

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590682

研究課題名(和文) エピジェネティクスを利用した新規胃癌リスクマーカーの開発

研究課題名(英文) Identification of novel gastric cancer risk markers

研究代表者

前北 隆雄 (MAEKITA, TAKAO)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10326358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胃粘膜萎縮陰性例を血清PG値で、
群に分類しメチル化レベルを比較した。遺伝子プロモーター領域は
と群で群よりそれぞれ有意に高かった(TM: 16.3 ± 9.9 , 7.4 ± 10.0 vs 2.6 ± 6.0 , $P < 0.05$, $P < 0.05$; HAND1: 6.5 ± 4.7 , 6.9 ± 6.9 vs 2.4 ± 4.9 , $P = 0.05$, $P < 0.05$; FLNc: 1.1 ± 0.7 , 1.6 ± 1.6 vs 0.4 ± 1.0 , $P = 0.10$, $P < 0.05$)。繰り返し領域は群と群で群より有意に低かった。DNAメチル化異常は炎症活動度が高い
群で顕著で、未分化癌リスクマーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the correlation between altered mucosal DNA methylation levels and activity of H. pylori-related gastritis, because inflammatory activity are associated with the development of diffuse-type gastric cancer. Methylation levels (promoter CpG islands (FLNc, HAND1, THBD, p41ARC, HRASLS, and LOX) and the CpG sites of non-coding repetitive elements (Alu and Sata) were examined by real-time methylation-specific PCR or bisulfite pyrosequencing. Methylation levels of the six CpG islands were consistently increased, and those of the two repetitive elements were consistently decreased in a stepwise manner with the activity of gastric inflammation. The observed correlation between altered DNA methylation levels and activity of H. pylori-related gastritis appears to be one of the relevant molecular mechanisms underlying the development of diffuse-type cancer. We might identify novel diffuse-type gastric cancer risk marker.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 胃癌 リスクマーカー

1. 研究開始当初の背景

胃癌は、世界的にみて、最も主要な癌の一つであり、現在死亡数は肺癌に次いで第2位を記録し、特にアジア圏においては依然高い癌死亡数を維持している。本邦においては、胃X線二重造影法による胃癌検診が全国的に普及し、死亡率減少効果が達成されている。加えて胃内視鏡検査の進歩発展は、胃癌早期発見に更に拍車をかけている状況にある。一方、胃癌スクリーニング効率向上の観点からは、胃癌発生リスクの評価に基づく対象集約が有効である事は言を待たない。しかしながら、個人の胃癌発生リスクを簡便かつ被験者の負担が比較的軽い手段を用いて評価する方法論は確立されて居らず、臨床の場において開発が強く求められる所である。胃癌発生リスク評価法の確立は、胃癌の二次予防ばかりでなく、一次予防にも大いに貢献する事が想定される。

申請者らは、これまで胃癌リスク診断確立を目的に研究に取り組んできた。 すなわち、

)血清ペプシノーゲン(PG)の測定系を確立し、血清PG値が萎縮性胃炎の程度を反映することを報告した(Ichinose, M. et al. Clin Chim Acta 126, 183-191, 1982)。

)慢性萎縮性胃炎の進展に伴い胃癌発生率の段階的な上昇をみとめ、化生成胃炎での胃癌発生率およびリスクが最も高いこと、そして血清PG値と血清 *Helicobacter pylori*(*H.pylori*)抗体を併用し、個人の胃癌発症リスクの予測が可能であること(Ohata, H. Ichinose, M. et al. Int J Cancer 109:138-143, 2004)を明らかにした。

)血清PG値と血清 *Helicobacter pylori*(*H.pylori*)抗体を併用し、より細分化することにより高精度に個人の胃癌発症高リスク群の絞り込みが可能であること(Yanaoka, K. Ichinose, M. et al. Int J Cancer 123:917-926, 2008 Yanaoka K, Ichinose M; Cancer Epidemiology,

