

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15940

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子発現解析を用いた胃底腺型胃癌の分子機序と発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism and carcinogenic mechanism of gastric adenocarcinoma of fundic-gland type using comprehensive gene expression analysis

研究代表者

深川 一史 (Fukagawa, Kazushi)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：80882175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃底腺型胃癌の網羅的遺伝子発現解析を世界で初めて行い、従来の胃癌の高分化型腺癌とは大きく異なる遺伝子発現プロファイルを示すことを明らかにした。また、NKX2-1/TTF-1 とその下流遺伝子(SFTPB、SFTPC、SCGB3A2 など)が胃底腺型胃癌に特異的に発現していることを示し、免疫組織化学分析でもそれを確認した。また、NKX2-1/TTF-1が胃癌細胞株において、その下流の標的遺伝子を調節できることを実証した。これらの結果から、肺や甲状腺で特異的に発現する転写因子であるNKX2-1/TTF-1が胃底腺型胃癌の発生においても重要な役割を果たしていることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺に特異的に発現する転写因子であるNKX2-1/TTF-1 とその下流遺伝子(SFTPB、SFTPC、SCGB3A2 など)が胃底腺型胃癌に特異的に発現していることを示し、免疫組織化学染色にてNKX2-1/TTF-1 および SFTPB が発現していることを確認した。さらに胃癌細胞株においてもNKX2-1/TTF-1が下流の標的遺伝子を調節できることも初めて実証した。これらの知見は今後、胃底腺型胃癌の解明に大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The comprehensive gene expression analysis of Gastric adenocarcinoma of fundic-gland type (GA-FG) was performed for the first time. GA-FG showed significantly different gene expression profile from well-differentiated adenocarcinoma of conventional gastric cancer. Bioinformatics analysis showed that NKX2-1/TTF-1 and its downstream genes, such as SFTPB, SFTPC, and SCGB3A2, are specifically expressed in cases of GA-FG. Moreover, immunohistochemical analysis confirmed that NKX2-1/TTF-1 and SFTPB are expressed at higher levels in GA-FG tumors than in the normal mucosa. We also demonstrated that NKX2-1/TTF-1 can regulate downstream target genes in both AGS and NUGC4 cells. Interestingly, NKX2-1/TTF-1, a tissue-specific transcription factor that is essential for the development of the lungs and thyroid, is ectopically expressed in GA-FG and can regulate downstream genes in the GA-FG tumor. This suggests that NKX2-1/TTF-1 plays an important role in the development of GA-FG.

研究分野：消化器内科

キーワード：胃底腺型胃癌 網羅的遺伝子発現解析 NKX2-1/TTF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌の主な原因として *Helicobacter pylori* (HP) の慢性持続感染が確立しており、随伴する胃粘膜の萎縮と腸上皮化生が胃癌の発生母地となることが知られている。我が国は HP 感染率が世界で最も高い国の1つであり、罹患率・死亡率のいずれも高い状態が長く続いてきたが、近年、世界的に HP 感染率が低下しており、我が国も同様の傾向である。今後、胃癌の発生率の緩やかな低下とともに、HP と関連の低い胃癌が増加することが確実視されている。その1つとして2007年に初めて報告された胃底腺型胃癌 (Gastric adenocarcinoma of fundic-gland type: GA-FG) が注目されており、2019年には消化器系腫瘍の WHO 分類第5版にも追加されるなど、広く認知されるようになった。胃底腺型胃癌の発癌機序は殆ど解明されておらず、Wnt/ カテニン系の活性化や GNAS 遺伝子変異などが指摘されているが、網羅的な遺伝子発現プロファイルを含めた研究は遅れている。

2. 研究の目的

胃底腺型胃癌の網羅的遺伝子発現解析・バイオインフォマティクス解析から特異的な遺伝子発現プロファイルを世界に先駆けて報告すること、更に分子生物学的解析・発現解析を組み合わせ、胃底腺型胃癌の発癌と発育進展の機序を解明することである。

