

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17412

研究課題名（和文）Helicobacter pylori未感染胃癌における腫瘍発生機構の解明

研究課題名（英文）Molecular characterization of gastric adenocarcinoma in Helicobacter pylori-uninfected patients

研究代表者

赤澤 陽一（AKAZAWA, YOICHI）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80822006

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）：ピロリ菌が胃癌の原因のほとんどを占めることは明白であるものの、ピロリ菌が感染していないにも関わらず発癌する胃癌（未感染胃癌）については未だ不明な点が多く十分に検討されていないのが現状です。本研究では、未感染胃癌に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行い、その特徴的な遺伝子変異を同定しました。その結果、GNAS遺伝子とAPC遺伝子の変異が、通常の胃癌と比較して高頻度であることが判明しました。また、未感染胃癌の中でも、胃底腺型胃癌、分化型胃癌、未分化型胃癌の3種類があることが知られていますが、GNAS変異は胃底腺型胃癌、APC変異は分化型胃癌に特徴的であることが判明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果からピロリ未感染胃癌は1. 胃底腺型胃癌、2. 分化型胃癌、3. 未分化型胃癌の3つに大別され、それぞれが特徴的な性質や遺伝子変異を持つことが明らかとなりました。今後はそれぞれの癌に対する治療薬の開発のため、本研究で判明した遺伝子変異の結果に基づいて、細胞株を用いた研究やマウスを用いた実験による発癌機序の検証などを予定しております。

研究成果の概要（英文）：Helicobacter pylori (HP) infection is definite carcinogen leading to risk of gastric cancer. Recently, gastric cancers in HP-uninfected gastric mucosa have been reported in several studies. However, clinicopathological and molecular features of HP-uninfected gastric cancer have not been elucidated. We evaluated the clinicopathological and genetic alterations of HP-uninfected gastric adenocarcinoma using next-generation sequencing. HP-uninfected gastric cancer was classified into 3 type (1. gastric adenocarcinoma of fundic-gland type (GA-F), 2. differentiated type gastric adenocarcinoma (DGA), 3. signet-ring cell carcinoma (SRCC)). Each subtype of HP-uninfected gastric adenocarcinoma harbored distinct clinicopathological and molecular characteristics: GA-FG was characterized by GNAS mutation, DGA was characterized by APC mutation.

研究分野：消化器内科

キーワード：胃癌 次世代シーケンサー 胃底腺型胃癌 ヘリコバクターピロリ ピロリ未感染胃癌

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) が胃癌の definite carcinogen であることは既に多くの研究結果から示されており、本邦では 2013 年に *H. pylori* 感染胃炎に対する除菌治療が保険収載され、*H. pylori* 感染率は年次的に低下傾向を示している。しかしながら、*H. pylori* 総除菌時代を迎えようとしている現在において、*H. pylori* 未感染胃癌 (*H. pylori*-uninfected gastric cancer: HPUGC) は胃癌の約 1% に存在し、かつ、その報告は近年増加傾向にあり、今後さらに社会的重要性が増す疾患であると考えられる。病理組織学的に、*H. pylori* 未感染胃癌は 1. 未分化型胃癌、2. 胃底腺型胃癌、3. 低異型度分化型胃癌の 3 つに大別される。これらの中で胃底腺型胃癌は、研究協力者である上山、八尾らが 2010 年に初めて提唱した疾患概念であり (Ueyama H, Yao T, et al. *Am J Surg Pathol.* 2010)、我々の研究グループは胃底腺型胃癌の分子病理学的解析を世界に先駆け継続的に発表し、Wnt/  $\beta$ -catenin シグナル伝達系関連遺伝子の変異やメチル化による同伝達系の活性化、sonic hedgehog シグナル伝達系の抑制、GNAS、Kras 変異による GTP 結合蛋白関連シグナル伝達系の活性化などが胃底腺型胃癌の発癌に関与している可能性を報告してきた (Yao T, et al. *Hum pathol.* 2013. Yao T, et al. *Hum Pathol.* 2014. Yao T, et al. *Virchows Arch.* Yao T, et al. *Digestion.* 2017. Yao T, et al. *Pathol Int.* 2017.)。一方、未分化型胃癌については、E-cadherin の発現低下の頻度が高いことや、CDH1 のプロモーターの高メチル化が多いことなどから、CDH1 の重要性が認識されているが (Tamura G et al. *J Natl Cancer Inst.* 2000.)、*H. pylori* 未感染未分化型胃癌における検討は未だ成されていない。さらに、*H. pylori* 未感染の低異型度分化型胃癌に関しても少数例の報告に留まり、その臨床病理学的・分子生物学的検討は未だ不十分であり、上記 3 病型を統一化した *H. pylori* 未感染胃癌の包括的なゲノム、エピゲノムデータは未だ報告がない。

