・腺癌に関しては先行して検体採取・細胞培養・網羅的遺伝子解析を開始する。平成 26 年度・27 年度には小腸腺腫・腺癌病変部を対象とした研究を推進する。実際の解析に当たっては腫瘍幹細胞と健常粘膜由来上皮幹細胞とを比較することとし、さらには生検検体の一部は病理学的に診断する予定とする。網羅的遺伝子解析として、培養(腫瘍)幹細胞に由来する DNA を対象とした全シーケンス解析と mRNA を対象としたマイクロアレイ解析を行う予定とする。

4. 研究成果

近年小腸内視鏡技術が大変進歩し、想定されていたよりも多くの疾患が小腸で報告されていることを背景に、小腸腺癌の早期診断例も報告されるようになってきた。基礎研究のレベルでも腸管上皮幹細胞の特異的分子マーカーが同定され、この上皮幹細胞が腺腫・腺癌の発生過程に中心的役割を果たしていることが明らかになり、さらには腸管上皮幹細胞を体外に取り出して培養する技術も開発された。我々の研究室も培養技術開発グループの一つとして先進的な培養技術を確立している。

本申請研究では、内視鏡技術・腸管上皮幹細胞に関する最新の細胞生物学的知見・腸管上皮幹培養技術を融合させ、小腸腺癌の自然史を把握し、その初期段階から進行癌に至る発育段階での細胞生物学的特性の全容を幹細胞レベルで明らかにし、小腸癌に対する有効な診断法・新規治療開発に役立て、さらにはこれらの結果を大腸癌と比較することを通じて、大腸には癌が多く小腸には少ない統計学的事実に対する合理的な結論を得ることを最終目標とし、それを通じて大腸癌の有効な予防法・新規治療法の提唱までを目的としている。

昨年度は倫理審査委員会の承認を得て、当院のデータベースより過去当院で小腸がん手術をされた患者を同定した。インフォームド・コンセントのもと、手術検体による網羅的遺伝子解析に着手している。本年度の成果により、小腸がん患者の手術検体を用いた解析が可能となり、網羅的遺伝子解析による疾患特異的な遺伝子変異を同定する予定としている。またバルーン内視鏡およびカプセル内視鏡を施行する環境を整え、検査施行件数は両者とも飛躍的に増加していることからより早期に小腸がんを発見できる基盤を構築できている。しかしながら、新規患者リクルートが難渋していることから、今後さらなる連携による小腸がん発見に努めていく。

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 12 件)

1: Hayashi R, Tsuchiya K, Fukushima K, Horita N, Hibiya S, Kitagaki K, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Fukuda S, Ohno H, Okamoto R, Nakamura T, Tanaka S, Chayama K, Watanabe M. Reduced Human α -defensin 6 in Noninflamed Jejunal Tissue of Patients with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016

May;22(5):1119-28. doi:10.1097/MIB.0000000000000707. PubMed PMID: 26891258. 査読有

2: Nagaishi T, Watabe T, Jose N, Tokai A, Fujii T, Matsuoka K, Nagahori M, Ohtsuka K, Watanabe M. Epithelial Nuclear Factor- κ B Activation in Inflammatory Bowel Diseases and Colitis-Associated Carcinogenesis. *Digestion*. 2016;93(1):40-6. doi: 10.1159/000441670. Epub 2016 Jan 14. PubMed PMID: 26789263. 査読有

3: Takenaka K, Ohtsuka K, Kitazume Y, Nagahori M, Fujii T, Saito E, Fujioka T, Matsuoka K, Naganuma M, Watanabe M. Correlation of the Endoscopic and Magnetic Resonance Scoring Systems in the Deep Small Intestine in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Aug;21(8):1832-8. doi:10.1097/MIB.0000000000000449. PubMed PMID: 26020602. 査読有