3. 研究の方法

本研究は2017年3月に東京大学医学部倫理委員会承認を得て検体採取を開始している。内視鏡的粘膜下腫瘍剥離術の際に胃底腺型胃癌症例より組織を採取し、RNA を抽出して解析を行った。集積した17例の中で3組の胃底腺型胃癌の腫瘍-正常粘膜ペアに対してマイクロアレイ解析を施行した。また、典型的な胃の高分化型腺癌6例についても同様にマイクロアレイ解析を行った。遺伝子発現解析結果を確認するために、胃底腺型胃癌16例に対して免疫組織化学染色を行った。胃癌細胞株である AGS 細胞および NUGC4 細胞に NKX2-1/TTF-1 をコードする遺伝子を導入し、その標的遺伝子の転写変化を評価した。

4. 研究成果

世界で初めて胃底腺型胃癌に対して網羅的遺伝子発現解析を施行し、胃底腺型胃癌に特異的な遺伝子プロファイルを明らかにした。

3例の胃底腺型胃癌の腫瘍部、正常部および、高分化型腺癌の腫瘍部、正常部における58201個の遺伝子プローブのうち、平均+ 2SD を満たす2379個のプローブに対して階層クラスタツリーを作成すると、Fig. 1 a に示すように、胃底腺型胃癌と典型的な胃の高分化型腺癌が明確にクラスター化されている。この結果は、胃底腺型胃癌と典型的な胃の高分化型腺癌とは遺伝子発現が大きく異なることを示唆する。

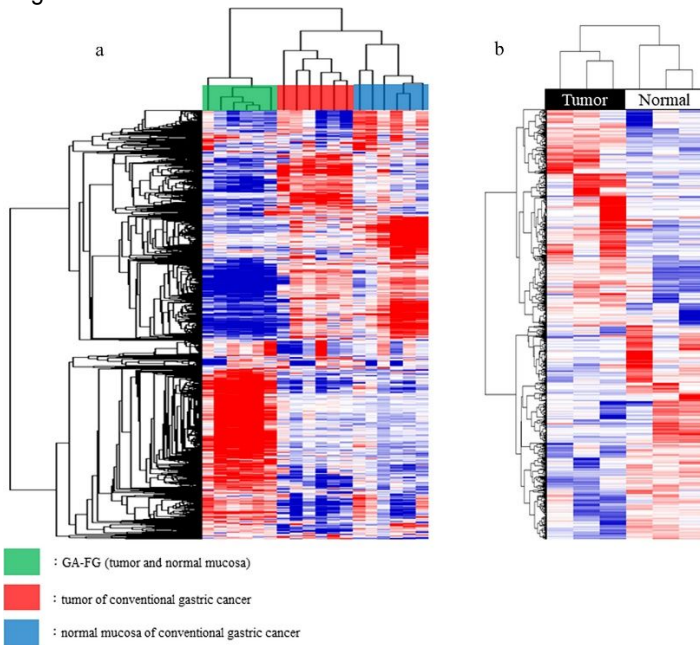
そこで、胃底腺型胃癌の腫瘍部と正常部の発現の違いについて詳しく調べた。

胃底腺型胃癌の腫瘍部と正常部を比較して2倍以上の発現変化を認めた2805遺伝子プローブを同定した (Fig. 1 b)。胃底腺型胃癌の腫瘍部で発現上昇している上位30遺伝子には、SFTPB、SFTPC、および SCGB3A2 とともに、肺/甲状腺分化のマスター制御因子である転写因子 NKX2-1/TTF-1 が含まれていた。これらの遺伝子は比較的肺に特異的に発現しており、NKX2-1/TTF-1 は肺において SFTPB、SFTPC、および SCGB3A2 など複数の遺伝子を直接活性化する。

16例の胃底腺型胃癌標本に対する免疫組織化学染色では、隣接する正常粘膜と比較して、SFTPB は腫瘍内でより高い発現を示す ($P < 0.05$) 一方で、SCGB3A2 では差は認めなかった ($P = 0.341$) (Fig. 2)。腫瘍部および正常部の HE 染色と NKX2-1/TTF-1 の免疫組織化学染色の代表例を示す (Fig. 3 a-d)。NKX2-1/TTF-1 の発現は正常部と比較し腫瘍部でより高いことが示された ($P < 0.05$) (Fig. 3e)

