

潰瘍性大腸炎の発癌背景粘膜における粘液形質変化

須田 和 敬

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科分野（第一外科）

（指導：若井俊文教授）

Changes of Mucin Phenotypes in Background Mucosa of Ulcerative Colitis - Associated Carcinogenesis

Kazuyoshi SUDA

Division of Digestive and General Surgery,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Toshifumi WAKAI)

要 旨

【緒言】発症から長期経過の潰瘍性大腸炎（Ulcerative Colitis：UC）における慢性持続性炎症粘膜では、大腸癌の発生リスクが高いことが知られている。UC合併大腸癌（Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Carcinoma：UC-CRC）では、高頻度に胃型への粘液形質変化を認めるが、慢性持続性炎症粘膜からの発癌過程における背景粘膜の粘液形質変化に関しては十分に解明されていない。本研究の目的は、UC合併大腸癌背景粘膜における胃型への粘液形質変化を解析し、胃型への粘液形質変化は発癌高危険群を選別するための指標となるかを明らかにすることである。

【方法】外科切除が施行された全大腸炎型UC-CRC 9例を対象とした。外科切除が施行された非拒癌全大腸炎型UCのうち、UC-CRC群に年齢、UC罹患期間を極力合致させた9例を抽出しUC対照群とした。UC対照群とUC-CRC群における非腫瘍性直腸粘膜における胃腺窩腺型粘液形質であるMUC5ACに対する免疫組織化学を施行し、MUC5AC発現様式および発現頻度を検討した。MUC5AC発現様式は、sporadic type（散在性発現）とdiffuse type（びまん性発現）とに分類した。

【結果】UC-CRC群において検索した4882陰窩中1161陰窩（23.8%）がsporadic typeのMUC5AC発現を示し、UC対照群における3769陰窩中408陰窩（10.8%）と比較してUC-CRC群で有意にsporadic typeのMUC5AC発現頻度が高かった（ $P < 0.001$ ）。UC-CRC群において検索した4882陰窩中206陰窩（4.2%）がdiffuse typeのMUC5AC発現を示し、UC対照群における3769陰窩中7陰窩（0.2%）と比較してUC-CRC群で有意にdiffuse typeのMUC5AC発現頻度が高かった（ $P < 0.001$ ）。UC-CRC群では9例（100%）、UC対照群では8例（89%）がsporadic typeのMUC5AC発現を認めた（ $P > 0.999$ ）。UC-CRC群では7例（78%）、UC対照群では2例（22%）がdiffuse typeのMUC5AC発現を認め、UC-CRC群では非腫瘍性直腸粘膜においてdiffuse typeのMUC5AC発現を認める頻度が高かった（ $P =$

Reprint requests to: Kazuyoshi SUDA
Division of Digestive and General Surgery
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・
一般外科学分野（第一外科） 須田 和 敬

0.057). ペアマッチさせた症例間で検索した陰窩単位での diffuse type の MUC5AC 発現頻度を比較した結果, 9 ペア中 5 ペアにおいて UC-CRC 群の方が diffuse type の MUC5AC 発現頻度が有意に高かった.

【結語】免疫組織化学で同定される diffuse type の MUC5AC 発現陰窩は, UC の発癌高危険群を選別するための指標となる可能性がある.

キーワード: 潰瘍性大腸炎, 大腸癌, 胃型粘液形質, MUC5AC, 免疫染色

緒 言

発症から長期経過の潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis : UC) における慢性持続性炎症粘膜では, 大腸癌の発生リスクが高いことが知られている¹⁾. UC 発症から 10 年以上の長期経過例や広範囲罹患例では, 大腸癌の発生リスクは高くなると報告されている¹⁾. UC 合併大腸癌 (ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma : UC-CRC) では, 高頻度に胃型への粘液形質変化を認めるが²⁾, 慢性持続性炎症粘膜からの発癌過程における背景粘膜の粘液形質変化に関しては十分に解明されていない.

