

令和元年6月24日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08955

研究課題名(和文) 胃癌の形質発現に関するエピジェネティクスネットワークの解明

研究課題名(英文) Epigenetic Mechanism Underlying Mucins in Gastric cancer

研究代表者

林 香月 (Hayashi, Kazuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00405200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の臨床検体の遺伝子発現、DNAメチル化、遺伝子変異を解析することで、胃腸形質発現を認めないNull型胃癌はDNAメチル化を多く認めるCIMP陽性胃癌と同様の群であることがわかった。形質発現の消失はDNAメチル化による遺伝子発現抑制が原因と推察される。また、Null型胃癌は、DNAメチル化によるミスマッチ修復遺伝子の発現抑制によって遺伝子変異を他の群に比して多くみとめる。さらに、PIK3CAの変異を高頻度に見とめることよりEBV関連胃癌がNull型に含まれることがわかった。CD274とPDCD1の発現が他の群に比して高値であり、Null型胃癌には免疫療法での治療効果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の粘液性質の分類で、形質発現を認めないNull型に関して、その分子生物学的な特徴は十分に報告されていない。また、Null型は予後が悪いことでも知られており、適切な薬物療法の開発が望まれている。本研究でNull型胃癌はDNAメチル化を多く有し、悪性化にDNAメチル化が関連していることがわかった。また、EBウイルス胃癌もNull型に多く含まれることや、CD274とPDCD1の発現が高値であることから免疫チェックポイント阻害剤が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed mRNA profile and DNA methylation status, gene mutations of Gastric cancer. We divided into 4 groups from mucin phenotype based on expression status of MUC2, CDX2, VIL1, ALPI. In Null type gastric cancer, which do not express any phenotypic markers, aberrant DNA methylation were enriched, suggesting that these are CpG island methylator phenotype (CIMP). Mutation rate of Null Type gastric cancer is higher than that of the other type gastric cancer because of silencing of mismatch repair gene induced by DNA methylation. PIK3CA mutation were enriched in Null type gastric cancer. It means EB virus associated gastric cancer were involved in Null type gastric cancer. Expression of CD274 and PDCD1, which known as target of immune checkpoint inhibitor, were higher than that of the other group. These data suggest that immune checkpoint inhibitor might be effective in Null type gastric cancer.

研究分野：消化器癌

キーワード：胃がん エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

消化管や膵・胆道系の上皮はすべて、化生や癌化のプロセスを経て、進化上最も古い臓器である腸に変化することが知られるが、この過程にどんな分子メカニズムが働くのかはほとんど不明である。また、それぞれの上皮に由来する癌は大体において、それぞれに特有な悪性度や生物学的特徴を持ち、あたかも由来組織の記憶を保っているように見える。大腸癌は、肝や肺転移しても胃癌の例より明らかに予後が良いが、申請者らの研究から、腸型胃癌は、大腸癌に類似するように予後が良いことが分かっている（*J Cancer Res Clin Oncol*,129:727-34,2003）。さらに、腸型形質胃癌の遺伝子は、大腸癌で高頻度に見られるβカテニン系の異常が多い事実を見いだした。βカテニン系の多くの遺伝子や、腸型上皮の分化に関わるCDX2遺伝子、胃型形質に関わるSOX2遺伝子は、発生過程においてエピゲノムにより制御されており、癌の形質は発生母地のエピゲノムメモリーにより特徴づけられるとの仮説の下、本研究の着想に至った。

胃癌を従来の組織的分類ではなく、癌に発現する胃腸の形質を検討して分類すると、胃型、胃腸混合型、腸型、いずれの形質も発現しない胃腸陰性型（Null型）に分類することができる。申請者らはこれらの胃癌のエピゲノムを、胃・腸メモリーの観点から、胃腸陰性型に分類される胃癌の解析は重要であると考え、胃腸陰性型胃がんは胃型ともに最も予後が悪い胃癌であることが知られているが（図1）、これまで胃腸陰性型胃癌については分子生物学的にほとんど解析されておらず、その詳細については不明な点が多い。胃腸形質を発現しない機序に加えて、腸上皮化生あるいは胃固有粘膜から発生するかも推定できていない。これらの背景から、本研究では胃腸のもつエピゲノムメモリーの解析は、胃型、腸型胃癌のみならず、Null型胃癌の病態を解明する大きな契機となる可能性が高い

