

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

胃癌分離腺管および周囲粘膜における 分離腸上皮化生腺管, 分離非腸上皮化生腺管の 分子病理学的解析

杉本 亮¹⁾, 織笠俊輔²⁾, 松井雄介³⁾,
肥田圭介³⁾, 若林 剛³⁾, 菅井 有¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 病理学講座: 分子診断病理学分野

²⁾ 岩手医科大学医学部, 内科学講座: 消化器肝臓内科分野

³⁾ 岩手医科大学医学部, 外科学講座

(Received on February 18, 2013 & Accepted on February 28, 2013)

要旨

胃癌及び周囲粘膜における腸上皮化生腺管及び非腸上皮化生腺管の DNA メチル化レベル, loss of heterozygosity (LOH) について検討した. 切除された胃癌 43 例を対象とし, 腺管分離法により得られた胃癌腺管, 腸上皮化生腺管, 前庭部非腸上皮化生腺管, 胃体部非腸上皮化生腺管の DNA メチル化レベル, LOH 状態を解析した. 癌腺管, 腸上皮化生腺管, 前庭部非腸上皮化生腺管, 胃体部非腸上皮化生腺管の順に DNA メチル化レベルの亢進がみられた. LOH 解析においては, 胃癌においては高

頻度にみられた一方, 腸上皮化生腺管においても個々の染色体アレルにおいては一定の頻度で LOH がみられた. しかし, LOH の蓄積は腸上皮化生腺管では低レベルであった. 前庭部非腸上皮化生腺管の LOH はほとんど認めなかった. 上記の結果から腸上皮化生腺管がメチル化レベルの上昇や染色体アレルの欠損はみられるが, ゲノムレベルの異常の蓄積はみられないことが示唆された. 腸上皮化生は単なる化生現象ではなく, DNA メチル化レベルの亢進した病変としての意義を有するものと思われた.

Key words : gastric cancer, intestinal metaplasia, DNA methylation, LOH

I. 緒 言

胃癌は近年減少傾向にあるものの, 現在でも男女とも本邦の死因のトップクラスを占める代表的な悪性疾患である¹⁾. 胃癌研究は, 世界的にも多くの報告がなされているが, 本邦の研究者からの先駆的な研究も多い²⁻⁵⁾. それにも関わらず, 胃癌の分子レベルの腫瘍発生は, いくつかの仮説の提案があるものの⁶⁾, 大腸の腫瘍発生仮説のような世界的にも受け入れられた仮説は存在しないのが現状である.

近年, 癌の分子腫瘍発生理論は, LOH (loss of heterozygosity), 遺伝子変異, 遺伝子増幅といったゲノムレベルの異常と DNA メチ

ル化などのエピゲノムの異常を基礎に解明されてきている^{7, 8)}. 胃癌においても同様にゲノムレベルの異常とエピゲノムのレベルの異常を基礎に腫瘍が発生することが明らかになってきている⁹⁾. 胃癌の原因とされる特定の遺伝子変異はこれまで報告されていないが, 胃癌には多くの LOH の蓄積がみられることが知られている^{9, 10)}. LOH は胃癌の主要な分子異常の 1 つであり, 胃癌の分子異常を特徴づける重要な分子異常である⁹⁻¹¹⁾. 一方 DNA メチル化異常についても胃癌において多くの報告がなされており, DNA メチル化が胃癌発生に重要な役割を担っていることが明らかになっている^{12, 13)}. 大腸腫瘍にお

いてゲノムワイドのエピゲノム異常 (DNA メチル化) の程度を分類する検討が行われているが, この報告によるとメチル化による腫瘍のタイプ化は腫瘍細胞の特性を知る上で有用とされている¹⁴⁾. しかしながら胃癌におけるゲノムワイドの DNA メチル化レベルの検討は十分に行われておらず, 今後の検討が期待されているところである.

胃癌の原因は *Helicobacter pylori* 感染による萎縮性胃炎のプロセスが重要であるが, このことは胃癌の発生において胃粘膜の炎症が重要な役割を担っていることを示している^{15, 16)}. 胃炎粘膜は最終的に萎縮し, 腸上皮化生を伴うことが知られており, 胃炎における最終的な意義は腸上皮化生の病態に帰結されると思われる^{15, 16)}. 腸上皮化生は従来完全型腸上皮化生と不完全型腸上皮化生に分類することが行われているが, 胃癌との関連性が指摘されているのは不完全型腸上皮化生である^{17, 18)}. しかしながら両者の分子レベルの異常については十分な検討はなされていない. 胃癌と腸上皮化生との関係についても前癌病変仮説と傍癌病変仮説とが対立しており, 欧米では前者を主張する研究者が多く, 本邦では後者を主張する研究者が多い^{15, 17, 18)}. いずれの説によるにしても, 腸上皮化生は胃癌の発生と密接に関連しており, 腸上皮化生の分子レベルの異常を解明することは, 胃癌発生を理解する上で重要な知見を提供するものと思われる.

本研究では胃癌, 周囲粘膜における完全型腸上皮化生, 不完全型腸上皮化生, 非腸上皮化生の分離腺管を作製し, 上記の各分離腺管間の分子異常を解析することを目的とした.

II. 材料および方法

1. 研究材料

2006年4月から2013年4月まで岩手医科大学外科にて切除された胃癌43例を対象とした. 既往に化学療法がある症例は対象から

表1. 解析症例の臨床病理学的事項

		症例数 (%)
総数		43
性別 (男/女)		29/14
年齢 (平均)		41 ~ 87 (71.9)
癌組織型 (n=24)	Tub1	11 (45.8)
	Tub2	8 (33.3)
	Pap	5 (20.8)
進行度分類 (n=24)	I	8 (33.3)
	II	4 (16.7)
	III	4 (16.7)
	IV	8 (33.3)

表2. 腺管分離により回収されたサンプルの内訳

	サンプル数	43
胃癌腺管	24	
完全型腸上皮化生腺管	33	
不完全型腸上皮化生腺管	43	
前庭部非腸上皮化生腺管	32	
胃体部非腸上皮化生腺管	43	

除外した. 本検討に用いた43例の臨床病理学的事項を表1に示す. 用いた症例の平均年齢は71.9歳 (87 ~ 41歳)であった. 胃癌の組織分類及び進行度分類は本邦の胃癌取り扱い規約第14版に従って分類した¹⁹⁾. 43症例の胃癌組織及び周囲粘膜 (前庭部もしくは胃体部) から得られた分離腺管分離の内訳を表2に示す.

