

令和元年6月11日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09295

研究課題名(和文) ヒトゲノム解析にピロリ菌ゲノム解析を併せることで超早期胃癌診断を実現する

研究課題名(英文) Molecular diagnostic markers for early gastric cancer using Human and H.Pylori genome alterations

研究代表者

渡邊 嘉行 (Watanabe, Yoshiyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90329243

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)：通常内視鏡検査時に廃棄される胃洗浄廃液から回収・解析したDNA異常(ヒトゲノム異常+ピロリ菌ゲノム異常)を胃癌分子マーカーとすることで、存在・予測診断に応用可能であると考え、我々が既に同定したヒトゲノム遺伝子異常に加えて、胃癌特異的ピロリ菌ゲノム異常の同定に成功した(胃洗浄廃液内に混在した複数種ピロリ菌の全ゲノム解析を次世代シーケンサーを用いた手法(G-Scan法))。今後は「ヒトゲノム+ピロリ菌ゲノム異常を分子マーカーとし、「廃液」による超早期胃癌診断を実現する」ため、前向き臨床試験の実施予定。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃洗浄廃液内に混在した複数種ピロリ菌の全ゲノム解析(G-Scan法)により、「胃癌に特異的なピロリ菌遺伝子異常(OMPs: outer membrane proteins)」を版權することができた。これによるピロリ菌構造変化が胃粘膜定着強固と持続炎症に関与し、癌化を促し得る」可能性が推測され、今後は「ヒトゲノム+ピロリ菌ゲノム異常を分子マーカーとし、「廃液」による超早期胃癌診断を実現する」ため、前向き臨床試験の実施および、ピロリ菌遺伝子異常(OMPs)による発がんメカニズム解析を行う予定である。これにより、廃液を用いるだけで胃癌診断が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We developed a next-generation sequencing (NGS)-based method for genome wide SNPs analysis of Helicobacter pylori strains (HPs) specific genomes using gastric wash sample (G-Scan method). Gastric cancer-specific candidate 71 HP gene SNPs was obtained from analysis using the remaining 4 cases of gastric cancer, 4 cases of gastritis.

研究分野：胃癌分子診断

キーワード：胃癌 胃洗浄廃液 ピロリ菌 遺伝子異常

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

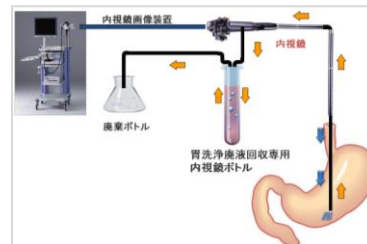
(1) 胃がん検診における内視鏡検査の見逃し。内視鏡検査は有用な胃がん診断ツールであるが、依然として見逃しが約 25% 存在する。その理由として内視鏡医の肉眼診断に頼っていることが挙げられる。今後は、内視鏡医の経験と勘に頼らない客観的診断を可能とした補助ツールが必要である。(右図：日本における胃がんの発生率は群を抜いて多い)



(2) 発癌 = ピロリゲノム異常 + ヒトゲノム異常。胃発がんにおいてヒトゲノム異常は遺伝子メチル化異常をはじめとした変化が重要かつ高頻度であり、網羅的メチル解析で得た遺伝子異常を診断マーカーとして応用することの有用性を報告してきた。一方でピロリ菌遺伝子異常からみた診断マーカーの研究はなく、我々は胃洗浄廃液を用いた解析により

①複数種のピロリ菌が混在すること、②癌症例と非癌症例におけるピロリ菌種に差異があること、③除菌前後でピロリ菌種の混在比が変化することを発見した。さらにヒトゲノム、ピロリゲノム、他種菌ゲノム、動植物ゲノム等が混在した胃液から選択的に目的種ゲノムのみを抽出する手法を考案

(G-Scan 法)。開発の基礎となった (G-Navi 法) は HBV 陽性肝癌患者肝組織のヒトゲノム組み込み研究で Genome Res.2015 に報告した。
(3) 通常内視鏡検査時に廃液となる胃洗浄廃液から回収した DNA は診断ツールとなる【内視鏡観察時胃内に貯留する胃液は強酸性であり、含有する胃粘膜細胞由来の DNA 解析利用は困難である。しかしながら、重曹とプロナーゼによる通常内視鏡検査前処置や胃内全域の洗浄観察行為は、高率に剥離細胞が含有するとともに、偶然にも DNA に影響のある胃内強酸性環境から守り、新鮮な粘膜剥離細胞を効率よく回収するという別の目的に非常に有効であることが判明し、特許取得した 2)。(右図：開発した胃洗浄廃液回収装置)