Biomarkers and Prevention 17: 838-845, 2008)を明らかにした。

更に、分子生物学的解析を用いた胃癌リスク診断確立の可能性を検討するために、胃癌で比較的高頻度に認められるエピジェネティックな現象の一つであるDNAメチル化異常に着目し、検討を行った。すなわち、DNA一次構造上、CpG配列部位に存在するシトシンは、二本鎖DNAの両方が、メチル化による修飾を受ける。DNA一次構造上のシトシンメチル化は、各遺伝子の部域でユニークなパターンをとり、体細胞では、DNA複製後もそのまま維持され、細胞の長期記憶装置として働く。このシトシンメチル化は遺伝子発現調節に重要な役割を果たしており、特に遺伝子プロモーター領域のCpGアイランド(CpG islands: CGI)がDNAメチル化されると、クロマチン構造の変化などを通じてその下流遺伝子の発現が永続的に抑制(サイレンシング)される。従って、癌抑制遺伝子(Tumor Suppressor Gene: TSG)のプロモーター領域CGIが誤ってメチル化されると、突然変異や染色体欠失同様、当該遺伝子是不活化される。現在まで、多くの癌抑制遺伝子が、**プロモーター領域CGIのメチル化により不活化される事が報告されている。**申請者らは、**卵巣癌において、Wntシグナルを介する重要な癌抑制遺伝子 *SFRP1* がプロモーター領域CGIのメチル化により不活化されていること**(Takada, T. **Maekita, T.** et al. Cancer Science 95:741-744, 2004)を明らかにした。

また、**非癌部胃粘膜においても、癌化と直接関連しないものの、過去の発癌因子への暴露を反映したDNAメチル化が少なからず存在(発がんの素地)**し、その量は発癌の確率と相関する可能性が想定されている。この点について申請者らは、**非癌部胃粘膜に蓄積したDNAメチル化異常の量が、胃癌リスクを反映している可能性について検討を行った。**

その結果、

) 健常者を対象に胃粘膜生検検体から抽出した DNA を用いて、メチル化異常の蓄積を *H.pylori* 感染の有無により比較検討した結果、*H.pylori* 陽性者では陰性者に比べて、癌抑制遺伝子 *CDKN2A* など 8 領域の遺伝子プロモーター領域において 5.4 倍 ~ 303 倍と高いレベルのメチル化異常の蓄積が認められ、

***H.pylori* 感染によりヒト胃粘膜の DNA メチル化が強力に誘発されること、また**

***H.pylori* 感染陰性者同士の比較では、健常者胃粘膜よりも胃癌患者の非癌部胃粘膜のほうが、2.2~32 倍の DNA メチル化異常が蓄積していること (Maekita, T. et al: *Clinical Cancer Research* 12, 989-995, 2006 Ushijima, T. Nakajima, T. **Maekita, T.**: *Journal of Gastroenterology* 41:401-407, 2006) を明らかにした。**

非癌部に蓄積した DNA メチル化異常の量が、癌リスクを反映している可能性について検討したのは世界に先駆ける発表であり多大な反響を呼び、**世界的に高い評価を得た (RESERCH HILIGHT Nature Reviews Cancer 6, 172-173, 2006 SELECTED SUMMARIES Gastroenterology November 1647-1649, 2006)。**

) DNA の遺伝子以外の繰り返し領域の塩基配列でも、*H.pylori* 感染非癌部胃粘膜には、癌細胞と同じく低メチル化が部分的ではあるがすでに起きていること (Yoshida T, **Maekita T.**, Ichinose M, et al: *Int J Cancer* 2010 epub ahead of print) も明らかにした。

H.pylori 感染による胃粘膜でのメチル化異常は、遺伝子領域での高メチル化も遺伝子以外領域での低メチル化も世界初の報告であり、胃粘膜におけるメチル化研究領域で申請者らは先駆的な立場にいる。