また, 本研究に関わった被験者には十分な説明を行い, 書類にて同意書を得た. 本研究は, 岩手医科大学医学部倫理委員の承認のもと行われた (承認番号 H24-211) .

2. 腺管分離法

組織片の採取は癌部分と周囲の前庭部粘膜及び癌から最も離れた胃体部粘膜の計3カ所から行った.

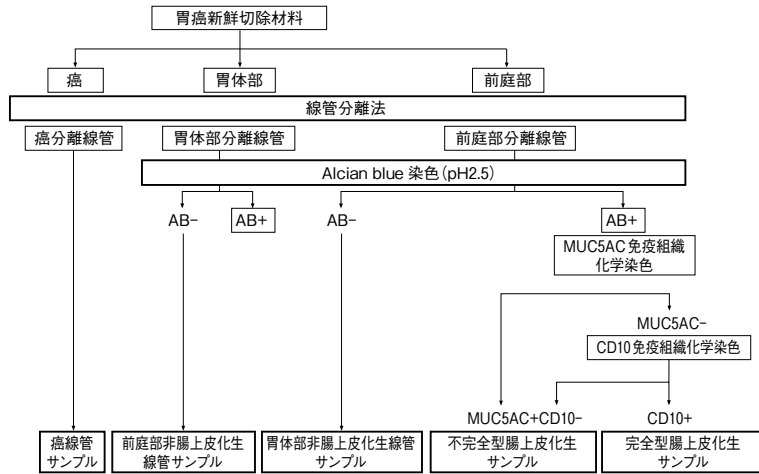


図1. 腺管分離法による解析サンプル調整の工程

採取された新鮮組織片を用いて腺管分離法を行った。腺管分離法は Arai ら²⁰⁾の方法を変更して行った。

癌部分および前庭部大彎，胃体部大彎の非癌粘膜組織片を各々剃刀で5mm程度に細切りにして，それらを30mmol/Lの ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む CMF Hanks 溶液 (calcium and magnesium-free Hank's balanced salt solution) 20ml に入れ，37℃で60分間加熱振盪した。1600回転で5分間遠心分離し上清を捨てた後，CMF 液を加えて，攪拌子を用いて400rpmで3分間攪拌した。その後，再び遠心分離を行い，上清を捨てた後70%エタノールで固定した。分離された各腺管を実体顕微鏡 (SZX16, Olympus, Tokyo) 下にて，癌および前庭部大彎，胃体部大彎粘膜の分離腺管を回収した。

本検討の腺管分離の工程を図1に示した。

3. 癌組織における癌腺管の分離

癌腺管の分離は実体顕微鏡下で行った (図2-a)。分離癌腺管は，1) パラフィン包埋用の分離癌腺管サンプルと，2) 分子解析用サンプルに2つに分けて回収した。回収された癌腺管の HE 分離腺管像を図2-bに示す。

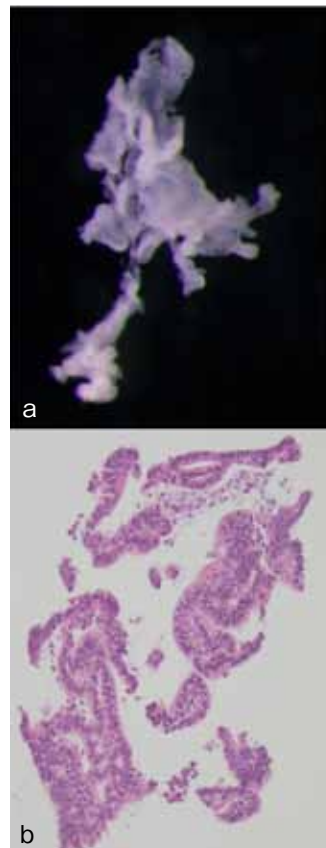


図2-a. 癌分離腺管の実体顕微鏡像
b. 癌分離腺管の HE 染色像

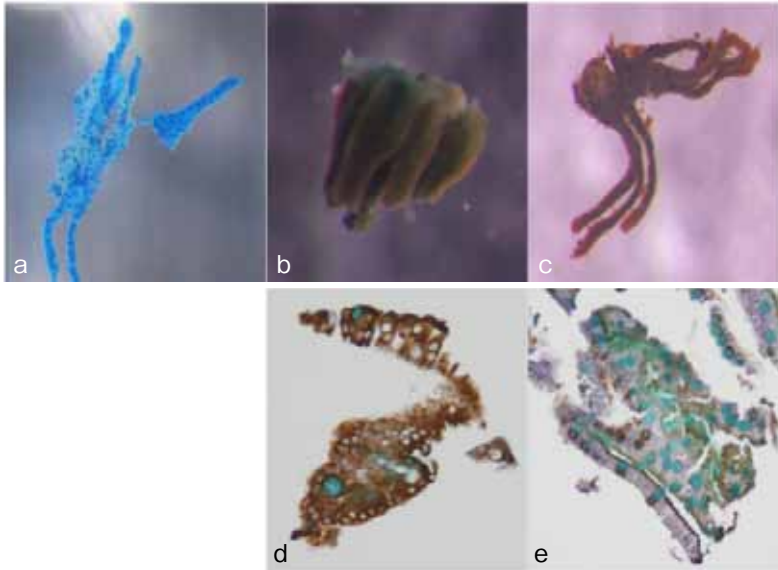


図 3-a. 腸上皮化生分離腺管の Alcian blue 染色の実体顕微鏡像
 b. 不完全型腸上皮化生の実体顕微鏡像
 c. 完全型腸上皮化生の実体顕微鏡像
 d. 不完全型腸上皮化生のヘマトキシリン染色像
 e. 完全型腸上皮化生のヘマトキシリン染色像

