

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19087

研究課題名(和文)胃癌におけるドライバー遺伝子の変化に及ぼすヘリコバクター・ピロリの役割

研究課題名(英文)Alteration of driver gene in hyperplastic polyp-associated gastric cancer

研究代表者

羅 奕 (Luo, Yi)

奈良県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30633797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌における早期遺伝子変化を腺窩上皮過形成ポリープに発生する腺癌により検討した。22例の過形成ポリープのうち高度異型性や乳頭管状腺癌が5例に認められ、いずれもH. pylori陰性・CDX2陰性で、すべての症例にBRAF:V600E変異が認められた。BRAF変異は胃癌ではまれであり、ピロリ菌によりBRAF変異に変化が生じる可能性を考え、ピロリ菌の影響のないBRAF変異陽性A375メラノーマ細胞にCagA遺伝子を導入し38週EGF処理を行った。この結果BRAF:V600Eは検出されたがBRAF阻害剤感受性は消失し、CagAによる新たなドライバー変化の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To assess the early carcinogenesis of stomach, we examined hyperplastic foveolar polyps (HFP). The 22 HFPs contained 3 mild dysplasia, one moderate dysplasia, 3 severe dysplasia, and 2 cancers. Five cases of severe dysplasia and cancer showed papillotubular structure and marked accumulation of 80HdG. All 5 cases is negative for H. pylori. Intestinal phenotype examined by CDX2, MUC2, CD10 was found only in a small part of the only two cases. In the five cases, mutation in BRAF codon 600 (V:GTG to E:GAG) was observed. The BRAF:V600E is known as a rare mutation in gastric cancer. To investigate the effect of H. pylori infection to BRAF mutation, A375 melanoma cell line carrying BRAF:V600E was transfected with CagA and continuously treated with EGF for 38 weeks. After treatment, A375 cells expressed CDX2. BRAF:V600E was still detected; however, vemurafenib sensitivity was disappeared. These data suggest that H. pylori infection abrogate the advantage of BRAF mutation.

研究分野：分子病理学

キーワード：胃癌 ドライバー遺伝子 ピロリ菌

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌においては、肺癌・膵癌・大腸癌などと異なりドライバー遺伝子と呼ばれる癌進展に強力な役割を果たす特定の遺伝子変異が乏しいことが知られる。HER2 や c-Met の増幅等の遺伝子増幅は報告されているが、点突然変異は p53 を除き高頻度のもは見られず、大腸癌や膵癌で高頻度に検出される K-ras や B-raf の点突然変異もまれである。一方、胃癌がヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)の影響を強く受け、99%の胃癌ではピロリ菌が発癌の母床の形成、あるいは、発癌過程における修飾として、胃癌発生を強力に促進することが知られる。その影響は、酸化ストレスの発生、エピジェネティックな変化の誘導、cagA 導入による増殖促進など多岐にわたっている。そこで、胃癌にも他の消化器癌に見られるドライバー遺伝子変化が早期には存在しているが、ピロリ菌感染の影響により消失した可能性の検討が必要と考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、胃癌発がん早期には進行癌では認められない遺伝子変異が存在するがピロリ菌による影響により「上書き」され消失したという仮説を検討するため、超早期胃癌における遺伝子異常を検索し、進行癌では見られない変異の有無を検討する。さらに、培養系によりピロリ菌に起因する影響を細胞培養系でシミュレートし、長期処理することによりドライバー遺伝子に対する影響の有無、新たに生じる遺伝子やシグナル系の変化について検討を行う。本研究から得られる知見により、ドライバー遺伝子成立の機構や胃癌における特異性が解明され、新たな治療標的の抽出に結び付くと期待される。

### 3. 研究の方法

ピロリ菌の影響の乏しい超早期の胃癌におけるドライバー遺伝子を検討することで、上記の可能性について何らかの糸口が発見できると考え、胃腺窩上皮型過形成ポリープから発生する腺癌について検討を行った。22例の過形成ポリープについて病理組織学的評価、ピロリ菌感染状態、および、遺伝子変化について検討を行った。さらに、ピロリ菌感染の影響のないヒトメラノーマ細胞株(A375)に CagA 処理を行い、B-raf 突然変異に対する影響を検討した。さらに A375 の B-raf 突然変異のクローナルな変化を解明するためバーコーディング技術による解析を行った。