) 多発性胃癌の患者は、単発胃癌患者より異所性、異時性再発のリスクが高いことは知られている。そこで、*HP* 感染陰性者におい

て、健常者胃粘膜、単発胃癌患者の非癌部胃粘膜、異時性多発性胃癌患者の非癌部胃粘膜のメチル化レベルを測定した。その結果、**健常者、単発胃癌患者、異時性多発性胃癌患者の順でメチル化レベルが上昇することが示された。** (Nakajima, T. **Maekita, T.** et al: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 15:2317-2312,2006)。

) 胃癌患者の癌部と同一患者非癌部胃粘膜で比較したところ、癌抑制遺伝子の DNA メチル化は、癌部に比べて非癌部で軽度であった (Enomoto, S. **Maekita, T.** et al: *Cancer Sci.* 12:1853-1861, 2007)。

以上、一連の報告を行って来た。

) また、動物実験でスナネズミを対象に、***H.pylori* 感染により胃粘膜の DNA メチル化が誘発され、除菌によりメチル化状態が改善する遺伝子がある**ことを明らかにした。

(Niwa T, **Maekita T.** et al: *Cancer Research*, 15;70(4):1430-40, 2010)

2 . 研究の目的

本研究は、申請者らのこれまでの研究結果および知見に基づき、胃粘膜由来 DNA のメチル化解析により、**個人の胃癌リスク評価の可能性を検討すると共に、最終的には胃癌ハイリスク群の同定を目指した。**すなわち胃癌前癌病変と考えられている慢性胃炎・腸上皮化生・胃腺腫・胃癌発生に至る過程での胃粘膜 DNA のメチル化変化を検討し、**胃癌リスクを強く反映する新規遺伝子領域を検索し、その意義を検討するために、これらの胃癌の各段階、特に *H.pylori* 感染症の進展との関連で詳細な検討を行うこと**を目的とした。

3 . 研究の方法

胃癌手術標本、内視鏡検査施行時に採取した生検材料、胃癌細胞株などを用いて、胃癌組織あるいは胃癌症例の**非癌部組織**におけ

る DNA のメチル化解析を行い、メチル化の蓄積が胃発癌リスクをより強く反映する遺伝子プロモーター領域を検索した。特に、胃癌発生に関して、胃癌多発地域のメインルートと考えられている atrophy-metaplasia-cancer sequence の過程での胃粘膜 DNA のメチル化変化を検討し、胃発癌リスクを反映する事が、想定される遺伝子領域を検索した。一般に、*H.pylori* 感染者は非感染者の 2.2 ~ 21 倍の胃癌リスク上昇があると報告されている(Correa P. et al:Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14: 1865-1868, 2005)。そのため *H.pylori* 感染のメチル化に及ぼす影響を検討する。

申請者が、これまでに明らかにした *CDKN2A*, *HAND1* のプロモーター領域をはじめとする胃発癌に伴うメチル化変化部位、8 遺伝子領域に関して、胃癌発生リスクマーカーとしての意義を検討するために、これら **遺伝子領域のメチル化レベルと胃粘膜病理組織所見(特に、胃炎の活動度、胃粘膜萎縮・腸上皮化生の有無)との関連、胃発癌の各段階、特に *H.pylori* 感染症の進展、除菌との関連について詳細な検討を行った。**

本研究項目で対象とする遺伝子領域としては、がん抑制遺伝子の発現調整に重要なプロモーター領域 CGI 中心部(core)として、*CDKN2A*, *hMLH1*, *LOX*, *CDH1* がん関連遺伝子以外のプロモーター領域 CGI 中心部として、*THBD*, *FLNc*, *HRASLS*, *HAND1* 遺伝子 がん抑制遺伝子の発現には直接関与しないプロモーター領域 CGI 辺縁部(non-c)として、*CDKN2A*, *hMLH1*, *CDH1* 遺伝子、がん関連遺伝子以外のプロモーター領域 CGI 辺縁部として、*THBD* 遺伝子 非プロモーター領域 CGI として *p41-ARC* 遺伝子 などを用いて解析した。

