

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293168

研究課題名(和文)ピロリ菌関連疾患に対する個別化医療への取り組み

研究課題名(英文) Personalized medicine for patients with Helicobacter pylori infection

研究代表者

松田 浩一 (Matsuda, Koichi)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：90401257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・ピロリ菌は最も頻度が高い病原性細菌の一つであり、感染者における疾患発症機構の解明及び個別化医療の実現を目的として研究を実施した。これまでにPSCA多型が胃潰瘍及び膀胱がん、肺がんの発症に関わる事、がん患者において血中PSCAが高値となることを示した。また400名の内視鏡受診者の血液および生検組織の解析結果から、胃粘膜組織におけるPSCAの発現と遺伝子多型が関連を示すこと、また胃がんのリスクが高いTT型を持つ人では除菌後のPSCA発現が顕著に上昇することが明らかとなった。除菌後胃がんにおいては、PSCAの発現上昇が寄与していると示唆され注意深い経過観察が必要になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：H. pylori is a gram-negative bacterium which is associated with gastric carcinoma, peptic ulcer, and MALT lymphoma. We have identified the association of prostate stem cell antigen (PSCA) polymorphism with H. pylori-related diseases including gastric cancer and peptic ulcer, however the role of this genetic variations on disease pathogenesis was largely remained to be elucidated. We have identified that PSCA variation is associated with risk of gastric ulcer, bladder cancer, and lung cancer. In addition, we found that PSCA protein is increased in the serum of several cancer patients. Moreover, T allele of SNP rs2294008 is associated with higher expression of PSCA mRNA. Interestingly, PSCA expression is decreased in gastric mucosa of H. pylori carrier and its expression was increased after eradication of H. pylori. Our finding suggests the possible role of PSCA in gastric cancer risk especially among subjects after H. pylori eradication.

研究分野：ゲノム医学

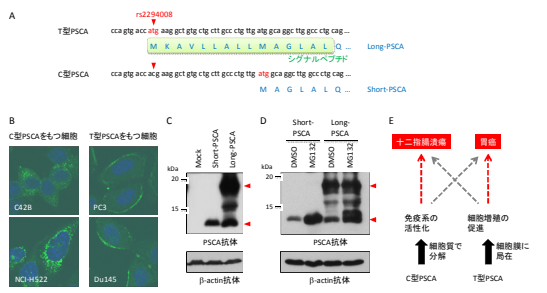
キーワード：ヘリコバクター・ピロリ菌 SNP

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染は、50歳以上の日本人の50-70%に認められ胃癌や胃十二指腸潰瘍の原因となるが、胃癌の生涯罹患率は約8%、胃十二指腸潰瘍で10-15%程度であり全ての感染者がこれらの疾患を発症するわけではない。また、これまでの疫学研究により十二指腸潰瘍の患者はピロリ菌感染があるにもかかわらず胃癌のリスクが低い事が知られていた。このようにピロリ菌感染後の臨床経過には個人差があるが、その違いにはピロリ菌株の違いや食事・ストレスなどの環境因子に加え、宿主側の遺伝的な素因が関与していると考えられている。

近年ゲノムワイド関連解析という手法によって、様々な疾患の感受性遺伝子が明らかとなっている。これまで我々の研究グループは感染症の重症化に関わる遺伝子の探索を行い、慢性B型肝炎やHCV陽性肝癌の関連遺伝子を報告してきた(研究業績3,4,7-18,20-23)。今回我々は1043人の十二指腸潰瘍患者及びコントロール21694人を用いて全ゲノム関連解析を行った。その結果、PSCA及びABO遺伝子が十二指腸潰瘍の発症と強い関連を示す事を明らかとした。さらにこの結果は独立した2集団においても確認された。

PSCA遺伝子領域で最も強い関連を示したSNP(rs2294008)は開始コドンの26塩基上流に存在し、Tアレルを持つ人では新たな開始コドンを生じ(ACG→ATG)、N末が9アミノ酸長くなる。その結果、新たにシグナルペプチドが予測された(図A)。



実際に、Tアレルを持つ細胞株では、PSCA

タンパク質は糖鎖付加を経てGPIアンカー型の分子として細胞膜上に局在する事が実験的に証明された(図B,C)。一方Cアレルを持つ細胞株ではPSCAタンパク質は膜への局在を示さず、細胞内で速やかに分解された(図B,D)。膜型PSCAは細胞増殖を活性化することで、損傷を受けた十二指腸粘膜の修復を促進する一方胃癌のリスクを高めると考えられる。一方細胞質型PSCAの場合、分解された断片が細胞外に提示され免疫系が活性化することで、潰瘍を発症しやすくなる一方胃癌には予防的に働く可能性が考えられた(図E)。

