

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15512

研究課題名（和文）CDH1病的胚細胞バリエーションと環境要因の解析-びまん型胃癌予防への応用-

研究課題名（英文）Analysis of CDH1 Pathological Germ Cell Variants and Environmental Factors - Application to Diffuse Gastric Cancer Prevention

研究代表者

鈴木 章浩 (SUZUKI, Akihiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：80869222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌は一般的に予後不良なびまん型胃癌と、比較的予後が良い腸型胃癌に分類される。内視鏡技術の発展に伴い早期発見・早期治療が可能となり、腸型胃癌に関しては予後改善に劇的な成果が出ている。代表者は日本人胃癌の大規模ゲノム解析を行い、びまん型胃癌の発癌と関連する生殖細胞系列の遺伝子変異を複数明らかにした（Suzuki et al., Science Advances, 2020）。本研究では、この解析により明らかにしたびまん型胃癌の発癌と関連する遺伝子の内、CDH1に着目する。CDH1を用いびまん型胃癌リスク因子の層別化を行い、将来的な予防医学への応用を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

びまん型胃癌は内視鏡検査による早期発見・早期治療が困難であり、依然として予後不良癌の代表格である。代表者は日本人胃癌の大規模ゲノム解析を行い、びまん型胃癌の発癌と関連する生殖細胞系列の遺伝子変異を複数明らかにした（Suzuki et al., Science Advances, 2020）。この解析で明らかにしたびまん型胃癌の発癌と関連する遺伝子の内、CDH1に着目する。申請者は、びまん型胃癌の発がんに関連する5種類の生殖細胞系列のCDH1変異（病的胚細胞バリエーション）を明らかにしたが、それらの機能的な解析は行えていない。解析することで将来的なびまん性胃癌の予防の足掛かりを作ることができる。

研究成果の概要（英文）：Gastric cancer is generally classified into diffuse-type gastric cancer, which has a poor prognosis, and intestinal-type gastric cancer, which has a relatively good prognosis. With the development of endoscopic techniques, early detection and treatment have become possible, and the prognosis of intestinal-type gastric cancer has improved dramatically. The applicant is a Japanese patient with large genomes of gastric cancer. The applicant performed a large-scale genome analysis of Japanese gastric cancer and revealed several germline gene mutations associated with carcinogenesis of diffuse-type gastric cancer (Suzuki et al., Science Advances, 2020). In this study, we focus on CDH1 among the genes identified in this analysis as being associated with carcinogenesis of diffuse-type gastric cancer, aiming to stratify risk factors for diffuse-type gastric cancer using CDH1 and apply it to preventive medicine in the future.

研究分野：胃がん

キーワード：胃がん CDH1

1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦において、罹患数2位、死亡数3位に位置するメジャーな癌の一つである。内視鏡技術の発展に伴い早期発見・早期治療が可能となり、腸型胃癌に関しては予後改善に劇的な成果が出ている。しかし、びまん型胃癌は内視鏡検査による早期発見・早期治療が困難であり、依然として予後不良癌の代表格である。内視鏡スクリーニングという、腸型胃癌と同様の早期発見アプローチが有効でないびまん型胃癌に対し、代表者はゲノム解析からリスク因子を明らかにできないかと考えた。そこで、代表者は日本人胃癌の大規模ゲノム解析を行い、びまん型胃癌の発癌と関連する生殖細胞系列の遺伝子変異を複数明らかにした (Suzuki et al., Science Advances, 2020)。本研究では、この解析により明らかにしたびまん型胃癌の発癌と関連する遺伝子の内、CDH1に着目する。

CDH1はカルシウム依存的に細胞と細胞を接着させる作用をもつ主要な細胞接着分子で、遺伝性びまん型胃癌の原因遺伝子の一つである。代表者は、びまん型胃癌患者が、生殖細胞のCDH1に病的胚細胞バリエーションを健常者集団より4倍程度多く(13.3%)保持していたことを明らかにした。病的胚細胞バリエーションとは、多くはヒト形質や疾患に影響を及ぼさないが、疾患リスク上昇など病的意義があるものである。この解析で代表者が明らかにしたびまん型胃癌に関連すると考えられるCDH1の病的胚細胞バリエーションは、p.G62V、p.T340A、p.L630V、p.V832M、p.E880Kの5種類であった。CDH1病的胚細胞バリエーションの機能解析は報告されているものの、報告ごとにアッセイが違つたために、結論が一定しないことが問題となっている。このため、上記5種類のバリエーションが発癌に寄与する程度の違いは解明できていない。また、4倍程度という保有率の低さから、環境因子も関与していると考えられるが、この解析では明らかにできなかった。以上の背景から、本研究では、CDH1病的胚細胞バリエーションの機能解析及び、それに付随する発癌に必要な環境因子の探索を行う。研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「生殖細胞系列CDH1変異と環境因子の組み合わせにより、びまん型胃癌発がんリスクを予測できるか」であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、びまん型胃癌の発癌と関連するCDH1の病的胚細胞バリエーションの機能解析と、環境リスク因子の探索である。