次に、NKX2-1/TTF-1 が陰性の胃細胞株において、NKX2-1/TTF-1 がその下流遺伝子の発現を誘導できるか調べた。野生型の TTF-1/NKX2-1 (pCMV-puro-TTF1) を導入した AGS では、コントロールや empty vector (pCMV-puro) TTF1/NKX2-1 の欠失変異体 (pCMV-puro-TTF1-HDD) と比較して、SFTPA、SFTPB、SCGB3A2、MYBPH の発現が増加していた。また、同様に野生型の TTF-1/NKX2-1 を導入した NUGC4 では、SFTPA と SFTPB の発現が増加していた (Fig. 4)。これらの結果から、NKX2-1/TTF-1 が胃癌細胞株においても、その下流の標的遺伝子を調節できることが実証できた。以上の結果から、NKX2-1/TTF-1 およびその下流遺伝子群が胃底腺型胃癌の発生において重要な役割を果たすことが示唆された。

Fig. 1

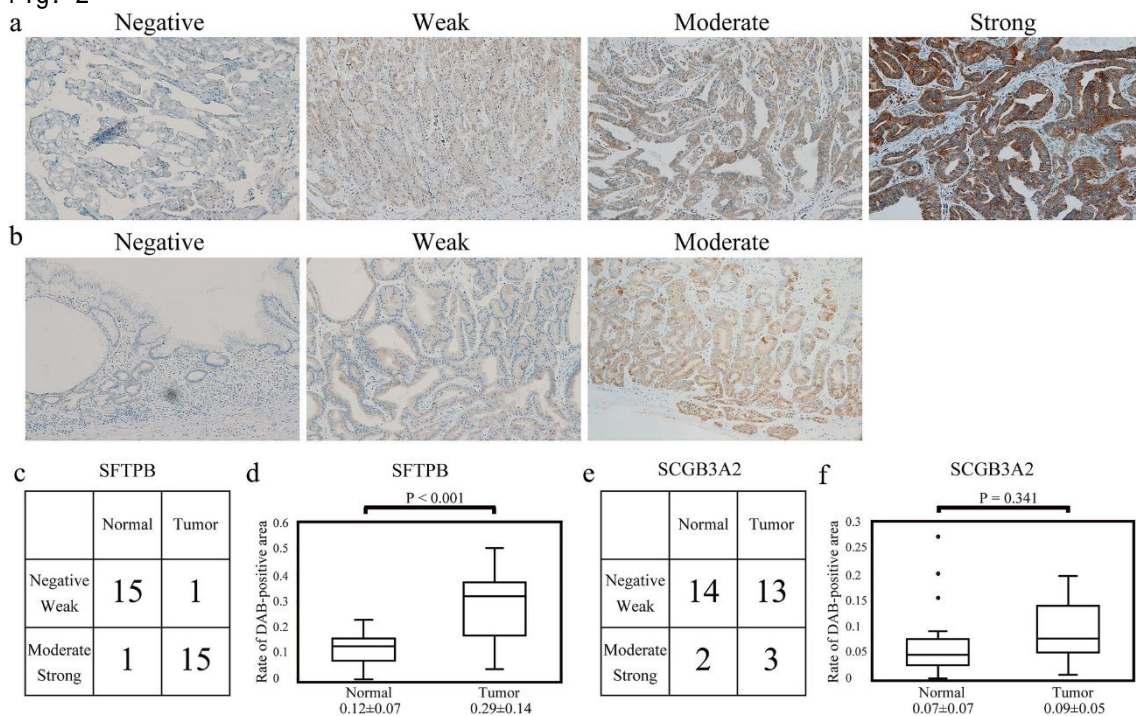


Gene expression analysis of gastric adenocarcinoma of fundic gland type and well-differentiated adenocarcinoma of conventional gastric cancer.

a A hierarchical cluster tree of unsupervised 2390 probes satisfying mean + 2 standard deviation criterion.

