

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16709

研究課題名（和文）細胞接着因子および細胞極性と消化管癌の関連について

研究課題名（英文）Research on the association between gastrointestinal cancer and cellular adhesion and polarity

研究代表者

高橋 悠（Takahashi, Yu）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80780543

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌は多彩な組織型を取ることが知られているが、その制御機構については明らかになってはいない。胃癌の細胞接着因子の発現と組織型や予後には関連があることが報告されておりそのうちのNECTIN1の発現と関連のある遺伝子を同定した。また胃癌は一般的には予後が悪いが、早期癌のうちに治療することができれば予後がよいことが知られている。以前より血清ピロリ抗体とペプシノゲン値の組み合わせによる診断法が胃癌リスク層別化に役立つことが報告されていたが、ピロリ菌感染率が減ってきた近年においても胃癌リスク層別化法（ABC法）は十分に有用であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌は大腸癌などに比較して多彩な組織型を取ることが知られているが、この組織型と細胞接着因子の一つであるNECTIN1という遺伝子の発現に関連があることを報告してきた。胃癌において細胞接着因子の発現と組織型や予後には関連があることが報告されているが、これらの制御機構については明らかになっていないところがあり、関連のある遺伝子を同定することによりこれらを明らかにすることに寄与すると考える。また胃癌リスク層別化法であるABC法がピロリ感染者が減ってきた現在でも有用であることが分かり、胃がん検診におけるハイリスク群の同定に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Gastric cancer is known to have various histological types, but the regulatory mechanisms are not yet clear. It has been reported that the expression of cell adhesion factors is associated with histological types and prognosis of gastric cancer, and we identified a gene associated with NECTIN1 expression. Gastric cancer is generally associated with a poor prognosis, but it is known that the prognosis is better if the cancer is treated in its early stages. It has been reported that a diagnostic method, so called "ABC method", based on a combination of serum H. pylori antibody and pepsinogen levels is useful for gastric cancer risk stratification. The ABC method was found to be sufficiently useful even in recent years when the rate of H. pylori infection has decreased.

研究分野：消化器内科

キーワード：消化器癌 胃癌 細胞接着因子

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は病理学的に構造異型と細胞異型を評価することにより診断されるが、この異型の形成には細胞接着が関わっていると考えられている。実際、E-cadherin(CDH1)の変異と胃癌に関連があることがよく知られている(Nature 392, 402-405:1998)。しかし E-cadherin の異常のみで全てを説明することはできずその他の細胞接着因子も関わっていると考えられるが包括的に説明する理論は提唱されていない。細胞間接着においては密着結合、接着結合、デスモゾームが大きな役割を果たしており、特に密着結合と接着結合から構成される apical junctional complex(AJC)は細胞極性の形成とも関連しており、これが失われることにより上皮間質転換が起こることが報告されている(Acta Pharmacol Sin 32, 552-264:2011)。AJC と悪性腫瘍の関連については、密着結合においては胃に特異的に発現する claudin18.2 を中心に、claudin と腸上皮化生・胃癌との関連について報告されてきている(J Histochem Cytochem 57(8), 775-785:2009)。接着結合は主に cadherin、nectin より構成されるが、nectin-afadin により形成される結合は cadherin-catenin による結合よりも先に形成され、密着結合の形成にも関わることが知られており、細胞接着において重要な役割を果たしていると考えられている(Acta Pharmacol Sin 32, 552-264:2011)。ところが E-cadherin についてはよく研究されている一方で、nectin と癌の関連についての報告はまだ少数である。そこで nectin と癌の関連について上皮性腫瘍である胃癌との関連について検討をしたところ、ヒトにおいて胃癌の組織型と NECTIN1 の発現に有意差があることが判明した(Pathol Int. 68(10),557-582:2018)。そのため、nectin 発現変化と消化器癌の悪性度の関連について検討を行うことを通じて、細胞接着因子の発現異常が腫瘍形成や悪性度に及ぼす影響について解析を行うこととした。