4: Matsuoka K, Saito E, Fujii T, Takenaka K, Kimura M, Nagahori M, Ohtsuka K, Watanabe M. Tacrolimus for the Treatment of Ulcerative Colitis. *Intest Res*. 2015 Jul;13(3):219-26. doi: 10.5217/ir.2015.13.3.219. Epub 2015 Jun 9. Review. PubMed PMID: 26130996; PubMed Central PMCID: PMC4479736. 査読有

5: Maeda Y, Ohtsuka K, Kudo SE, Wakamura K, Mori Y, Ogata N, Wada Y, Misawa M, Yamauchi A, Hayashi S, Kudo T, Hayashi T, Miyachi H, Yamamura F, Ishida F, Inoue H, Hamatani S. Endocytoscopic narrow-band imaging efficiency for evaluation of inflammatory activity in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2015 Feb 21;21(7):2108-15. doi: 10.3748/wjg.v21.i7.2108. PubMed PMID: 25717245; PubMed Central PMCID:

PMC4326147. 査読有

6: Denzer UW, Rösch T, Hoytat B, Abdel-Hamid M, Hebuterne X, Vanbiervliet G, Filippi J, Ogata H, Hosoe N, Ohtsuka K, Ogata N, Ikeda K, Aihara H, Kudo SE, Tajiri H, Treszl A, Wegscheider K, Greff M, Rey JF. Magnetically guided capsule versus conventional gastroscopy for upper abdominal complaints: a prospective blinded study. *J Clin Gastroenterol*. 2015 Feb;49(2):101-7. doi: 10.1097/MCG.000000000000110. PubMed PMID: 24618504. 査読有

7: Li X, Zhao YJ, Dai J, Li XB, Xue HB, Zhang Y, Xiong GS, Ohtsuka K, Gao YJ, Liu Q, Song Y, Fang JY, Ge ZZ. Carbon dioxide insufflation improves the intubation depth and total enteroscopy rate in single-balloon enteroscopy: a randomised, controlled, double-blind trial. *Gut*. 2014 Oct;63(10):1560-5. doi:10.1136/gutjnl-2013-306069. Epub 2014 Mar 13. PubMed PMID: 24626435. 査読有

8: Takenaka K, Ohtsuka K, Kitazume Y, Nagahori M, Fujii T, Saito E, Naganuma M, Araki A, Watanabe M. Comparison of magnetic resonance and balloon enteroscopic examination of the small intestine in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2014 Aug;147(2):334-342. e3. doi: 10.1053/j.gastro.2014.04.008. Epub 2014 Apr 13. PubMed PMID: 24732015. 査読有

9: Saito E, Nagahori M, Fujii T, Ohtsuka K, Watanabe M. Efficacy of salvage therapy and its effect on operative outcomes in patients with ulcerative colitis. *Digestion*. 2014;89(1):55-60. doi: 10.1159/000356221. Epub 2014 Jan 20. PubMed PMID: 24458114. 査読有

10: Fujii T, Naganuma M, Kitazume Y, Saito E, Nagahori M, Ohtsuka K, Watanabe M. Advancing magnetic resonance imaging in Crohn's disease. *Digestion*. 2014;89(1):24-30. doi: 10.1159/000356210. Epub 2014 Jan 20. Review. PubMed PMID: 24458109. 査読有

11: Nagahori M, Fujii T, Saito E, Ohtsuka K, Watanabe M. [Biologics treatment for ulcerative colitis]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*. 2013 Nov;110(11):1909-15. Review. Japanese. PubMed PMID: 24189818. 査読有

12: Ito G, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. Lineage-specific expression of bestrophin-2 and bestrophin-4 in human intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2013 Nov 5;8(11):e79693. doi:10.1371/journal.pone.0079693. eCollection 2013. PubMed PMID: 24223998; PubMed Central PMCID: PMC3818177. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 大塚和朗:小腸内視鏡の適応と手技. 第 12 回日本消化管学会総会. 京王プラザホテル (東京都新宿区). 2016.2.27

