

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	田 中 淳 美
学 位 論 文 題 目			
<i>Helicobacter pylori</i> 除菌治療の胃腸上皮化生におけるマイクロサテライト不安定性 および K-ras codon 12 遺伝子点突然変異に対する効果			
北海道医学雑誌 第 8 1 卷 第 3 号 平成 1 8 年 5 月 掲 載 予 定			
研 究 目 的			
<p><i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) 持続感染に関連して発生する胃粘膜萎縮・腸上皮化生は、分化型胃癌の発生母地とされ、また腸上皮化生は前癌病変とされている。最近の前向き研究から <i>H. pylori</i> 除菌により胃発癌が抑制されることが報告されたが、その発癌抑制のメカニズムは明らかではなかった。マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability: MSI) は、ミスマッチ修復系システムの異常に伴う DNA 変異で、胃癌や腸上皮化生においても報告されている。また、K-ras codon 12 点突然変異は、多くのヒト悪性腫瘍で認められる。そこで、本研究では、<i>H. pylori</i> 除菌治療の胃癌発生抑制のメカニズムを明らかにするために、<i>H. pylori</i> 感染胃粘膜の腸上皮化生における MSI と K-ras codon 12 点突然変異、および細胞動態について検討し、<i>H. pylori</i> 除菌治療に伴うこれらの変化を解析した。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p><i>H. pylori</i> 陽性で腸上皮化生を認めた、慢性胃炎症例 39 例 (慢性胃炎群)、分化型早期胃癌症例 53 例 (早期胃癌群) を対象とした。うち慢性胃炎 39 例全例と胃癌のうち内視鏡的粘膜切除 (EMR) を行った 25 例 (早期胃癌 EMR 群) は除菌後 1 年間観察し、除菌前後の生検材料における腸上皮化生を比較した。ホルマリン固定パラフィン切片より Laser capture microdissection system を用いて腸上皮化生から選択的に DNA を抽出した。MSI は ABI PRISM310 Genetic Analyzer と GeneScan, K-ras codon12 点突然変異は semi-nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法と direct sequencing にて解析した。腸上皮化生の組織学的評価は、updated Sydney System に準じてスコア化した。腸上皮化生の細胞動態の検討として、増殖能とアポトーシスの検出をそれぞれ Ki-67 染色, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling (TUNEL) 法により行った。統計学的解析は、<math>\chi^2</math> 検定および Mann-Whitney 検定を用い、p 値が 0.05 未満を有意とした。</p>			

## 成 績

MSIは慢性胃炎群と早期胃癌群の腸上皮化生において、それぞれ10.3% (4/39)と28.3% (15/53)に認め、早期胃癌群の腸上皮化生における頻度が有意に高かった ( $p<0.05$ )。また、早期胃癌群の癌組織部では37.7% (20/53)にMSIを認め、腸上皮化生でMSIを認めた15例中11例が癌部でも同様にMSIを認めた。*H. pylori*除菌前後の腸上皮化生におけるMSIの頻度は、慢性胃炎群では10.3%から2.6%へ、早期胃癌EMR群では24%から4%へと有意に低下した ( $p<0.05$ )。

*K-ras* codon12点突然変異は、慢性胃炎群の腸上皮化生では47.4% (18/38)、早期胃癌群の腸上皮化生では1.9% (1/53)に認め、慢性胃炎群の腸上皮化生で有意に変異率が高かった ( $p<0.0001$ )。また、癌部での*K-ras*遺伝子変異はわずか3.8% (2/53)であった。除菌治療前後の腸上皮化生における*K-ras*遺伝子変異は、慢性胃炎群では除菌治療により47.4%から13.2%へと有意に低下した ( $p<0.0005$ )が、早期胃癌EMR群では除菌による変化を認めなかった。*K-ras* codon12変異パターンは、除菌治療後GAT (Asp), TGT (Cys)は消失し、AGT (Ser)が残存する傾向を認めた。また、早期胃癌群の腸上皮化生の変異パターンは癌部の変異パターンと異なっていた。

腸上皮化生の組織学的スコアは、除菌治療後1年間の経過観察では改善を認めず、細胞動態に関しては、アポトーシス分画/増殖分画比が早期胃癌EMR群において除菌後やや増加する傾向にあった。

## 考 案

早期胃癌群の腸上皮化生におけるMSIは、慢性胃炎群の腸上皮化生より高頻度に認められた。さらに、早期胃癌群の腸上皮化生にMSIを認めた症例の多くが癌組織においても同様にMSIがみられたことから、腸上皮化生に発現するMSIは胃発癌に関わる早期のマーカーとなり得る可能性が示唆された。さらに、*H. pylori*除菌治療により腸上皮化生でのMSIの頻度は低下した。

MSIや*K-ras*遺伝子変異といったDNA変異が腸上皮化生に生じる原因として、*H. pylori*感染に起因する胃固有粘膜の慢性炎症が、胃粘膜上皮の増殖・分化の異常、さらに腸上皮化生におけるDNA異常を引き起こしている可能性が考えられる。さらに、除菌治療による炎症の著明な改善が胃固有粘膜の状態を安定化させ、腸上皮化生のDNA変異を減少させたと予想された。*K-ras* codon12点突然変異の頻度が慢性胃炎の腸上皮化生で高かったことに関しては、慢性胃炎群の方が早期胃癌群と比して炎症の程度が強かったことが関連するものと考えられる。一方、早期胃癌群の腸上皮化生部と同様癌部の両者において*K-ras*遺伝子変異の頻度は低く、また癌部と腸上皮化生部での変異パターンが異なっていたことが特徴であった。この事実から、大腸癌の発癌機序とは異なり、胃における*K-ras*遺伝子変異は、分化型胃癌発生の主要な経路に関わる役割は低いものと思われた。