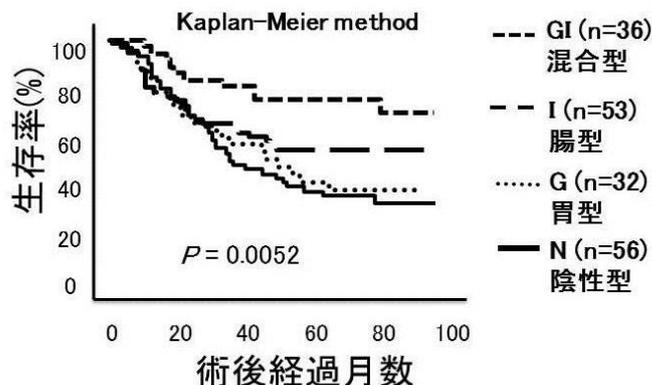


図1 形質発現と進行胃癌の予後との関連

2. 研究の目的

本研究では、多様性が顕著な胃癌において、申請者らが一貫して報告してきた「腸形質発現胃癌は大腸癌の性質を有する」事実を腸のエピゲノムメモリーの観点で解析する。胃型、腸型、混合型、胃腸陰性型胃癌のエピゲノムプロファイルを腫瘍発生およびlineage-specificな分化に関わるエピゲノム変化を同定することが可能となる。

また、予後が悪いことが知られている胃型とNull型の胃癌、一方で予後は比較的良いとされる腸型の粘液性質を有する腸型胃癌、混合型胃癌、これらの分類にもとづくエピゲノムプロファイルリングを同定することで、胃癌の悪性度に関わるエピゲノムマーカーを同定することを期待する。

分類不能型の胃癌に関しては分子生物学的な解析が少なくその詳細については不明な点が多い。したがってNull型の胃癌には特徴的なジェネティック・エピジェネティックな遺伝子異常が存在すると推測される。本研究では、Null型の胃癌に関わるエピゲノム異常を明らかにするとともに、その発生に特徴的なDNAメチル化異常を利用した、前癌病変および早期癌の診断マーカーの同定を目指す

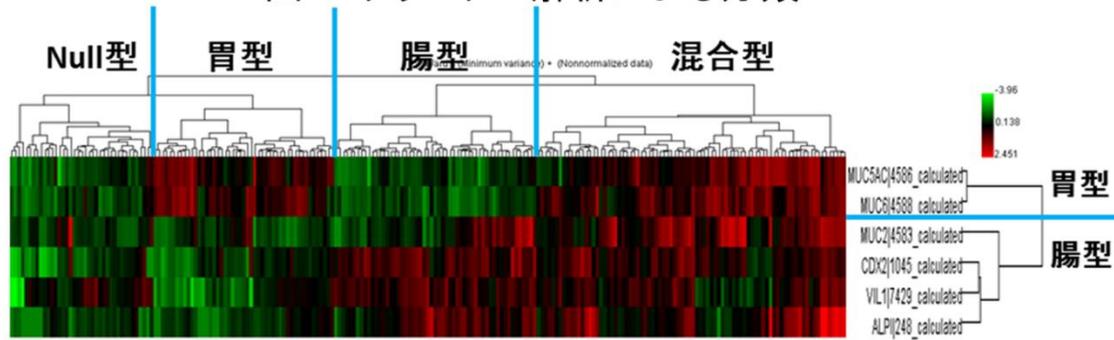
3. 研究の方法

自施設の臨床検体を中心とした研究を予定していたが、TCGA等の遺伝子網羅的なデータを使用することで偏りのない検体をもとにした検討が可能と考え使用可能なデータベースを使用し解析を始めた。TCGAのデータより胃癌と正常胃粘膜228例のデータを用いてRNAseq, exom, DNAメチル化の解析をした。解析対象は胃型のマーカーと腸型のマーカーの遺伝子発現をもとに混合型、腸型、胃型、Null型の4群に分類した。

4. 研究成果

胃癌と正常胃粘膜228例のRNAseqのデータを用いて、胃型のマーカーであるMAC5AC, MAC6、そして腸型のマーカーであるMUC2, CDX2, VIL1, ALPIのRPKMをZ-scoreで標準化しクラスター解析を施行した。（図2）

