

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870685

研究課題名(和文)胃癌におけるGenetic/epigeneticな異常の相互作用と予後との関連

研究課題名(英文)Genetic/epigenetic interaction in the gastric carcinogenesis

研究代表者

田原 智満 (Tahara, Tomomitsu)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：80533968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌発生の分子メカニズムを明らかにし、患者予後予測や癌発生危険群のバイオマーカーを探索する目的で、臨床検体を用い、胃癌の腫瘍部、背景粘膜および胃癌の高危険群であるH. pylori感染胃炎の胃粘膜の遺伝子変異・メチル化の検討を行った。遺伝子変異とメチル化の組み合わせである分子サブタイプと胃癌患者の予後に楯伊那関連があること、非腫瘍部胃粘膜の遺伝子メチル化と胃粘膜の形態学的な変化に関連があることを確認した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of genetic/epigenetic interaction in the gastric carcinogenesis, we investigated genetic/epigenetic anomalies of primary gastric cancer, adjacent gastric mucosa and non-neoplastic gastric mucosa from cancer-free, but H. pylori positive patients, who are at risk for developing gastric cancer. We showed that molecular subtypes, combining genetic/epigenetic anomalies is associated with prognosis of gastric cancer patients. We also showed that DNA methylation status in the non-neoplastic gastric mucosa is associated with its morphologic features.

研究分野：消化管内科

キーワード：胃癌 遺伝子変異 遺伝子メチル化 分子サブタイプ

1. 研究開始当初の背景

H. pylori 感染率の低下により、本邦の胃癌の発生頻度は年々低下傾向にあり、効率的な検診システムの構築や画像診断技術の向上により早期診断も可能となった。しかし依然として胃癌の治療のために病院を受診する患者数は多く、診断時切除不能な進行症例も数多く存在する。特に進行胃癌症例における術後再発、化学療法に対する耐性に関わる因子については従来の臨床病理学的背景因子では十分に予測できるとは言い難い。

消化器癌発生の分子メカニズムとして、染色体不安定性や遺伝子点変異などの Genetic な異常の蓄積が発癌に重要とされてきた。一方 DNA メチル化に代表される Epigenetic な異常による遺伝子転写の不活化は遺伝子変異に変わる代替的な癌発生メカニズムとして重要とされ、さらに DNA メチル化は前癌病変に加え、炎症、加齢でも認めることにより、発癌早期の遺伝子異常と考えられてきた。胃癌において TP53, PTEN に代表される不活化型点変異、KRAS, PIK3CA に代表される活性化型点変異やミスマッチ修復系の異常であるマイクロサテライト不安定が Genetic な異常として重要とされ、臨床病理学的背景因子との関連が検討されてきた。Epigenetic な異常としてはミスマッチ修復遺伝子の hMLH1 や癌の発生に重要な E-cadherin が DNA メチル化により不活化されることが報告されている。加えて大腸癌においてはじめて報告された癌特異的な遺伝子メチル化の過剰蓄積を示す CpG アイランドメチル化形質 (CIMP: CpG island methylator phenotype) が胃癌においても報告され、ユニークな臨床病理学的特徴を有することが示されている。CIMP 陽性の胃癌、大腸癌は TP53 などの癌抑制遺伝子の変異が稀であることより DNA メチル化は胃、大腸において遺伝子変異に変わる代替的な癌発生メカニズムとされてきたが、我々は Exome sequencing を用いた Genome-wide アプローチ研究により、CIMP 陽性大腸癌が CIMP 陰性大腸癌とは全く違う遺伝子変異のスペクトラムを示すことを見出した。胃癌においても高頻度に CIMP を呈する Epstein-Barr (EB) ウイルス、マイクロサテライト不安定性陽性胃癌において高頻度にクロマチンリモデリング遺伝子である ARID1A の不活化型変異が起こっていることが示され、我々のグループでも CIMP 陽性胃癌臨床検体における Exome sequencing において ARID1A 遺伝子のみならず Pathway-specific な遺伝子変異が蓄積されているという知見を得つつある。多くの癌が DNA メチル化、遺伝子変異の相互的な異常をもつことが示されているのと同様に、胃癌においても Genetic/epigenetic な相互作用が発癌～進展に重要であると考えられる。胃癌、大腸癌において癌の発育進展の過程において遺伝子メチル化の割合が変化することも示され

ている。

2. 研究の目的

本研究の目的は胃癌において Genetic/epigenetic な異常の相互作用が生物学的特徴を規定するという仮説にもとづき胃癌臨床検体における遺伝子変異、DNA メチル化、遺伝子発現の網羅的な解析を行い胃癌における分子生物学的異常をカタログ化し、胃癌における Genetic/epigenetic の相互作用と臨床病理学的背景因子との関わりを明らかにすることである。

3. 研究の方法

胃癌 217 症例に関して TP53, PTEN, KRAS, PIK3CA の遺伝子変異を検索した。

CpG island メチル化形質 (CIMP) に関して MINT1,2,12,25,31 及び MLH1 のメチル化をパイロシーケンスにて検討した。これらの分子異常の組み合わせと臨床病理学的因子につき検討を行った。