4. 研究成果

H.pylori 感染による萎縮性胃炎において、胃

粘膜の DNA メチル化異常の蓄積が分化型胃癌発癌リスクと相関することを示してきたが、萎縮を背景としない未分化型胃癌発癌の DNA メチル化との関係についての詳細は不明であるため検討することとした。

検体は PG 法陰性の健常者 56 名 (男 29 女 27: *Hp* 陰性 34 陽性 22)の内視鏡検査の際に胃前庭部より採取した。DNA を抽出し、分化型胃癌発癌において高メチル化を示す遺伝子(*TM*, *HAND1*, *FLNc*)のプロモーター領域の CpG アイランドと低メチル化を示す繰り返し領域(*Alu*)のメチル化レベルを real-time MSP 法と Pyrosequencing 法によりそれぞれ解析した。われわれは、胃粘膜萎縮を評価する血清 PG 値陰性群のなかで、特定の集団(群: PG I > 70 ng/mL かつ PG I/II ratio < 3.0)は 群(PG I > 70 ng/mL かつ PG I/II ratio > 3.0)や 群(PG I < 70 ng/mL かつ PG I/II ratio > 3.0)より未分化型胃癌がん発生率が高いことを報告した(Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008: 838-45)。胃粘膜 DNA メチル化異常の蓄積と未分化型胃癌発癌リスクについて検討しリスクマーカーとしての有用性を検証してみた。血清 PG 値を用いて、上記のように対象を α 、 β 、群に分類し、それぞれのメチル化レベルを比較した。遺伝子プロモーター領域のメチル化レベルは 群と β 群で α 群よりそれぞれ有意に高かった(*TM*:16.3 \pm 9.9, 7.4 \pm 10.0 vs 2.6 \pm 6.0, $P < 0.05$, $P < 0.05$; *HAND1*:6.5 \pm 4.7, 6.9 \pm 6.9 vs 2.4 \pm 4.9, $P=0.05$, $P < 0.05$; *FLNc*: 1.1 \pm 0.7, 1.6 \pm 1.6 vs 0.4 \pm 1.0, $P=0.10$, $P < 0.05$)。繰り返し領域のメチル化レベルは promoter 領域とは逆に 群と β 群で α 群よりそれぞれ有意に低かった(43.6 \pm 3.0, 44.9 \pm 4.6 vs 48.5 \pm 3.0, $P < 0.05$, $P < 0.05$)。DNA メチル化異常は胃粘膜の炎症の活動度が高いと考えられる β 群、群で顕著であり、萎縮性胃炎が軽度な胃粘膜の未分化型胃癌発癌のリスクと関連しており、分化

型胃癌同様癌化に深く関与し、リスクマーカーとして有用である可能性が示唆された。

共同の研究者として、国立がんセンター研究所主体で行われた胃癌新規リスクマーカーの探索研究に参加した。*H.pylori*既感染の胃癌症例と*H.pylori*既感染の非胃癌症例でマイクロアレイを用いて、胃癌症例で

hypermethylationが確認される15CGIs (#1 EMX1, #2 miR663, #3 NKX6-1 NK6, #4 OTP, #5 OPLAH, #6 CYP1B1, #7 NEFM, #8 PMF1, #9 BDNF, #10 SSTR5, #11 MYO1D, #12 CAMK2N2, #13 GATA4, #14 NFATC1, #15 ANKRD9) がリスクマーカー候補として挙げられ、その有用性を*H.pylori*既感染の胃癌10症例と*H.pylori*既感染の非胃癌10症例で検討した。7CGIs (#1 EMX1, #2 miR663, #3 NKX6-1, #4 OTP, #5 OPLAH, #6CYP1B1, #7 NEFM) において、胃癌症例非がん部胃粘膜のほうが*H.pylori*既感染の非胃癌健常者胃粘膜よりも有意にメチル化異常が蓄積されえおり、新規の胃癌リスクマーカーとして有用ではないかと考えられた。

今後、こういった新たな胃癌リスクマーカー候補に、数症例での前向き検討をする予定であり、研究を継続していく所存である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

