

Helicobacter pylori 除菌後に発見された

早期胃癌の臨床病理学的検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 日本では2008年の大規模無作為試験にて、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 除菌が異時性胃癌の出現を抑制することが初めて証明され、2009年のメタ解析試験により1次癌の予防効果も示唆された。しかしながら、我々は除菌成功症例からの胃癌発症にたびたび遭遇するようになり、臨床現場では除菌成功例をどのように扱うべきかが新たな問題となっている。除菌による胃癌予防効果と限界を検証するために、除菌後に発見される胃癌の臨床的、病理学的特徴を明らかにすることは現段階における胃癌診療において最も必要とされる課題の一つと思われる。一方、1990年代に入り、免疫組織化学の発展により胃癌粘液形質に基づいた胃型腺癌と腸型腺癌の識別が可能となり、胃癌発生～発育の機序解明の一助となりうる事が期待されている。*H. pylori* 除菌成功後に発見された胃癌と、除菌がなされず感染継続中に発見された胃癌を臨床病理学的に比較検討し、除菌が胃癌発育に与える影響につき考察した。

【対象と方法】 1995年から2009年までに北海道大学病院で除菌成功後に経過観察された患者のうち、除菌成功後に発見され切除された早期胃癌17症例18病変を対象とした。これに対し、同時期に内視鏡で発見された*H. pylori*感染胃癌である非除菌胃癌症例の中から年齢、性別、深達度をマッチングさせて無作為に抽出した36症例36病変をコントロール群とし、臨床病理学的検討を行った。切除された病変の病理学的評価は胃癌取り扱い規約(第14版)に基づいて判定した。免疫組織化学染色は、胃型マーカーとしてMUC5AC (CLH2; 1:100, Novocastra, Newcastle, UK)、MUC6 (CLH5; 1:100, Novocastra, Newcastle, UK)を、腸型マーカーとしてMUC2 (Ccp58; 1:100, Novocastra, Newcastle, UK)、CD10 (56C6; 1:50, Novocastra, Newcastle, UK)のモノクローナル抗体を使用した。胃型もしくは腸型いずれかの形質のみが陽性であるものは、それぞれ完全胃型、完全腸型と判断した。胃型、腸型の両方の形質の発現を認める物を、胃腸混合型とし、その形質の比率により、胃型優位混合型、胃＝腸混合型、腸型優位混合型に分類した。そして完全胃型と胃型優位混合型を胃型優位、完全腸型と腸型優位混合型を腸型優位と定義した。さらに、p53タンパク発現と増殖能を調べるため、p53染色(Do-7; 1:300, Novocastra, Newcastle, UK)とKi-67染色(MIB1; 1:200, DAKO, Hamburg, Germany)を行った。背景粘膜に関しては、前庭部大弯、小弯、体中部大弯、小弯、胃角部小弯から生検を行い、組織学的検討を行った。updated Sydney Systemに基づき、それぞれの生検検体についてinflammation、activity、atrophy、intestinal metaplasiaの程度をスコア化した。

【結果】 除菌群における、除菌から癌発見までの期間は中央値31.7ヶ月(0.8-133.8ヶ月)であった。過去1年以内の内視鏡検査の頻度は両群間に差はなかった。肉眼形態は、コントロール群では表面隆起型、陥凹型がほぼ同率で存在したのに対し、除菌群では77.8%が表面陥凹もしくは表面陥凹主体の病変で、コントロール群に比べ有意に多かった。腫瘍径

は除菌群で有意に小さく平均 $9.5 \pm 5.4\text{mm}$ であった。Ki-67 index score は腫瘍サイズに関わらず、除菌群で有意に低かった。粘液形質に関しては除菌群では 13 病変 (72.2%) が胃型優位、4 病変 (22.3%) が腸型優位で胃型形質をもたないものは 1 例のみであった。それに対し、コントロール群では 15 症例 (41.7%) が胃型優位、20 症例 (55.6%) が腸型優位であり、除菌群との間に有意差を認めた。更に 25mm 以内の粘膜内癌に限定すると、胃型優位と腸型優位の比率はそれぞれ除菌群で 84.6%、7.7% に対し、コントロール群で 36.8%、57.9% であり、やはり有意差をもって除菌群で胃型優位が多かった。25mm 以内の粘膜内癌では両群間に腫瘍径の差はなかった。腫瘍径や Ki-67 index score は粘液形質の違いに関わらず、除菌群で小さかった。両群の粘膜内癌 38 病変中で腸型形質を有しているものは 17 病変にとどまっていたのに対して、sm 浸潤癌のほとんど (16 病変のうち 13 病変)、さらに脈管侵襲をきたしているものはすべて腸型形質を有していた。除菌群において、完全胃型のものは除菌後長期を経てから発見されたものが多い傾向があり、除菌後に発生した可能性が予測された。腸型優位の 4 病変のうち、3 病変が除菌後 2 年以内に発見されていた。残りの 1 病変は除菌後 59 ヶ月で発見されているものの、既に 10mm、sm 浸潤をきたすまでに成長しており、除菌時には既に存在していた可能性が考えられた。sm 浸潤をきたしている病変はすべて腸型の形質をもっていた。腸型形質をもつものは、除菌時には既に存在しており、除菌前の環境で既に腸型化された可能性が考えられた。背景粘膜は慢性炎症、活動性は除菌後で score が低く、萎縮、腸上皮化生に関しては前庭部小弯や体部で特に除菌後群の score が低かった。