### 2. 研究の目的

早期癌が全て分化型癌というわけではないため、早期癌のような組織型の混在が少ない症例の解析を通して nectin をはじめとする細胞接着因子の発現変化と関連のある遺伝子群を同定すること、また nectin の過剰発現や発現低下により癌化能に及ぼす影響について検証をすること。また、細胞極性は正常上皮組織においては管腔側では消化液に対する防御因子、基底側で血管と物質の受け渡しを行うトランスポーターが発現するなど秩序だった機能の維持に必須であり、維持に必要な 3 つのタンパク質複合体のうち aPKC-Par3-Par6 複合体が密着結合と関連していることが報告されている(Nat Rev Mol Cell Biol 5(3), 220-231:2004)。細胞極性と細胞接着には密接な関連があり、AJC の構成因子である nectin の安定発現には細胞極性が重要な役割を果たしていると考えた。実際、Nectin1 の発現と胃癌の組織型の関連を検討する過程では発現量のみならず、発現部位にも違いがあることが判明しており、この発現部位の差異に細胞極性が関わっているのではないかと考え細胞極性と nectin 発現の関連について検討することとした。

### 3. 研究の方法

早期胃癌生検検体を用いた網羅的遺伝子発現解析により nectin 1 の発現変化と関連のある遺伝子群を同定する。

Nectin1 以外の nectin family 遺伝子について、ヒト臨床検体を用いて発現解析を行う。

胃癌由来細胞株に nectin の発現変化が癌化能に及ぼす影響について検証をする。

大規模健康者コホートを用いて胃癌発症リスクについて解析を行う。

### 4. 研究成果

早期胃癌臨床検体において Nectin1 の高発現と低発現の差異について検証を行った。

8 症例の高分化型腺癌症例と 4 症例の未分化型成分優位型の胃癌を用いて網羅的遺伝子発現解析(Agilent SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K ver.3.0)を行った。結果として Nectin1 の発現は図 1 のように高分化型腺癌で高発現の傾向を認めた。

これらにおいて、Nectin1 の発現差と有意な相関を認める遺伝子を 165 個同定した。

一方で Nectin1 以外の Nectin family の胃癌検体における発現解析は Nectin2, Nectin3, Nectin4 において市販抗体を購入して組織免疫染色を試みたが評価に値するような染色性が得られず、現時点では解析不能という結論となった。今後 Nectin2-4 において組織免疫染色に適した抗体が得られるようなことがあれば再度検証

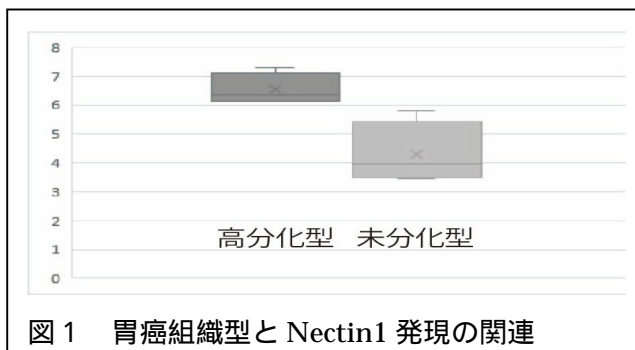


図 1 胃癌組織型と Nectin1 発現の関連

をしてみたいと考える。

胃癌由来細胞株へ Nectin1 を過剰発現させて癌化能に及ぼす影響について解析を行ったが、4 種類の胃癌由来細胞株への導入した結果明らかな変化は認めなかった。一方で胃癌由来細胞株における Nectin1 の western blotting により異なるバンドが検出される例を認めた (図 2)。

RT-PCR では Nectin1 の transcript は全ての細胞株で同様に検出できる一方で、NECTIN1 抗体と反応するバンドには差異が認められた。この細胞株間での差異について文献的考察を行なったところ、MKN7, NCI-N87 は極性細胞であるのに対して、AGS, MKN1 は非極性細胞であることが判明した (J Cell Biochem 81,241-251:2001, Plos One 8(7),e68761:2013)。おそらくこのことに起因する現象と考えられたが、免疫沈降法によりこのバンドに結合するタンパク質の同定を試みたが、うまく免疫沈降が行われず現時点においては検証できていない。またこのバンドは過剰発現させた場合に認められるバンドとは大きさが異なるため過剰発現でも検証できずこちらについても有用な抗体が得られるようになれば再度検証したいと考えている。