図2 クラスタ解析による分類

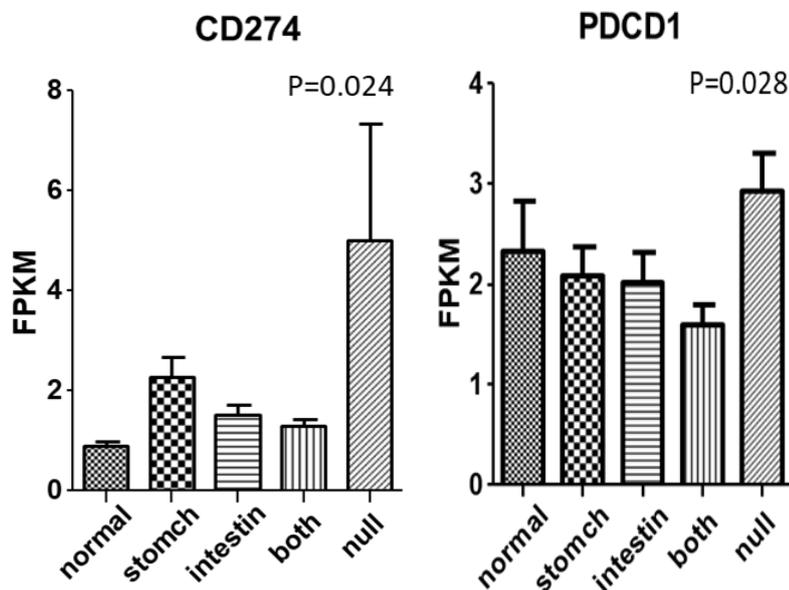


クラスタ解析では、腸型 55 例、胃型 49 例、Null 型 39 例の 4 群に明確に分類された。クラスタ解析に正常胃粘膜 22 例を加えて解析すると癌は同様に分類され、正常粘膜は 13 例が混合型、8 例が胃型、1 例が Null 型に分類された。これより正常組織での混合型は腸上皮化生に伴う遺伝子発現変化であることが示唆された。次にイルミナ 450K アレイのプロンプでプロモーター領域の CpG アイランドに存在するプロンプを選択し、DNA メチル化のプロファイルからクラスタ解析を施行し対象症例を分類した。その結果、DNA メチル化が高頻度に認められる CIMP-high 症例の 73% は Null 型であることが明らかとなった。この結果は、DNA メチル化による MAC5AC、MAC6、MUC2、CDX2、VIL1、ALPI の発現抑制が原因で Null 型に関与していることを示唆していると考えられる。

次に RNAseq に基づき分類されたサンプル (混合型 62 例、腸型 48 例、胃型 36 例、Null 型 35 例) の遺伝子変異を exom のデータを解析し検討した。変異を認める遺伝子数は混合型で 159 ± 643 遺伝子、腸型で 213 ± 734 遺伝子、胃型で 288 ± 527 遺伝子、Null 型で 303 ± 157 遺伝子であり、Null 型は遺伝子変異数が比較的多い均一な集団であることがわかった。一方でその他の群では遺伝子変異の少ない症例と遺伝子変異が極めて多い症例の混在した集団であることがわかる。次にマイクロサテライト不安定性 (MSI) の原因を考えるために、既知のミスマッチ修復遺伝子 (MSH2、MSH3、MSH4、MSH5、MSH6、MLH1、MLH3、PMS2) の変異を検討した。ミスマッチ修復遺伝子の変異の頻度は Null 型では 3% にとめたが、その他の群では 12~13% の頻度でミスマッチ修復遺伝子の変異をみとめた。DNA メチル化の解析より Null 型は DNA メチル化を多く認める集団であった、したがって Null 型では MLH1 のメチル化などのミスマッチ修復遺伝子のメチル化を原因とする MSI が主体と考えられた。この Null 型では PIK3CA の変異が 34% と高率であることから、TCGA 分類での EBV 関連胃がんも Null 型に含まれることが分かった。DNA メチル化プロファイルの違いを生ずる原因を検討するため DNA 脱メチル化酵素である TET1、TET2、TET3 の遺伝子変異を検討した。その結果、混合型で 16%、腸型で 13%、胃型で 8%、Null 型で 3% であった。TET は脱メチル化酵素でありその活性が強くなると脱メチル化が進行すると推測される。したがって TET の変異が機能獲得変異であれば Null 型で変異が少なく、混合型で変異が多いことが説明可能である。変異の部位と hot spot の有無に関して検討が必要である。同様に DNA メチル化異常の原因として知られる IDH1/2 についても検討したが、変異はすべての群で 2~3% と同等であり関与は否定的と考えられた。