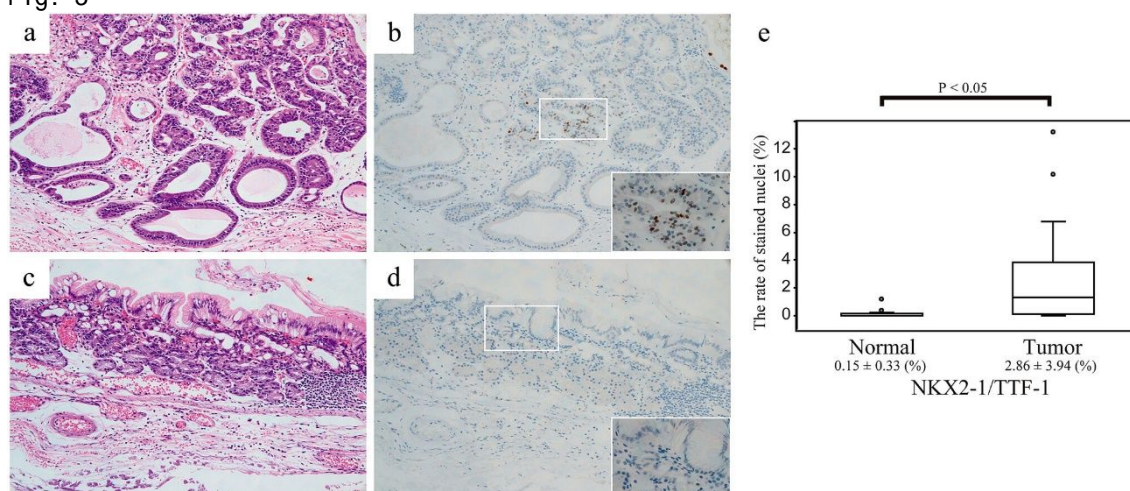
b A hierarchical cluster tree of the 2805 probes (1410 up-regulated, 1395 down regulated) which demonstrated over a two-fold expression difference between tumor and normal mucosa of gastric adenocarcinoma of fundic-gland type

Fig. 2



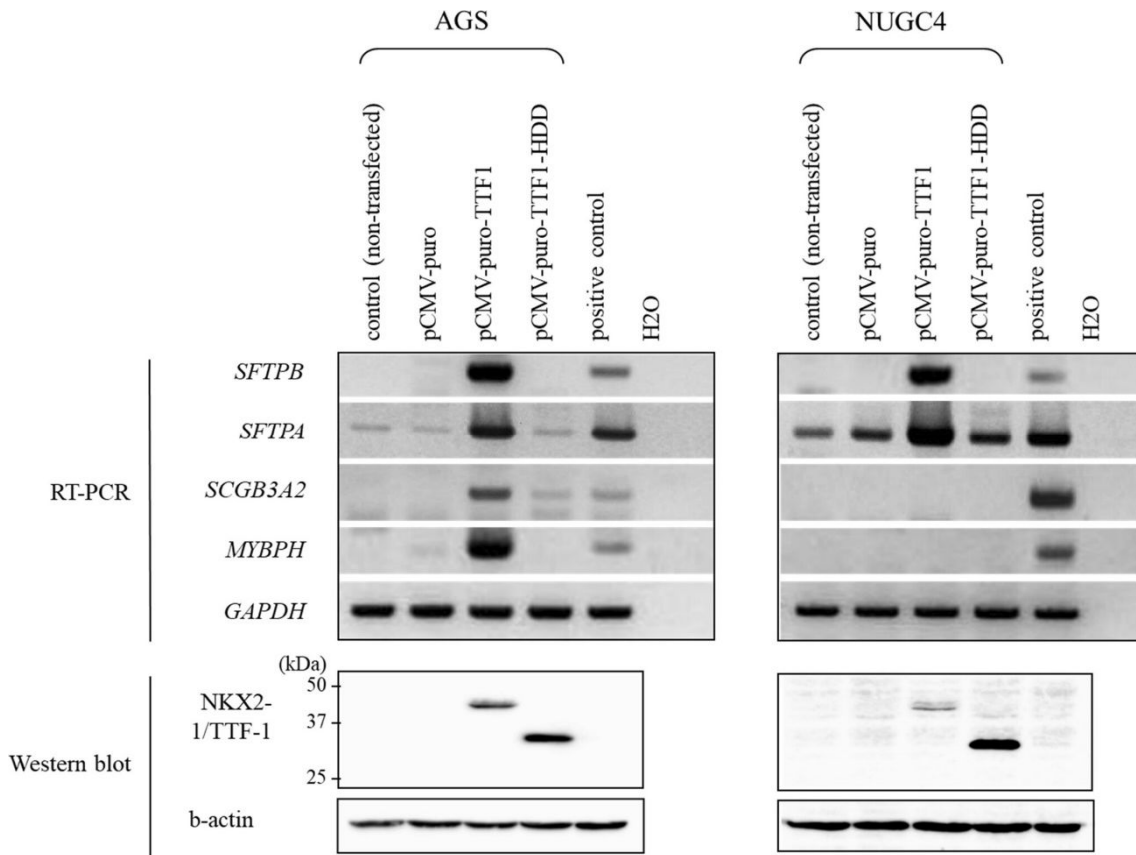
- Results of immunohistochemical staining for SFTPB and SCGB3A2 protein in GA-FG.
- The representative immunoreactivity intensity of cytoplasmic SFTPB with negative, weak, moderate, strong ($\times 200$).
 - The representative immunoreactivity intensity of cytoplasmic SCGB3A2 with negative, weak, moderate ($\times 200$).
 - The comparison of SFTPB expression between GA-FG and surrounding normal mucosa by immunohistochemical staining.
 - The comparison of immunohistochemical staining positive area rate of SFTPB between GA-FG and surrounding normal mucosa.
 - The comparison of SCGB3A2 expression between GA-FG and surrounding normal mucosa by immunohistochemical staining.
 - The comparison of immunohistochemical staining positive area rate of SCGB3A2 between GA-FG and surrounding normal mucosa.