【考察】 一般に、胃癌は胃型の形質を保持したまま発生するとされる。成長するにつれ増殖帯付近で腸型形質を獲得し、その後、腸型成分は増殖帯を超えて広がり、いずれ腫瘍全体が腸型優位の形質に移行していく (腸型化)。今回の研究では、sm 癌のほとんど、また脈管侵襲をきたしているものはすべて腸型の形質を有しており、腸型化の仮説をうらづける結果となっている。Mizoshita らの報告によると、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine によって Mongolian gerbils に誘発させた *H. pylori* 陰性胃癌は全て完全胃型の粘液形質であった。それに対し、同薬剤で発癌に至らせた *H. pylori* 感染の胃癌では 56% が腸型形質を有していたことより、*H. pylori* が、正常粘膜と同様に癌組織における腸型化を誘発する可能性を示した。除菌後胃癌については、N-methyl-N-nitrosourea を投与し *H. pylori* に感染させたグループとその後除菌を施したグループで発生した胃癌の粘液形質を比較検討し、除菌後では完全胃型の割合が多い傾向が見られ、特に除菌後発生の分化型癌はすべて完全胃型を示した。

本研究はヒトにおける除菌後胃癌の粘液形質に関する初めての報告である。除菌群で胃型優位の腫瘍が多く、除菌治療により胃癌発育過程における腸型化が抑制されている可能性が考えられた。しかし、もともと今回の対象となった除菌群はコントロール群と比べ腫瘍径が小さかったことより、胃癌発育の初期の段階をみている可能性があった。そこで、発育段階をより詳細にあわせるため、25mm 以内の粘膜内癌に限定して検討したところ、両群間に腫瘍径の差はなく、かつ、除菌群で胃型形質が有意差をもって多いという結果であった。除菌群では *H. pylori* が完全に排除された環境で発生し成長した純粋な除菌後発生胃癌から、除菌前に発生し *H. pylori* の影響を受けながら発育した癌まで存在し、その違いは少なからず発見時の粘液形質に影響していると思われた。そこで、除菌から癌発見までの期間と、腫瘍径をもとに、発生・発育過程のどの時点で除菌が介入したかを推測し、粘液形質の違いを比較した。個々の臨床病理学的情報から、腸型形質を保有する症例は除菌前にすでに腸型化が生じていた可能性が考えられたが、除菌後発生癌、見逃し癌、潜在癌を明確に判断することは困難であった。明らかな傾向は見いだすためには、今後除菌後長期を経て発見された症例の蓄積が必須である。一方、今回のデータより、同じ粘液形質や組織型であっても除菌後発見されたものは Ki-67 index score や腫瘍径が小さく、除菌によって増殖能が抑制される可能性が考えられた。*H. pylori* が増殖動態に直接的な影響を与えている可能性が考えられる。陥凹型の腫瘍形態には、腫瘍増殖能のほかにも除菌後の胃内環境の変化が影響していると考えられる。背景粘膜は除菌群で萎縮 score が低い傾向があった。

除菌後の高酸状態が癌の表層への発育を阻害していた可能性が考えられる。

【結論】 *H. pylori* 除菌により腫瘍増殖能および腸型化が抑制される可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松野吉宏
副査	教授	浅香正博
副査	教授	藤堂省
副査	教授	山本有平
副査	准教授	飛驒一利

