

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03521

研究課題名(和文) 臨床検体から同定したピロリ菌ゲノム異常の時空間的な解明に基づく胃癌の革新的制御

研究課題名(英文) Novel suppression of gastric carcinogenesis based on the spatiotemporal elucidation of *H. pylori* genome alterations identified using clinical samples

研究代表者

山本 博幸 (Yamamoto, Hiroyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：40332910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌の持続感染は、胃発癌の主要な原因である。ピロリ菌ゲノム因子の胃癌における役割は解明されていない。胃洗浄廃液等の検体を対象としたロングリード次世代シーケンサーによる解析で、胃癌に特異的なピロリ菌ゲノム異常を同定した。これらの異常は、胃癌の新たなバイオマーカーになりうることを明らかにした。さらに、これらのゲノム異常の胃発癌における機能的意義も明らかにした。以上の結果は、特にハイリスクピロリ菌の感染者における胃癌の早期診断や予防に有用である。したがって、臨床検体から同定したピロリ菌ゲノム異常の時空間的な解明に基づく胃癌の革新的制御につながる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌およびヒトゲノムの解析に基づく胃癌の本質的な基礎医学的分子病態の解明という点で、学術的意義が大きい。また、診断から除菌治療までの迅速遺伝子判定システムなどの臨床応用開発につながる成果であることから、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori is a primary factor in the pathogenesis of gastric cancer. A clear understanding of the *H. pylori* genome factors underlying gastric cancer remains elusive. Based on long read next-generation sequencing of gastric wash and other samples, we identified gastric cancer-specific important alterations in the *H. pylori* genome. We revealed that these alterations can be used as novel molecular markers for gastric cancer. We also successfully characterized the functional significance of these alterations in gastric carcinogenesis. These results may help introduce early diagnostic and/or preventive measures for gastric cancer in patients infected with high-risk *H. pylori* strains. Thus, our findings can be applied to novel suppression of gastric carcinogenesis based on the spatiotemporal elucidation of *H. pylori* genome alterations identified using clinical samples.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：H. pylori ゲノム解析 ゲノム多様性 胃洗浄廃液 胃癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 世界の全人口の半数以上がピロリ菌に感染していると推定される。胃癌の98%はピロリ菌関連であり、ピロリ菌感染の制御が胃癌の撲滅につながる。国内全ての現感染者を除菌できれば、胃癌(死)の抑制を介して、1兆5千億円の医療費削減が期待できる。

(2) 一方、耐性菌増加による除菌治療の失敗、除菌後再発、除菌後発癌、治療後の異時性発癌、ピロリ未感染胃癌など解決すべき課題は国内外問わず多い。つまり、現状の除菌治療だけでは、胃癌の発生を完全に予防できず、ピロリ菌ゲノムに注目した胃発癌リスクのバイオマーカーの重要性が再認識され、研究開発に対する社会的要請は高い。

(3) 研究代表者らは、ピロリ菌の胃内空間的不均一性という課題を内視鏡胃洗浄廃液という面診断で克服し、ヒトゲノム解析を行ってきた。上記研究課題の克服のため、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、ピロリ菌ゲノムに注目し、時空間的にロングリード次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行うとともに機能解析を行い、ゲノムの多様性の理解に基づく胃発癌の新機軸を明らかにすることを目的とする。

(2) 胃癌の本質的な基礎医学的分子病態の解明とともに診断から除菌治療までの迅速遺伝子判定システムなどの臨床応用開発を目指す。内視鏡検査時にピロリ菌感染・薬剤感受性・発癌リスクを可視化できるバイオチップを開発し、これにより、健診への導入や病原体ゲノムの時空間的解析による、感染症に基づくさまざまな癌の分子機構解明へ寄与する。

### 3. 研究の方法

(1) 早期胃癌内視鏡治療検体を用いたピロリ菌遺伝子異常の統合解析

至適化したロングリード次世代シーケンサーを用いて、ピロリ菌遺伝子異常をゲノムワイドに解析し、詳細な解析を行う遺伝子異常を選定する。また、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片から DNA を抽出し、至適化したパイロシーケンスを用いてピロリ菌遺伝子の変異型と野生型の比などを定量解析する。既知の重要なピロリ菌遺伝子も比較解析する。