### 4. 研究成果

22例の腺窩上皮過形成ポリープを検討した。21例中過形成性上皮に、軽度異型を伴うもの3例、中等度異型を伴うもの1例、高度異型を伴うもの3例、癌を伴うもの2例であった。図1には、腺窩上皮過形成ポリープ先端部の早期腺癌と周囲の腺窩上皮の過形

成性変化の組織像を示した。

Case 21

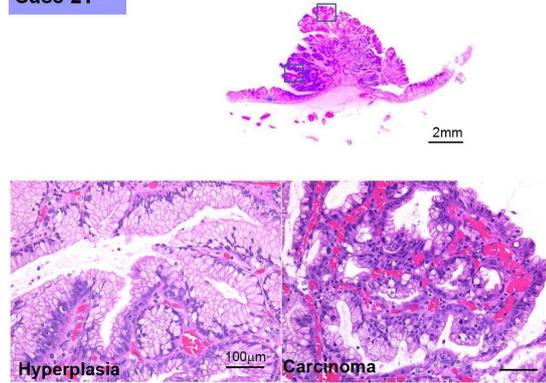


図1

高度異型症例・癌症例では、ポリープ内に有意に広範囲な炎症性肉芽組織が見られ高度の 8OHdG 蓄積が認められた。高度異型病変・癌病変には、乳頭管状構造が認められ、PAS 陽性粘液の産生は低下していた。この5例は、組織学的には全例 H.pylori 陰性であり、CDX2, MUC2, CD10 の腸型形質は2例のごく一部にのみ認められた。一方、この5例では、p53 免疫染色陽性であり、BRAF codon 600 に V(GTG)→E(GAG)の突然変異が認められ、MIB1 index は70%以上であった。また、Olfactomedine-4 陽性細胞の増加も認められた。図2には、腺癌部分における 8OHdG の貯留、高い MIB-1 陽性細胞数、および、p53 核内貯留を免疫染色で検討した結果を示した。

Case 19

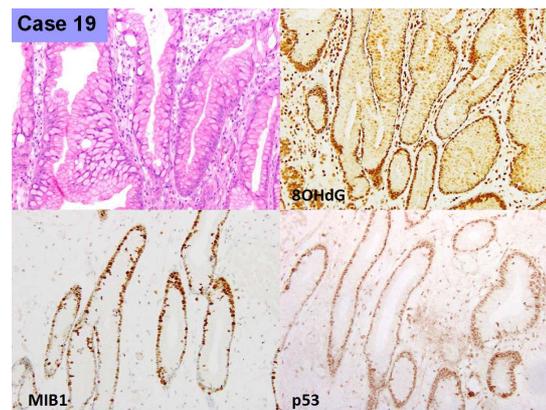


図2

次に、ドライバー遺伝子変異に対するピロリ菌の影響を検討した。BRAF:V600E 突然変異を有する A375 メラノーマ細胞に CagA 遺伝子を導入した上で 38 週にわたり EGF 処理を行った。この結果、処理株では BRAF:V600E が検出されたが CDX2 発現が認められた。さらに、親株は BRAF 阻害剤ベムラフェニブ感受性であったが、処理株ではその感受性が消失していた。このため、CagA の影響により BRAF:V600E を「上書き」するドライバー変化が新たに生じた可能性が考えられた。

しかし、もともとの細胞集団が BRAF 遺伝子異常について不均一であった可能性が

あり、CagA 導入と EGF による連続処理により癌細胞にもともと存在した B-raf 突然変異を欠くサブクローンの選択が生じた可能性も否定できない。このため、バーコーディング技術により個々の細胞に「背番号」を振り、単一細胞由来のクローンにおける BRAF 遺伝子異常の変化、BRAF 分子標的薬感受性低下を検討し、該当するクローンを抽出し全ゲノムシーケンシングを施行し、新規な遺伝子異常を同定することとした。BRAF 変異型の A375 ヒト・メラノーマ細胞株に A/T と C/G を交互に合計 30 塩基の長さでランダムに配置した「バーコーディング配列」を導入したのち CagA+EGF を 40 週にわたり連続処理した。その後、BRAF 阻害薬であるベムラフェニブを用いて阻害実験を行ったところ、阻害をされない細胞の増殖が認められた。これらについてバルクでシーケンシングを行ったところ野生型の BRAF 配列が確認された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Nakashima C, Shingo K, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Kawahara I, Goto K, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Expression of long-chain fatty acid receptor GPR40 is associated with cancer progression in colorectal cancer: A retrospective study. *Oncol Lett.* 2018;15(6):8641-8646. doi: 10.3892/ol.2018.8383.

