

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19379

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ菌除菌後胃癌の克服に向けて

研究課題名(英文)Research for gastric cancer after the removal of helicobacter pylori

研究代表者

卜部 祐司(Urabe, Yuji)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：10648033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、早期胃癌の内視鏡治療後の症例にたいしてもピロリ菌の除菌治療は行われているが、近年ではピロリ菌の除菌治療後に出現する除菌後胃癌が問題となっている。除菌後胃癌と未除菌の胃癌のゲノム変異に差がないかを解析をおこなった。まず未除菌早期分化型胃癌でのゲノム変異を同定し、除菌後胃癌とのゲノム変異と差がないかを検討したが有意な差を認めなかった。またこの除菌後胃癌は発見が遅れる傾向にあるという報告が散見させるが、理由の一つに正常上皮に近いような上皮(低異型度上皮)に覆われる事が知られている。このためこれらの上皮が正常部由来か癌由来をゲノム変異をもちいて検討したところ、癌部に似通った変異パターンをしめした。

研究成果の概要(英文)：Recently, cases which undergo endoscopic resection against early-stage gastric carcinoma eradicate agent for Helicobacter Pylori(HP). However, several cases were developed gastric carcinomas after eradication agent for HP. Then, the aim of this study was to identify genetic changes for post-eraduation gastric cancer. However, there was no significant genetic change pattern between post-eraduation early-stage gastric cancer and post-eraduation early-stage gastric cancer.

Sometime, low-grade atypia (ELA) appears on the surface of gastric cancer after successful Helicobacter pylori eradication therapy. The cause of ELA is unknown. We examined the genetic changing patterns for ELA. Result of this study is the genetic changing pattern of ELA part is similar to that of cancer part in early-stage early-stage gastric carcinoma eradicate agent for HP.

研究分野：消化器内科

キーワード：早期分化型胃癌 ヘリコバクター・ピロリ菌除菌療法 除菌後胃癌

1. 研究開始当初の背景

日本では胃癌は最も死亡率の高い癌の一つである。胃癌の原因は様々な報告によりヘリコバクター・ピロリ菌(HP)の感染が強く関連することが報告されている(The New England Journal of Medicine, 2001, 345, 11, 784-789.)。近年の内視鏡機器の進歩により早期の段階での胃癌の発見が可能となり、内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)の登場により、腫瘍径に関係なく内視鏡治療を行うことが可能となった。このような背景から胃癌に対して内視鏡的切除術にて治療を行うことが多く、胃癌患者の胃の臓器温存が可能となっている。さらに胃癌の内視鏡治療後に HP の除菌治療を行うことによって異時性癌の累積発生率を減少することも報告されている。しかし異時性癌の発生が完全に抑えられるわけではないため定期的なサーベイランスが必要となってくる。近年、除菌により胃癌の視認が困難となる症例が報告されている。このような胃癌には低悪性度の異形上皮が現れることが報告され(Helicobacter. 2014;19:289-95.)、異時性癌拾い上げのバイオマーカーの確立が求められている。食道癌などの癌では異時性癌のリスク因子があきらかになっているものの、胃癌では臨床情報や病理背景因子の検討では時性腫瘍の発生は男性である以外、リスク因子は認められなかった(Gastroenterol Res Pract. 2014: Epub.)。エピジェネティックな研究としては Asada ら (Gut. 2015;64:388-96.)が、背景粘膜の miR-124a-3 と EMX1, NKX6-1 のメチル化レベルが異時性癌発症に関連があったことを報告している。また Suzuki ら (J Gastroenterol. 2014;49:1135-44.)が背景粘膜の miR-34b/c, SFRP2, DKK2 のメチル化レベルが異時性癌発症に関連があったことを報告している。