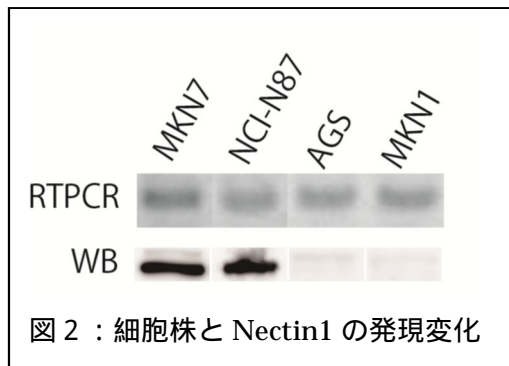


図 2 : 細胞株と Nectin1 の発現変化

以上のように当初想定していた結果は十分得られなかった。細胞膜タンパク質というやや扱いの難しいものを対象にしたことがよい抗体が得られず検証に難渋した一因となっていると考える。Nectin の発現解析を通して細胞接着因子の発現異常と胃癌の組織型との関連やそのメカニズムについての理解を深めるという想定であったが、感度特異度に優れた抗体が得られず不十分な解析となってしまった。早期胃癌において以前に免疫染色における Nectin1 と組織型との関連があることを報告してきたが、今回の網羅的遺伝子発現解析によって mRNA レベルでも発現差があることが判明した。現時点ではこの発現差に影響を与える詳しいメカニズムについては分かっていないが、Nectin の発現差との関連のある遺伝子群の検証などにより細胞接着因子の発現異常に影響を与える要因について解明されることが望まれる。

また本研究の元々のテーマとは異なるが、胃癌は早期発見・早期治療ができれば予後がよい疾患である一方で、発見が遅くなると予後不良であることが知られており早期発見が重要な疾患である。本邦においてはがん検診の対象となっているが現時点では一律 40 歳以上に対して胃透視検査もしくは 50 歳以上に 2 年に一度の内視鏡検査となっており内視鏡件数の観点からは現実的とは言えない状況である。医療資源の適正配分や検診による不利益最小化などの観点からはハイリスク群の絞り込みなどが今後重要となると考える。また近年ヘリコバクターピロリ菌感染除菌治療が広まってきたことや、生活環境の改善などによりピロリ菌感染者数が減少傾向にあるが近年の状況について大規模コホートを用いた検証はあまりされていないのが実情であり、今回これらについて解析を行った。

約 2 万人の単一施設における健康診断受診者データを用いて、胃癌のリスク因子の解析および、血清ピロリ抗体とペプシゲノン値による胃癌リスク層別化法の有用性について検証をおこなった。

2010 年からの観察研究の結果から、胃癌発症リスクと関連のある因子として年齢、性別、血清ピロリ抗体価、血清ペプシゲノン値、ABC リスク層別化法、喫煙があげられた。ロジスティック回帰分析においては、50 歳以上、ABC リスク層別化法における B 群、C 群、現喫煙者が胃癌リスクと関連が認められた。ABC リスク層別化法と胃癌発症リスクについては図 3 に示す通り、CD 群で最も胃癌発症リスクが高く、次に B 群であった。除菌成功後の E 群と未感染群である A 群では胃癌発症に有意差を認めなかった。また胃癌の発症予防にピロリ菌除菌があげられているが、図 4 に示すように研究参加時点でピロリ菌除菌治療を行っていなかった症例において、今回の 10 年間の観察