Fig. 3



- Results of HE and immunohistochemical staining for NKX2-1/ TTF-1 protein in GA-FG.
- HE staining in the tumor area ($\times 200$).
 - Immunohistochemical staining for NKX2-1/TTF-1 in the tumor area ($\times 200$). The inset of the lower right is a high-powered view of the area enclosed by the white square ($\times 400$).
 - HE staining in the normal area ($\times 200$).
 - Immunohistochemical staining for NKX2-1/TTF-1 in the normal area ($\times 200$). The inset of the lower right is a high-powered view of the area enclosed by the white square ($\times 400$).
 - The rate of stained nuclei of 16 cases of GA-FG between tumor and surrounding normal.

Fig. 4



Results of expression in AGS (left) and NUGC4 cells (right) in vitro. Upper panel; RT-PCR detecting *SFTPB*, *SFTPA*, *SCGB3A2*, *MYBPH*, and *GAPDH* mRNA in AGS and NUGC4 cells transfected with empty vector (pCMV-puro), wild-type NKX2-1/TTF-1 (pCMV-puro-TTF1) or homeodomain deletion mutant NKX2-1/TTF-1 (pCMV-puro-TTF1-HDD) expression constructs. MKN-1 (for *SFTPB*, *SCGB3A2*, and *GAPDH*), WiDr (for *SFTPA*), and HepG2 (for *MYBPH*) cells were used as positive controls. Lower panel: NKX2-1/TTF-1 protein expression was detected by western blot analysis using anti-NKX2-1/TTF-1.

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 Fukagawa Kazushi、Takahashi Yu、Yamamichi Nobutake等	4. 巻 26
2. 論文標題 Transcriptome analysis reveals the essential role of NK2 homeobox 1/thyroid transcription factor 1 (NKX2-1/TTF-1) in gastric adenocarcinoma of fundic-gland type	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 44 ~ 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-022-01334-5	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深川一史 高橋悠 藤城光弘
2. 発表標題 胃底腺型胃癌の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第108回 日本消化器病学会 総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深川一史 高橋悠 小池和彦
2. 発表標題 生検検体を用いた胃底腺型胃癌の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第101回日本消化器内視鏡学会 総会
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
---------	---------