近年、各社より発売された BeadChip や次世代シーケンサーによりゲノム網羅的な

解析が短時間・低コストで行えるようになった。また大規模なデータを扱う統計学的手法が確立され、ゲノム研究は従来の Candidate gene approach からゲノム網羅的な解析に移行しつつある。このような背景から様々な疾患でゲノム網羅的な解析が行われている(研究業績#4,7,8,9,12,13)。胃癌においては、germ line での研究として、ゲノムワイド関連解析(GWAS)において PSCA と MUC1 の2つの遺伝子が疾患感受性遺伝子として同定されている(Nat Genet. 2008;40:730-40)。また Somatic mutation の研究として、次世代シーケンサーを用いた胃癌のエキソームもしくは全ゲノム解析で、複数の発癌に関わる Driver 遺伝子が同定させている。また PSCA については十二指腸潰瘍の発症リスクとして関連することが GWAS で報告されており、この十二指腸潰瘍のリスクアレルは胃癌と反対のアレルとなっている。この結果は、十二指腸潰瘍既往は胃癌発症しにくいことを間接的に証明することになる。このように胃癌に対するゲノム網羅的な研究は行われているが、早期癌や異時性癌を対象とした研究はほとんどおこなわれておらず、異時性癌の発症のバイオマーカーとなるゲノムマーカーの確立や早期癌、特に HP 除菌介入による早期癌の形態変化における癌ゲノムの研究はおこなわれていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3つからなる。

1. HP 陽性の胃分化型早期癌を用いて癌におけるゲノム変異を同定する。
2. HP 除菌後胃癌と早期癌においてゲノム変異を比較し、有意な差をみとめなしか検討する。
3. 除菌後胃癌の症例は癌の発見が遅れる事が報告されており、この原因の一つに正常上皮に近い低異型度の上皮が癌の上皮に被覆されることがわかっている。しかしながら、これが正常上皮由

来か癌から変化をしたものなのかはつきりしていない。このためこの低異型度上皮の起源についてあきらかにする。

3. 研究の方法

1. DNA の抽出。

胃 HP 陽性分化型早期癌の患者から同意を取得し、内視鏡治療 FFPE 検体の癌部、正常部よりレーザーマイクロダイセクション法にてそれぞれの組織を抽出し、抽出した患者と同症例の血中リンパ球から gDNA を抽出する。未除菌の症例に対しては癌と正常部から抽出を行う。HP 除菌症例に対しては病理標本の癌上皮部に低異型度の上皮があるかを検討して、低異型度の上皮がある場合には癌・正常部以外に低異型度上皮部からのダイセクションを行い、gDNA から抽出を行う(図)。

2. ライブラリーの作成とシーケンス

まずは胃早期癌 19 症例に対してエクソーム解析を行い、早期胃癌における変異パターンを推測し、疾患患者性候補となる遺伝子を絞り込む。絞り込んだ遺伝子についてパネルを作成し、癌関連遺伝子も含めたカスタムパネルを作成し、作成したパネルを用いて、30 症例 HP 未除菌分化型胃癌、10 症例除菌後胃癌、担癌胃正常粘膜、低異型度上皮部をシーケンスし、認められた変異について生殖細胞(リンパ球のシーケンス)を除去し、somatic mutation を同定する。