H. pylori の発がんメカニズム：感染診断と除菌 前北隆雄 榎本祥太郎 吉田岳市 井口幹崇 加藤順 一瀬雅夫 感染症内科 科学評論社 vol.2 No.4 363-370 2014 査読無

臨床検査 ここまで進んだ検査の世界 各論 7 消化管 前北隆雄 井上泉 井口幹崇 加藤順 一瀬雅夫 診断と治療 診断と治療社 vol.102 No.1 51-57 2014 査読無

Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active *Helicobacter pylori*-related gastritis. Yoshida T, Kato J, Maekita T, Yamashita S, Enomoto S, Ando T, Niwa T, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Iguchi M, Tamai H, Ushijima T, Ichinose M. *Gastric Cancer* Oct;16(4):488-97, 2013
DOI 10.1007/s10120-012-0230-x 査読有

胃癌診療の今～特に診断法と治療法の変遷について 前北隆雄 一瀬雅夫 *Medical Practice* 文光堂 vol.30 No.7 2013 査読無

Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses reveal an association between the CpG island methylator phenotype and oncogenic mutations in gastric cancers. Kim JG, Takeshima H, Niwa T, Rehnberg E, Shigematsu Y, Yoda Y, Yamashita S, Kushima R, Maekita T, Ichinose M, Katai H, Park WS, Hong YS, Park CH, Ushijima T. *Cancer Letter* Mar 1:330(1):33-40, 2013
doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.022. 査読有

Identification of gastric cancer risk markers that are informative in individuals with past *H. pylori* infection. Nanjo S, Asada K, Yamashita S, Nakajima T, Nakazawa K, Maekita T, Ichinose M, Sugiyama T, Ushijima T. *Gastric Cancer* Oct;15(4):382-8, 2012 査読有

慢性胃炎におけるエピジェネティクス異常と胃癌リスク診断応用 榎本祥太郎 前北隆雄 吉田岳市 中沢和之 加藤順 一瀬雅夫 *Helicobacter Research* vol.16 no.2 136-141 2012 査読無

[学会発表](計 4件)

Genome structure associated with susceptibility to aberrant DNA methylation induction by *H.pylori* infection or aging
ゲノム構造とピロリ菌感染または加齢による DNA メチル化異常の誘発感受性との関連 南條宗八 山下聡 レンバーグ・エミル 安藤孝将 前北隆雄 一瀬雅夫 杉山敏郎 牛島俊和 第 71 回 日本癌学会学術総会(札幌) ポスター P-2341 2012.09.20

胃未分化癌発癌母地における DNA メチル化異常 吉田岳市 **前北隆雄** 加藤順
第 19 回 JDDW 2011 (第 53 回 日本消化器病学会大会) ワークショップ W14
エピジェネティクスと消化器癌
2011.10.21

Gastric cancer risk markers that reflect epigenomic damage induced by Helicobacter pylori infection
ヘリコバクター・ピロリ菌によるエピゲノム障害を反映した胃がんリスクマーカーの同定 南條宗八 浅田潔 山下聡 中島健 **前北隆雄** 二瀬雅夫 杉山敏郎 牛島俊和 第 70 回 日本癌学会学術総会 (名古屋) 口頭発表 J3-2 H.pylori J-3110 2011.10.05

DNA methylation in gastric mucosae at risk for diffuse-type cancer
胃未分化癌のリスクが高い胃粘膜では DNA メチル化異常が高度に誘発されている 吉田岳市 山下聡 **前北隆雄** 榎本祥太郎 出口久暢 井上泉 井口幹崇 玉井秀幸 加藤順 牛島俊和 二瀬雅夫 第 70 回 日本癌学会学術総会 (名古屋) ポスター P-2020 2011.10.04

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前北 隆雄 (MAEKITA TAKAO)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：10326358

(2) 研究分担者

二瀬 雅夫 (ICHINOSE MASAO)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号：50143425

(3) 連携研究者

()

研究者番号：