発癌早期の遺伝子メチル化を検索する目的で、HP 陽性胃粘膜で高度メチル化を呈する遺伝子 (Igf2, Myod1, SLC6A12, MIR124A1, GDNF, CDH1, PRDM5, MLF1, RORA など) に関して胃癌 217 症例の腫瘍部・背景胃粘膜および、H. pylori 除菌歴のない非胃癌 106 例、94 例の異なるコホートからなる胃炎サンプルのメチル化解析を行った。

HP 除菌後の胃粘膜に蓄積される遺伝子メチル化と胃癌との関連を検索する目的で、除菌後胃癌症例の腫瘍近傍胃粘膜 (n=43)、非萎縮部の体部胃粘膜 (n=42)、非担癌患者の体部胃粘膜 (n=48) の遺伝子メチル化を Illumina Infinium Methylation EPIC、パイロシーケンスを用い解析し、遺伝子発現、テロメア長との関連を検討した。

4. 研究成果

胃癌 217 症例に関して、CIMP の状態と p53 遺伝子の Central core 領域 hot spot 変異 (R175, G245, R248, R249, R273, R282) の有無による分子サブタイプが最も予後と関連しており、全症例は 1) CIMP + TP53 hot spot 変異なし (n=120)、2) CIMP - TP53 hot spot 変異なし (n=81)、3) CIMP + TP53 hot spot 変異あり (n=8)、4) CIMP - TP53 hot spot 変異あり (n=5) の 4 群に分類された。分子サブタイプ 4), 3), 2), 1) の順に生存期間、無再発期間とも有意に短く (ともに $P < 0.0001$)、診断時の病期は進んでおり ($P=0.003$)、静脈侵襲 ($P=0.01$)、リンパ節転移 ($P=0.02$)、腹膜播種 ($P=0.001$) の頻度が高くなった。多変量解析では分子サブタイプが独立した予後因子として抽出された。(ハザード比=1.66, 95%信頼区間=1.07-2.57, $P=0.006$)。

HP 陽性胃粘膜で高度メチル化を呈する遺伝子 (Igf2, Myod1, SLC6A12, MIR124A1,

GDNF, CDH1, PRDM5, MLF1, RORA など)の高度メチル化に関連する因子を統計学的に検討したところ、組織学的胃炎の程度、テロメア短縮、拡大内視鏡像による胃粘膜形態が高度メチル化に有意に関連していた。胃癌患者での解析では、背景胃粘膜におけるメチル化は非胃癌例に比較し高かったが、腫瘍部においては CIMP + 症例ではメチル化はさらに高くなるものの、CIMP - 腫瘍部では背景粘膜よりむしろ低下しており CIMP - 腫瘍の発生過程において HP に関連する遺伝子メチル化が他の癌発生に関連する遺伝子異常にスイッチして、消失していく可能性が考えられた。

HP 除菌後症例での検討では、ゲノムワイド解析において除菌後に発生した胃癌近傍胃粘膜では、CpG islands を中心とした高度メチル化が認められ、テロメア長の短縮、DNMT1 発現レベルの上昇と関連していた。胃底腺領域における高メチル化を有する胃粘膜の拡大内視鏡像の特徴を調べたところ、絨毛～楯円上の構造にコイル状の血管像であり、同所見を有する部位では除菌後経過年数に関わらず MYOD1、SLC16A12、IGF2、RORA、PRDM5 の高度メチル化を認めた。一方、それ以外の部位のメチル化は除菌後経過年数とともに低くなった。2016 年 10 月～2018 年 2 月の前向き観察において、高度メチル化の形態学的所見が胃体部小彎～噴門に及ぶ症例の新規除菌後胃癌の発見率は 8.6%(8/93)であり、小範囲または認めない例 1.4%(1/74)よりも有意に高く($P < 0.05$)、HP 除菌後に高メチル化を示す胃粘膜の形態学的特徴は、内視鏡により診断可能であり、除菌後胃癌のリスクを予想するうえで有用であると考えられた。

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 3 件)

Tahara T, Yamazaki J, Tahara S, Okubo M, Kawamura T, Horiguchi N, Ishizuka T, Nagasaka M, Nakagawa Y, Shibata T, Kuroda M, Ohmiya N. Magnifying narrow-band imaging of gastric mucosal morphology predicts the H. pylori-related epigenetic field defect. *Sci Rep*. 2017 Jun 8;7(1):3090. (査読有)

Tahara T, Shibata T, Okamoto Y, Yamazaki J, Kawamura T, Horiguchi N, Okubo M, Nakano N, Ishizuka T, Nagasaka M, Nakagawa Y, Ohmiya N. Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features

and survival of gastric cancer. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42252-6 (査読有)

Tahara T, Shibata T, Okubo M, Kawamura T, Horiguchi N, Ishizuka T, Nakano N, Nagasaka M, Nakagawa Y, Ohmiya N. Demonstration of potential link between Helicobacter pylori related promoter CpG island methylation and telomere shortening in human gastric mucosa. *Oncotarget*. 2016 Jul 12;7(28):43989-96. (査読有)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

田原智満 (TAHARA, Tomomitsu)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：80533968

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()