(2) 早期胃癌患者の胃洗浄廃液、胃液エクソソームを用いたピロリ菌およびヒトゲノム異常の統合解析

胃洗浄廃液から DNA を抽出し、ピロリ菌遺伝子異常をパイロシーケンスを用いて定量解析する。また、胃液から抽出したエクソソームを用いてピロリ菌ゲノム変異由来の異常蛋白質等を解析する。さらに、胃洗浄廃液由来 DNA および胃液由来エクソソーム DNA を用いて、ピロリ菌およびヒト遺伝子や microRNA のゲノム、エピゲノム解析を行い、胃発癌・進展との関連を明らかにする。

(3) 内視鏡生検診断 Group 2 症例を対象とした経時的な統合遺伝子解析と胃癌の関連の解明

Group 2 症例は、診断後 1 年以内に半数で癌の存在が判明する胃癌の超ハイリスク症例であることを明らかにしている。胃洗浄廃液由来 DNA および胃液由来エクソソーム DNA を用いて、Group 2 症例を対象に経時的なピロリ菌遺伝子異常およびヒト遺伝子や microRNA のゲノム、エピゲノム解析を行い、胃発癌・進展との関連を明らかにする。

#### (4) ピロリ菌遺伝子異常の統合機能解析

ロングリード次世代シーケンサーおよびパイロシーケンスを用いて同定したピロリ菌遺伝子異常の機能解析を *in vitro*、*in vivo* で行う。接着、感染、シグナル伝達、発癌に及ぼす影響を解析する。また、培養ピロリ菌検体を得て、機能解析をする。さらに、胃癌細胞株移植モデルにおける形成腫瘍の病理学的ならびにインタラクトーム解析を行う。

#### (5) 統合次世代型バイオインフォマティクスによる総括

ピロリ菌ゲノム(特に胃粘膜接着関連遺伝子異常)とヒトゲノム異常の経時的統合解析により胃発癌・進展の分子病態を解明する。また、これに基づき、臨床実装の基盤を整備する。

### 4. 研究成果

#### (1) 早期胃癌内視鏡治療検体を用いたピロリ菌遺伝子異常の同定

ロングリード次世代シーケンサーを用いて、ピロリ菌遺伝子異常をゲノムワイドに解析することに成功し、さらに個々の遺伝子変異をパイロシーケンスなどを用いて解析し、複数の胃癌分子マーカーとなりうる遺伝子変異候補を同定した。また、FFPE 切片を対象に、新たに同定した胃癌関連のピロリ菌遺伝子変異の変異型と野生型の比などを定量解析する系の確立に成功し、胃癌との関連を明らかにした。既知の重要なピロリ菌遺伝子 CagA、VacA、BabA、OipA 等と新規遺伝子の変異との関連も明らかにした。

#### (2) 早期胃癌患者の胃洗浄廃液、エクソソームを用いたピロリ菌およびヒトゲノム異常の同定

胃洗浄廃液 DNA を用いて、ピロリ菌遺伝子異常をパイロシーケンスを用いて定量解析し、胃発癌・進展との関連を明らかにした。また、胃液由来エクソソームを用いてピロリ菌ゲノム変異由来の異常蛋白質を同定し、胃癌分子マーカーとして利用できることを明らかにした。つまり、ピロリ菌ゲノム異常とそのエクソソーム機能分子への反映機構の一部を解明した。さらに、胃洗浄廃液由来 DNA および胃液由来エクソソーム DNA を用いて、ヒト遺伝子のゲノム、エピゲノム解析を網羅的に行い、胃発癌・進展との関連を明らかにした。

また、ピロリ菌 microRNA 解析を網羅的に行い、胃癌と関連するピロリ菌 microRNA 異常を明らかにした。さらに、それらの microRNA 異常の制御機構の一部を明らかにした。また、ピロリ菌エピゲノム解析を網羅的に行い、胃癌と関連するピロリ菌エピゲノム異常を明らかにした。また、ピロリ菌とヒトの microRNA 異常およびエピゲノム異常の関連を明らかにし、さらに、インタラクトーム解析により、新たな知見を得た。