4. 腸上皮化生腺管もしくは非腸上皮化生腺管の分離

前庭部粘膜及び胃体部粘膜より回収したエタノール固定後分離腺管をシャーレ内で Alcian blue (pH2.5) にて1時間、室温(25℃)で染色を行った後、Alcian blue 陽性(以後 AB+) 腺管と Alcian blue 陰性(AB-) 腺管(非腸上皮化生腺管に相当)を実体顕微鏡下で分別し回収した(図 3-a)²¹⁾。胃体部粘膜から得られた腸上皮化生腺管は量的に少数であったため、今回の解析から除外した。

腸上皮化生腺管(AB+)を更にシャーレ内で 0.05M Tris buffer solution (TBS: Tris buffer containing 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, pH7.6) 中に浮遊させ、それらの腺管に対して抗 MUC 5AC 抗体(Novocastra Laboratories, Newcastle, UK)を用いて DAKO Envision + system

(DAKO, Glostrup, Denmark)により免疫染色を行った²¹⁾その後 MUC5AC 陽性 AB+ 腺管(図 3-b)と MUC5AC 陰性 AB+ 腺管を実体顕微鏡下で別々に回収した。後者の MUC5AC 陰性腺管に対して更に CD10 モノクローナル抗体(56C6, Novocastra Laboratories)で同様に免疫染色を行った(図 3-c)。

前庭部粘膜から得られた分離腺管は 1) MUC5AC 陽性腸上皮化生腺管, 2) MUC5AC 陰性 CD10 陰性腸上皮化生腺管, 3) MUC5AC 陰性 CD10 陽性腸上皮化生腺管, 4) 非腸上皮化生腺管の 4 種類で、胃体部粘膜から得られた分離腺管は非腸上皮化生腺管のみであった。最終的には、MUC5AC 陽性腸上皮化生腺管と MUC5AC 陰性 CD10 陰性腸上皮化生腺管を不完全型腸上皮化生腺管とし、MUC5AC 陰性 CD10 陽性腸上皮化生腺管を完全型腸上皮化生腺管として扱った

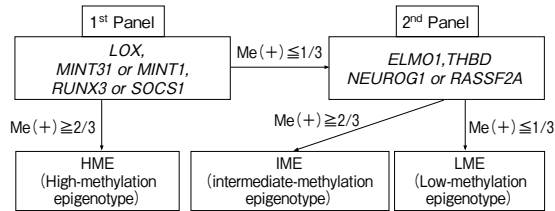


図4. 高メチル化マーカーと中等度メチル化マーカーを用いたメチル化状態の分類

(表2).

分類された完全型腸上皮化生腺管, 不完全型腸上皮化生腺管, 前庭部から得られた非腸上皮化生型腺管, 胃体部から得られた非腸上皮化生腺管の各分離サンプルを分子解析用の分離腺管とパラフィン包埋用の分離腺管を各々分けて回収した. 不完全型腸上皮化生, 完全型腸上皮化生のヘマトキシリン染色像を各々図3-d, 3-eに示す.

5. DNA 抽出

得られた分離癌腺管及び完全腸上皮化生腺管, 不完全腸上皮化生腺管, 前庭部非腸上皮化生腺管, 胃体部非腸上皮化生全腺管の各分離腺管サンプルからDNA抽出を行った.

6. DNA メチル化解析

上記で回収した分離腺管から得られたDNAを用いて, 9遺伝子 (*LOX*, *MINT31*, *RUNX3*, *ELMO1*, *THBD*, *NEUROG1*, *SOCS1*, *p16*, *hMLH1*) のプロモーター領域におけるDNAメチル化率をBisulfite-pyrosequencing法にて解析した²²⁾. DNAメチル化率30%以上をDNAメチル化陽性とした.

DNAメチル化状態については, Yagiら¹⁴⁾の2 panel methodに従って, High Methylation Epigenotype (HME), Intermediate Methylation Epigenotype (IME), Low Methylation Epigenotype (LME)に分類した(図4). また, 上記マーカーのPCR産物が得られない場合は, 同一カテゴリーに分類されている他のマーカーを用いた^{14, 23)}. HMEについては, *MINT31*,

*RUNX3*の代わりに*MINT1*, *SOCS1*を用い, IME, LMEの場合は*NEUROG1*の代わりに*RASSF2A*を代用した.

7. Loss of heterozygosity (LOH) 解析

各サンプルのLOH解析は, PCR-LOH (polymerase chain reaction-loss of heterozygosity)法にて行った. 癌関連遺伝子が位置する6染色体部位(3p, 4p, 5q, 9p, 17p, 18q)を, 14種のマイクロサテライトマーカー(D3S2402, D3S1234, D4S2639, D4S1601, D5S107, D5S346, D5S299, D5S82, D9S171, D9S1118, TP53, D18S487, D18S34, DCC)を用いて解析した. 各染色体のマイクロサテライトマーカーのうち1種類でもLOHがあれば, LOHありとした. プライマーの塩基配列はマイクロサテライト (<http://gdbwww.org/gdb/>)より得た.

各サンプルにおける各領域の評価は, Habanoら²⁴⁾の方法を用い2つの対立遺伝子の面積比(q-value)をもとに算出した. 胃体部大彎の非化生腺管との比較において30%以上の変化を示したもの(q-value<0.7)をLOH陽性とした.

LOH状態については0~30%未満を低LOH状態, 30~60%未満を中等度LOH状態, 60%以上を高LOH状態と定義した.