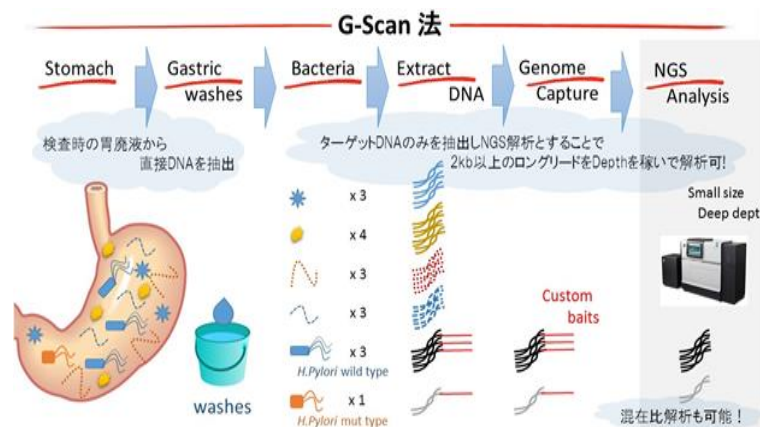


2. 研究の目的

胃がんは内視鏡検診導入やピロリ菌除菌治療実施にも関わらず癌部位別死因 2 位、見逃し率約 25% である。我々は、通常内視鏡検査時に廃棄される胃洗浄廃液から回収・解析した DNA 異常を胃がんの分子マーカーとすることで、従来法の弱みである「見逃し」の解消につなげることができるとともに、存在・予測診断にも応用可能であることを米国 Gastroenterology 誌 2) に報告 (特許取得) した。さらに胃洗浄廃液を用い混在する定量的複数種ピロリ菌全ゲノム解析を可能にする手法 (G-Scan 法) を考案した。これにより、超早期胃がん発症に特異的なピロリゲノム異常の同定が可能となる。本法は胃全体のヒトゲノム+ピロリゲノム情報による「廃液を用いた超早期胃がん遺伝子診断」として画期的な唯一の方法であり、本技術の優位性・応用展開の可能性は高く、先進医療へ向けた臨床展開へつなげる。

(1) 独自開発した複数種ピロリ全ゲノム解析法(G-Scan 法)は、胃洗浄廃液検体を用いることで超早期胃がん発症に特異的なピロリ配列の同定が可能となる【独自開発 G-Scan 法 (next-generation sequencing-based method of integrated whole helicobacter pylori genomes) は、我々が以前に Genome Res.誌 2015 年に報告した G-Navi 法をさらに改良した手法であり、胃内に混在するヒトゲノム、ピロリゲノム、他種菌ゲノム、動植物ゲノム等から容易に「ピロリ菌ゲノムのみ」を抽出し、NGS 解析することができる画期的な手法である。カスタム作成したピロリゲノム特異的 baits (Custom baits) を用いることで、ピロリ菌 DNA 断片のみを胃液中から抽出、テンプレート DNA 量を最小限にできる。また、唯一ロングリードが可能な PacBio RS

Systems 解析を組み合わせたことにより「ロングリード (2kb)」と「十分な解析回数 (Deep depth)」の両方を併せ持つ効率的かつ高性能な「ピロリ菌 NGS 解析」が実現可能となる。さらに胃洗浄廃液検体を用いることで複数種ピロリ菌の胃内混在比定量も可能となり、ヒトゲノム異常診断との組み合わせることで宿主側とピロリ菌側とからみた総合的な超早期胃がん遺伝子診断アルゴリズムを構築する (下図)。



