

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15781

研究課題名（和文）慢性胃炎粘膜のゲノム解析による胃癌の起源の同定

研究課題名（英文）The detection of gastric cancer cell of origin by genetic analysis of chronic gastritis mucosa

研究代表者

清水 孝洋 (Shimizu, Takahiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70812684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌の多くは、ヘリコバクター・ピロリ菌の感染による慢性胃炎粘膜より発生する。慢性胃炎粘膜を構成する腺管のもつゲノム異常を調べたところ、腸粘膜の性質をもつ腸上皮化生に多くのゲノム異常が蓄積されており、早期胃癌と同程度の遺伝子変異の数を認め、また早期胃癌とよく似たコピー数異常を認めた。ゲノム異常の解析からは、慢性胃炎を構成する腸上皮化生が癌の発生母地を形成している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の多くは、ヘリコバクター・ピロリ菌の感染による慢性胃炎粘膜より発生する。ただし、慢性胃炎をもった人のうち胃癌が発生するのは一部であり、ピロリ菌の除菌療法後にも胃癌が発生する人もいる。本研究の結果は、ピロリ菌感染による慢性胃炎粘膜に腸粘膜の性質をもつ腸上皮化生が存在すると、胃癌の発生リスクが高いことを示唆する。胃癌のリスク、定期的な内視鏡検査の必要性を考える上で、重要な科学的根拠と考える。

研究成果の概要（英文）：Gastric cancer develops in chronic gastritis mucosa related with *Helicobacter pylori* infection. To explore the susceptibility of gastric glands to cancer development, we investigated genetic alterations in pure gastric glands. Whole-exome sequencing of single gastric glands revealed significantly higher accumulation of somatic mutations in intestinal metaplasia glands compared with non-intestinal metaplasia glands. The numbers of somatic mutations in intestinal metaplasia glands were similar to those in intramucosal gastric carcinoma. In addition, clustered glands with intestinal metaplasia had various copy number aberrations whose patterns were similar to those of intramucosal gastric carcinoma. These findings suggest that, in the gastric mucosa inflamed with *H. pylori* infection, intestinal metaplasia glands expand via acquisition of copy number aberrations, contributing to field cancerization.

研究分野：胃癌

キーワード：腸上皮化生 ヘリコバクター・ピロリ菌 遺伝子変異 コピー数異常

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌は *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染による慢性胃炎粘膜に高率に発生することが知られている ( )。近年、*H.pylori* 除菌療法が普及し、胃癌の発生が抑制されることが期待されているものの、除菌後からの発癌も多く、胃癌の発生数はいまだ減少していない。上部消化管領域においては、除菌療法とともに、除菌後の胃癌のリスク診断、早期発見が重要な問題となっている。

(2) 胃粘膜は *H.pylori* 感染による長期間の慢性炎症により、壁細胞が消失し (萎縮性胃炎) さらに化生性変化が生じてくる。これまでの多くの報告から、腸上皮化生を伴った胃粘膜は胃癌の高リスクであることが示唆されている ( )。しかしながら、これまで腸上皮化生からの胃癌発生を直接証明した報告はなく、胃粘膜が腸上皮の形質を持つことはむしろ癌発生に対して抑制的に働いているという報告もある ( )。また、近年、Brunner 腺様の形態を呈した別の化生性変化、spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia (SPEM) も、高頻度に胃癌に隣接して存在していることから、前癌病変の候補として注目されている ( )。このように、慢性炎症により胃粘膜に生じた化生性病変が前癌状態として重要な位置を占めると考えられているが、胃癌の発生源の同定には至っておらず、化生性病変からの胃発癌の分子メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、胃癌の起源を同定することにより、胃癌の発生メカニズムを明らかにすることである。*H.pylori* 感染による慢性胃炎粘膜を構成する各腺管におけるゲノム異常を網羅的に解析することで、胃癌の発生源となる細胞群、腺管群を同定することを目指す。また、ゲノム異常生成の分子メカニズムの解明を行うとともに、胃粘膜の前癌状態の形成メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 内視鏡的もしくは外科的切除を行った胃癌症例について、新鮮切除標本の非癌部から粘膜を採取し、EDTA 溶液を用いることで、一腺管単位に分離する。アルシアン・ブルー染色を行い、腸上皮化生腺管と非腸上皮化生腺管を区別する。コントロールとなる正常胃粘膜については、胃粘膜下腫瘍など慢性胃炎のない症例の外科的切除標本から胃粘膜を採取し、同様に一腺管単位に分離する。

