

## 学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	盛 一 健太郎
<b>学位論文題目</b>			
Effects of <i>Helicobacter pylori</i> infection on genetic instability, aberrant CpG island methylation status and cellular phenotype in intestinal metaplasia of Barrett's esophagus in Japanese population: a prospective follow-up study after eradication			
(日本人を対象としたバレット食道におけるゲノム不安定性、CpG アイランドのメチル化および細胞形質に対するヘリコバクター・ピロリ菌の影響についての検討：除菌療法施行例を含む前向き研究)			
共著者名			
Jiro Watari, Kiron M. Das, Hiroki Tanabe, Amen H. Zaky, Mikihiro, Fujiya, Toshifumi Ashida, and Yutaka Kohgo			
未公表			
<b>研 究 目 的</b>			
<p>バレット食道は、食道扁平上皮が化生円柱上皮に置換された上皮であり、食道腺癌の発生母地として古くから重要視されてきた。近年、欧米では食道腺癌の著明な増加が報告され、本邦でも大きな関心を集められている。バレット食道は、慢性の胃食道逆流による胃食道逆流症 (GERD) の終末像である。GERD は <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) の感染率の低下や除菌療法の普及によって増加傾向にあるとされ、GERD と強い関連のあるバレット食道の増加が懸念される。しかし、一方で <i>H. pylori</i> 除菌療法が GERD の発症を抑制するとの報告もあり、<i>H. pylori</i> とバレット食道やそれを発生母地とするバレット食道癌との関連については一定の見解が得られていない。</p> <p>バレット食道からの食道腺癌の発癌機構として metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence が考えられている。つまり、バレット食道粘膜における特殊腸上皮化生 (Specialized intestinal metaplasia, SIM) は、分化型胃癌の発生母地とされる胃の腸上皮化生と同様に前癌病変と見なされている。われわれは胃における腸上皮化生と分化型胃癌でのゲノムの不安定性<sup>1)</sup>や <i>H. pylori</i> 除菌による腸上皮化生での様々な遺伝子異常の変化について報告し、ハイリスクの腸上皮化生に発現する分子マーカーも明らかにした<sup>2)</sup>。しかし、バレット食道においては SIM におけるマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability : MSI) などのゲノム不安定性やメチル化異常について、系統的に解析した報告はない。本研究の目的は、バレット食道に発現する種々の genetic および epigenetic な異常を検討し、さらに、それらと <i>H. pylori</i> 感染との関連性についての解析を加えることにより、バレット食道およびバレット食道癌の発生機序とその分子機構にかかわる <i>H. pylori</i> 感染の影響について明らかにすることである。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

通常内視鏡観察でバレット食道とされる食道下端の柵状血管網と扁平円柱上皮の境界部に囲まれた粘膜より生検を行った。早期バレット食道癌症例 (DYS 群、n=8) と特殊腸上皮化生 (SIM) を認めた症例 (BE 群、n=88) を対象とし、SIM を認めないバレット食道 14 例を対照群 (CLE 群) とした。さらに除菌療法が成功後に、2 年までの経過を観察できた症例 9 例も検討した。DNA はホルマリン固定パラフィン切片より Laser capture microdissection system を用いて SIM と癌部から選択的に抽出した。GIN は MSI とヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity : LOH) について、Bethesda 基準に準じた 5 つのマイクロサテライト・マーカーを用いて ABI PRISM 310 Genetic Analyzer と GeneScan によって解析した。また、DNA を CpGenome™ DNA Modification Kit (Chemicon International, Inc., Ca, USA) を用いて二硫化処理後、Methylation specific PCR を行い、*hMLH1*、*E-cadherin*、*p16*、*APC* のプロモーター領域 CpG アイランドにおけるメチル化を評価した。さらに、バレット食道の SIM やバレット食道癌と特異的に反応するモノクローナル抗体 (Das-1 抗体<sup>3)</sup>、腸型形質を認識する) を用いて、各群における反応性についても検討を加えた。また、*H. pylori* 除菌治療によるゲノム不安定性およびメチル化異常の変化を 2 年間前向きに検討した。統計学的解析は、 $\chi^2$  検定および Fisher 検定、Mann-Whitney 検定を用い、p 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