8. 統計解析

データの統計解析には, 統計ソフトStat Mate III for Windows Ver. 3.07 (Atom, Tokyo, Japan)を使用した. 2群間比較にはchi-square testを用いた.

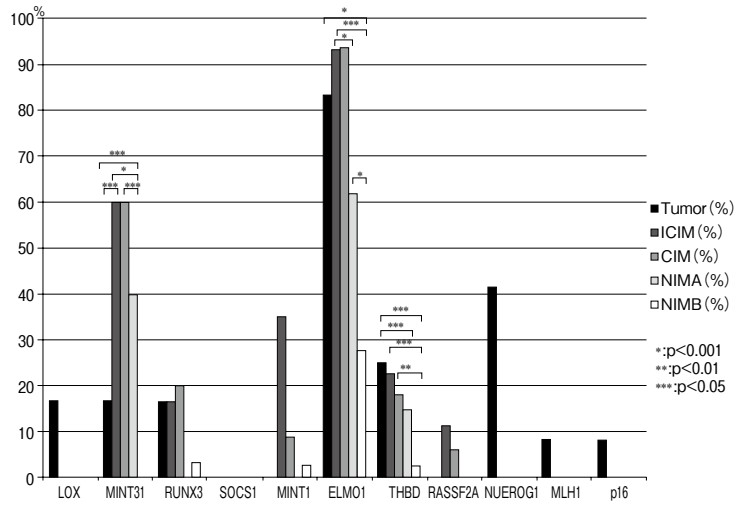


図 5. 癌, 完全型腸上皮化生, 不完全型腸上皮化生, 前庭部非腸上皮化生, 胃体部非腸上皮化生の各種 DNA メチル化マーカーにおける DNA メチル化頻度.

表 3. 癌, 腸上皮化生, 非腸上皮化生におけるメチル化状態

	Tumor (%)	CIM (%)	ICIM (%)	NIMA (%)	NIMB (%)	p-value ^a	p-value ^b	p-value ^c	p-value ^d	p-value ^e	p-value ^f
	24	33	43	32	43						
LME	12 (50.0)	24 (72.7)	34 (79.1)	27 (84.4)	43 (100)	<0.05	<0.05	<0.001	<0.01	<0.01	<0.05
IME	8 (33.3)	8 (24.3)	8 (18.6)	5 (15.6)	0 (0)	NS	NS	<0.001	<0.01	<0.01	<0.05
HME	4 (16.7)	1 (3.0)	1 (2.3)	0 (0)	0 (0)	NS	NS	<0.05	NS	NS	NS

ICIM: Incomplete intestinal metaplasia crypt
 CIM: Complete intestinal metaplasia crypt
 NIMA: Nothing with intestinal metaplasia at antrum gland crypt
 NIMB: Nothing with intestinal metaplasia at body gland crypt

Abbreviation: NS indicates non significant (ie, >0.05)

a: Tumor versus ICIM d: CIM versus NIMB
 b: Tumor versus NIMA e: ICIM versus NIMB
 c: Tumor versus NIMB f: NIMA versus NIMB

III. 結 果

癌腺管及び完全型腸上皮化生腺管 (Complete intestinal metaplasia: CIM), 不完全型腸上皮化生腺管 (Incomplete intestinal metaplasia: ICIM), 前庭部非腸上皮化生腺管 (Nothing with intestinal metaplasia at Antrum: NIMA), 胃体部非腸上皮化生腺管 (Nothing with intestinal metaplasia at Body: NIMB) におけるメチル化, LOH の比較検討を行った.

1. 癌腺管, 腸上皮化生腺管, 前庭部非腸上皮化生腺管, 胃体部非腸上皮化生腺管の DNA メチル化の解析

各マーカーの DNA メチル化の陽性頻度について図 5 に示す. HME を分類するマーカーのうち, *MINT31* がもっとも陽性率が高かった. *MINT31* において, 癌腺管は完全型腸上皮化生腺管, 前庭部非腸上皮化生腺管と比較し有意に陽性率が低かった (各々 $p < 0.05$, $p < 0.05$). また, 前庭部非腸上皮

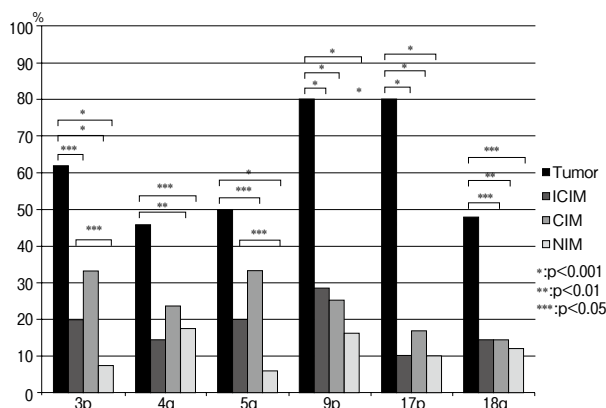


図 6. 癌，完全型腸上皮化生，不完全型腸上皮化生，前庭部非腸上皮化生の各種マイクロサテライトマーカーによる LOH 頻度

表 4. 癌，完全型腸上皮化生，不完全型腸上皮化生，非腸上皮化生の LOH 状態

	Tumor (%)	CIM (%)	ICIM (%)	NIMA (%)	p-value ^a	p-value ^b	p-value ^c
	24	33	43	32			
LME	14 (58.3)	2 (6.1)	1 (2.3)	0 (0)	p<0.001	p<0.001	p<0.001
IME	3 (12.5)	2 (6.1)	1 (2.3)	7 (21.9)	NS	NS	NS
HME	7 (29.2)	29 (87.8)	41 (95.4)	25 (78.1)	p<0.001	p<0.001	p<0.001

CIM: Complete intestinal metaplasia crypt
 ICIM: Incomplete intestinal metaplasia crypt
 NIMA: Nothing with intestinal metaplasia crypt at antrum