胃がんの化学療法として、nivolumab による免疫療法が保険適応となっている。免疫療法に対する反応性を考え CD274 (PDL-1)、PDCD1 (PD1)、PDCD2L (PDL-2)、CTLA4 の発現を比較した。分散分析にて CD274 と PDCD1 の発現が Null 型では有意に高値であった。($P=0.024$ 、 $P=0.028$)

本研究より Null 型の胃癌は、DNA メチル化によってその形質発現が抑制されており、DNA メチル化を高頻度に認める CIMP 陽性胃癌と類似していることがわかる。また、MSI 陽性率が高く、



PD1 と PDL1 の発現が有意に高値であることがわかった、したがって免疫療法での治療が有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

- ①Hori Y, **Hayashi K**, Sobajima Y, Naitoh I, Miyabe K, Yoshida M, Kataoka H. Successful peroral endoscopic removal of migrated metal stent. *Endoscopy*. 2019 Jun 4. doi: 10.1055/a-0915-1756. 【査読あり】
- ②Hori Y, Yoshida M, **Hayashi K**, Naitoh I, Kato A, Miyabe K, Kataoka H. Endoscopic drainage using a lumen-apposing metal stent under contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography guidance. *Endoscopy*. 2019 Apr 12. doi: 10.1055/a-0875-3546. 【査読あり】
- ③Hori Y, **Hayashi K**, Naitoh I, Kato H, Nomura T, Miyabe K, Yoshida M, Jinno N, Natsume M, Kato A, Asano G, Takiguchi S, Nakajima K. Feasibility and safety of duodenal covered self-expandable metallic stent fixation: an experimental study. *Surg Endosc*. 2019 Feb 13. doi: 10.1007/s00464-019-06694-1. 【査読あり】
- ④Zhang H, Pandey S, Travers M, Sun H, Morton G, Madzo J, Chung W, Khowsathit J, Perez-Leal O, Barrero CA, Merali C, **Okamoto Y**, Sato T, Pan J, Garriga J, Bhanu NV, Simithy J, Patel B, Huang J, Raynal NJ, Garcia BA, Jacobson MA, Kadoch C, Merali S, Zhang Y, Childers W, Abou-Gharbia M, Karanicolas J, Baylin SB, Zahnow CA, Jelinek J, Graña X, Issa JJ. Targeting CDK9 Reactivates Epigenetically Silenced Genes in Cancer. *Cell*. 2018 Nov 15;175(5):1244-1258.e26. 【査読あり】
- ⑤Kato A, Naitoh I, Miyabe K, **Hayashi K**, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Jinno N, Asano G, Kato H, Kuno T, Takahashi S, Kataoka H. An Increased Chromosome 7 Copy Number in Endoscopic Bile Duct Biopsy Specimens Is Predictive of a Poor Prognosis in Cholangiocarcinoma. *Dig Dis Sci*. 2018 Dec;63(12):3376-3381. 【査読あり】
- ⑥Hori Y, Naitoh I, Miyabe K, Yoshida M, Kato A, Jinno N, **Hayashi K**. Simultaneous side-by-side bilateral metal stent placement using a colonoscope in a patient with Billroth II reconstruction. *Endoscopy*. 2018 Aug;50(8):E218-E219. 【査読あり】
- ⑦Hori Y, Naitoh I, **Hayashi K**, Miyabe K, Yoshida M, Fujita Y, Natsume M, Jinno N, Kato A, Nakazawa T, Shimizu S, Hirano A, Okumura F, Ando T, Sano H, Takada H, Togawa S, Joh T. The utility and efficacy of self-expandable metal stents for treating malignant gastric outlet obstructions in patients under best supportive care. *Support Care Cancer*. 2018 Oct;26(10):3587-3592. 【査読あり】
- ⑧Kato A, Naitoh I, Kato H, **Hayashi K**, Miyabe K, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Jinno N, Yanagita T, Takiguchi S, Takahashi S, Joh T. Case of pancreatic metastasis from colon cancer in which cell block using the Trefle® endoscopic scraper enables differential diagnosis from pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2018 Mar 15;10(3):91-95. 【査読あり】