3. 研究の方法

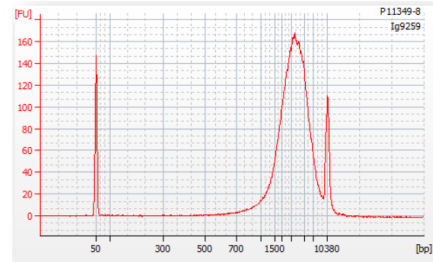
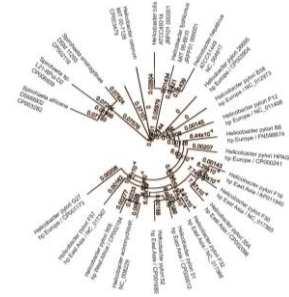
(1) 胃洗浄廃液から抽出した複数種混在ピロリ菌 DNA を用い G-Scan 法にて胃内混在のピロリ菌全遺伝子解析を行う。

(2) 胃癌症例、健常者、除菌治療前後等の情報別のピロリ菌全遺伝子配列の差異、混在率を解析。

(3) 既に解析済みのヒト遺伝子マーカーと今回得られたピロリ菌遺伝子マーカーの結果をもとにアルゴリズム化させ、超早期胃癌診断法として臨床応用できる形を構築する。既に本大学生命倫理委員会において、本臨床自主試験研究の承認を得ており (第 1494 号)、症例の登録・検体回収が行う状況にある。臨床応用へ向けた従来腫瘍マーカーと本法との解析結果を比較検証するとともに、先進医療の制度を活用した臨床応用を具体的に構築する。

4. 研究成果

(1) NCBI に登録されているピロリ菌全種遺伝子配列を抽出し (右図)、全配列情報をもとに、NGS (PacBio) に特化した条件で、15000 Original Baits (primers) の作成に成功した。また、胃洗浄廃液 (臨床検体) より得られた gDNA を一定条件で断片化させた後に精製した結果、全ての検体において 10ng/uL 以上 (平均 3396bp、26.7nmol/L) の DNA を得ることに成功した (右下図: Agilent 2100 Bioanalyzer)。得られた DNA を用い、作成したピロリ菌特異的配列による Original Baits を用いて「ピロリ菌ゲノムのみ」を選択的にゲノムキャプチャーさせ、得られたピロリ菌ゲノムのみを効率的かつロングリード解析が可能な次世代シーケンサー (PacBio) にて解析を行った結果、下記のように解析に十分なリード数および長いリード長 (リード数: 150,292、リード長: 平均 9kb) を得ることができた。



PacBio RSII run Result

Polymerase Read Summary (per Sample)

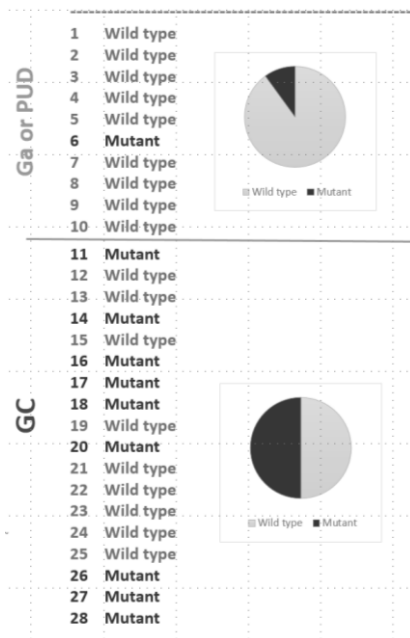
Metrics	Pre-Filter(Raw)	Post-Filter(Filtered)
Number of Reads	150,292	83,005
Total Number of Bases (bp)	1,452,390,146	1,404,488,606
Mean Read Length (bp)	9,663	16,920
N50 Read Length (bp)	30,656	30,958
Mean Read Score	0,491	0,847

(2) 「胃炎症例」 vs 「早期胃癌症例」より採取した胃洗浄廃液を用い、G-Scan 解析で胃癌特異的ピロリ菌遺伝子異常の同定に成功した (1 塩基バリエーション: 6419 箇所、2 塩基バリエーション: 414 箇所、3 塩基バリエーション: 64 箇所、4 塩基バリエーション: 5 箇所、5 塩基バリエーション: 1 箇所、欠損: 51 箇所、挿入: 36 箇所、置換: 7 箇所) (下図)。候補遺伝子異常の中でも、最も早期胃癌症例に特異的な胃内ピロリ菌遺伝子異常は OMPs 遺伝子の複数塩基挿入 (insertion) であった。さらに、この OMPs 遺伝子の複数塩基挿入 (insertion) に注目し、臨床検体 28 症例 (胃炎 10 症例、早期胃癌 18 症例) において Pyrosequencing 解析による検証を行った結果、早期胃癌症例に高頻度にピロリ菌遺伝子異常を認めることが判明した (学会発表)。