Abbreviation: NS indicates non significant (ie, >0.05)

a: Tumor versus CIM
 b: Tumor versus ICIM
 c: Tumor versus NIMA

化生腺管は完全型腸上皮化生腺管，不完全型腸上皮化生腺管と比較し陽性率が低かった (各々 p<0.001, p<0.01). *SOCS1* では陽性例は見られなかった。一方 IME, LME を示すマーカーのうち陽性率が高かったのは *ELMO1* であった。*ELMO1* では，胃体部非腸上皮化生腺管は癌腺管，不完全型腸上皮化生腺管，前庭部非腸上皮化生腺管と比較し有意に陽性率が低かった (各々 p<0.001, p<0.05, p<0.001)。

癌腺管，完全型腸上皮化生腺管，不完全型腸上皮化生腺管，前庭部非腸上皮化生腺管，

胃体部非腸上皮化生腺管の DNA メチル化状態の頻度を表 3 に示した。

癌腺管において，HME とされた例は 4 例 (16.7%) であったが，LME とされた例は 12 例 (50.0%) で IME とされた例は 8 例 (33.3%) であった。

完全型腸上皮化生腺管においては，LME は 24 例 (72.7%)，IME は 8 例 (24.3%)，HME は 1 例 (3.0%) であった。一方，不完全型腸上皮化生腺管においては，LME は 34 例 (79.1%)，IME は 8 例 (18.6%)，HME は 1 例 (2.3%) であった。

前庭部非腸上皮化生においては, LME は 27 例 (84.4%), IME は 5 例 (15.6%) で, HME はみられなかった. 胃体部非腸上皮化生においては, LME が 43 例 (100%) で IME, HME はみられなかった.

また, 不完全型腸上皮化生腺管, 完全型腸上皮化生腺管の IME は胃体部非腸上皮化生腺管と比較して, 有意に高かった (各々 $p < 0.01$, $p < 0.05$).

2. 癌腺管, 腸上皮化生腺管, 前庭部非腸上皮化生腺管における LOH の頻度

各分離腺管の LOH の頻度は, 癌において最も高かった. 一方腸上皮化生腺管においては, 完全型, 不完全型双方において, 各マーカーにおいて LOH の頻度がやや高い傾向がみられた. 前庭部非腸上皮化生腺管では各マーカーで LOH 頻度が低かった (図 6).

3. 各分離腺管の LOH 状態の比較

癌腺管, 完全型腸上皮化生腺管, 不完全型腸上皮化生腺管, 前庭部非腸上皮化生腺管, 胃体部非腸上皮化生腺管の LOH 状態の頻度を表 4 に示す.

LOH 状態は癌腺管において高 LOH 状態 (以下 LOH-H) は 14 例 (58.3%), 中等度 LOH 状態 (以下 LOH-I) は 3 例 (12.5%), 低 LOH 状態 (以下 LOH-L) は 7 例 (29.2%) であった. 完全型腸上皮化生においては, LOH-H は 2 例 (6.1%), LOH-I は 2 例 (6.1%), LOH-L は 29 例 (87.8%) であった. 不完全腸上皮化生においては, LOH-H は 1 例 (2.3%), LOH-I は 1 例 (2.3%), LOH-L は 41 例 (95.4%) であった. 前庭部非腸上皮化生腺管では, LOH-H はなく, LOH-I は 7 例 (21.9%), LOH-L は 25 例 (78.1%) であった.

IV. 考 案

胃癌の分子解析を行う際に, 癌細胞のみの採取は重要である. 最近の報告では癌の分子異常は癌細胞にのみならず間質細胞にもみら

れることが報告されているので²⁵⁾, 癌細胞の分子異常を正確に解析するためには癌腺管の採取が必要である²⁴⁾. また周囲粘膜の腸上皮化生や介在する非腸上皮化生腺管の分子異常の解析にも, 分離腺管の解析は極めて有用である²¹⁾. 周囲粘膜の構成腺管の比率は多様で, 新鮮組織片から直接 DNA を解析する方法では, 正確な周囲粘膜を構成する腺管の解析は困難である. 本研究では周囲粘膜の腸上皮化生腺管を完全型腸上皮化生腺管と不完全型腸上皮化生に分離・分別し, 更に介在する非腸上皮化生腺管も区別して解析した. このように個々の周囲粘膜の構成腺管の形質を区別して解析した報告はこれまでに我々以外の報告は皆無である.

胃癌の発癌仮説は Tahara ら⁶⁾の仮説はあるが, 大腸癌における Vogelstein ら²⁶⁾の報告と異なり, 世界的に受け入れられた仮説はない. このことは, 胃癌では大腸癌の場合と異なり大腸腺腫のような明瞭な前癌病変が確定されていないことによる. 胃腺腫を前癌病変として考える研究者もいるが^{6, 15)}, 明らかな境界を持った癌を含む腺腫内癌は稀であり, 胃の場合腺腫を前癌病変として積極的に治療対象としている内視鏡医も極めて少ないことから²⁷⁾, 胃腺腫は前癌病変として認識することは困難であろう. 腸上皮化生の前癌病変としての意義については欧米と本邦では全く考えが異なっている^{15, 17)}. 欧米では腸上皮化生を明確な前癌病変と認識しているが¹⁵⁾, 本邦ではそのような考え方が少数である¹⁷⁾. 腸上皮化生は胃癌周囲粘膜に広範に存在し, 胃癌病変を取り囲んでいるようにみえることが多く, 胃癌の発生と関連していることは間違いないものと思われる. しかし, そのような組織像が観察できるからと言って, 腸上皮化生を胃癌の前癌病変と即断することは短絡的である. 形態的に腸上皮化生腺管が胃癌の前癌病変とされるためには, 腸上皮化生腺管から直接癌腺管が発生している