学位論文題名

Helicobacter pylori 除菌後に発見された

早期胃癌の臨床病理学的検討

申請者は主に免疫組織化学の手法を用い、*H. pylori* 除菌成功後に発見された胃癌と、除菌がなされず感染継続中に発見された胃癌を、臨床病理学的に比較検討し、除菌が胃癌発育に与える影響につき考察した。除菌群では有意に表面陥凹型が多く、腫瘍径や Ki-67 index は小さかったことより除菌によって増殖能が抑制される可能性が考えられた。粘液形質に関してはコントロール群に比べ除菌群で胃型優位のものが多かった。一般に、胃癌は胃型の形質を保持したまま発生し、成長するにつれ腸型化していくとされる。本研究はヒトにおける除菌後胃癌の粘液形質に関する初めての報告であり、除菌治療により胃癌発育過程における腸型化が抑制されている可能性が考えられた。

審査会では、学位論文内容の発表後、副査の山本有平教授から、*H. pylori* 以外の腸型化に関わる因子の有無を問われた。申請者は *H. pylori* の病原因子である CagA が腸型化を引き起こしているとする説もあるが、決定的な因子や機序解明には至っていないのが現状であると回答した。また、腫瘍が悪性度は腸型の方が高いのかとの問いに、申請者は腸型で悪性度が高いとする説の根底にあるのは、成長に伴い腸型化するという特徴が理由であるが、胃型癌では、E-cadherin の遺伝子異常の頻度が高く、これにより低分化型の形態やリンパ管侵襲の頻度が高いため生物学的悪性度が高いとする主張もあり、一定の見解が得られていない現状を述べた。続いて、副査の飛驒一利准教授から見落とし症例は対象から外した方がよかったのではないかと指摘が出た。これに対し申請者は、純粋な除菌後発生癌と潜在癌、見落とし癌を臨床的に明確に区別するのは事実上困難であるため、過去の内視鏡検査画像を見返して明らかな見落としと判断したもの以外は対象に入れていること、更に症例を増やすことによって、それぞれの相違点が顕著化し、鑑別が可能になるかもしれないと述べた。また、成長につれ腸型化していくにも関わらず、データで Ki67 index が腸型で低いのはなぜかとの問いに対し、Ki67 index だけで生物学的悪性度を判断できないこと、

明らかな機序は不明だが、胃型の段階では複製が盛んに行われ、腸型化するとその段階を終え組織浸潤など、増殖の方向性に違いがある可能性が推測されると回答した。続いて、副査の藤堂省教授からは感染率と発癌率の相関についての質問があった。申請者は、東アジアで単離される *H. pylori* はほとんどが病原因子の CagA を持っているのに対し、欧米では 30~40%程度とされ、このことが、欧米とアジアにおいて感染率と発がん率の相関が一致しない原因と思われると回答した。次に胃癌で除菌した 4 例は他と比べ、何か違いがあったかとの問いに対し、本研究では個別に検討はしていないが、以前に別の研究で異時性胃癌の粘液形質を検討したことがあるが、明らかな傾向は見いだせなかったと述べた。続いて、主査の松野吉宏教授は、今回の結果からは除菌が発育抑制をする可能性については言えるが、胃癌予後を改善することまでは言及できないことを指摘した。*H. pylori* 陰性など、将来的に増加するであろう胃癌についての研究はどう考えるかとの問いに、申請者は若年者に発生する *H. pylori* 陰性胃癌と、除菌後発生胃癌が胃癌研究における今後の課題となるが、*H. pylori* にいちど暴露されたか否かで、その特徴に違いがあることが予想されるので感染歴を明確に分けて研究することの重要性を述べた。除菌群の特徴には内視鏡検査の頻度等が、影響しているのではないかと問いには、両群において過去 1 年以内の検査回数に差がなく、病期を合わせるために深達度を合わせたことで両群の背景に一致性を持たせたと答えた。続いて、副査の浅香正博教授から粘液形質に対する欧米の反応に関する質問があった。この分野は日本と韓国のからの報告がほとんどで、欧米からはあまり評価されないことを述べた。浅香教授は早期胃癌の診断自体が、欧米に浸透していない問題点についてコメントを加えた。また、臨床では今後、除菌後の症例をどのように扱っていくべきかとの問いに、除菌後であっても年 1 回の内視鏡検査をうけるのが妥当で、この問題を解決するには更なる研究が必要であると回答した。また、今後はどのように研究を広めていくかとの問いに、申請者は多施設研究として症例数の追加、進行胃癌の検討（深部浸潤部や遠隔転移組織の形質など）、CDX2 や SOX2 などのホメオボックス遺伝子レベルの発現様式の調査などを行っていきたいと回答した。

この研究は *H. pylori* 除菌後に発生する胃癌について臨床病理学的に検討した最初の論文であり、胃の発癌に対する除菌の影響を明らかにした点で今後の胃癌撲滅への貢献が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。