

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15972

研究課題名（和文）培養細胞を用いた胃粘膜発癌メカニズムと遺伝子変異・ピロリ菌感染相互作用の解明

研究課題名（英文）Analysis of association in gastric carcinogenesis, genetic alteration, and H. pylori infection with cell culture system

研究代表者

竹内 康英 (Takeuchi, Yasuhide)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80646373

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）：胃粘膜の発癌過程の解明のため、本研究では胃癌ドライバー遺伝子変異の候補が、実際の非腫瘍部胃粘膜上皮細胞においてどのような分子生物学的変化をもたらすのか、その詳細を解明することを目的としていた。60個の新規胃粘膜組織片を収集し、培養実験を実施中である。同時に実施した既収集サンプルの再解析では、非癌部由来ヒト胃粘膜上皮集塊と、単離した胃腺窩に対して網羅的遺伝子変異解析を行い、ドライバー遺伝子変異の検索と、胃粘膜における遺伝子変異蓄積・クローン拡大の詳細、組織学的な腸上皮化生の占める面積の相関を解明し、胃癌ドライバー遺伝子として知られる遺伝子の一部が非癌部で高頻度で変異していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の人口あたりの罹患率は98.5例、死亡率は34.3人（いずれも人口10万対）とされており、その発生メカニズム、治療標的の発見が待たれている。疫学的にはピロリ菌感染による腸上皮化生と胃癌発生に有意な相関があることが知られていたが、その詳細はわかっていなかった。本研究の遂行により腸上皮化生と胃粘膜上皮における遺伝子異常の蓄積に有意な相関があること、遺伝子異常のパターンは非癌部腸上皮化生領域と癌部領域とで有意な差があることがあきらかになった。このメカニズムを解明していくことで、胃癌の進展・発症予防に資する知見を得られることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the detailed mechanism of carcinogenesis in gastric epithelial cells, by inducing genetic alterations of driver genes in cultured gastric cells. So far, almost 60 gastric tissues have been collected by different patients and on culturing. Analysis on genetic alterations on the primary tissue and gastric crypts/pits revealed that the genetic alterations in the gastric stem cells accumulate with the aging of the patients, and some of the known driver genes of gastric cancers were frequently mutated, compared to the gastric cancer tissue, in the non-tumorous gastric epithelial cells.

研究分野：人体病理学

キーワード：遺伝子変異解析 発癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1-1) 学術的背景：胃癌発症のメカニズム解明に対する需要

本邦の胃癌年間死亡者数は約4万3千人で、がん死亡原因の第3位とされている(国立がん研究センター、2018年)。5年生存率は胃癌全体で約73.7%である一方、進行癌では16.6%と非常に低く、胃粘膜の癌化メカニズム解明、早期の胃癌治療につながる知見が求められている。

旧来、ヘリコバクターピロリ菌(以下ピロリ菌)の慢性感染が胃癌のリスク因子であることが知られており、特にピロリ菌によって生じた胃粘膜上皮の遺伝子変異が上皮細胞の無秩序な増殖・癌化につながると考えられている(W. Fischer, 2002)。しかしながらピロリ菌感染患者における胃癌発症の割合は10年で約3%程度(N. Uemura, 2001)とされており、なぜピロリ菌感染患者のごく一部にしか胃癌が発症しないのか、その基盤の解明が待たれている。

#### (1-2) 学術的「問い」につながる、探索研究から得られた知見(未公開データ)

旧来、クローン性の細胞増殖は腫瘍特有の現象と考えられてきた。しかし近年、複数の研究機関が、高感度・網羅的な遺伝子変異解析を実現し、一見正常な組織でも遺伝学的にはクローン性増殖と遺伝子変異の蓄積が存在することを報告してきた。食道、大腸などの消化管に関しては、申請者を含む研究グループが世界に先駆けて成果を報告した(N. Kakiuchi 2020, A. Yokoyama, 2019)。