UC 罹患期間が大腸癌の累積発生率に影響を与えることから¹⁾, UC 罹患期間のバイアスを極力排除するために, 外科切除が施行された非担癌全大腸炎型 UC のうち, UC-CRC 群に年齢, UC 罹患期間を極力合致させた UC 対照群を抽出し比較検討するペアマッチ研究デザインを立案した. 本研究では, UC-CRC の発生には背景粘膜における胃型への粘液形質変化が関与しているという仮説を立て, 仮説検証を行った.

本研究の目的は, UC 合併大腸癌背景粘膜における胃型への粘液形質変化を解析し, 胃型への粘液形質変化は発癌高危険群を選別するための指標となるかを明らかにすることである.

対象と方法

1. 対象

外科切除が施行された全大腸炎型 UC-CRC 9

例を対象とした. 外科切除が施行された非担癌全大腸炎型 UC のうち, UC-CRC 群に年齢, UC 罹患期間を極力合致させた 9 例を抽出し UC 対照群とした. 症例の年齢中央値は 47 歳 (23-77 歳), 性別は男性 3 例, 女性 6 例であった. UC-CRC 群における癌の発生部位は右側結腸 1 病変, 左側結腸 3 病変, 直腸 10 病変であった. 腫瘍径の中央値は 46.5mm (2-125mm) であった.

2. 方法

切除標本を全割し, 10%ホルマリンで固定後に, パラフィン包埋ブロックから薄切し, HE 染色標本を作製した. UC-CRC 群と UC 対照群とにおける非腫瘍性直腸粘膜を含む切片を決定した. 当該切片のパラフィン包埋ブロックから再度 3 μ m の連続切片を作製し, それぞれ HE 染色, 胃腺窩腺型粘液形質である MUC5AC (mouse monoclonal antibody against Human Muc-5AC glycoprotein, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK; dilution at 1 : 100) に対する免疫組織化学を施行した. 非腫瘍性直腸粘膜における MUC5AC 発現様式および発現頻度を検討した. MUC5AC 発現は, 細胞質内に存在する免疫反応性粘液をもって発現陽性と定義した. 陰窩中に一つでも MUC5AC 発現陽性の細胞を認めた場合, 陰窩単位で陽性と判定した. MUC5AC 発現様式は, 粘膜の表層から中層を中心に散在性に発現を示す sporadic type (図 1a) と粘膜全層 (表層, 中層, 深層) に, びまん性に発現を示す diffuse type (図 1b) とに分類した.