像を提示することが必要である²⁷⁾。本邦では伝統的に胃癌材料の全割標本の作製が行われているが、これまでそのような像を観察した病理医はいない²⁷⁾。腸上皮化生と癌との関連性を知るためには、腸上皮化生腺管と癌腺管の分子解析の比較は欠かせないものと思われる。本研究では、分離腺管を用いて、腸上皮化生腺管を2つの形質に分類して解析を行った(完全型、不完全型)。加えて腸上皮化生粘膜内に介在する非腸上皮化生腺管の分子解析も施行できた。胃癌はcancer fieldを形成していると言われ²⁸⁾、癌周囲粘膜の構成腺管の解析は胃癌発生の解析に重要な情報を提供するものと思われる。

これまで腸上皮化生腺管を完全型、不完全型に分類することが行われていた。これらの分類の基準はいくつかのものがあるが^{29, 30)}、本研究では粘液形質とCD10の発現の有無によって腸上皮化生腺管を分類した。本研究では胃型形質を有する腸上皮化生腺管とCD10を発現していない腸上皮化生腺管を不完全型腸上皮化生とし、CD10の発現がみられる腸上皮化生腺管を完全型腸上皮化生腺管として分類した。完全型と不完全型をパネート細胞の有無によって分類する方法が有名であるが²⁹⁾、分離腺管を実体顕微鏡下でパネート細胞を指標にして分類することは困難である。胃癌の発生前に癌細胞の粘液形質が密接に関連していることが明らかになっていることから³¹⁾、腸上皮化生腺管を粘液形質とCD10の発現の有無で分類する方法が合理的、有用な分類と思われる。

胃癌細胞が高度にDNAメチル化されていることは、これまで多くの報告がある^{9, 13)}。しかし、ここで注意すべきことは、ゲノムワイドにメチル化されている現象と癌の増殖などに有利に作用する特定の遺伝子が選択的にメチル化されている現象を区別することである。前者のレベルで高度なメチル化が起きている場合は、大腸癌などでも明らかにさ

れたように特定の疾患、病型を特徴づけていることが多く、癌の分子病型を反映している^{32, 33)}。一方後者の方は、必ずしもゲノムワイドにメチル化されているとは限らず、一定の分子病型を規定している訳ではないと思われる。癌細胞のゲノムワイドのメチル化を調べるマーカーとして、Toyotaら³²⁾やWeisenbergerら³⁴⁾のマーカーが多く用いられてきたが、これらのマーカーは癌細胞のメチル化のレベルを高とそれ以外に二分することは可能であるが、中等度にメチル化されている状態と低レベルにメチル化されている状態を区別することはできなかった。Yagi, Kanedaら¹⁴⁾は大腸腫瘍において中等度メチル化がKi-ras変異の有無と密接に関連し、悪性度も高いことを報告している。腫瘍細胞において中等度のメチル化状態を知ることが、腫瘍細胞におけるDNAメチル化の意義を解明する上で重要である。

本研究においては、胃癌及び周囲粘膜の腸上皮化生腺管、非腸上皮化生腺管について、DNAメチル化状態(ゲノムワイドにみた場合のDNAメチル化レベル)を解析した。今回の検討では胃癌細胞の約15%程度がゲノムワイドにメチル化されていることが示された。中等度メチル化は30%程度であり、残りの部分が低メチル化状態であった。一方腸上皮化生腺管の中等度メチル化は、完全、不完全共に20%程度であり、胃体部の非腸上皮化生腺管のそれと比較しても高かった。前庭部粘膜の非腸上皮化生腺管では、同様の非腸上皮化生腺管であるにも関わらず胃体部の非腸上皮化生腺管よりメチル化状態が高いことが示され、高度な炎症状態にある粘膜では全体のメチル化状態のレベルが上昇していることを表しているものと思われる。即ち腸上皮化生腺管のメチル化レベルは明らかに胃固有の上皮細胞より上昇していることを示している。DNAメチル化レベルからみた場合、腸上皮化生腺管は単なる可逆的な化生細胞で

はなく、病変としての意義を有しているものと思われる。

本研究では完全型腸上皮化生、不完全型腸上皮化生の DNA メチル化状態には差異はみられなかった。このことは DNA メチル化レベルでは両者の違いを説明することはできないことを示唆している。DNA メチル化が腫瘍の初期発生に関連していることを示している報告は多いが、それは腫瘍発生に関連する遺伝子の不活化が起きていることを示しているのであって、ゲノムワイドのメチル化レベルについてのものではない。腸上皮化生についても以前の我々の報告²¹⁾からも明らかのように癌関連遺伝子のメチル化は高頻度に起きていることが分かっており、一定の癌関連遺伝子のメチル化が腸上皮化生の発生に重要である可能性を示唆している。この場合も、完全型と不完全型腸上皮化生の違いを説明することはできなかった。ゲノムワイドの DNA メチル化レベルもしくは特定の癌関連遺伝子の DNA メチル化から完全型腸上皮化生と不完全型腸上皮化生の病態を規定することは困難である。両者の違いは粘液形質や CD10 発現に関連する遺伝子の状態を検討することが重要と思われる。

胃癌研究において cancer field 仮説を支持するものが多い^{28, 29)}。これは一定の領域で発癌レベルが上昇し、領域を形成していることを示している仮説である。今回の我々の検討でも癌周囲粘膜である前庭部粘膜において腸上皮化生腺管のみならず、非腸上皮化生腺管の DNA メチル化レベルが胃体部のそれと比較して高いことが示された。このことは、上記の cancer field 仮説を DNA メチル化の観点から支持する所見と思われた。形態的には鑑別困難な非腸上皮化生腺管であっても、DNA メチル化状態が異なっているとする報告はこれまで皆無である。胃癌の発癌研究をする上で有用な知見と考えられる。

