

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15921

研究課題名（和文）胃粘膜の恒常性維持におけるDNAメチル化制御の役割と発癌への関与

研究課題名（英文）The role of DNA methylation on the maintenance of gastric mucosa and gastric carcinogenesis.

研究代表者

清水 孝洋（Shimizu, Takahiro）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70812684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌の多くは、ヘリコバクター・ピロリ菌の感染に関連した慢性胃炎粘膜より発生する。本研究では、慢性胃炎粘膜を構成する腺管におけるDNAメチル化状態の網羅的解析を行った。それにより、腸粘膜の性質をもつ腸上皮化生腺管に多くのDNAメチル化異常が蓄積していることが分かった。各腺管に特異的に見られるDNAメチル化異常の解析から、腸上皮化生においてDNAメチル化異常の蓄積が発癌基盤の形成に関与していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の多くは、ヘリコバクター・ピロリ菌の感染による慢性胃炎粘膜より発生する。以前から、慢性胃炎粘膜にはDNAメチル化異常が多く存在していることが報告されていたが、発癌との直接的関与については不明な点が多かった。本研究では、慢性胃炎粘膜においてDNAメチル化異常が多く含まれている腺管群を明らかにし、発癌との関与を解析した。胃発癌メカニズムの解明だけでなく、胃癌のリスク腺管を考える上でも重要な科学的根拠と考える。

研究成果の概要（英文）：Gastric cancer develops in chronic gastritis mucosa related with Helicobacter pylori infection. In this study, we performed DNA methylation analysis in pure gastric glands. Comprehensive DNA methylation analysis revealed that gastric glands with intestinal metaplasia had more aberrant DNA methylation compared with those without intestinal metaplasia. The investigation of methylated genes specifically shown in intestinal metaplasia and non-intestinal metaplasia suggested that the accumulation of aberrant DNA methylation in intestinal metaplasia could be involved in the formation of field cancerization in the stomach.

研究分野：胃癌

キーワード：腸上皮化生 ヘリコバクター・ピロリ菌 DNAメチル化異常

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌は *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染による慢性胃炎粘膜に高率に発生することが知られている( )。癌はゲノム異常が蓄積して生じることが分かっており、近年、胃癌においてもゲノム異常の全体像が明らかにされている。その結果は、癌の治療ターゲットを見つけることにつながる一方、ゲノム異常パターンの解析は、発癌メカニズムの解明に寄与する。申請者らのグループは、胃癌及び発癌前の慢性胃炎粘膜におけるゲノム異常の全体像及びパターンを解析することで、遺伝子編集酵素である Activation-induced cytidine deaminase (AID) が慢性胃炎粘膜に異所性に発現することが、胃発癌におけるゲノム異常蓄積の大きな要因であることを示してきた( )。そのゲノム異常パターンからは、ゲノム異常生成過程において DNA メチル化が関与する可能性も示唆されている。DNA メチル化異常は、胃癌組織だけでなく慢性胃炎粘膜においてすでに蓄積しており、DNA メチル化の変化が多く蓄積した胃粘膜は発癌の高リスクであることが報告されている( )。しかしながら、ミスマッチ修復遺伝子 MLH1 のプロモーターメチル化など発癌との関与が明らかなく一部メチル化異常を除いて、DNA メチル化状態の変化の蓄積がどのように発癌に寄与しているのか不明のままである。

(2) 元来、DNA メチル化調節機構は、組織の発生段階などにおいて重要であり、メチル化を導入する DNA メチルトランスフェラーゼと、受動的もしくは能動的脱メチル化作用とのバランスで成り立っている。組織障害に対する恒常性維持においても DNA メチル化調節機構は重要と考えられており、申請者は、マウスの胃粘膜障害モデルの解析において、DNMT1 が miRNA を介して発現上昇することを明らかにしている( )。しかしながら、胃粘膜の障害時における DNA メチル化調節機構の本質的な役割については不明である。また、慢性炎症からの発癌過程において、恒常性維持に寄与している DNA メチル化状態の変化がどのように発癌と関わっているのか、発癌に直接的に関わる DNA メチル化異常がどのようなものであるのかはいまだ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、胃粘膜の恒常性維持における DNA メチル化制御の役割、及び発癌への関与を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) 胃上皮細胞に特異的に Tet1、Tet2 をノックアウトし DNA メチル化異常を起こすマウスを作成する。高容量タモキシフェン投与による壁細胞障害を起こすことで急性胃粘膜障害を誘導し、胃粘膜の変化を観察する。変化が見られれば、胃腺管のトランスクリプトーム及び DNA メチル化解析により、急性胃粘膜障害の際に重要な DNA メチル化の変化を同定する。

(2) (1)のマウスを用いて、*H.pylori* PMSS1 strain を感染させ、慢性胃炎を誘導する。タモキシフェン投与により Tet1、Tet2 をノックアウトすることで、胃粘膜がどのように変化するかを観察する。また、発癌物質である MNU を投与し、腫瘍発生における影響を観察する。さらに、胃腺管及び発生した腫瘍のトランスクリプトーム解析、DNA メチル化解析を行い、慢性胃粘膜障害及び腫瘍発生において重要な遺伝子を同定する。