## 成 績

1) ゲノム不安定性は、CLE 群では認めず、BE 群では 53.4% (47/88 例)、DYS 群では 62.5% (5/8 例) に認め、CLE 群との間に有意差を認めた (それぞれ  $p < 0.0001$ 、 $p < 0.005$ )。また、Das-1 抗体陽性率は CLE 群では 7.1% (1/14 例)、BE 群と DYS 群でそれぞれ 73.9% (65/88 例)、100% (8/8 例) で CLE 群との間に有意差を認めた ( $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ )。2) BE 群と DYS 群でのメチル化異常の頻度は、*hMLH1* ではそれぞれ 8.4%、16.7%、*E-cadherin* では 54.7%、25.0%、*p16* では 15.3%、33.3%、*APC* では 71.6%、75.0%であった。一方、CLE 群では *hMLH1*、*E-cadherin*、*p16* のメチル化は認めなかったが、*APC* では 35.7%に認めた。また、MSI に関連するミスマッチ修復遺伝子 *hMLH1* のメチル化の頻度は MSI 陽性例では 14.8%で、MSI 陰性例 (0%) に比べ有意に高かった ( $p < 0.05$ )。3) *H. pylori* 陽性例でのゲノム不安定性の頻度は 65.4%で陰性群の 36.1%と比較して有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また、*hMLH1*、*E-cadherin*、*p16*、*APC* のメチル化異常の頻度は、*H. pylori* 陽性例でそれぞれ 10.6%、68.6%、15.7%、71.2%で、このうち *E-cadherin* のみが *H. pylori* 陰性例に比べて陽性例において有意に高頻度でメチル化をきたしていた ( $p < 0.001$ )。4) *H. pylori* 除菌療法を施行したゲノム不安定性陽性の BE 症例の 5 例中 3 例でゲノム不安定性は安定化し、*E-cadherin* のメチル化陽性例の 7 例中 3 例が、*APC* のメチル化陽性例の 9 例中 5 例が除菌治療後にそれぞれメチル化異常の改善を認めた。

## 考 案

本研究から、SIM を認めないバレット食道 (CLE 群)、SIM を認める BE 群、DYS 群へと食道病変が進展するに従いゲノム不安定性、*E-cadherin*、*p16*、*APC* 遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化異常および Das-1 抗体で認識される腸型細胞形質の頻度が増加することが明らかとなった。さらに、ゲノム不安定性や *E-cadherin*、*p16* のメチル化異常は CLE 群には認めず、BE 群、DYS 群にのみ認めたことから、これらの genetic および epigenetic な異常や腸型形質への変化は、前癌病変とされるバレット食道における SIM およびバレット食道癌の発生に関与していることが示唆された。一方、*APC* 遺伝子のメチル化はすでに CLE 群でも認めており、*APC* 遺伝子のメチル化は食道扁平上皮から円柱上皮へと粘膜変化を来す早期に関与しているものと考えられた。また、*H. pylori* 感染はゲノム不安定性と *E-cadherin* のメチル化異常に関与していることも明らかとなった。興味あることに BE 群を対象とした *H. pylori* 除菌治療では、ゲノム不安定性と *E-cadherin*、*APC* のメチル化異常の頻度が低下していた。この事実から、*H. pylori* 感染はバレット食道の発生に関与する DNA 異常を惹起し、さらにその除菌治療が DNA 異常を低下させることが示唆された。以上の結果から、*H. pylori* 除菌治療が、胃癌の発生を抑制する<sup>4)</sup> のと同様に、バレット食道やバレット食道癌への進展を抑制する可能性があると考えられた。

## 結 論

ゲノム不安定性と *E-cadherin*、*APC* のメチル化は、バレット食道からのバレット食道癌への発癌機構として考えられている metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence において初期に出現する分子異常と考えられる。これらの分子異常は *H. pylori* 感染との関連が示唆され、*H. pylori* 除菌療法は少なくとも一部のバレット食道の癌化へのステップを改善すると考えられた。

## 引 用 文 献

- 1) Tanaka A, Watari J, Tanabe H, Maemoto A, Fujiya M, Ashida T, Das KM, Kohgo Y. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on genetic instabilities in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24 (Supple 4): 194-202.
- 2) Watari J, Tanaka A, Tanabe H, Sato R, Moriichi K, Zaky A, Okamoto K, Maemoto A, Fujiya M, Ashida T, Das KM, Kohgo Y. K-ras mutations and cell kinetics in *Helicobacter pylori* associated gastric intestinal metaplasia: a comparison before and after eradication in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *J Clin Pathol*. 2007;60:921-6.
- 3) Das KM, Prasad I, Garla S, Amenta PS. Detection of a shared colon epithelial epitope on Barrett epithelium by a novel monoclonal antibody. *Ann Intern Med* 1994;120:753-56.
- 4) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi M, Yamakido M, Taniyama K,

Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 2001;345:784-789.