2. 研究の目的

本研究では、研究期間内に以下の項目を明らかにすることを目標としている。まず全ゲノム関連解析や候補遺伝子解析によるピロリ菌関連疾患感受性遺伝子の同定。さらのこれらの解析結果やこれ迄の知見を元にピロリ菌感染者における疾患発症リスク予測システムの構築を目指す。またPSCA遺伝子多型による胃癌、十二指腸潰瘍発症の制御機構の解明を行う。

胃癌は日本人で最も多い癌であり、年間10万人が罹患し、5万人が亡くなっている。さらにピロリ菌は日本人だけでなく途上国を中心に多くの人種で感染が広がっており、今後途上国において平均寿命が伸びるに従い胃癌の発症者数の増加が見込まれる。そこで、ピロリ菌の感染者に対してどのような予防・検診システムを構築していくかは国際的にも重要な課題である。今後ピロリ菌の検査と遺伝子型測定を組み合わせることで、効果的な胃癌・消化性潰瘍の予防プログラムの確立と、疾患の早期発見につながると期待できる。今回の研究によって得られる成果は、実際の臨床応用に向けて非常に意義が高いものとなると期待できる。

またPSCAは前立腺癌を含む様々な癌で

高発現が報告されており、PSCA を標的とした抗体薬の開発も試みられている。しかし、抗体を治療に用いる場合、標的タンパク質の細胞膜への局在が必須であり、その為にはPSCA 遺伝子多型を用いて患者の選別が必要となってくる。治療効果の改善が見込めると期待できる。分子標的治療薬においては、腫瘍組織における標的分子の発現や遺伝子変異の有無などが治療対象患者を選択するためのバイオマーカーとして用いられてきたが、遺伝子多型が抗癌剤の治療効果と関連するという報告はほとんどない。PSCA 遺伝子多型は、ピロリ菌除菌による疾患予防だけでなく、PSCA を標的とした薬剤開発を考える上でも重要な因子と考えられる。

我々は全ゲノム関連解析という手法を通して、ピロリ菌によって生じる疾患発症（十二指腸潰瘍、胃癌）にPSCA の遺伝子多型（宿主側因子）が深く関与することを明らかとした。しかしながら、これらの遺伝子の違いが疾患の発症を制御する分子メカニズムはまだ十分に明らかになっていない。我々は宿主側の遺伝子の解析を通して、疾患の発症メカニズムの解明や、リスク予測システムの構築による予防や早期発見、さらにはPSCA の活性化が見られる癌に対する治療薬の開発につなげることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では3年間で以下の項目を解析対象とする。

- (1)ゲノム解析によるPSCA 多型と疾患リスクとの検討
- (2)疾患バイオマーカーとしての血中PSCA の評価
- (3)PSCA 遺伝子多型による胃癌、十二指腸潰瘍発症の制御機構の解明
- (1)がん及びピロリ菌関連疾患（消化性潰瘍）

についてPSCA 多型が発症リスクと関連するかどうかを検討する。具体的には、バイオバンクジャパンより約4,000例の胃潰瘍症例（十二指腸潰瘍非合併例）が供与済みであり、これらの症例を用いてPSCA 及びABO 遺伝子のタイピングを進めていく予定である。またがんで行ったGWASの結果を基に疾患リスクとの関連を検討する。

平成26-27年度は新規のピロリ菌関連疾患に対する遺伝子の同定を目的として、胃潰瘍（約1500症例）、消化性潰瘍（約2500例）、及び特発性血小板減少性紫斑病（約300例）を対象とした全ゲノム関連解析を行う予定である。既に得られた予備的なデータでは複数の遺伝子で特発性血小板減少性紫斑病の発症と関連が示唆された。これらの結果について、更なるサンプルを用いて再現性の検討と機能解析を進める予定である。

(2)また我々は膜型PSCA が培地中に分泌される事も明らかとしている。ELISAにて血中PSCA のアッセイ系を構築する予定である。抗体は市販のものを組み合わせて作成する予定であるが、必要に応じてモノクローナル抗体の作成を行う。これらのシステムを用いてがん患者血清中のPSCA 蛋白の測定を実施する。

(3)さらに胃内視鏡受信者を中心に胃粘膜組織におけるPSCA の発現を定量化し、PSCA 多型やピロリ菌感染との関連を検討し、PSCA の制御機構を明らかとする。