(2) 一腺管単位におけるゲノム異常の網羅的解析を行うために、一腺管単位に分離した腺管から DNA を抽出し、全ゲノム増幅を行う。その後、Agilent SureSelect XT、Illumina NovaSeq 6000 system を用いて、全エクソンシーケンス及びコピー数解析を行う。各症例のコントロールとして、末梢血より DNA を抽出し、同様に全エクソンシーケンスを行う。

(3) 腺管塊のゲノム異常の網羅的解析のために、腸上皮化生もしくは非腸上皮化生腺管を腺管塊として採取し、DNA 抽出、xGen custom-designed Gene Capture Pools、xGen CNV Backbone Panel (IDT) を用いて、遺伝子を絞ったディープシーケンス解析、コピー数異常解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) まず、一腺管単位の全エクソン解析の方法を検証した。内視鏡的切除を行った早期胃癌症例について、新鮮切除標本の非癌部より 2mm 径のパンチにて粘膜を採取し、アルシアン・ブルー染色を行った後、腺管分離法にて一腺管単位に分離した。各腺管より抽出した DNA を 2 つに分け、各々を全ゲノム増幅した後、全エクソンシーケンスを行った。コントロールとして同一症例の末梢血より抽出した DNA を全エクソンシーケンスし、2 つのサンプルの塩基変化を検出した。検出された塩基変化の VAF (variant allele frequency) の分布は 0.5 が中心であり、 $VAF \geq 0.25$  を有意な異常とすると、2 つのサンプルで検出したゲノム異常は 97.7% で一致することが分かった。この結果から、 $VAF \geq 0.25$  をカットオフとすることで、全ゲノム増幅、全エクソンシーケンスの過程によるエラーを最小限にできることが分かった。

(2) 慢性胃炎粘膜を構成する腺管に存在するゲノム異常を正確に調べるために、一腺管単位のゲノム異常の網羅的解析を行った。*H.pylori* 感染による慢性胃炎を背景に発生した早期胃癌 11 症例、胃癌を発生していない慢性胃炎 4 症例より、腸上皮化生 29 腺管、非腸上皮化生 21 腺管計 50 腺管を一腺管単位で分離し、全ゲノム増幅を行った後全エクソン解析を行った。また、コントロールとして正常胃 11 症例より 19 腺管も分離した。全エクソン解析では、正常胃腺管には平

均 17.8 個の変異を認めたのに対して、慢性胃炎を構成する非腸上皮化生腺管には平均 29.8 個、腸上皮化生腺管には平均 80.8 個の変異を認めた(図 1: IM; 腸上皮化生, non-IM; 非腸上皮化生, normal; 正常胃腺管)。全エクソンあたり、正常胃腺管では年率 0.325 個、非腸上皮化生腺管では年率 0.407 個、腸上皮化生腺管では年率 1.105 個の変異を獲得している計算となり、腸上皮化生に多くの変異が蓄積していることが分かった。非癌部を解析した早期胃癌 8 症例の癌部の全エクソン解析を行うと、平均 89.65 個の変異を認めており、腸上皮化生腺管には早期胃癌と同等の変異数を認めていることが分かった。また、全エクソンシーケンスデータを用いてコピー数解析を行ったところ、腸上皮化生 29 腺管のうち 7 腺管に、非腸上皮化生 21 腺管のうち 4 腺管にコピー数異常を認めた。

腸上皮化生に蓄積しやすい遺伝子変異としては、*MUC6*, *TTN*, *MUC19*, *RYR2*, *THSD7B*, *MUC16*, *STN1*, *ADGRL3* 遺伝子の変異が 3 症例以上で認められたが、有意に多い遺伝子変異は認めなかった。次に、癌関連遺伝子に絞って解析すると、腸上皮化生腺管には平均 3.4 個の変異を認め、非腸上皮化生や正常胃腺管の平均 1.4 個、0.9 個よりも多い傾向にあった。しかしながら、*TP53*, *ARID1A* 遺伝子などの既知の胃癌の Driver 遺伝子変異は認めなかった。一方、早期胃癌の全エクソン解析では、平均 6.0 個の癌関連遺伝子の変異を認め、*TP53*, *ARID1A* 遺伝子などの変異も見られた。これらの結果から、腸上皮化生腺管には、一腺管あたり早期胃癌と同等数の遺伝子変異が蓄積しているが、Driver となる遺伝子変異はほとんど認めていないことが分かった。