Nakashima C, Yamamoto K, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Matsushima S, Fujii K, Ohmori H, Sasahira T, Sasaki T, Kitadai Y, Kirita T, Kuniyasu H. Expression of cytosolic malic enzyme (ME1) is associated with disease progression in human oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2018;109(6):2036-2045. doi: 10.1111/cas.13594.

Kishi S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Kawahara I, Goto K, Fujii K, Ohmori H, Nakashima C, Sasaki T, Kuniyasu H. Pro-metastatic signaling of the trans fatty acid elaidic acid is associated with lipid rafts. *Oncol Lett.* 2018;15(4):4423-4426. doi: 10.3892/ol.2018.7817.

Tanabe E, Kitayoshi M, Fujii K, Ohmori H, Luo Y, Kadochi Y, Mori S, Fujiwara R, Nishiguchi Y, Sasaki T, Kuniyasu H. Fatty acids inhibit anticancer effects of 5-fluorouracil in mouse cancer cell lines. *Oncol Lett.* 2017;14(1):681-686. doi: 10.3892/ol.2017.6190.

Kadochi Y, Mori S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Nishiguchi Y, Kishi S, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Remodeling of energy metabolism

by a ketone body and medium-chain fatty acid suppressed the proliferation of CT26 mouse colon cancer cells. *Oncol Lett.* 2017;14(1):673-680. doi: 10.3892/ol.2017.6195.

Mori S, Kadochi Y, Luo Y, Fujiwara-Tani R, Nishiguchi Y, Kishi S, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Proton pump inhibitor induced collagen expression in colonocytes is associated with collagenous colitis. *World J Gastroenterol.* 2017;23(9):1586-1593. doi: 10.3748/wjg.v23.i9.1586.

Fujii K, Luo Y, Fujiwara-Tani R, Kishi S, He S, Yang S, Sasaki T, Ohmori H, Kuniyasu H. Pro-metastatic intracellular signaling of the elaidic trans fatty acid. *Int J Oncol.* 2017;50(1):85-92. doi: 10.3892/ijo.2016.3797.

[学会発表](計 23 件)

川原 勲, 宮川良博, 森 拓也, 後藤 桂, 羅 奕, 西口由希子, 國安弘基. 長鎖脂肪酸のがん間質細胞を介したがん幹細胞性の誘導. 第 107 回日本病理学会総会、札幌市、2018.6.21-23

羅 奕, 谷 里奈, 西口由希子, 岸 真吾, 國安弘基. 胃癌におけるドライバ遺伝子変化の検討. 第 28 回日本消化器癌発生学会・第 9 回国際消化器癌発生会議、熊本市、2017.11.17-18

Kishi S, Kuniyasu H, Honoki K, Fujiwara-Tani R, Mori S, Luo Y, Nishiguchi Y, Tsujiuchi T, Tanaka Y. Pterostilbene inhibits cell growth through suppression of stemness in osteosarcoma cells. 76th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2017.9.28-30

Kuniyasu H, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Nishiguchi Y, Kishi S, Kondo M, Sasaki T. A role of mesenchymal stem cells of acquisition of EMT phenotype in colon cancer cells. 76th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2017.9.28-30

Luo Y, Fujiwara-Tani R, Nishiguchi Y, Sasaki T, Kuniyasu H. Effect of H. pylori on alteration of driver gene in gastric cancer. 76th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2017.9.28-30

國安弘基, 谷 里奈, 羅 奕, 大森 斉, 佐々木隆光. 大腸癌細胞の EMT 形質獲得における間葉系幹細胞の役割. 第 26 回日本癌転移学会、大阪市、2017.7.27-28

谷 里奈, 佐々木隆光, 羅 奕, 國安弘基. 膵癌における新規ゲムシタピン耐性遺伝

子である MAST4 の作用機序. 第 26 回日本癌転移学会、大阪市、2017.7.27-2

谷 里奈、佐々木隆光、岸 真五、羅 奕、國安弘基. MAST4 は膀胱癌における新規ゲムシタピン耐性遺伝子である. 第 106 回日本病理学会総会、東京都、2017.4.27-29