4. 研究成果

(1)PSCA遺伝子多型と疾患リスクの関連解析
胃潰瘍 4288 症例、膀胱癌 545 症例、肺癌 2005 症例及びコントロール 16567 名の解析の結果、PSCA 多型と疾患発症リスクと関連する事を明らかとした。またリスクアレルは、膀胱癌、肺癌は胃癌と、胃潰瘍は十二指腸潰瘍と一致していた。また肺癌組織においてPSCA

の発現を Tissue array で検討した結果、PSCA の発現が上昇していることが示された。

PSCA多型と胃潰瘍、肺がんリスクの相関

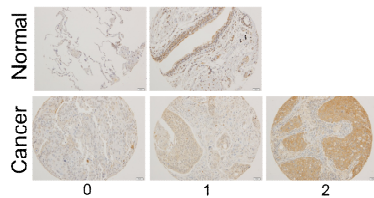
Disease	rs2294008			T freq.	P	OR
	CC	TC	TT			
*Gastric ulcer	686	2037	1565	0.602	1.07 x 10 ⁻⁵	0.90
**Lung cancer	247	914	844	0.649	0.0126	1.09
Control	2360	7587	6620	0.629		

PSCA多型と膀胱がんリスクの相関

Table Result of previously reported SNPs

#rsID	chr	chrloc	gene	relative pos.	case			control			P/trend	OR	MAF		allele	
					11	12	22	11	12	22			case	ctrl		
rs17074580	18	43309911	SLC14A1	0	5	86	439	28	979	4619	1.8x10 ⁻⁴	1.54	0.091	0.061	A	G
rs1014971	22	39332623	AP0BCE3A	-20904	117	256	157	920	2545	1761	0.0074	1.19	0.462	0.420	T	C
rs2294008	8	143761831	PSCA	0	241	228	61	2079	2418	730	0.0002	1.20	0.330	0.371	T	C
rs9642860	8	126718068	MYC	-30247	63	226	241	491	2165	2569	0.039	1.15	0.332	0.301	T	G
rs798766	4	1734239	TACC3	0	15	174	341	154	1461	3611	0.056	1.17	0.192	0.169	A	G
rs11892031	2	234565283	UGT1A8	0	528	4	0	5143	83	0	0.13	2.11	0.004	0.008	T	G
rs401681	5	1322087	CLPTM1L	0	56	245	229	579	2288	2359	0.64	1.03	0.337	0.330	A	G
rs710521	3	189645933	LEPREL1	28584	298	203	29	2948	1996	282	0.92	0.99	0.246	0.245	T	C
rs8102137	19	30296653	CCNE1	-6048	439	89	2	4355	834	37	0.92	0.99	0.088	0.087	A	G

肺組織におけるPSCAの発現上昇



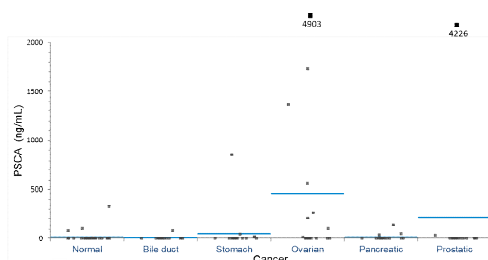
PSCA expression	0	1	2	Total
Lung cancer	91	41	6	138
Normal Lung	91	26	0	117

P = 0.01711

(2) PSCAの腫瘍マーカーとしての検討

さらに培養細胞においてPSCAが培養上清中に分泌されるという結果より、PSCAのバイオマーカーとしての有用性を検証するために、PSCAの測定系の確立を進めた。複数の抗体を検討した結果サンドイッチELISAの系を構築し、recombinant proteinを用いてassay系が機能することを確認した。更に複数のがん検体を用いて測定した結果、卵巣がんにおいて高頻度に上昇することが空きからとなった。これらの成果より、PSCAが腫瘍マーカーとして機能する可能性が示された。

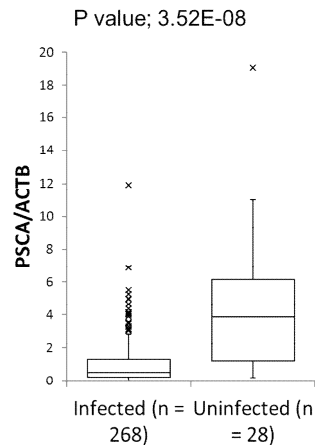
PSCA in serum of various cancer patients