今回の腸上皮化生スコア・細胞動態の検討から、除菌治療は、腸上皮化生のアポトーシスを増加させて細胞動態の不均衡を改善させるが、組織学的な腸上皮化生自体を消失させるまでには至らないことが明らかとなり、除菌治療の胃癌発症抑制効果として、腸上皮化生におけるDNA変異

の減少が最も重要であると考えられた。

## 結 論

腸上皮化生における MSI は、胃発癌の早期マーカーになり得る可能性が示唆され、発癌のハイリスク群の抽出に有用と考えられた。一方、*K-ras* 遺伝子変異は胃癌発生との関わりは低いと考えられた。*H. pylori* 除菌治療により腸上皮化生の組織学的改善や細胞動態に変化は見られないものの、腸上皮化生における MSI の低下や *K-ras* 遺伝子変異の減少を認めたことは、*H. pylori* 除菌治療による胃癌発症抑制効果のひとつとして、腸上皮化生における DNA 変異の減少が関与していることが示唆された。

### 引 用 文 献

- 1) Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multifactorial process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740.
- 2) Leung WK, Kim JJ, Kim Jg, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 537-543.
- 3) Gong C, Mera R, Bravo JC, Ruiz B, Escamilla RD, Fontham ETH, Correa P, Hunt JD. *KRAS* mutations predict progression of preneoplastic gastric lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:167-171.

### 参 考 论 文

- 1) Watari J, Saitoh Y, Fujiya M, Shibata N, Tanabe H, Inaba Y, Okamoto K, Maemoto A, Ohta T, Yasuda A, Ayabe T, Ashida T, Yokota K, Obara T, Kohgo Y. Reduction of syndecan-1 expression in indifferently differentiated type early gastric cancer and background mucosa with gastric cellular phenotype. *J Gastroenterol* 2004; 39: 104-112.
- 2) Watari J, Saitoh Y, Fujiya M, Nakamura K, Inaba Y, Okamoto K, Tanabe H, Yasuda A, Miyokawa N, and Kohgo Y. Spontaneous remission of primary diffuse large B-cell gastric lymphoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 414-420.

## 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	田中 淳美
審査委員長 谷口隆信 ㊞  審査委員 高後裕 ㊞  審査委員 若宮伸隆 ㊞			
学 位 論 文 題 目  <b><i>Helicobacter pylori</i> 除菌治療の胃腸上皮化生におけるマイクロサテライト不安定性および K-ras codon 12 遺伝子点突然変異に対する効果</b>			
<p><i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) 感染は胃における第 1 群発癌因子と規定され、その胃粘膜への持続感染によって生じた炎症性変化を発生母地として発癌に至ると考えられている。一方、癌及びその前段階において様々な遺伝子異常が関与していることも広く知られている。著者はゲノム内に存在する単純な繰り返し配列であるマイクロサテライトの instability と癌遺伝子として知られる K-ras の点突然変異という 2 つの癌関連遺伝子異常に着目し、<i>H. pylori</i> 感染患者の除菌治療前後において検討した結果を報告している。</p> <p>症例は <i>H. pylori</i> 感染が確認された慢性胃炎 39 例と分化型早期胃癌 53 例の計 92 例であり、これらについては生検組織並びに摘出標本からホルマリン固定切片を作製した後、胃粘膜正常部位、腸上皮化生部位、腫瘍部位をそれぞれ顕微鏡下レーザー補足法にて細胞塊として摘出し DNA を抽出した。慢性胃炎 39 例と内視鏡手術によって胃が温存できた胃癌症例 25 例については、除菌をおこなって経過観察し 1 年後の内視鏡下生検組織からも同様に DNA を抽出して除菌前後での比較を行った。抽出した DNA から PCR にてゲノムの対象部位を増幅し解析をおこなっている。</p>			

マイクロサテライト instability の解析においては、慢性胃炎腸上皮化生部において39例中4例に異常が認められ、除菌後には39例中1例に頻度が低下した。胃癌症例の腸上皮化生部においては53例中15例に異常が認められ、胃が温存できた25例での検討では6例の異常であったものが除菌後には1例にまで減少した。胃癌症例腫瘍部においては53例中20例に異常が認められ、腫瘍部位、癌症例化生部位、胃炎症例化生部位の順で頻度が高く、除菌に伴ってマイクロサテライト instability 異常は消失することが明らかとなった。

K-ras 点突然変異については、慢性胃炎腸上皮化生部において39例中18例に異常が認められ、除菌後には39例中5例に頻度が低下した。胃癌症例の腸上皮化生部においては53例中1例に異常が認められ、胃が温存できた25例での検討では除菌前後でいずれも1例と変化を認めなかった。胃癌症例腫瘍部においては53例中2例に異常が認められ、頻度は胃炎症例化生部位、腫瘍部位、癌症例化生部位、の順で癌症例で低いというやや意外な結果であった。正常粘膜部位においては K-ras 変異は認められず除菌によって消失することから、炎症によって生じた変異を持つ細胞が消炎と共に死滅していると考えられるが、詳細については更なる検討が必要と考えられる。

本研究は顕微鏡下レーザー補足法を用いて対象となる組織のみを厳密に区別して取り出し DNA の解析をおこなったもので、改めて *H. pylori* 感染から慢性炎症、発癌へと連なる道筋を遺伝子異常の観点から確認し、今後の解析の方向性を示したものと見える。40歳以上の日本人の約70%が *H. pylori* 抗体価が陽性であり、今後の研究の発展を期待したい。

申請者に対して査問を行い、当該分野に関する申請者の知識／経験／見識は課程博士に相応しいものであると判断した。以上、本論文が博士の学位に値すると判定したことを報告致します。