IM	1.105 mutations per year	R <sup>2</sup> = 0.934
non-IM	0.407 mutations per year	R <sup>2</sup> = 0.825
Normal	0.325 mutations per year	R <sup>2</sup> = 0.894

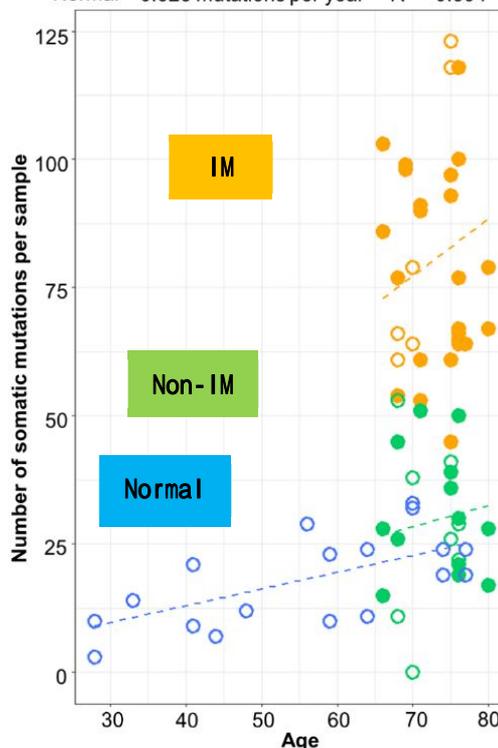


図 1

(3) 次に、慢性胃炎において腺管の拡大に関するゲノム異常を同定するために、同じ特徴を持った腺管を塊として採取し、その腺管塊に存在するゲノム異常を調べた。早期胃癌 26 症例の非癌部胃粘膜より、腸上皮化生腺管のみを含む腺管塊 72 サンプル、非腸上皮化生腺管のみを含む腺管塊 24 サンプル、計 96 サンプルを採取した。そのうち 95 サンプルについて遺伝子変異の解析を行った。対象は、胃癌でよく見られる遺伝子変異及び、非癌部胃粘膜の一腺管単位の全エクソン解析でよく見られた遺伝子変異を含む 98 遺伝子とし、deep sequencing 解析を行った。ターゲット領域の平均 depth は 585.4 で、 $VAF \geq 0.02$  をカットオフとした。ランダムに抽出したすべての塩基変化が PCR ベースの別の sequencing 方法でも検出されたため、カットオフ  $VAF \geq 0.02$  は妥当であることが確認された。上記の 95 サンプルについて解析を行ったところ、腸上皮化生、非腸上皮化生腺管塊にそれぞれ平均 1.92、1.67 個の遺伝子変異を認めた。しかしながら、腸上皮化生腺管塊には、既知の胃癌の Driver 遺伝子となる変異は認めず、腺管の拡大に関する遺伝子変異の同定には至らなかった。

(4) 上記の 96 腺管塊について、網羅的なコピー数異常を調べた。非腸上皮化生は 24 サンプル中 2 サンプルのみコピー数異常を認めたのに対して、腸上皮化生は 72 サンプル中 33 サンプルにコピー数異常を認めた。特に、腸上皮化生には染色体単位などの broad のコピー数増幅が多く、broad のコピー数欠失、focal なコピー数異常はほとんど認めなかった。早期胃癌と比較すると、