現在、この結果をもとに、生命倫理委員会の承認のもと、多施設前向き臨床試験を実施中にあり (「廃液を用いた新規胃癌遺

Candidate SNPs: 3 out of 4 cases in Ca (no Gastritis)

Candidate SNPs	(total 6997 sites)
SNV	6419
MNV(2 nucleotides)	414
MNV(3 nucleotides)	64
MNV(4 nucleotides)	5
MNV(5 nucleotides)	1
Deletion	51
Insertion	36
Replacement	7



伝子診断」胃癌症例で高頻度に認めるヘリコバクター・ピロリ菌遺伝子異常に注目し、これらの遺伝子群「OMP 遺伝子ほか候補遺伝子異常」の再現性を検証する目的から胃洗浄廃液を用いた早期胃癌症例による新たな前向き多施設共同試験を実施する。廃液より得た試料から DNA を抽出し、OMP 遺伝子異常解析だけでなく、同時に既報告のあるヒトゲノム異常、ピロリ菌ゲノム異常についても解析を行い比較検討する。更に治療後胃癌異時再発との関連性、対照群であるピロリ菌感染胃炎症例における胃癌発生について経過観察を行う (ピロリ菌感染胃癌・胃腺腫 (内視鏡治療適応) 症例: 200 症例、ピロリ菌感染胃炎症例: 100 症例)、症例のエントリーが終了次第解析を行い、結果をもとに学会発表、論文化の予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3件）

- ① Oikawa R, Watanabe Y, Miyamoto S, Sato Y, Ono S, Mabe K, Yamamoto H, Kato M, Itoh F. Enrichment of Helicobacter pylori mutant strains after eradication therapy analyzed by gastric wash-based quantitative pyrosequencing. Tumour Biol. 【査読あり】 2017 Oct;39(10):1010428317734865. doi: 10.1177/1010428317734865.
- ② Miyamoto S, Watanabe Y, Oikawa R, Ono S, Mabe K, Kudo T, Yamamoto H, Itoh F, Kato M, Sakamoto N. Analysis of Helicobacter pylori genotypes in clinical gastric wash samples. 【査読あり】 Tumour Biol. 2016 Aug;37(8):10123-32. doi: 10.1007/s13277-016-4886-4.
- ③ Yamamoto H, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, Yoshida Y, Maehata T, Yasuda H, Itoh F. BARHL2 Methylation Using Gastric Wash DNA or Gastric Juice Exosomal DNA is a Useful Marker For Early Detection of Gastric Cancer in an H. pylori-Independent Manner. 【査読あり】 Clin Transl Gastroenterol. 2016 Jul 21;7(7):e184. doi: 10.1038/ctg.2016.40.

〔学会発表〕（計 4件）

- ① 渡辺嘉行。「NGSによる胃がん特異的 H. pylori 遺伝子異常の網羅的探索」第24回日本へリコバクター学会学術集会 シンポジウム2 2018年6月29日
- ② Yoshiyuki Watanabe, Ritsuko Oikawa, Hiroyuki Yamamoto, Fumio Itoh. Enrichment of Helicobacter pylori mutant strains after eradication therapy analyzed by gastric wash-based quantitative pyrosequencing and NGS. 米国消化器病週間、米国（ワシントンDC）、2018年6月4日
- ③ Yoshiyuki Watanabe, Ritsuko Oikawa, Hiroyuki Yamamoto, Fumio Itoh. Enrichment of Helicobacter pylori mutant strains after eradication therapy analyzed by gastric wash-based quantitative pyrosequencing. 米国がん学会、米国（シカゴ）、2018年4月14日
- ④ 渡辺嘉行、及川律子、宮本修一、佐藤義典、小野尚子、間部克裕、山本博幸、加藤元嗣、伊東文生。「胃洗浄廃液を用いた胃内 H. pylori 菌遺伝子 NGS 解析の診断・治療への応用」日本消化管学会総会学術大会 2017。

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0件）
- 取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.marianna-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山本 博幸

ローマ字氏名：YAMAMOTO HIROYUKI

所属研究機関名：聖マリアンナ医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40332910

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。