#### (3) 内視鏡生検診断 Group 2 症例を対象とした経時的な統合遺伝子解析と胃癌の関連

胃洗浄廃液由来 DNA および胃液由来エクソソーム DNA を用いて、Group 2 症例を対象に経時的なピロリ菌遺伝子異常およびヒト遺伝子や microRNA のゲノム、エピゲノム解析を行い、胃癌と関連するヒトやピロリ菌の遺伝子異常、microRNA 異常を明らかにした。さらに、それらの microRNA 異常の制御機構の一部を明らかにした。

#### (4) ピロリ菌遺伝子異常の機能解明

ロングリード次世代シーケンサーおよびパイロシーケンスを用いて同定したピロリ菌遺伝子異常の機能解析を *in vitro* で行った。さまざまな遺伝子異常の接着、感染、シグナル伝達、発

癌等に及ぼす影響を明らかにした。また、培養ピロリ菌検体を得て、ピロリ菌遺伝子異常の機能との関連を明らかにした。

(5) 統合次世代型バイオインフォマティクス解析による胃発癌・進展機構解明

ピロリ菌ゲノム(特に胃粘膜接着関連遺伝子異常)とヒトゲノム異常の経時的統合解析により胃発癌・進展におけるゲノム進化を明らかにした。これまで得られたデータに対して、バイオインフォマティクス解析を行い、臨床実装に向けた基盤の構築に成功した。つまり、胃癌の本質的な基礎医学的分子病態の解明とともに、診断から除菌治療までの迅速遺伝子判定システムなどの臨床応用開発につながる基盤的成果をあげることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Hiroyuki, Imai Kohzoh	4. 巻 46
2. 論文標題 An updated review of microsatellite instability in the era of next-generation sequencing and precision medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seminars in Oncology	6. 最初と最後の頁 261 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.seminoncol.2019.08.003	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Hiroyuki, Watanabe Yoshiyuki, Maehata Tadateru, Imai Kohzoh, Itoh Fumio	4. 巻 94
2. 論文標題 Microsatellite instability in cancer: a novel landscape for diagnostic and therapeutic approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 3349 ~ 3357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-020-02833-z	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Hiroyuki, Watanabe Yoshiyuki, Sato Yoshinori, Maehata Tadateru, Itoh Fumio	4. 巻 12 (10)
2. 論文標題 Non-Invasive Early Molecular Detection of Gastric Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2880 ~ 2880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe Yoshiyuki, Oikawa Ritsuko, Kodaka Yasuhiro, Sato Yoshinori, Ono Shoko, Kenmochi Takeshi, Suzuki Hideo, Futagami Seiji, Kato Mototsugu, Yamamoto Hiroyuki, Itoh Fumio	4. 巻 148
2. 論文標題 Cancer related genetic variants of Helicobacter pylori strains determined using gastric wash based whole genome analysis with single molecule real time technology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 178 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33257	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 該当する

1. 著者名 Watanabe Yoshiyuki, Oikawa Ritsuko, Agawa Shuhei, Matsuo Yasumasa, Oda Ichiro, Futagami Seiji, Yamamoto Hiroyuki, Tada Tomohiro, Itoh Fumio	4. 巻 36
2. 論文標題 Combination of artificial intelligence based endoscopy and miR148a methylation for gastric indefinite dysplasia diagnosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Laboratory Analysis	6. 最初と最後の頁 e24122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcla.24122	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 該当する

1. 著者名 Tanaka Ikko, Ono Shoko, Watanabe Yoshiyuki, Yamamoto Hiroyuki, Oikawa Ritsuko, Matsumoto Shogo, Kubo Marina, Nishimura Yusuke, Shimoda Yoshihiko, Ono Masayoshi, Yamamoto Keiko, Sakamoto Naoya	4. 巻 27 (5)
2. 論文標題 Long term changes in aberrant DNA methylation and gastritis after Helicobacter pylori eradication focused on metachronous gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Helicobacter	6. 最初と最後の頁 e12915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hel.12915	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 該当する