3. 未除菌胃癌と除菌後胃癌と対比

除菌後胃癌症例と未除菌胃癌症例に対して変異の割合やパターンを比較検討する。

4. 低異型度上皮の解析

低異型度上皮についてもシーケンス解析を行い、癌と正常部のどちら由来かについても解析を行う。

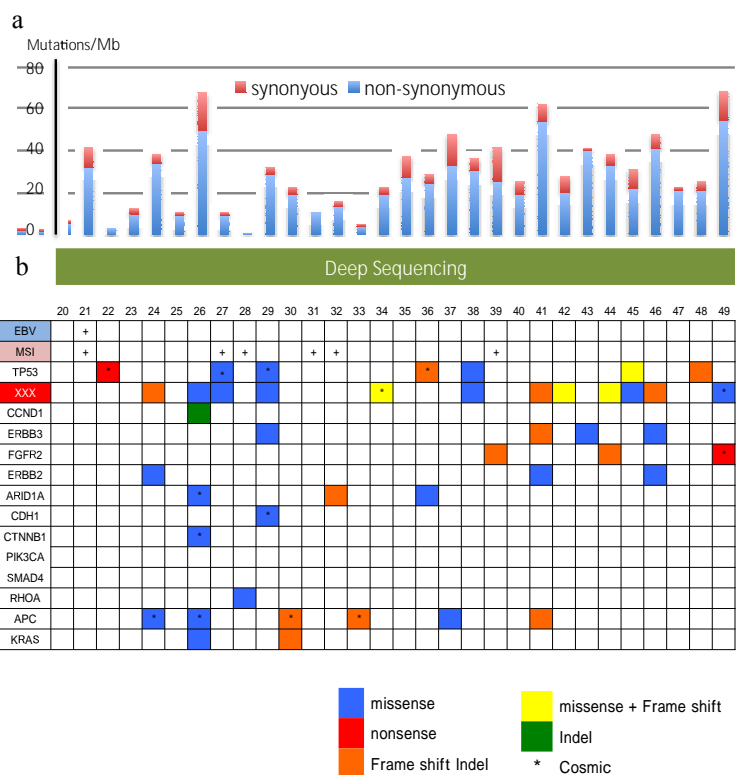
4. 研究成果

1. 未除菌胃癌の解析結果

胃分化型早期癌 19 症例についてエクソーム

解析をおこなった結果、TP53, ERBB3, ARID1A, APC, KRAS に変異をみとめた。これらの変異はこれまでの進行癌のゲノム解析の結果、胃癌に有意な関連を認めた、変異である。

解析結果でみとめた変異のうち、複数症例に変異を認めた遺伝子を搭載したカスタムパネルを作成し、追試を 29 症例に対しておこなったところ、ゲノム上有意な関連をもつ遺伝子を 2 つみとめることができた。(図)



2. 除菌後胃癌についての解析

1 の結果をもとにパネルを用いた deep sequence を用いて解析をおこなった。低異型度上皮を持つ除菌後分化型胃癌 10 症例について解析を行った。癌での somatic mutation の結果を、未除菌胃癌の結果(1 の結果)と比較したが有意な差は認められなかった。(下図)また除菌後胃癌では正常部に変異を認める事ができなかった。低異型度上皮部では癌部の変異は全て低異型度上皮部にふくまれていることから低異型度上皮は癌から発生し、なんらかの修飾をうけて組織構造は変質

している可能性が示唆された(下図)。また癌部と低異型度上皮部の変異同士の変異クローン頻度(mutant allele fraction; MAF)をみても MAF の変化癌部と低異型度上皮部で差を認めなかった。またこれらの結果をまとめて現在、論文投稿中である。

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/gittract/>
6 . 研究組織
(1)研究代表者
広島大学・病院(医)・助教
卜部祐司 (Yuji Urabe)
研究者番号：10648033

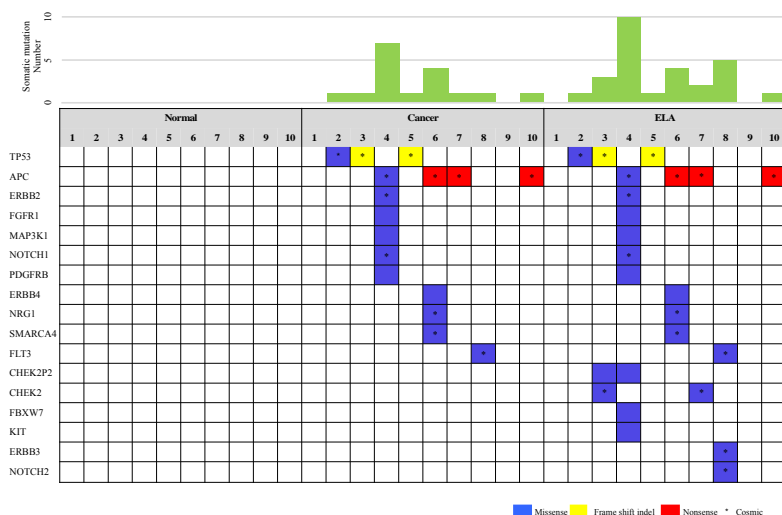
(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

(4)研究協力者

益田和彦 (Kazuhiko Masuda)
中村耕樹 (Koki Nakamura)
伊藤公訓 (Masami Ito)
広島大学・医歯薬保健学研究所・
准教授、研究者番号：60325206

Mutation profiling



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 0 件)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：