その成果に続いて、申請者は胃に対して、本研究課題の着想に至る予備実験・探索研究を開始した。組織学的には正常なヒト胃粘膜上皮(n=122)に対して感度・網羅的な遺伝子変異解析を行い、食道・大腸と同様、非腫瘍部胃粘膜上皮でもクローン性増殖と遺伝子変異蓄積が生じていること、ピロリ菌感染でそれらが加速することを明らかにした。分泌型ムチンをコードするMUC6の機能喪失型変異や、転写因子の一種をコードするSOX9の変異が非腫瘍部胃粘膜におけるクローン性増殖のドライバー遺伝子の候補として挙がってきたが、いずれも既知の胃癌(TCGA, 2014)のデータよりも有意に頻度が高かった。特定の遺伝子変異が、非腫瘍部における秩序あるクローン性増殖に対しては有利にはたらく一方で、無秩序なクローン性増殖である癌組織で生じる細胞間の増殖・生存の競争においては不利にはたらく可能性をみいだした。

#### (1-3) 本研究課題の核心をなす学術的「問い」

上記研究から導き出される、本研究課題の核心をなす「問い」は、探索研究で明らかにしたMUC6のような特定の遺伝子に生じた変異が、一見正常な非腫瘍部胃粘膜での秩序あるクローン性増殖には有利に作用する一方で、無秩序なクローン性増殖である癌組織では不利に作用している可能性が高いが、その分子生物学的機序はどのようなものか?である。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、胃粘膜が癌化する過程の詳細を明らかにすることである。その一端として、統計学的手法をもちいた上記の探索研究でドライバー遺伝子変異の候補として浮上した遺伝子変異が、実際の非腫瘍部胃粘膜上皮細胞において増殖に有利に作用するのか、ドライバー遺伝子変異の作用に対してピロリ菌感染は何らかの相互作用を示し発癌に影響を及ぼすのか、を、後述のオルガノイド作成などの手技をもちいて解明していく。

### 3. 研究の方法

本研究では、まずピロリ菌陽性・陰性を含む患者の非癌部・癌部胃粘膜から培養細胞株を樹立し、着目遺伝子の変異陽性株・陰性株に分類する。変異陰性株で複数クローンを作成し、一部に遺伝子変異を導入する。各群の培養系にピロリ菌を感染させ、遺伝子変異の導入前後やピロリ菌の感染前後の各段階における細胞の形態学的特徴や増殖活性、細胞内シグナリングの変化を明らかにすることで、遺伝子変異・細菌感染間にはどのような相互作用が存在し、癌化に寄与するのか、解明することとした。

#### 【研究1】胃粘膜上皮由来培養細胞株の作成と形質の確認(2021年-2022年)

複数患者から胃粘膜を採取し、複数のヒト胃粘膜上皮由来培養細胞株(オルガノイドなど)を樹立する。培養株のDNAをシーケンスし、遺伝子変異の有無を判定する。遺伝子変異の有無に応じた培養細胞の形態学的な特徴の差異を、HE染色標本やPeriodic acid-Schiff反応を用いた細胞質内外の粘液の染色、各種免疫組織化学的染色によって明らかにする。非腫瘍部だけでなく癌部や良性腫瘍に対しても同様の操作を行う。

#### 【研究2】遺伝子変異やピロリ菌感染によって生じる変化の定性・定量(2022年-2024年)

研究1で作成した培養細胞ライブラリーのうち、変異陰性の株を複数クローンに分け、レンチウイルスなどを用いてドライバー遺伝子変異を導入する。各種細胞染色法を実施して、遺伝子変異の導入によって細胞形質に生じる変化を明らかにする。遺伝子変異陽性・陰性群、コントロール群に対してピロリ菌を感染させ、慢性胃炎状態を模した培養系を作成する。遺伝子変異やピロリ

菌感染の陽性・陰性群が増殖に与える影響を細胞増殖速度の定量で明らかにする。細胞内増殖シグナル活性を反映する CD44 などのウェスタンブロッティングや定量 PCR で増殖活性の変化を証明し、RNA マイクロアレイを用いて細胞質内シグナリングの変化を定量・定性する。これらの結果を総合的に解析し、各種遺伝子変異やピロリ菌感染が胃粘膜上皮の増殖活性にどのような影響を与え、最終的な癌化に寄与するかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