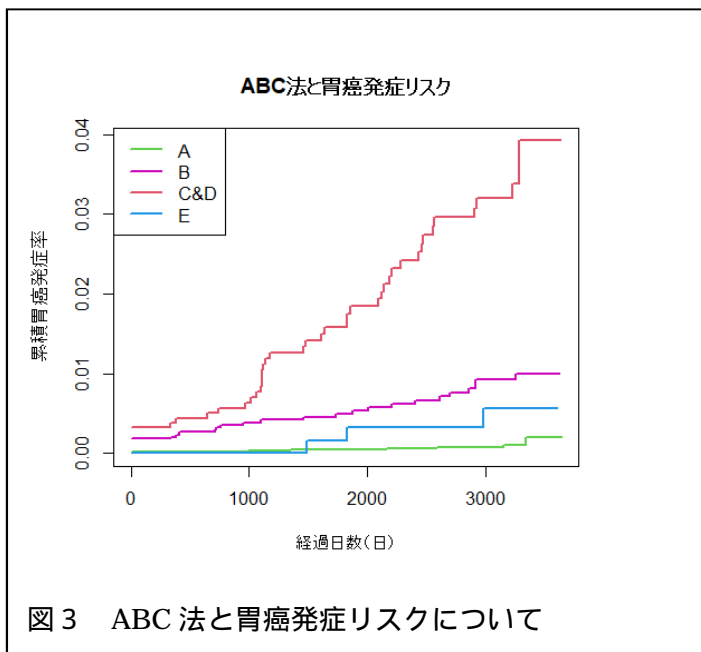
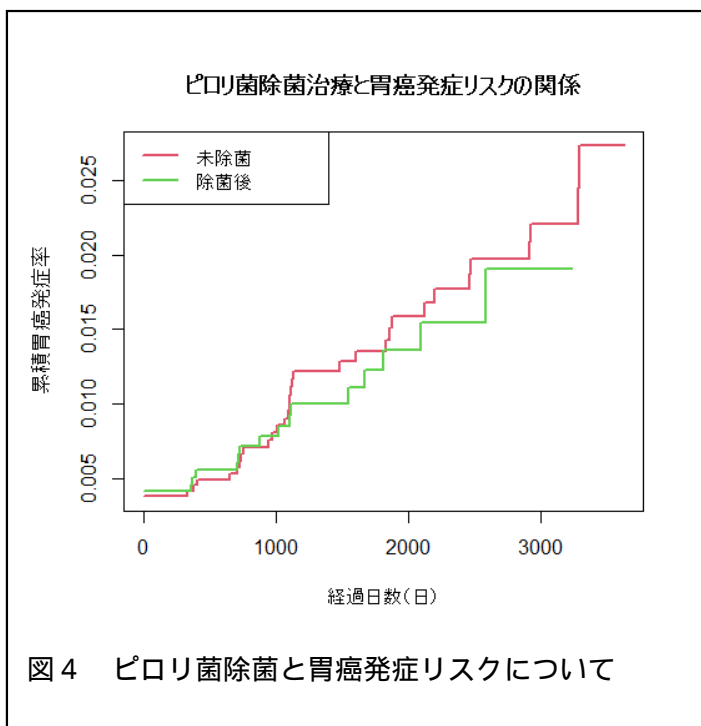


図 3 ABC 法と胃癌発症リスクについて

期間においては研究参加後にピロリ菌除菌した症例と、除菌しなかった症例の間で胃癌発症に

有意差を認めなかった。一方で研究開始前にピロリ菌除菌が成功していた群ではピロリ菌陽性群との間で胃癌発症に有意差が認められた。このことから、ピロリ菌除菌による胃癌リスク予防効果は確かにあるものの、除菌治療早期には発症予防効果は少ないため除菌治療が成功したからと安心せず少なくとも10年間はフォローアップが必要であることが必要であると考えられた。今後これら除菌後も胃癌発症をきたす症例を絞り込む方法が開発されることが望ましい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Yu, Yamamichi Nobutake, Kubota Dai, Shimamoto Takeshi, Nagao Sayaka, Sakuma Nobuyuki, Sakaguchi Yoshiki, Yakabi Seiichi, Tsuji Yosuke, Wada Ryoichi, Mitsushima Toru, Ichinose Masao, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Risk factors for gastric cancer in Japan in the 2010s: a large, long-term observational study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 481 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-021-01273-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------