

令和元年6月20日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14990

研究課題名(和文) 胃炎組織におけるクローン拡大と発がんメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of clonal expansions in gastritis tissues

研究代表者

越前 佳奈恵 (Echizen, Kanae)

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助教

研究者番号：20743834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃がんの前がん病変である胃炎組織において、特定の遺伝子変異を持った細胞が増殖するクローン拡大がどの程度進んでいるかを確認するためDNAシーケンスを用いた解析を行った。具体的には、ピロリ菌感染後に腺管型の胃がんを発症した患者の手術検体から、胃がん隣接した胃炎組織を採取し、DNAを抽出して、解析を行った。これらの解析から、胃炎組織においては、微小な領域でのクローン拡大が進行していること、胃炎によって遺伝子変異が著しく蓄積するようになること、そして、発がんする際には強力な変異を獲得したクローンが爆発的に拡大することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胃がんの前がん病変である胃炎組織において、すでに遺伝子変異を持った上皮細胞のクローン拡大が進行していることが明らかとなった。胃炎領域におけるクローン拡大の状況や、その発がんとのかわりは未解明であり、本研究によって、ピロリ菌感染による胃炎の新たな病態が明らかとなった。本研究によって解明した胃の前がん病変における病態は、今後の発がん予防・発がんメカニズムの解明に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells which have strong genetic alterations are largely expanded in cancer tissues. To analyze clonal expansion in pre-cancerous gastritis tissues, we did exome sequence analyses with gastritis tissues adjacent to stomach cancer. We analyzed 19 gastritis tissues from 4 helicobacter pylori infected patients. From these DNA sequence analyses, we found that epithelial cells which have some mutations are already expanded in gastritis tissues. But these are smaller than clonal expansions in cancer tissues. These results suggest that clonal expansions have started from pre-cancerous areas.

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：胃炎 クローン拡大

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【研究の学術的背景】

(1) 非がん組織におけるクローン拡大

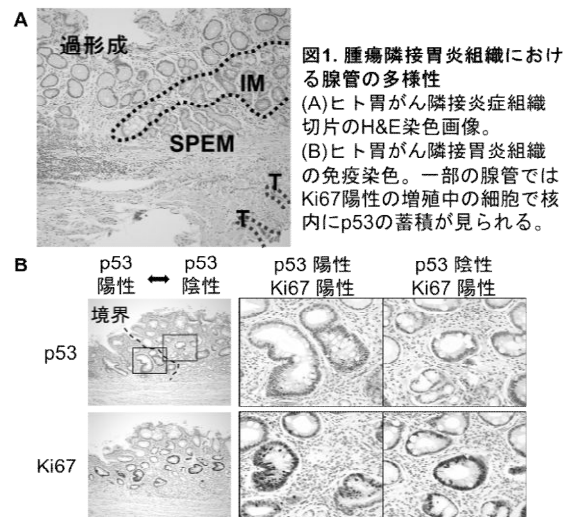
従来よりがん組織において、特定の遺伝子変異を持った細胞がクローナルに増殖していることが報告され、この「クローン拡大」ががんの特徴として考えられてきた。しかし、非がん組織においてもゲノム変異を伴うクローン拡大が起きていることが報告された。(Martincorena et.al, *Science*, 2015, Ross-Innes & Becq et.al, *Nat Genet*, 2015)。また、慢性炎症を背景とするがんでは、多発的に発がんすることが報告されており、“Field Cancerization”の概念が提唱されているが、炎症に起因した複数のクローン拡大が発がんに関与するのではないかと考えられた。

(2) ヒト胃癌発生を誘導するドライバー遺伝子

TCGAをはじめ複数のグループからヒト胃癌検体を用いた大規模遺伝子変異解析の結果が報告された (*Nature*, 2014)。胃癌は組織学的な分類により、浸潤型 (Diffusive type) と腸型 (Intestinal type) に分けられるが、腸型の胃癌においては p53 (75.6%) や ARID1A 遺伝子 (9.8%) の変異が存在することが報告された (Wang et al. *Nat Genet*, 2014)。

(3) ヒト胃炎組織の多様性

ヒト胃粘膜上皮では、*H. pylori* 感染による慢性炎症によって過形成 (hyperplasia)、および、SPEM (Spasmolytic peptide-expressing metaplasia) と腸上皮化生 (Intestinal metaplasia, IM) の2種類の化生 (metaplasia) が発生することが報告されている。これらの化生病変は、モザイク状に存在することが知られており、当該グループにおいても、ヒト胃組織標本で確認した (図 1A)。しかし、胃炎組織におけるクローン拡大については未だ報告されていない。また、予備の実験の結果から、化生病変内の Ki67 陽性の増殖細胞において p53 の核内蓄積を示す細胞集団が認められており、化生を伴う胃炎組織においてすでに p53 変異を持つ細胞のクローン拡大が形成される可能性が考えられた (図 1B)。さらに、ヒト胃炎組織において、p53, ARID1A, K-ras 遺伝子に、低頻度ながらも変異が存在することが報告されており (Watari et al, *J Clin Pathol*, 2007; Shimizu et al, *Gastroenterology*, 2014)、胃癌発生前にすでに遺伝子変異をともなうクローン拡大が起きている可能性を示唆していた。