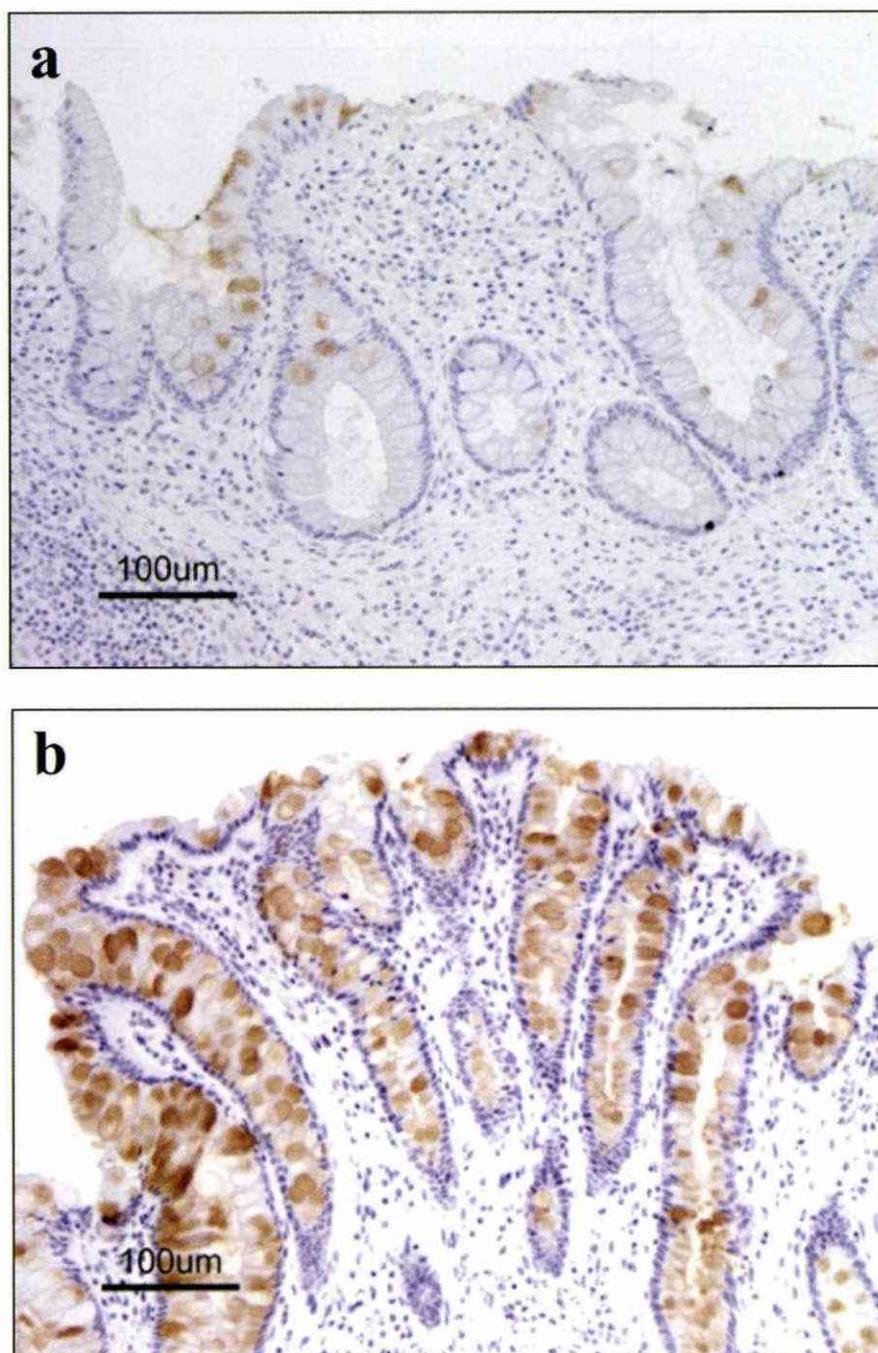


図1 非腫瘍性直腸粘膜における MUC5AC 発現様式

胃腺窩腺型粘液形質である MUC5AC に対する免疫組織化学。細胞質内に存在する免疫反応性粘液である MUC5AC は褐色に染色されている。

a：粘膜の表層から中層を中心に散在性に MUC5AC 発現を示す sporadic type.

b：粘膜全層（表層、中層、深層）に、びまん性に MUC5AC 発現を示す diffuse type.

表1 陰窩単位での MUC5AC 発現様式および発現頻度

	MUC5AC 発現様式	検索陰窩数	MUC5AC 発現陽性の陰窩数	P 値
UC-CRC 群	Sporadic type	4882	1161 (23.8%)	< 0.001
UC 群	Sporadic type	3769	408 (10.8%)	
UC-CRC 群	Diffuse type	4882	206 (4.2%)	< 0.001
UC 群	Diffuse type	3769	7 (0.2%)	

UC-CRC : ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma (潰瘍性大腸炎合併大腸癌) ; UC : ulcerative colitis (潰瘍性大腸炎)

表2 症例単位での MUC5AC 発現様式および発現頻度

群	MUC5AC 発現様式	症例数	MUC5AC 発現陽性の症例数	P 値
UC-CRC 群	Sporadic type	9	9 (100%)	> 0.999
UC 対照群	Sporadic type	9	8 (88.9%)	
UC-CRC 群	Diffuse type	9	7 (77.8%)	0.057
UC 対照群	Diffuse type	9	2 (22.2%)	

UC-CRC : ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma (潰瘍性大腸炎合併大腸癌) ; UC : ulcerative colitis (潰瘍性大腸炎)

3. 統計解析

統計学的検討は PASW Statistics 17 software package (SPSS Japan, Tokyo, Japan) を用いて行った。Mann - Whitney's U - test および Fisher の直接確率法にて検定し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した。