本研究の独自性は、びまん型胃癌においてCDH1の病的胚細胞バリエーションと環境リスク因子を交錯することである。上述した代表者の解析では、びまん型胃癌においてCDH1の病的胚細胞バリエーションが健常集団より約4倍多く集積していたが、その患者らには濃厚な家族歴を認めなかった。このことから、環境因子の交錯が考えられ、本研究での解明を目指す。

本研究の創造性は、びまん型胃癌リスク因子の層別化による、将来的な予防医学への応用である。解析で得られたリスク因子保持者を抽出し、重点的なスクリーニングやリスク因子の回避の指導を行うことで、より効率的なびまん型胃癌の予防に寄与できると考えられる。

3. 研究の方法

(1)CDH1病的胚細胞バリエーションの機能解析、機序の解明

代表者が報告したCDH1の病的胚細胞バリエーションはp.G62V、p.T340A、p.L630V、p.V832M、p.E880Kの5つであり、これらの多くはデータベース上の解析では病原性ありと判定される。前者3つは細胞外ドメインに位置し、後者2つは細胞内ドメインに位置する。

細胞外ドメインは細胞同士の接着能に関与している。細胞内ドメインの変異も接着能を抑制するという報告もあるため (Suriano et al., 2003)、CDH1の上記5つのバリエーションが発現できるようにトランスフェクション法を用いて、ヒト胃上皮細胞であるHGaEpCに導入する。そして、CytoSelect™細胞接着アッセイで接着能を評価する。

CDH1の細胞内ドメインは、p120-カテニン、 β -カテニン、 γ -カテニンおよび δ -カテニンとの相互作用を介してアクチン細胞骨格に結合している。これらのタンパク質との結合能を評価するためにコムギ胚芽無細胞系を用いる。合成されたタンパク質にイムノクロマト法を用いて、これらのカテニンらとの結合能を評価する。そしてカテニンには様々な転写因子が結合するために、変異のある癌とない癌での転写因子の差異を解析する。具体的には、一般的な胃癌の細胞株であるAGSやKATO-IIIと、p.E880K変異があるLMSUを比較してLMSU特異的なエンハンサー領域を特定する。特定されたエンハンサー領域におけるmotif解析を施行し、濃縮されているmotifを抽出する。抽出されたmotifに関わる遺伝子発現の解析を行い、CDH1バリエーションにおいては

のような遺伝子発現の制御がなされているかを調べることで機序が解明できると考える。

(2) マウスにおける同様の立体構造を引き起こすバリエーションの探索及び機能解析、環境因子の負荷。

ヒトにおける CDH1 の p.G62V、p.T340A、p.L630V、p.V832M、p.E880K と、同様なタンパクの構造変化をもたらす Cdh1 変異マウスを購入する。バリエーションを保持したマウスに、飲酒・喫煙・ピロリ菌感染・塩分摂取といった環境因子を負荷して、胃癌ができるか観察する。発癌に至るまでに負荷した因子の定量も行う。発癌したものに対して HE 標本作製して、びまん型胃癌かどうか病理学的検証を行う。採取できた癌組織のエクソームシーケンスを行うことで、変異シグネチャーの解析を行うことができる。そこで、飲酒や喫煙の変異シグネチャーを認めれば、その環境要因の関与を特定できると考える。また、ゲノム検査の結果特徴的な変化があるかどうか (1) で示された遺伝子発現の変化があるかどうかとも検証する。

(3) ヒトにおける応用

(2) で特定できたリスク因子を基に、ヒトでも検証を行う。本邦で検査可能な FoundationOne® CDx では生殖細胞系列疑いの VUS が検出される特徴がある。C-CAT のデータベースにアクセス可能となれば、FoundationOne® CDx で検出された CDH1 のバリエーションと、臨床情報の照合が可能となる。マウスで認められた環境要因を基に、ヒトではどの程度負荷されると発癌したのかを検証する。

4. 研究成果

胃上皮を安定的に培養を行うための微小環境の調整をしていたが、3年間で安定的に培養するのは困難であった。新型コロナウイルスの影響もあり、細胞の取り扱いを習熟するのが困難な状態で試行錯誤をしていたが困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------