ピロリ菌陽性・陰性を含む患者の非癌部・癌部胃粘膜からの培養細胞株樹立を試みたが、研究期間早期には芳しい成功率を得られなかった。原因としては研究開始当初の新型コロナウイルス流行やそれに伴う研究環境の変化、検体搬送の際に使用した培養液の種類や検体の温度管理が影響していることが判明した。

培養株樹立に難航しているなかで、培養株を採取した患者由来の胃粘膜上皮由来 DNA をシーケンスし、遺伝子変異の有無の検索は続行した。遺伝子変異の有無に応じた胃粘膜の形態学的な特徴の差異を、HE 染色標本や Periodic acid-Schiff 反応を用いた細胞質内外の粘液の染色、各種免疫組織化学的染色で解析した。既存のサンプルに加えて新規に 110 個の非腫瘍部胃粘膜組織片を採取し、合計 53 人の患者から 232 個の胃粘膜組織片を採取し解析した。腸上皮化生を伴った胃粘膜組織片では、腸上皮化生を伴わない胃粘膜組織片と比較して有意に遺伝子変異が蓄積していた。さらに、遺伝子変異を有する細胞集団（クローン）が粘膜面上で占める面積も、腸上皮化生を伴った胃粘膜組織では有意に拡大していた。ピロリ菌感染によって腸上皮化生が生じることや胃癌発癌率が有意に高まることが実験医学的・疫学的に示されており、その分子生物学的背景には胃粘膜上皮における遺伝子変異の蓄積と、遺伝子変異を有するクローンの拡大があることを示した。非癌部胃粘膜組織片におけるクローン拡大で、変異が正の選択へと働く遺伝子として、MUC6 や ARID1A、SOX9、ARID2 が候補として挙がった。特に MUC6 の変異は腸上皮化生を伴った胃粘膜組織片におけるクローン拡大において有意に正の選択へと働いていること、全長 2,439 アミノ酸の MUC6 タンパクの中でも特定の部位に遺伝子異常が集積していることが示された。自然環境下では遺伝子変異はランダムに発生していることが想定される中、無作為に抽出した胃粘膜上皮組織片で有意に特定の遺伝子に特定の遺伝子異常が発見されることは、その遺伝子異常が胃粘膜上皮におけるクローン拡大において有利に作用することが想定されるため、現在その MUC6 の遺伝子異常が、分子生物学的に細胞内にどのような作用をもたらすか、胃粘膜上皮におけるクローン拡大をもたらしているのか、in vitro/vivo 下における検証を加えている。

形態学的な特徴との相関に関しては、一般的に腸上皮化生は杯細胞の有無などにもとづき、完全型と非完全型とに分類され、完全型がより安定して腸管上皮と類似した形質を示す、とされている。手作業にもとづく分類のため全症例・全サンプルでの検討は完了してはいないが、現状のデータ (n=50) では非腸上皮化生粘膜、非完全型腸上皮化生粘膜、完全型腸上皮化生、の順で、胃粘膜上皮に遺伝子異常が蓄積しており、それと相関して遺伝子異常を有するクローンが拡大する傾向も認められている。本研究は現在も続行しており、古典的な形態学的評価と、最先端の遺伝子異常解析結果との相関を検証し、一般病院の病理診断科における形態学的評価への還元を目指している。

食道や大腸、皮膚などほかの臓器の非癌部組織におけるクローン拡大が特定の遺伝子の変異（点突然変異など）と有意に相関することが知られている一方、上記検証の中で、胃粘膜上皮における腸上皮化生/クローン拡大は遺伝子の変異だけでなく、染色体のコピー数変化とよく相関することを明らかにした。MYC を含む 8 番染色体や MYCN, ERBB4 を含む 2 番染色体、GNAS, SALL4 や SRC を含む 20 番染色体の増幅がクローン拡大と有意に相関することが明らかになり、本結果を共同研究者らとともに論文発表した (PMID: 35363856)。