(3) PSCA多型及びピロリ菌感染によるPSCA発現制御機構の解明

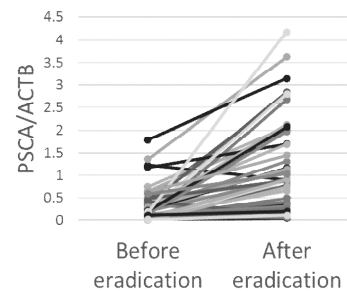
またPSCA多型やピロリ菌感染が遺伝子発現に及ぼす影響を検討する目的で胃内視鏡検査受診者から胃粘膜、血液の収集を進めた。気管内で350名の胃内視鏡受診者から同意を取得の上、胃生検組織の一部を解析用を取得した。平行して血液及び除菌後のサンプルも収集した。これまでピロリ菌感染者268名、非感染コントロール28名、また268名中54名については除菌後のサンプルも収集している。遺伝子発現解析の結果、感染者で有意にPSCAの発現が低下していた。

胃粘膜におけるPSCAの発現



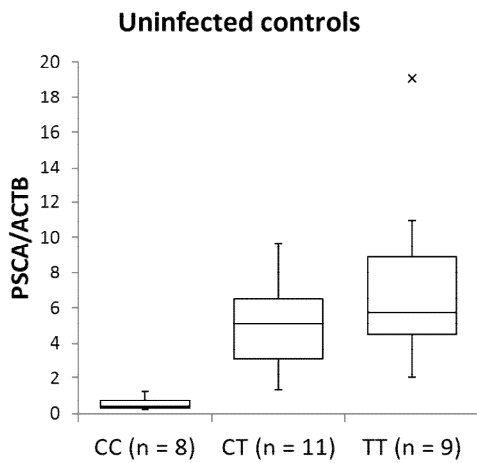
さらに除菌後の患者のほぼ全例でPSCAの発現が上昇していた。これらの結果より、PSCAの発現はピロリ菌感染によって抑制されることが示された。

P value; 6.67E-09
n = 54

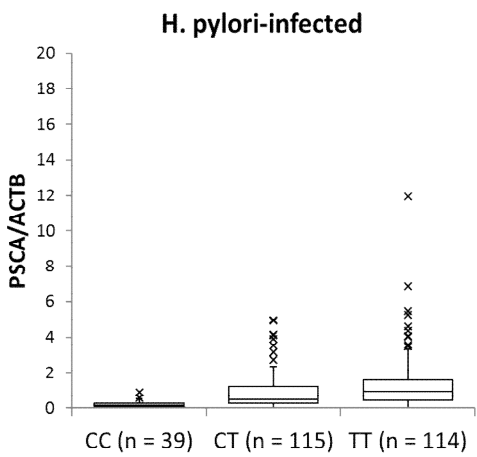


またPSCA多型と遺伝子発現の相関についても検討した。ピロリ菌感染者、非感染者のいずれにおいても、TT型においてPSCAの発現が高値を示した。

ピロリ菌非感染者におけるPSCA多型とPSCA発現の相関

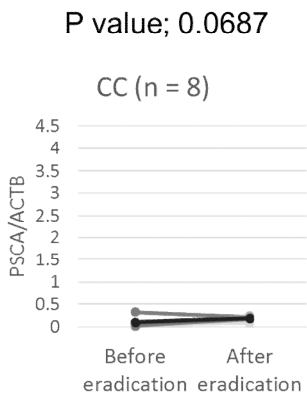


ピロリ菌感染者におけるPSCA多型とPSCA発現の相関

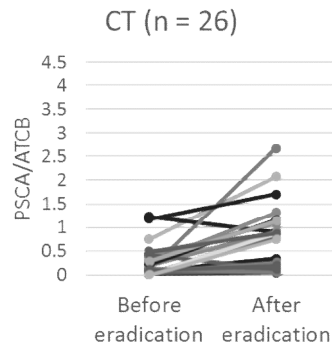


更に除菌後の発現レベルとPSCA多型の関係を検討した所、TTタイプでPSCAの発現がより高値になることが示された。これらの結果より、PSCAの発現上昇が、除菌後胃癌の原因となっている可能性が示唆された。