胃癌の LOH 解析は、これまで多くの報告

があり、胃癌でしばしばみられる染色体アレルの欠損領域も明らかになっている⁹⁻¹¹⁾。今回の我々の検討も、これまで報告された胃癌で好発する染色体アレルの欠損領域を検討した。胃癌においてはいずれの染色体アレルにおいても高度の欠損 (LOH) が起きていることが示された。このことは胃癌においても高度なゲノムレベルの異常が起きていることを示していることを示しているのと同時に大腸癌のように初期発生に関連する基本的な染色体アレル (17p, 18q, 5q) が不明確であることを示唆している。このことが胃癌の発癌仮説が定型的に示されない理由の 1 つと思われる。一方腸上皮化生においては、完全、不完全共に染色体アレルの欠損が一定の頻度で起きていることが示された。LOH 解析における各染色体アレルの欠損の頻度は、癌腺管 > 腸上皮化生腺管 > 前庭部内の非腸上皮化生腺管の順に多くみられた。このことは、腸上皮化生はもちろん非腸上皮化生腺管においてもゲノムレベルの異常が高頻度ではないが実際に起きていることを示しており、極めて興味深い所見である。

LOH についても LOH の蓄積の程度を LOH 状態として検討した。癌においては LOH 状態が高い癌が多いが、腸上皮化生腺管及び非腸上皮化生腺管共に LOH 状態は低いレベルであることが明らかになった。このことは個々の染色体アレルの欠損は一定レベルで起きているが、LOH の蓄積は起きていることを示しており、この違いが腫瘍と腸上皮化生の違いを明確にしているものと思われた。癌関連遺伝子の LOH の出現により、細胞の増殖能にドライブがかかることが予想され⁹⁾、実際多くの癌において増殖能の亢進が観察される。しかし腸上皮化生腺管や非腸上皮化生腺管ではそのようなことは起きておらず、腺管の増殖領域 (非腸上皮化生腺管の場合は増殖帯) は一定のレベルに局限されている (腺管下方 1/3 程度に局限してみられ

る)³⁵⁾。このように腺管内の増殖領域を一定の領域に限定させていることが、LOH の出現にも関わらず、細胞の増殖を無秩序に亢進させない理由であり、LOH の蓄積が起きない理由でもあると考える(増殖領域が制御されていれば、異常細胞は一定の機序で腺管内から排除されると思われる)。今回の結果は、腸上皮化生腺管が非腸上皮化生腺管と比較しても単なる化生現象とは言えないことを示していると思われる。LOH についてもメチル化同様にゲノムワイドレベルの異常を解析する必要があるが、今後の検討課題としたい。

今回の検討において、腸上皮化生腺管の意義については、前癌病変、傍癌病変いずれにおいても明らかにできなかった。しかし、ゲノムレベルの蓄積が非腸上皮化生腺管とほとんど変わらないことから考えて、どちらかと言えば、傍癌病変としての意義にとどまるものと思われた。今後のゲノムレベル(及びエピゲノムレベル)の網羅的な解析が必要と思われる。

胃癌及び周囲粘膜における腸上皮化生腺管及び非腸上皮化生腺管のゲノムワイドのDNAメチル化レベルについて検討した。胃癌腺管、腸上皮化生腺管、前庭部非腸上皮化生腺管、胃体部非腸上皮化生腺管の順にDNAメチル化レベルの亢進がみられた。LOH解析においては、胃癌においては高頻度にみられたが、腸上皮化生腺管においても個々の染色低アレルにおいては一定の頻度でLOHがみられた。しかし、LOHの蓄積は腸上皮化生腺管では低レベルである、ゲノムレベルの異常の蓄積は腸上皮化生ではみられないことが示唆された。腸上皮化生は明らかに単なる化生現象ではなく、DNAメチル化レベルの亢進した病変としての意義を有するものと思われた。

本稿を終えるにあたり、研究の遂行に多大なご協力をいただきました菅原江利佳女史、葛西俊之氏、中央臨床検査部の検査技師の皆様深く感謝いたします。

文 献

- 1) **Jemal A, Bray F, Center MM, et al.**: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69-90, 2011.
- 2) **Kobayashi S, Prolla JC, Yagi M, et al.**: Gastroscopic diagnosis of early gastric carcinoma based on Japanese classification. *Gastrointest Endosc* **16**, 92-97, 1969.
- 3) **Yasuda K, Mizuma Y, Nakajima M, et al.**: Endoscopic laser treatment for early gastric cancer. *Endoscopy* **25**, 451-454, 1993.
- 4) **Ono H, Kondo H, Gotoda T, et al.**: Endoscopic mucosal resection for treatment of early gastric cancer. *Gut* **48**, 225-229, 2001.
- 5) **Yamada H, Ikegami M, Shimoda T, et al.**: Long-term follow-up study of gastric adenoma/dysplasia. *Endoscopy* **36**, 390-396, 2004.
- 6) **Tahara E, Semba S and Tahara H**: Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* **23**, 307-315, 1996.
- 7) **Ogino S and Goel A**: Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* **10**, 13-27, 2008.
- 8) **Leggett B and Whitehall V**: Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* **138**, 2088-2100, 2010.
- 9) **Sugai T, Habano W, Endoh M, et al.**: Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. *Int J Cancer* **127**, 2500-2509, 2010.
- 10) **Jiao YF, Sugai T, Habano W, et al.**: Analysis of microsatellite alterations in gastric carcinoma using the crypt isolation technique. *J Pathol* **204**, 200-207, 2004.
- 11) **Jiao YF, Sugai T, Habano W, et al.**: Clinicopathological significance of loss of heterozygosity in intestinal- and solid-type gastric carcinomas: a comprehensive study using the crypt isolation technique. *Mod Pathol* **19**, 548-555, 2006.
- 12) **Zhao C and Bu X**: Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis.