結 果

1. 陰窩単位での MUC5AC 発現様式および発現頻度

UC - CRC 群において検索した 4882 陰窩中 1161 陰窩 (23.8%) が sporadic type の MUC5AC 発現を示し、UC 対照群における 3769 陰窩中 408 陰窩 (10.8%) と比較して UC - CRC 群で有意に

sporadic type の MUC5AC 発現頻度が高かった ($P < 0.001$) (表 1)。UC - CRC 群において検索した 4882 陰窩中 206 陰窩 (4.2%) が diffuse type の MUC5AC 発現を示し、UC 対照群における 3769 陰窩中 7 陰窩 (0.2%) と比較して UC - CRC 群で有意に diffuse type の MUC5AC 発現頻度が高かった ($P < 0.001$)。

2. 症例単位での MUC5AC 発現様式および発現頻度

UC - CRC 群では 9 例 (100%)、UC 対照群では 8 例 (89%) が sporadic type の MUC5AC 発現を認めた ($P > 0.999$)。UC - CRC 群では 7 例 (78%)、UC 対照群では 2 例 (22%) が diffuse type の MUC5AC 発現を認め、UC - CRC 群では

表3 ペアマッチさせた陰窩単位での diffuse type の MUC5AC 発現頻度

ペア症例	群	年齢	UC 罹患年数	検索陰窩数	Diffuse type の MUC5AC 発現陽性の陰窩数	P 値
1	UC-CRC 群	59	1	796	7 (0.9%)	0.047
	UC 対照群	58	1	522	0	
2	UC-CRC 群	63	1	144	4 (2.8%)	NS
	UC 対照群	62	1	63	0	
3	UC-CRC 群	23	8	453	66 (14.6%)	< 0.001
	UC 対照群	33	7	722	0	
4	UC-CRC 群	52	10	255	1 (0.4%)	NS
	UC 対照群	52	8	497	0	
5	UC-CRC 群	29	12	613	37 (6.0%)	< 0.001
	UC 対照群	29	12	233	0	
6	UC-CRC 群	35	14	1256	0	NS
	UC 対照群	37	14	767	0	
7	UC-CRC 群	47	16	660	79 (12.0%)	< 0.001
	UC 対照群	48	12	632	0	
8	UC-CRC 群	77	19	173	0	NS
	UC 対照群	74	15	99	3 (3.0%)	
9	UC-CRC 群	40	20	532	12 (2.3%)	< 0.001
	UC 対照群	50	18	234	4 (1.7%)	

UC-CRC : ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma (潰瘍性大腸炎合併大腸癌) ; UC : ulcerative colitis (潰瘍性大腸炎)

非腫瘍性直腸粘膜において diffuse type の MUC5AC 発現を認める頻度が高かった (P = 0.057) (表 2).

3. ペアマッチさせた陰窩単位での diffuse type の MUC5AC 発現頻度

ペアマッチさせた症例間で検索した陰窩単位での diffuse type の MUC5AC 発現頻度を比較した結果, 9 ペア中 5 ペアにおいて UC-CRC 群の方が diffuse type の MUC5AC 発現頻度が有意に高かった (表 3).

考 察

UC やクローン病などの炎症性腸疾患に大腸癌や小腸癌が発生することがある. 炎症性腸疾患を基にした発癌のなかでは, UC に合併する大腸癌 UC-CRC が注目されており, 同癌は colitic cancer とも呼ばれる. 炎症性腸疾患を合併しない通常の大腸癌の細胞粘液形質は 90% 以上が MUC

5AC 発現を認めないが, UC-CRC では, 高頻度 (60% 以上) に MUC5AC 発現を認める²⁾. MUC 5AC は胃腺窩上皮細胞のコア蛋白であり, 正常の大腸上皮細胞では発現していないため³⁾, UC などの炎症性腸疾患では, 発癌の前段階から慢性持続炎症による大腸上皮細胞の細胞系列変化 (胃化生) が起こっている可能性がある⁴⁾と推定されるが, 慢性持続性炎症粘膜からの発癌過程における背景粘膜の粘液形質変化に関しては十分に解明されていない. 本研究では, UC-CRC の発生には背景粘膜における胃型への粘液形質変化が関与しているという仮説を立て, UC 罹患期間のバイアスを極力排除するためにペアマッチ研究デザインを立案し, 仮説検証を行った. その結果, UC における担癌粘膜では非担癌粘膜に比べ, diffuse type の MUC5AC 発現陰窩の発現頻度が高いことから, 免疫組織化学で同定される diffuse type の MUC5AC 発現陰窩は, UC の発癌高危険群を選別するための指標となる可能性があることを解明した.