- ⑨Yoshida M, Marumo Y, Naitoh I, **Hayashi K**, Miyabe K, Nishi Y, Fujita Y, Jinno N, Hori Y, Natsume M, Kato A, Iida S, Joh T. Autoimmune Hemolytic Anemia Obscured by the Obstructive Jaundice Associated with IgG4-related Sclerosing Cholangitis in a Patient with Type 1 Autoimmune Pancreatitis: A Case Report and Review of the Literature. *Intern Med*. 2018 Jun 15;57(12):1725-1732. 【査読あり】
- ⑩Hori Y, Naitoh I, **Hayashi K**, Kondo H, Yoshida M, Shimizu S, Hirano A, Okumura F, Ando T, Jinno N, Takada H, Togawa S, Joh T. Covered duodenal self-expandable metal stents prolong biliary stent patency in double stenting: The largest series of bilioduodenal obstruction. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Mar;33(3):696-703. 【査読あり】
- ⑪Sato T, Cesaroni M, Chung W, Panjarian S, Tran A, Madzo J, **Okamoto Y**, Zhang H, Chen X, Jelinek J, Issa JJ. Transcriptional Selectivity of Epigenetic Therapy in Cancer. *Cancer Res*. 2017 Jan 15;77(2):470-481. 【査読あり】
- ⑫Kato A, Kataoka H, Yano S, **Hayashi K**, Hayashi N, Tanaka M, Naitoh I, Ban T, Miyabe K, Kondo H, Yoshida M, Fujita Y, Hori Y, Natsume M, Murakami T, Narumi A, Nomoto A, Naiki-Ito A, Takahashi S, Joh T. Maltotriose Conjugation to a Chlorin Derivative Enhances the Antitumor Effects of Photodynamic Therapy in Peritoneal Dissemination of Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2017 Jun;16(6):1124-1132. 【査読あり】
- ⑬Hori Y, Naitoh I, **Hayashi K**, Ban T, Natsume M, Okumura F, Nakazawa T, Takada H, Hirano A, Jinno N, Togawa S, Ando T, Kataoka H, Joh T. Predictors of stent dysfunction after self-expandable metal stent placement for malignant gastric outlet obstruction: tumor ingrowth in uncovered stents and migration of covered stents. *Surg Endosc*. 2017 Oct;31(10):4165-4173. 【査読あり】
- ⑭Hori Y, **Hayashi K**, Yoshida M, Naitoh I, Ban T, Miyabe K, Kondo H, Nishi Y, Umemura S, Fujita Y, Natsume M, Kato A, Ohara H, Joh T. Novel characteristics of traction force in biliary self-expandable metallic stents. *Dig Endosc*. 2017 May;29(3):347-352. 【査読あり】
- ⑮Hori Y, Naitoh I, **Hayashi K**, Ban T, Natsume M, Okumura F, Nakazawa T, Takada H, Hirano A, Jinno N, Togawa S, Ando T, Kataoka H, Joh T. Predictors of outcomes in patients

undergoing covered and uncovered self-expandable metal stent placement for malignant gastric outlet obstruction: a multicenter study. *Gastrointest Endosc.* 2017 Feb;85(2):340-348.e1. 【査読あり】

⑩ Tahara T, Shibata T, **Okamoto Y**, Yamazaki J, Kawamura T, Horiguchi N, Okubo M, Nakano N, Ishizuka T, Nagasaka M, Nakagawa Y, Ohmiya N. Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer. *Oncotarget.* 2016 Jul 5;7(27):42252-60. 【査読あり】

〔雑誌論文〕（計 1 件）

肝炎ウイルス感染が肝細胞に及ぼすエピジェネティックな影響 岡本泰幸
肝胆膵 76(5): 867-872, 2018.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：溝下 勤

ローマ字氏名：Mizoshita Tsutomu

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：40347414

研究分担者氏名：岡本 泰幸

ローマ字氏名：Okamoto Yasuyuki

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名： 研究員

研究者番号（8桁）：60444973

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。