近年、次世代シーケンサー (next generation sequencer, NGS) の登場により、がんにおける体細胞変異や遺伝子増幅・欠損の包括的なプロファイルが解読可能となり、The Cancer Genome Atlas (TCGA) に代表される様々ながん種における遺伝子変異アトラスが作成され、胃癌の分野では、4 つの分子サブタイプ: Epstein-Barr virus 陽性癌、マイクロサテライト不安定癌、ゲノム安定癌、染色体不安定癌が新たに提唱されるに至っている。各サブタイプの胃癌はそれぞれ特徴的な遺伝子変異、メチル化異常、遺伝子増幅、蛋白質過剰発現などの分子異常を有しており、臨床病理学的特徴との関連や分子標的治療薬の標的となる可能性が示唆されているが (The Cancer Genome Atlas Research Network, *Nature.* 2014)、*H. pylori* 未感染胃癌の分子サブタイプに関する報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、*H. pylori* 未感染胃癌の治療成績の向上の要となる発癌原因因子を特定する事を目的とするとともに、網羅的ゲノム解析による *H. pylori* 未感染胃癌の科学的データベース構築に基づいて生物学的理解を深め、将来的な予後予測バイオマーカーや新規治療標的薬による臨床応用の基盤となる研究となる事を目指す。

## 3. 研究の方法

解析は *H. pylori* 未感染胃癌の NGS による網羅的遺伝子解析からなり、申請者がこれまで行って来た希少・特殊型胃癌のゲノム解析研究経験を元に (Akazawa Y et al. *Hum Pathol.* 2018)、高

精度な病理・内視鏡診断及び臨床情報が紐付いた臨床検体を用いる。我々は *H. pylori* 未感染胃癌の症例蓄積を行い、これらのホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体から、腫瘍組織 DNA を抽出、Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel を用いて 409 遺伝子に対する網羅的遺伝子解析を行った。ペア正常検体についても解析を行い、後天的体細胞変異の絞り込みを行った。また NGS で得られたゲノム異常に関する追加検証として、ターゲットシーケンス (Sanger 法) 及び免疫染色による蛋白発現を行った。研究体制として、本研究では 2 年の研究期間内に、申請者である赤澤が主導的に網羅的遺伝子解析、臨床病理学的事項及び *in vivo* での検証実験を行い、研究協力者である上山浩也 (順天堂大学消化器内科 准教授)、林大久生 (順天堂大学人体病理病態学 准教授)、齋藤剛 (順天堂大学人体病理病態学 准教授)、八尾隆史 (順天堂大学人体病理病態学 主任教授) から実験遂行、データ解釈に介して適宜サポートを得る。研究の進捗状況は、月に一度上記のリサーチグループミーティングでお互いに情報を共有し、3 月ごとに目標の達成度について評価し改善を行った。

#### 4. 研究成果

*H. pylori* 未感染胃癌は、臨床病理学的に 1. 未分化型胃癌、2. 胃底腺型胃癌、3. 低異型度分化型胃癌の 3 つに大別される。NGS の解析結果から胃底腺型胃癌において、GNAS 変異率が 20.0% と、通常型胃癌 (TCGA データベース、5.7%) と比較して、有意に高頻度であった ( $p < 0.05$ )。また、低異型度分化型胃癌については、APC 変異率が 41.9% と、通常型胃癌 (TCGA データベース、11.7%) と比較して、有意に高頻度であった ( $p < 0.05$ )。さらに興味深い事に、低異型度分化型胃癌については、内視鏡的・臨床病理学的特徴からさらに 3 つに亜分類することが報告されているが (白色調扁平隆起型で粘液形質が胃型のタイプ、発赤調隆起型で、粘液形質が胃型のタイプ、発赤調の平坦陥凹型で粘液形質が胃腸混合型のタイプ)、APC 変異は のみで確認され、に特異的な遺伝子異常である可能性が示された。今回の研究では未分化型胃癌については、NGS にて異常な遺伝子変異は検出されなかった。ただし、他施設での少数例での報告では、CDH1 遺伝子変異が散発性 (非遺伝性) の *H. pylori* 未感染未分化型胃癌に検出されたとの報告もあるため、今後のさらなる症例の集積および解析が望まれる。

上記の結果から、*H. pylori* 未感染胃癌は 1. 未分化型胃癌、2. 胃底腺型胃癌、3. 低異型度分化型胃癌の 3 つに大別され、それぞれの内視鏡的・臨床病理学的・分子病理学的が明らかとなった。今後は分子標的治療薬の標的同定を目指し、*H. pylori* 未感染胃癌の発癌・進展に関連する遺伝子異常候補に対して、Crisper-cas9 を用いたゲノム編集や、3T3 細胞や BaF3 細胞株に導入する。tumor formation assay 等の *in vitro* での機能解析、免疫不全マウス移植モデルを用いた *in vivo* での実験により、候補遺伝子異常の発癌性の検証、及び薬剤感受性実験を施行することが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤澤陽一
2. 発表標題 Clinicopathological and molecular characterization of early gastric cancer in Helicobacter pylori-uninfected patients
3. 学会等名 第101回日本内視鏡学会総会 シンポジウム
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
---------	---------