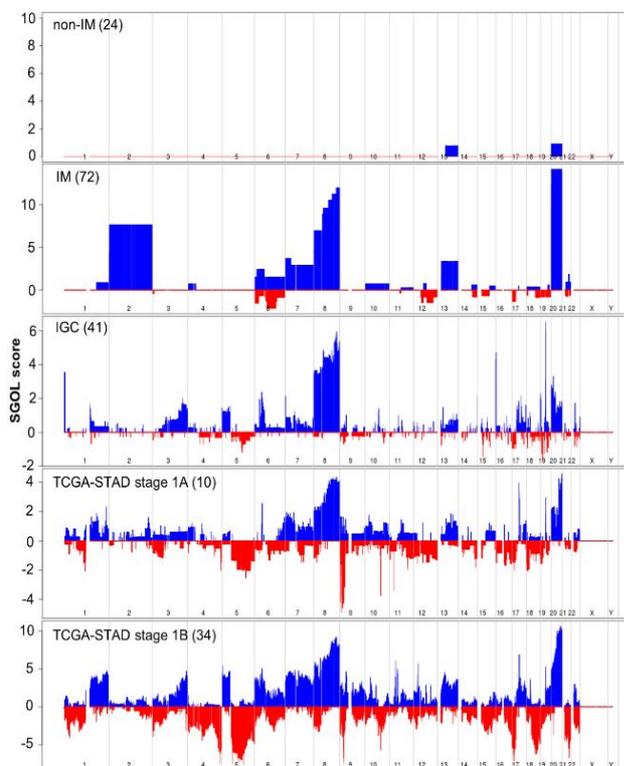


図 2

broad のコピー数増幅は粘膜内癌にもよく見られ、粘膜内癌、粘膜下層浸潤癌と進行するにつれ、broad のコピー数欠失、focal なコピー数異常が多くなる傾向にあった。また、腸上皮化生に認められたコピー数異常の部位は染色体 2、8、20 番が多く、粘膜内癌にみられる異常と同じ傾向であった（図 2：non-IM；非腸上皮化生、IM；腸上皮化生、IGC；粘膜内癌、TCGA-STAD；TCGA データベース）。これらの結果から、腸上皮化生の拡大にはコピー数異常が関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、慢性胃炎粘膜においては、腸上皮化生腺管に粘膜内癌と同程度の遺伝子変異が蓄積されていること、腸上皮化生腺管はコピー数異常を獲得しながら拡大し、胃において発癌母地を形成していることが明らかとなった。

(5) 本研究の結果は、慢性胃炎粘膜において、腸上皮化生腺管が発癌母地を形成していることを示唆するものである。これまで、臨床的に、また病理学的に、腸上皮化生が前癌病変であるのか傍癌病変であるのか議論の分かれるところであったが、本研究のゲノム解析からは、少なくとも発癌の素地を形成していることが分かった。ただし、腸上皮化生腺管が胃癌の発生源であるということを直接示したものではないため、その検証は今後の課題である。

腸上皮化生腺管が発癌のリスクであることが明らかになったことは、臨床面において大きなメッセージとなる。*H. pylori* 感染による慢性胃炎においては、除菌療法によっても腸上皮化生は消失せずそのまま残ることが多い（ ）。したがって、腸上皮化生が形成される前に早めに除菌療法を行うことが重要と考えられる。また、腸上皮化生が形成された胃粘膜をもつ症例においては、胃癌の高リスクとして定期的な内視鏡検査による胃癌のサーベイランスが必要である。

今後は、発癌のリスクである腸上皮化生が形成されるメカニズムを明らかにすることが求められる。それは、腸上皮化生の予防及び、腸上皮化生に対する治療につながり、胃癌の予防的な治療に大きく貢献することが期待される。

#### < 引用文献 >

- Polk DB et al. *Nat Rev Cancer* 2010;10:403-14.
- Li D et al. *Am J Gastroenterol* 2016;111:1104-13.
- Giroux V et al. *Nat Rev Cancer* 2017;17:594-604.
- Goldenring JR et al. *Gastroenterology* 2010;138:2207-10.
- Kodama M et al. *J Gastroenterol Hepatol* 2021;36:2210-6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kumagai Ken, Shimizu Takahiro, Takai Atsushi, Kakiuchi Nobuyuki, Takeuchi Yasuhide, Hirano Tomonori, Takeda Haruhiko, Mizuguchi Aya, Teramura Mari, Ito Takahiko, Iguchi Eriko, Nikaido Mitsuhiro, Eso Yuji, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Miyamoto Shin'ichi, Obama Kazutaka, Ogawa Seishi, Marusawa Hiroyuki, Seno Hiroshi	4. 巻 82
2. 論文標題 Expansion of Gastric Intestinal Metaplasia with Copy Number Aberrations Contributes to Field Cancerization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1712 ~ 1723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-1523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊谷健、清水孝洋、高井淳、竹田治彦、妹尾浩
2. 発表標題 腸上皮化生を伴う慢性胃炎粘膜を構成する一腺管あたりの遺伝子異常の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷健、清水孝洋、妹尾浩
2. 発表標題 慢性萎縮性胃炎粘膜を構成する一腺管あたりのゲノム異常の解析
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷健、清水孝洋、高井淳、妹尾浩
2. 発表標題 Comprehensive genetic analysis of gastric intestinal metaplasia
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷健、清水孝洋、高井淳
2. 発表標題 胃粘膜における腺管単位でのゲノム解析による、胃癌ハイリスク腺管の検討
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------