- Histol Histopathol **27**, 1271-1282, 2012.
- 13) **Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, et al.**: Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *Hum Pathol* **40**, 1534-1542, 2009.
 - 14) **Yagi K, Takahashi H, Akagi K, et al.**: Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma. *Am J Pathol* **180**, 616-625, 2012.
 - 15) **Correa P, Piazuelo MB and Wilson KT.**: Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. *Am J Gastroenterol* **105**, 493-498, 2010.
 - 16) **Leung WK and Sung JJ.**: Review article: intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* **16**, 1209-1216, 2002.
 - 17) **Tsukamoto T, Toyoda T, Mizoshita T, et al.**: Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in rodent models. *Semin Immunopathol* **35**, 177-190, 2013.
 - 18) **Tatematsu M, Tsukamoto T and Inada K.**: Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. *Cancer Sci* **94**, 135-141, 2003.
 - 19) 日本胃癌学会 (編): 胃癌取扱い規約, 14 版. 金原出版, pp. 8-57, 2010.
 - 20) **Arai T and Kino I.**: Morphometrical and cell kinetic studies of normal human colorectal mucosa. Comparison between the proximal and the distal large intestine. *Acta Pathol Jpn* **39**, 725-730, 1989.
 - 21) 小飯塚仁彦, 菅井 有, 幅野 渉, 他: 腺管分離法を用いた非化生腺管・腸上皮化生腺管・癌腺管のメチル化解析. *岩手医誌* **62**, 189-201, 2010.
 - 22) **Kimura T, Yamamoto E, Yamano H, et al.**: novel pit pattern identifies the precursor of colorectal cancer derived from sessile serrated adenoma. *Am J Gastroenterol* **107**, 460-469, 2012.
 - 23) **Kaneda A and Yagi K.**: Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci* **102**, 18-24, 2011.
 - 24) **Habano W, Sugai T, Nakamura S, et al.**: A novel method for gene analysis of colorectal carcinomas using a crypt isolation technique. *Lab Invest* **74**, 933-940, 1996.
 - 25) **Ishiguro K, Yoshida T, Yagishita H, et al.**: Epithelial and stromal genetic instability contributes to genesis of colorectal adenomas. *Gut* **55**, 695-702, 2006.
 - 26) **Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al.**: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Eng J Med* **319**, 525-532, 1988.
 - 27) **Sugai T, Inomata M, Uesugi N, et al.**: Analysis of mucin, p53 protein and Ki-67 expressions in gastric differentiated-type intramucosal neoplastic lesions obtained from endoscopic mucosal resection samples: a proposal for a new classification of intramucosal neoplastic lesions based on nuclear atypia. *Pathol Int* **54**, 425-435, 2004.
 - 28) **Rocco A, Compare D and Nardone G.**: Cancer stem cell hypothesis and gastric carcinogenesis: Experimental evidence and unsolved questions. *World J Gastrointest Oncol* **15**, 54-59, 2012.
 - 29) **González CA, Sanz-Anquela JM, Gisbert JP, et al.**: Utility of subtyping intestinal metaplasia as marker of gastric cancer risk. A review of the evidence. *Int J Cancer*, DOI: 10.1002/ijc.28003, 2012.
 - 30) **Eriksson NK, Kärkkäinen PA, Färkkilä MA, et al.**: Prevalence and distribution of gastric intestinal metaplasia and its subtypes. *Dig Liver Dis* **40**, 355-360, 2008.
 - 31) **Endoh Y, Tamura G, Ajioka Y, et al.**: Frequent hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in differentiated-type tumors of the stomach with the gastric foveolar phenotype. *Am J Pathol* **157**, 717-722, 2000.
 - 32) **Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al.**: CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8681-8686, 1999.
 - 33) **Sugai T, Habano W, Jiao Y-F, et al.**: Analysis of molecular alterations in left- and right-sided colorectal carcinomas reveals distinct pathways of carcinogenesis: proposal for new molecular profile of colorectal carcinomas *J Mol Diagn* **8**, 193-201, 2006.
 - 34) **Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al.**: CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* **38**, 787-793, 2006.
 - 35) **Li Y, Chang X, Zhou W, et al.**: Gastric intestinal metaplasia with basal gland atypia: a morphological and biologic evaluation in a large Chinese cohort. *Hum Pathol*, DOI: 10.1016/j.humpath.2012.07.002, 2012.

Molecular analysis of gastric cancer and intestinal and non intestinal metaplasia with crypt isolation technique

Ryo SUGIMOTO¹⁾, Shunsuke ORIKASA²⁾, Yusuke MATSUI³⁾,
Keisuke KOEDA³⁾, Go WAKABAYASHI³⁾ and Tamotsu SUGAI¹⁾

¹⁾ Division of Molecular Diagnostic Pathology, Department of Pathology,
School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

²⁾ Department of Gastroenterology and Hepatology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

³⁾ Department Surgery, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on February 18, 2013 & Accepted on February 28, 2013)

Abstract

We studied the DNA methylation level and loss of heterozygosity(LOH) in intestinal metaplastic glands and non-intestinal metaplastic glands in the region of gastric cancer and the surrounding mucous membrane. In 43 cases of resected gastric cancer, we analyzed the DNA methylation level and LOH status in the gastric glands in the region of gastric cancer, intestinal metaplastic glands, non-intestinal metaplastic glands in the antrum, and non-intestinal metaplastic glands in the gastric corpus obtained by the crypt isolation technique. Increase in the DNA methylation level was observed in the gastric cancer glands, intestinal metaplastic glands, non-intestinal metaplastic glands in the

antrum, and non-intestinal metaplastic glands in the gastric corpus, in descending order. In the LOH analysis, LOH was observed at a high frequency in the region of the gastric cancer, and also in the intestinal metaplastic glands in individual low alleles at a certain frequency; however, the degree of LOH accumulation in the intestinal metaplastic glands was low. The above results suggested that intestinal metaplastic glands show an increase in the methylation level but no accumulation of genome abnormalities. Thus, intestinal metaplasia is obviously not just a metaplastic phenomenon, but also has significance as a methylated lesion.