2. 竹中健人、大塚和朗、北詰良雄、福田将義、野崎賢吾、渡辺 守、岩本史光、木村麻衣子、藤井俊光、松岡克善、長堀正和:クローン病小腸狭窄に対する MREC 所見と内視鏡下バルーン拡張術の手術回避に対する検討. 第 12 回日本消化管学会総会. 京王プラザホテル (東京都新宿区). 2016.2.26

3. 竹中健人、大塚和朗、北詰良雄、福田将義、野崎賢吾、岩本史光、木村麻衣子、藤井俊光、松岡克善、長堀正和、渡辺 守:クローン病小腸病変に対するバルーン内視鏡および MRI 所見. 第 53 回小腸研究会. アイーナ (岩手県盛岡市). 2015.11.7

4. 大塚和朗、長堀正和、渡辺 守:クローン病治療における生物学的製剤と内視鏡治療・外科手術. JDDW2015. グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区). 2015.10.8

5. 大塚和朗、和田祥城、渡辺 守:潰瘍性大腸炎関連腫瘍の内視鏡診断と治療. 第 89 回日本消化器内視鏡学会総会. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市). 2015.5.30

6. 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守: 当院における生物学的製剤の長期予後とクローン画像評価の重要性. 第 101 回日本消化器病学会総会. 仙台国際センター (宮城県仙台市). 2015.4.23
7. 大塚和朗: クローン病の小腸病変を可視化する. 第 52 回 小腸研究会. 東京ガーデンパレス (東京都文京区). 2014.11.15
8. 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守: クローン病における小腸病変の評価におけるシングルバルーン内視鏡の有効性. 第 52 回 小腸研究会. 東京ガーデンパレス (東京都文京区). 2014.11.15
9. Takenaka K, Otsuka K, Nagahori M, Fujii T, Saito E, Watanabe M: Comparison of Magnetic Resonance and Balloon Enteroscopic Examination of Deep Small Intestine in Patients with Crohn's Disease. 2nd annual meeting of Asian organization for crohn's and colitis. Seoul (Korea) 2014.6.20
10. 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守: クローン病小腸病変の評価における シングルバルーン内視鏡の有効性. 第 100 回日本消化器病学会総会. 東京国際フォーラム (東京都千代田区). 2014.4.23-26.
11. Takenaka K, Otsuka K, Nagahori M, Fujii T, Saito E, Watanabe M: Comparing MR enterocolonography to enteroscopy in Crohn's disease, especially focusing on small intestinal findings. 9th congress of European Crohn's and Colitis Organisation. Copenhagen (Denmark) 2014.2.20
12. 岡田英理子、土屋輝一郎、岩寄美智子、

堀田伸勝、福島啓太、日比谷秀爾、加納嘉人、大塚和朗、荒木昭博、渡辺 守: 全小腸マッピング生検を用いた NSAIDs・抗血小板薬による小腸粘膜障害の病理学的検討. 第 10 回日本消化管学会総会学術集会. コラッセふくしま (福島県福島市). 2014.2.14

13. 竹中健人、大塚和朗、藤井俊光、長堀正和、斉藤詠子、荒木昭博、新田沙由梨、鈴木雅博、渡辺 守: クローン病における小腸病変に対するバルーン内視鏡所見と MR 所見の比較. 第 97 回日本消化器内視鏡学会関東地方会. 海運クラブ (東京都千代田区). 2013.12.15

14. 岡田英理子、土屋輝一郎、岩寄美智子、堀田伸勝、福島啓太、日比谷秀爾、加納嘉人、大塚和朗、荒木昭博、渡辺 守: NSAIDs 服用患者における全長小腸粘膜の病理学的検討. 第 85 回 日本消化器内視鏡学会総会. 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2013.5.10-12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 和朗 (OHTSUKA, Kazuo)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・特別
診療教授
研究者番号：00338443

(2) 研究分担者

土屋 輝一郎 (TSUCHIYA, Kiichiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授
研究者番号：40376786

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：10175127

(3) 連携研究者

()
研究者番号：