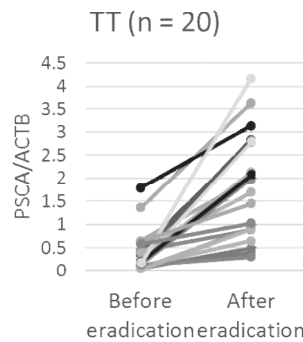
PSCA多型別の除菌前後のPSCA発現変化



P value; 3.26E-04



P value; 8.86E-05



以上のように、これまでに PSCA 遺伝子多型が胃癌、十二指腸潰瘍だけでなく、胃潰瘍及び膀胱がん、肺がんなど様々な疾患リスクと関連を示すことが示された。また一部のがん患者で PSCA が高値となることが明らかとなり、PSCA は複数のがん発症に寄与することが示された。PSCA は膜タンパク質であることから、PSCA が発がん、潰瘍形成における有用なバイオマーカーとなりうるだけでなく、治療標的になりうる事が示唆された。

さらに PSCA 多型と遺伝子発現が有意な相関を示したことから、PSCA 多型が遺伝子発現制御に寄与することで、疾患発症に関わる事が示唆された。

これらゲノム解析によって得られた知見について、疾患予防に応用可能かどうかを検討するには、前向きコホートでの検討が必要となる。現在、内視鏡受診者検体の収集を進めており、一部の患者では除菌後の検体も収集している。今後の宿主側の遺伝子多型やピロリ菌の薬剤感受性、病理を含む各種検査結果

と予後情報と合わせて解析することで、リスク予測モデルの構築が可能になると期待される。またこれらの試料を用いたマルチオミックス解析によって、ピロリ菌感染が消化管疾患発症を引き起こすメカニズムの解明や、新規疾患バイオマーカーの同定につながると期待される。

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 34 件) (すべて査読あり)

[1] K. Matsuda, A. Takahashi, C.D. Middlebrooks, W. Obara, Y. Nasu, K. Inoue, K. Tamura, I. Yamasaki, Y. Naya, C. Tanikawa, R. Cui, J.D. Figueroa, D.T. Silverman, N. Rothman, M. Namiki, Y. Tomita, H. Nishiyama, K. Kohri, T. Deguchi, M. Nakagawa, M. Yokoyama, T. Miki, H. Kumon, T. Fujioka, L. Prokunina-Olsson, M. Kubo, Y. Nakamura, T. Shuin, Genome-wide association study identified SNP on 15q24 associated with bladder cancer risk in Japanese population, *Hum Mol Genet*, 24 (2015) 1177-1184. (査読あり)

[2] P.H. Lo, Y. Urabe, V. Kumar, C. Tanikawa, K. Koike, N. Kato, D. Miki, K. Chayama, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk, *PloS one*, 8 (2013) e61279. (査読あり)

[3] C. Tanikawa, Y. Okada, A. Takahashi, K. Oda, N. Kamatani, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Genome wide association study of age at menarche in the Japanese population, *PloS one*, 8 (2013) e63821. (査読あり)

[4] C. Tanikawa, K. Matsuo, M. Kubo, A. Takahashi, H. Ito, H. Tanaka, Y. Yatabe, K. Yamao, N. Kamatani, K. Tajima, Y. Nakamura, K. Matsuda, Impact of PSCA variation on gastric ulcer susceptibility, *PloS one*, 8 (2013) e63698. (査読あり)

[学会発表] (計 14 件)

- ① Koichi Matsuda Impact of genetic variations on chronic viral infection and prognosis. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2016. 2. 22. 高輪プリンスホテル (東京、港区)
- ② 松田浩一 がん GWAS 研究の最前線と社会実装へ向けた取り組み 日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015. 10. 17. 京王プラザホテル (東京、新宿区)
- ③ 松田浩一 ゲノム研究成果の臨床応用に向けて 第 38 回日本がん疫学・分子疫学研究会総会 2015. 6. 5. ラフレさいたま (埼玉、さいたま市)
- ④ Koichi Matsuda The Biobank Japan Project for Personalized medicine 2015 SNUCRI Cancer Symposium 2015. 4. 2. Seoul (Korea)
- ⑤ Koichi Matsuda Impact of genetic variations on chronic viral infection and prognosis. 4th International Kyoto Liver Cancer Symposium. 2014. 4. 8. 京都国際会議場 (京都、京都市)
- ⑥ Koichi Matsuda GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis The 4th JCA-AACR Symposia, 2013. 2. 25 Hawaii (USA)

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/matsudalab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 浩一 (MATSUDA, Koichi) 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：90401257

(2) 連携研究者

谷川 千津 (TANIKAWA, Chizu) 東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：30422421

(3) 研究協力者

豊島 治 (TOYOSHIMA, Osamu)