大森 斉、羅 奕、谷 里奈、藤井 澄、國安弘基. プロトンポンプ阻害剤の大腸癌への影響. 第 106 回日本病理学会総会、東京都、2017.4.27-29

國安弘基、谷 里奈、羅 奕、岸 真五、佐々木隆光、大森 斉. 大腸癌細胞の EMT 形質獲得における間葉系幹細胞の役割. 第 106 回日本病理学会総会、東京都、2017.4.27-29

羅 奕、谷 里奈、西口由希子、佐々木隆光、國安弘基. 胃癌におけるドライバー遺伝子変化の検討. 第 106 回日本病理学会総会、東京都、2017.4.27-29

Nishiguchi Y, Luo Y, Fujiwara-Tani R, Sasahira T, Kondo M, Sho M, Kuniyasu H. The effect of anti-claudin-4 antibody on chemotherapeutic sensitivity in gastric cancer. 12th International Gastric Cancer Congress, Beijing, China, 2017.4.20-23

羅 奕、谷 里奈、桂川広幸、岩田直也、大森 斉、佐々木隆光、國安弘基. 腺窩上皮過形成ポリープ由来胃癌のドライバー遺伝子変化. 第 89 回日本胃癌学会、広島、2017.3.8-10

西口由希子、羅 奕、藤原里奈、笹平智則、中島 祥介、國安弘基. 胃癌における Dyrk2/HMGB1 発現の Cisplatin 治療効果への影響. 第 89 回日本胃癌学会、広島、2017.3.8-10

西口由希子、羅 奕、藤原里奈、笹平智則、近藤昌夫、中島祥介、國安弘基. 胃癌における抗 Claudin-4 抗体の化学療法感受性への影響. 第 89 回日本胃癌学会、広島、2017.3.8-10

中嶋千恵、桐田忠昭、羅 奕、藤原里奈、栗原 都、山本一彦、笹平智則、國安弘基. Malic enzyme 1 の口腔扁平上皮癌における発現. 第 35 回日本口腔腫瘍学会、福岡、2017.1.26-27

Sasaki T, Fujiwara R, Luo Y, Dohara Y, Shinya S, Kato D, Shiwaku Y, Kuniyasu H. MAST4 is associated with gemcitabine resistance of pancreatic ductal carcinoma. 75th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2016.10.6-8

Mori S, Kadochi Y, Luo Y, Katsuragawa H, Nishiguchi Y, Ohmori H, Kuniyasu H. Effect of proton pump inhibitor on colonic cancer cells. 75th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2016.10.6-8

Kadochi Y, Mori S, Luo Y, Iwata N, Fujiwara R, Fujii K, Kuniyasu H. Effect of middle chain fatty acid and ketone body on cancer cells. 75th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2016.10.6-8

Kuniyasu H, Luo Y, Sasaki T, Chihara Y, Fujiwara R, Nishiguchi Y, Hashimoto Y, Kondo M. Enhancement of antitumoral effect of molecular-targeting antibody by anti-claudin-4 antibody. 75th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2016.10.6-8

②Luo Y, Ohmori H, Kadochi Y, Mori S, Fujii K, Sasaki T, Kuniyasu H. Trans fatty acid enhances the progression of colorectal cancer by activating cancer stem cells. 75th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2016.10.6-8

②Kawahara I, Goto K, Mori T, Luo Y, Kodama K, Sasaki T, Kuniyasu H. Inhibitory effect of magnetic hyperthermia on muscle atrophy in cancer-burden mice. 75th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Yokohama, 2016.10.6-8

③Kuwada M, Chihara Y, Luo Y, Sasaki T, Fujimoto K, Kondoh M, Kuniyasu H. Pro-chemotherapeutic effects of antibody against extracellular domain of claudin-4 in bladder cancer. Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2016, New Orleans, 2016.4.16-20.

〔図書〕(計 1 件)

Fujii K, Ohmori H, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Nishiguchi Y, Kishi S, Sasaki T, Kuniyasu H. Role of CD10 in the metastasis of colorectal cancer to the liver. JNMA 67(4-6):41-50, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.narmed-u.ac.jp/~molepath/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

羅 奕 (LUO, Yi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30633797