2. 研究の目的

本研究は、*H. pylori* 感染による慢性炎症から胃癌へと遷移する際に、胃粘膜上皮組織の組織学的変遷のどの段階でクローン拡大が起こるのか、また、がんへと遷移させるドライバーとなる事象は何かを明らかにすることを目的として行った。これらの解析により、ゲノム変異を伴う胃癌の前がん病変の本態解明と、発がんメカニズムの解明を目指して行った。

3. 研究の方法

H. pylori 感染による萎縮性胃炎を背景に持つ高分化型 (tubular type 1) 胃癌検体において、同一検体内の胃炎組織、胃粘膜化生組織、および胃癌組織から、病理学的所見と対応させて複数箇所の粘膜上皮サンプルを採取して DNA シークエンス解析 (エキソームシークエンス) を行い、特定の遺伝子変異を持つ細胞クローン拡大の有無、遺伝子変異パターン、コピー数異常等を比較した。具体的には、石川県立中央病院、消化器外科で手術を行った検体のうち、インフォームドコンセントを行い、同意が得られた場合のみサンプリングを行った。DNA シークエンス解析は、京都大学医学部、腫瘍生物学講座 (小川誠司教授) において行った。全ての実験・解析は金沢大学、石川県立中央病院、京都大学の各倫理委員会の承認の下行った。

4. 研究成果

(1) 胃炎組織においてクローン拡大が進行している

胃癌と、その近接した胃炎組織、合計 27 検体のサンプル採集を行い、このうち 4 症例について合計 19 か所の胃炎の微小組織と、各症例の腫瘍に組織についてエキソームシークエンス解析を行った。これらの解析の結果、胃癌組織だけでなく、胃炎組織においても複数の遺伝子変異の蓄積が見られた。この中で、胃炎の各微小領域において、最大の Variant Allele Frequency を持つ変異は、その値がそれぞれ 0.2~0.6 程度有った。この結果は、微小領域として採取した、直径 3 mm の領域に、100 個前後の腺管が含まれることを考えると、変異を持つ上皮細胞が数十個~数百個の腺管にまたがって存在している可能性を示す。以上のことから、胃癌の背景となる胃炎組織においては、すでに、いたるところで微小なクローン拡大が進んでいることが明らかとなった。また、これらの胃炎組織にみられた変異は、同一症例の胃癌組織で見られた変異と異なることから、胃癌は胃炎組織とは独立したクローンから発生したことが分かった。さらに、このうちの 1 症例について、胃炎組織に加え、胃炎ではない組織も採集して解析を行った。この結果、遺伝子変異数は胃炎組織と比べてかなり少ないが、胃炎に非依存的に、小さなクローン拡大が起こっていることが分かった。胃炎組織では *MUC6* など、すでに胃癌のドライバー変異として報告されている変異が見られたが、胃癌組織の様な染色体不安定性の獲得は見られなかった。

(2) 胃炎組織における遺伝子変異数と腸上皮化生の頻度は相関する傾向にある

シークエンス解析を行った、胃炎組織における 19 か所の微小領域について、その組織切片を用いて、炎症マーカーや腸上皮化生マーカーの抗体を用いて免疫染色を行い、病理学的解析を行った。この結果、遺伝子変異の蓄積は炎症の度合いよりも、腸上皮化生の頻度と相関する傾向にあることが分かった。以上の結果から、腸上皮化生が遺伝子変異の蓄積を促進する可能性が考えられた。

以上の解析によって、ピロリ菌感染による胃炎組織におけるクローン拡大の状態が明らかとなった。各遺伝子変異がどのようにクローン拡大を促進するかを検証することは、今後の課題である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. NF- κ B-induced NOX1 activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells. **Echizen K**, Horiuchi K, Aoki Y, Yamada Y, Minamoto T, Oshima H, Oshima M. *Oncogene*. 2019 Jan 30.

2. Interleukin 1 Up-regulates MicroRNA 135b to Promote Inflammation-Associated Gastric Carcinogenesis in Mice. Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, **Echizen K**, Sakai E, Yong ZWE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, Oshima M. *Gastroenterology*. 2019 Mar;156(4):1140-1155.e4.

3. The inflammatory microenvironment that promotes gastrointestinal cancer development and invasion. **Echizen K**, Oshima H, Nakayama M, Oshima M. *Adv Biol Regul*. 2018 May;68:39-45.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. **越前佳奈恵** . 炎症依存的な胃発がんモデルマウスを用いた研究 . 金沢がん研究者フォーラム・北信がんプロ FD 講演会 (口演), 金沢, 2017 年 11 月 21 日

2. **越前佳奈恵**, 青木やよい, 堀内契吾, 大島浩子, 大島正伸 . 胃炎および炎症依存的な胃がん発生における Nox1 複合体/ROS の機能解析 . 第 76 回日本癌学会学術総会 (ポスター発表), 横浜, 2017 年 9 月 30 日

〔図書〕(計 1 件)

越前佳奈恵, 坂井絵梨, 中山瑞穂, 大島浩子, 大島正伸 . がん微小環境による発がん促進機構 . 細胞 (ニューサイエンス社) vol. 50, 234-237, 2018.

〔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 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://genetics.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。