欧米では、一般人口に対して、10年以上の長期経過全大腸炎型 UC では大腸癌の発癌リスクが14.8倍高いことが報告されている⁴⁾。Eadenら¹⁾は、UC罹患期間別の大腸癌の累積発生率は、UC罹患期間10年では2.1%、20年では8.5%、30年では17.8%であり、UC罹患期間が長いほど大腸癌の発生リスクは高くなることを報告している。UC-CRC (Colitic cancer) の前癌病変である dysplasia の存在が明らかにされてからは⁵⁾、サーベイランス大腸内視鏡検査による早期発見が重要と考えられるようになった⁶⁾。UC の炎症粘膜に発生する大腸癌は、dysplasia と呼ばれる異型上皮を母地 (前癌病変) として癌が発生するとされている⁵⁾。dysplasia は通常の隆起性病変を呈する大腸腺腫とは異なり周囲非腫瘍性粘膜との境界が不明瞭な平坦な病変であることが多い⁵⁾、大腸内視鏡検査で認識することは困難であるという問題点が存在する。

Borralhoら⁷⁾は、UC 90例を対象として非腫瘍性大腸粘膜の MUC5AC 発現を検討した結果、MUC5AC 発現が陽性であった症例は、63例 (70%) であったと報告した。Borralhoら⁷⁾の MUC5AC 発現陽性判定基準は、上皮細胞が少なくとも10%染色されていると定義しているが、発現様式による分類に関しては言及していない。本研究では、MUC5AC 発現様式を粘膜の表層から中層を中心に散在性に発現を示す sporadic type (図 1a) と粘膜全層 (表層, 中層, 深層) に、びまん性に発現を示す diffuse type (図 1b) とに分類した。その結果、陰窩単位での MUC5AC 発現頻度は、sporadic type, diffuse type ともに UC 対照群と比較して UC-CRC 群の方が陰窩単位での MUC5AC 発現頻度が有意に高かった (表 1)。また、症例単位で MUC5AC 発現頻度を解析した結果 (表 2)、sporadic type の MUC5AC 発現頻度は両群間で明らかな差を認めなかったが、UC-CRC 群では diffuse type の MUC5AC 発現頻度が高かった。以上のことから、UC における慢性持続性炎症粘膜に生じる発癌では、発癌の前段階から慢性持続炎症による胃型への粘液形質変化 (diffuse type の MUC5AC 発現)、つまり大腸上皮

細胞の細胞系列変化 (胃化生) が生じていると考えられる。

Tatsumiら⁸⁾は、UCに関連した大腸腫瘍性病変における MUC5AC 発現を cut-off 値5%以上を陽性とする判定基準を用いて検討した結果、MUC5AC 発現頻度は UC-CRC で73%、high-grade dysplasia 90%、low-grade dysplasia 89%と高いことから、MUC5AC 発現は UC における発癌の初期段階 (dysplasia) から重要な役割を演じており、胃型への粘液形質変化を MUC5AC 発現で評価する方法は、UCに関連した大腸腫瘍性病変の鑑別に有用であると報告している。Dysplasia は大腸内視鏡検査で認識することが困難な場合が多いため、その発見には10cm間隔の盲目的生検⁹⁾¹⁰⁾、色素内視鏡による狙撃生検¹¹⁾¹²⁾が行われてきた。免疫組織化学的手法により MUC5AC 発現を評価する方法論は、大腸内視鏡検査により得られる組織生検材料にも臨床応用可能であり、UCの発癌高危険群を UC 罹患期間 (10年以上) だけでなく、MUC5AC 発現の評価判定により、さらに選別することができる可能性がある。