#### 参 考 論 文

- 1) 渡 二郎, 佐藤 龍, 田邊裕貴, 金野陽高, 石川千里, 稲場勇平, Amen H. Zaky, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 前本篤男, 藤谷幹浩, 蘆田知史, 高後 裕, 横田欽一, 斉藤裕輔. Crohn 病の上部消化管病変の臨床と経過-胃・十二指腸病変を中心に. 胃と腸 42;417-428, 2007
- 2) Amen H. Zaky, Watari J, Tanabe H, Sato R, Moriichi K, Tanaka A, Maemoto A, Fujiya M, Ashida T, Kohgo Y. Clinicopathological implications of genetic instability in intestinal type gastric cancer and intestinal metaplasia as a precancerous lesion: Proof of field cancerization in the stomach. American Journal of Clinical Pathology 2007 (inpress)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	盛一 健太郎
<p>審査委員長 若 宮 信 隆 ㊞</p> <p>審査委員 小 川 勝 洋 ㊞</p> <p>審査委員 高 後 裕 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Effects of <i>Helicobacter pylori</i> infection on genetic instability, aberrant CpG island methylation status and cellular phenotype in intestinal metaplasia of Barrett' s esophagus in Japanese population: a prospective follow-up study after eradication</p> <p>(邦題：日本人を対象としたバレット食道におけるゲノム不安定性、CpG アイランドのメチル化および細胞形質に対するヘリコバクター・ピロリ菌の影響についての検討：除菌療法施行例を含む前向き研究)</p> <p>バレット食道は、食道扁平上皮が化生円柱上皮に置換された上皮であり、食道腺がんの発生母地として古くから重要視されてきた。本がんの発がん機構として、metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence が考えられている。バレット食道粘膜における特殊腸上皮化生 (Specialized intestinal metaplasia: SIM) が、分化型胃がんにおける胃の腸上皮化生と同様に、前がん病変とみなされている。渡らは、胃における腸上皮化生と分化型胃がんでのゲノムの不安定性や <i>H. pylori</i> 除菌による腸上皮化生での遺伝子異常について明らかにしてきた。</p> <p>論文提出者は、バレット食道に発現する種々の遺伝子の変化を検討し、さらに、<i>H. pylori</i> 感染における除菌効果を解析することによって、バレット食道やバレット食道がんの発生機序とその分子機構を明らかにするために、以下の検討を行った。</p> <p>方法としては、内視鏡観察下において、バレット食道とされる食道下部の柵状血管網と扁平円柱上皮の境界部における粘膜生検を行い、遺伝子解析や免疫染色を行</p>			

い、患者の組織像や臨床状態との比較により、それらの相関性について検討を行った。また、*H. pylori* 除菌治療例においては、治療前後の遺伝子変化を2年間の前向き検討での解析を行った。

その結果として、バレット食道から徐々に食道病変が進展するにしたいが、ゲノム不安定性、*E-cadherin*・*p16*・*APC*遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化異常および Das 抗体で認識される腸型細胞形質の頻度が増加することが明らかとなった。さらに、腸上皮化生のない、バレット食道群には、ゲノム不安定性や *E-cadherin*, *p16* のメチル化異常は認めず、腸上皮化生群と早期バレット食道がん例にのみにこの異常が認められた。一方、*APC* 遺伝子のメチル化は、腸上皮化生のないバレット食道ですでに存在していた。つぎに、*H. pylori* 感染においては、感染陰性例に対して、ゲノム不安定性と *E-cadherin* のメチル化異常の頻度が高かった。*H. pylori* 除菌治療後においては、ゲノム不安定性と *E-cadherin*, *APC* 遺伝子メチル化異常の頻度が低下することを明らかにした。

これらの結果は、前がん病変とされるバレット食道において、genetic 及び epigenetic な異常や腸型形質への変化が、特殊腸上皮化生やバレット食道がんの発生に関与していること、また、*H. pylori* 感染は、バレット食道発生に関する DNA 異常を惹起し、さらにその除菌治療が DNA 異常の頻度を低下させていることを示している。

本研究によって、胃がんと同様に、ゲノム不安定性と *E-cadherin*, *APC* のメチル化が、バレット食道からバレット食道がんへの発がん機構において働いている可能性を明らかになり、*H. pylori* 除菌治療の有用性が、食道がんにおいても当てはまることが初めて明らかになった。

これらの結果は、臨床的にも非常に意義深いと考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。