(3) 臨床検体を用いて、早期胃癌組織及び慢性胃炎組織におけるメチル化状態を網羅的に解析する。内視鏡的切除を施行した早期胃癌症例の非癌部の胃粘膜より腺管分離法にて胃腺管を分離する。分離した胃腺管をアルシアンブルーにて染色を行うことで、腸上皮化生、非腸上皮化生腺管に分ける。同一のサンプルより DNA と RNA を採取する。

(4) (3)にて分離した DNA についてイルミナ社の MethylationEPIC BeadChip を用いて網羅的な DNA メチル化解析を行う。また、分離した RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行う。それらのデータを統合的に解析する。さらに、同定した DNA メチル化異常について多数例を用いて validation を行う。また、マウスモデルにて抽出した DNA メチル化異常と比較することで、慢性胃炎からの胃発癌において重要な DNA メチル化異常を同定する。

### 4. 研究成果

(1) 胃上皮細胞に特異的に遺伝子をノックアウトするために、Epcam-CreERT2 マウスを用いた。まず、Epcam-CreERT2 マウスと tdTomato マウスを交配させ、タモキシフェン 4mg を 2 日連続で腹腔内投与したところ、胃粘膜の isthmus 領域と腺底部の細胞が赤色で標識された。また、3 か月後のマウスでは、胃粘膜の多くの細胞が赤色で標識されていた。したがって、Epcam-CreERT2 マウスは胃粘膜における幹細胞、主細胞をマークすることが分かった。次に、Epcam-CreERT2 マウスと Tet1-flox マウス、Tet2-flox マウス、Tet1,Tet2-double flox マウスを交配させ、胃上

皮細胞に Tet1、Tet2 をノックアウトしたマウスを作成した。タモキシフェン 4mg を 2 日連続で投与するマウスは壁細胞、主細胞の障害を起こす急性胃粘膜障害のモデルであり、Tet1、Tet2 ノックアウトマウスをコントロールマウスと比較した。タモキシフェン投与翌日、3 日後、7 日後、14 日後の胃粘膜を評価したが、特に違いは認めなかった。

(2) マウスの慢性胃炎モデルとしては、*H. felis* モデルが最も使用されてきたが、ヒトの慢性胃炎は *H. pylori* によるものが典型的であり、マウスに慢性感染を起こす *H. pylori* PMSS1 strain を用いた。まず、野生型マウスに *H. pylori* PMSS1 strain を感染させたところ、壁細胞消失、Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia (SPEM) の発生といった、ヒト慢性胃炎を模倣する変化が確認された。次に、慢性胃炎における Tet1、Tet2 の役割を調べるために、(1) で作成した、Epcam-CreERT2 マウスと Tet1、Tet2 ノックアウトマウスの交配マウスに、*H. pylori* PMSS1 strain を感染させた。感染後 6 カ月で組織の評価を行ったが、コントロールマウスとの違いは認めなかった。さらに、*H. pylori* PMSS1 strain 感染に発癌物質 MNU の投与も行ったが、腫瘍発生に差は認めなかった。

(3) 臨床検体を用いて、慢性胃炎粘膜を構成する胃腺管の DNA メチル化状態について、腺管の特徴毎に調べた。まず、内視鏡的切除を行った早期胃癌症例について、非癌部の胃粘膜より新鮮組織を採取し、EDTA を用いた腺管分離法にて胃腺管のみを採取した。次に、アルシアンブルー染色を行い、腸上皮化生、非腸上皮化生に分け、腸上皮化生のための腺管集塊、非腸上皮化生のための腺管集塊を区別した(図 1)。その上で、それらの腺管集塊より DNA 及び RNA を同一検体から採取した。慢性胃炎を認めない胃として、胃粘膜下腫瘍等 *H. pylori* 未感染の胃切除症例より胃粘膜を採取し、同様に胃腺管を分離採取した。

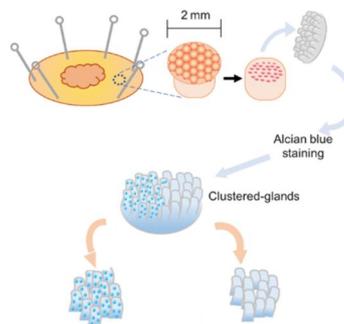


図1

(4) (3)にて分離した 26 の DNA サンプルについて、イルミナ社の MethylationEPIC BeadChip を用いて網羅的な DNA メチル化解析を行った。また、同一サンプルより採取した RNA を用いて、トランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析にて、腸上皮化生と非腸上皮化生が正確に分離されていることを確認した。また、パネート細胞に特徴的な遺伝子の発現の有無によって、腸上皮化生を完全型、不完全型に分けた。さらに、採取した腺管の周囲の組織を病理学的に評価することで確認した。その結果、26 サンプルの内訳は、完全型腸上皮化生 6 サンプル、不完全型腸上皮化生 6 サンプル、非腸上皮化生 11 サンプル、正常胃腺管 3 サンプルに分けられた。