炎症性腸疾患の代表である UC からの発癌は罹患期間と相関することが知られている¹⁾。UC 罹患期間のバイアスを排除するために立案したペアマッチ研究デザインにより陰窩単位での diffuse type の MUC5AC 発現頻度を比較した結果、UC-CRC 群の方が diffuse type の MUC5AC 発現頻度が有意に高かったことから (表 3)、UC の慢性持続性炎症粘膜における MUC5AC 発現の評価の際には、diffuse type の MUC5AC 発現が発癌高危険状態を示唆する免疫組織学的特徴であると考えられる。

細胞系列変化は、病理組織学的には細胞粘液形質の変化として認識され、近年の粘液に対する分子生物学的アプローチにより、粘液の基本構造であるコア蛋白に対する免疫組織化学により細胞系列の分類が可能になってきた。本研究には、いくつかの制限がある。第一に後ろ向き研究であること、第二に症例数が少ないことである。今後の課題としては、術前大腸内視鏡検査により得られる組織生検材料および切除標本の両者で MUC5AC

発現の比較検討を行う必要がある。さらに大腸内視鏡検査により得られる組織生検材料に対して diffuse type の MUC5AC 発現を前向きに検討し、UC からの発癌を早期発見できるのか検証していく必要がある。

結 論

担癌, 非担癌を問わず, UC の炎症粘膜では胃型への粘液形質変化を認めるが, 担癌粘膜では非担癌粘膜に比べ, diffuse type の MUC5AC 発現陰窩の発現頻度が高いことから, 免疫組織化学で同定される diffuse type の MUC5AC 発現陰窩は, UC の発癌高危険群を選別するための指標となる可能性がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合病院研究科消化器・一般外科分野, 若井俊文教授, 同分子診断病理学分野, 味岡洋一教授に深謝いたします。また, 本研究に関して標本作製の指導を頂きました職員 (山口尚之, 佐藤彩子, 小林和恵) の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Eaden JA, Abrams KR and Mayberry JF: The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48: 526 - 535, 2001.
- 2) Kanoh T, Ajioka Y, Watanabe H and Hatakeyama K: MUC1, MUC2, and MUC5AC mucin core protein expression in ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma. *Acta Medica et Biologica* 52: 21 - 27, 2004.
- 3) Jass JR and Walsh MD: Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J Cell Mol Med* 5: 327 - 351, 2001.
- 4) Ekblom A, Helmick C, Zack M and Adami HO: Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323: 1228 - 1233, 1990.
- 5) Morson BC and Pang LSC: Rectal biopsy as an aid to cancer control in ulcerative colitis. *Gut* 8: 423 - 434, 1967.
- 6) Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C and Gastrointestinal Consortium Panel: Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale - Update based on new evidence. *Gastroenterology* 124: 544 - 560, 2003.
- 7) Borralho P, Vieira A, Freitas J, Chaves P and Soares J: Aberrant gastric apomucin expression in ulcerative colitis and associated neoplasia. *J Crohn's Colitis* 1: 35 - 40, 2007.
- 8) Tatsumi N, Kushima R, Vieth M, Mukaisho K, Kakinoki R, Okabe H, Borchard F, Stolte M, Okanoue T and Hattori T: Cytokeratin 7/20 and mucin core protein expression in ulcerative colitis-associated colorectal neoplasms. *Virchows Arch* 448: 756 - 762, 2006.
- 9) Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC, Ritchie JK and Williams CB: Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 31: 800 - 806, 1990.
- 10) Eaden JA and Mayberry JF: Colorectal cancer complicating ulcerative colitis: a review. *Am J Gastroenterol* 95: 2710 - 2719, 2000.
- 11) Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, Koehler HH, Stolte M, Kanzler S, Nafe B, Jung M, Galle PR and Neurath MF: Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124: 880 - 888, 2003.
- 12) Rutter MD, Saunders BP, Schofield G, Forbes A, Price AB and Talbot IC: Pancolonoscopic indigo carmine dye spraying for the detection of dysplasia in ulcerative colitis. *Gut* 53: 256 - 260, 2004.

(平成 25 年 8 月 27 日受付)