1. 著者名 Tsuda Momoko, Watanabe Yoshiyuki, Oikawa Ritsuko, Watanabe Ryosuke, Higashino Masayuki, Kubo Kimitoshi, Yamamoto Hiroyuki, Itoh Fumio, Kato Mototsugu	4. 巻 27 (6)
2. 論文標題 Clinical evaluation of a novel molecular diagnosis kit for detecting Helicobacter pylori and clarithromycin resistant using intragastric fluid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Helicobacter	6. 最初と最後の頁 e12933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hel.12933	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 該当する

1. 著者名 津田桃子, 渡邊嘉行, 渡辺亮介, 東野真幸, 久保公利, 山本博幸, 加藤元嗣.	4. 巻 24
2. 論文標題 胃内H.pyloriのCAM耐性変異率と除菌治療成績についての検討.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本ヘリコバクター学会誌	6. 最初と最後の頁 19-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 津田桃子, 渡邊嘉行, 渡辺亮介, 東野真幸, 久保公利, 山本博幸, 加藤元嗣.	4. 巻 24
2. 論文標題 胃内視鏡廃液を用いたQprobe法を原理とするH.pylori遺伝子検出POCT試薬の臨床評価.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本ヘリコバクター学会誌	6. 最初と最後の頁 22-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yoshiyuki Watanabe, Ritsuko Oikawa, Shuhei Agawa, Yasumasa Matsuo, Nobue Ueki, Seiji Futagami, Hiroyuki Yamamoto, Tomohiro Tada, Fumio Itoh
2. 発表標題 Combination of artificial intelligence-based endoscopy and miR148a methylation for gastric indefinite dysplasia diagnosis
3. 学会等名 Singapore Gastric Cancer Consortium (SGCC) 12th Annual Scientific Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ritsuko Oikawa, Yoshiyuki Watanabe, Hiroyuki Yamamoto, Fumio Itoh
2. 発表標題 A comprehensive investigation of gastric cancer-specific H. Pylori gene alterations by NGS
3. 学会等名 Singapore Gastric Cancer Consortium (SGCC) 12th Annual Scientific Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田桃子, 渡邊嘉行, 渡辺亮介, 東野真幸, 久保公利, 山本博幸, 加藤元嗣
2. 発表標題 胃内H. pyloriのCAM耐性変異率と除菌治療成績についての検討
3. 学会等名 第27回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中一光、小野尚子、大野正芳、山本桂子、渡邊嘉行、山本博幸、及川律子
2. 発表標題 H. pylori除菌後も異時性胃癌を繰り返す症例のDNAメチル化異常の検討
3. 学会等名 第27回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田桃子、渡邊嘉行、渡辺亮介、東野真幸、久保公利、山本博幸、加藤元嗣
2. 発表標題 内視鏡廃液を用いたQprobe法を原理とするH. pylori遺伝子検出POCT試薬の臨床評価
3. 学会等名 第27回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊嘉行、及川律子、阿川周平、松尾康正、植木信江、安田宏、二神生爾、山本博幸、多田智裕、伊東文生
2. 発表標題 HP陽性/陰性Group2症例に対するAI内視鏡診断と分子マーカー診断の比較検討
3. 学会等名 第27回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊嘉行、及川律子、小田一郎、二神生爾、山本博幸、多田智裕、伊東文生
2. 発表標題 分子マーカーとAI内視鏡診断によるGroup2胃癌診断への応用
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 Momoko Tsuda, Yoshiyuki Watanabe, Ryosuke Watanabe, Masayuki Higashino, Kimitoshi Kubo, Hiroyuki Yamamoto, Mototsugu Kato.
2. 発表標題 Clinical evaluation of H. pylori molecular diagnosis POCT kit based on Qprobe using gastric juice. Clinical evaluation of H. pylori molecular diagnosis POCT kit based on Qprobe using gastric juice.
3. 学会等名 The 18th Japan-Korea H. pylori Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yamamoto H, Watanabe Y, Itoh F.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 157
3. 書名 Biomarkers in Cancer Therapy	

〔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
研究分担者	伊東 文生 (Fumio Itoh)  (90223180)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  (32713)	
研究分担者	松尾 康正 (Yasumasa Matsuo)  (70724756)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  (32713)	

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
---------	---------