(5) まず、DNA メチル化状態の全体像の解析を行った。正常胃腺管と比較して、非腸上皮化生腺管、腸上皮化生腺管の順に DNA メチル化異常が多い傾向にあった。特にプロモーター領域におけるメチル化の亢進が多く見られた。Gene body については DNA メチル化異常はほとんど見られなかった。胃癌組織の DNA メチル化解析では、プロモーター領域のメチル化亢進及びゲノム全体の低メチル化を認めており、ゲノム全体の低メチル化の有無が腸上皮化生と胃癌の DNA メチル化状態の違いの一つであった。

(6) DNA メチル化異常が胃発癌基盤の形成にどのように関与しているのかを調べるために、どのような遺伝子のプロモーター領域にメチル化異常が生じているのかを DMR を用いて解析した。正常胃腺管と比較して、やはり非腸上皮化生腺管、腸上皮化生腺管の順にプロモーター領域の高メチル化が見られたが、Tier1、2 にリストアップされている癌関連遺伝子のプロモーター領域の高メチル化も同様の傾向であった。しかしながら、*MLH1*、*CDKN2A* など胃癌において DNA メチル化異常が重要であると言われている遺伝子のメチル化亢進は、腸上皮化生腺管には認めなかった。この点も、腸上皮化生と胃癌の DNA メチル化状態の違いの一つであった。

これまでに、我々は慢性胃炎を構成する胃腺管のゲノム解析から、腸上皮化生腺管に多くのゲノム異常が蓄積していることを報告してきた( )。遺伝子変異の signature 解析からは、腸上皮化生におけるゲノム異常蓄積の原因は cell turnover の亢進と考えられた。そこで、cell turnover の亢進に関係する遺伝子について DNA メチル化状態を調べたところ、腸上皮化生において、SFRP1、SFRP2 などの DNA メチル化亢進が挙げられた。現在、多数例での validation を含めさらに解析を進めている。

(7) (4)における DNA メチル化解析の結果を用いて PCA 解析を行ったところ、腸上皮化生の DNA メチル化状態は 2 群に分けられることが分かった。メチル化異常の多い群とメチル化異常がそれ程多くない群である。これらの群について、トランスクリプトームの結果を再解析しその特徴を調べたところ、前者には胃粘膜に特徴的な遺伝子の発現がほとんどなかったのに対して、後者には胃粘膜に特徴的な遺伝子の発現が認められた。すなわち、胃粘膜の特徴を全く持たない細胞で構成された腸上皮化生には多くの DNA メチル化異常が存在することが分かった。現在、多数例

での validation を行うとともに、胃癌との関わりについて解析を進めている。

(8) これまでの結果から、腸上皮化生を含む化生が胃癌の発生源になっている可能性が考えられた。1 例のみではあるが、早期胃癌の近傍に化生を認めたため、それらのゲノム解析を行い、化生から早期胃癌が発生していることを示した( )。この症例について DNA メチル化異常についても解析を行い、化生からの発癌における DNA メチル化異常の関与を明らかにする予定である。

(9) 本研究では、慢性胃炎粘膜を構成する腸上皮化生腺管に多くの DNA メチル化異常が蓄積していることが分かった。これは、腸上皮化生腺管には粘膜内癌に匹敵する程のゲノム異常が蓄積しているという我々のこれまでの報告( )と類似する結果であった。現在、DNA メチル化異常とゲノム異常の関係を調べることで、胃発癌基盤の形成過程の解析を進めている。また、本研究では腸上皮化生腺管にはメチル化の程度が大きく違う 2 群が含まれていることが分かった。この解析をさらに進めることで、多様な特徴を示す胃癌の発生過程を明らかにする手がかりとなるだけでなく、臨床面において胃癌のサーベイランスの方法や予防的治療につながると考えている。

#### <引用文献>

- Polk DB et al. *Nat Rev Cancer* 2010;10:403-14.
- Matsumoto Y et al. *Nat Med* 2007;13:470-6.
- Shimizu T et al. *Gastroenterology* 2014;147:407-17.
- Yamashita S et al. *PNAS* 2018;115:1328-33.
- Shimizu T et al. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020;9:61-78.
- Kumagai K et al. *Cancer Res* 2022;82:1712-23.
- Kumagai K et al. *J Pathol* 2023;259:362-8.

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 Kumagai Ken, Shimizu Takahiro, Nikaïdo Mitsuhiro, Hirano Tomonori, Kakiuchi Nobuyuki, Takeuchi Yasuhide, Minamiguchi Sachiko, Sakurai Takaki, Teramura Mari, Utsumi Takahiro, Hiramatsu Yukiko, Nakanishi Yuki, Takai Atsushi, Miyamoto Shin'ichi, Ogawa Seishi, Seno Hiroshi	4. 巻 259
2. 論文標題 On the origin of gastric tumours: analysis of a case with intramucosal gastric carcinoma and oxyntic gland adenoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 362 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6050	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
---------	---------