DNA シーケンスと並行して、一部組織片 (n=40) では mRNA シーケンスを実施し、新規融合遺伝子の出現や、遺伝子発現の変化を検証した。既報と矛盾しない結果として、腸上皮化生を伴った胃粘膜組織片では CDX2 など下部消化管粘膜で発現する遺伝子の発現亢進が確認され、形態学的な形質と細胞内における分子生物学的な変化が相関することを確認した。新規融合遺伝子の出現を伴った組織片は認められず、癌において融合遺伝子が検出される頻度が低いこととあわせて、胃粘膜発癌過程において融合遺伝子の出現は頻度が低く、発癌早期における重要な現象ではない可能性を確認した。

研究期間終盤、難航していた培養細胞株が徐々に樹立できるようになってきた。その中でオルガノイド作成を試み、一部細胞株では成功したものの、当初予定していたレンチウイルスによる遺伝子異常の導入や、オルガノイド内腔へのピロリ菌注入までには至らなかった。オルガノイドに対してレンチウイルスを用いて遺伝子異常を導入する操作に関してはウイルス濃度や温度管理などの条件が厳しいことが知られており、系の安定化に時間を要した。また、オルガノイドにピロリ菌を注入する操作に関しても、物理的・機械的な操作に対するオルガノイドの脆弱性を認め、注入操作・手技の安定化に時間を要した。このため当初予定していた、DNA/RNA シーケンスを用いた、遺伝子異常の導入前後やピロリ菌注入の前後におけるオルガノイドの分子生物学的変化の定量・定性的評価に足るサンプル数を確保できず、本報告書に公開可能な研究結果データを取得することができなかった。ただしデータ公開が困難であることに関しては単純に研究期間が不足していたことが原因であり、オルガノイド作成・樹立や各種導入の手技は確率しているた

め、今後引き続き継続して上記研究を続行し、胃粘膜発癌メカニズムと遺伝子変異・ピロリ菌感染相互作用の解明を目指して研究を続けていく予定をしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2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 -

1. 著者名 Takeuchi Yasuhide, Mineharu Yohei, Arakawa Yoshiki, Hara Masayuki, Oichi Yuki, Kamata Takahiko, Fukuyama Keita, Yamamoto Yoshihiro, Yamanaka Toshiyuki, Kakiuchi Nobuyuki, Hiratomo Emi, Hirata Masahiro, Yokoo Hideaki, Hirose Takanori, Minamiguchi Sachiko, Ogawa Seishi, Muto Manabu, Miyamoto Susumu, Haga Hironori	4. 巻 48
2. 論文標題 A novel SREBF1::NACC1 gene fusion in an unclassifiable intracranial tumour	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropathology and Applied Neurobiology	6. 最初と最後の頁 66 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nan.12843	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 -

1. 著者名 Yamashita Haruki, Arakawa Yoshiki, Terada Yukinori, Takeuchi Yasuhide, Mineharu Yohei, Sumiyoshi Sosuke, Tokunaga Shinya, Nakajima Kohei, Kawabata Naoko, Tanaka Kuniaki, Tanji Masahiro, Umeda Katsutsugu, Minamiguchi Sachiko, Ogawa Seishi, Haga Hironori, Takita Junko, Miyamoto Susumu	4. 巻 39
2. 論文標題 Whole-genome sequencing analysis of an atypical teratoid/rhabdoid tumor in a patient with Phelan-McDermid syndrome: a case report and systematic review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 232 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-022-00440-7	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Takeuchi Yasuhide, Yoshida Kenichi, Halik Adriane, Kunitz Annegret, et al.	4. 巻 151
2. 論文標題 The landscape of genetic aberrations in myxofibrosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 565 ~ 577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kumagai Ken, Shimizu Takahiro, Takai Atsushi, Kakiuchi Nobuyuki, Takeuchi Yasuhide, Hirano Tomonori, Takeda Haruhiko, Mizuguchi Aya, Teramura Mari, Ito Takahiko, Iguchi Eriko, Nikaido Mitsuhiro, Eso Yuji, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Miyamoto Shin-ichi, Obama Kazutaka, Ogawa Seishi, Marusawa Hiroyuki, Seno Hiroshi	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Expansion of gastric intestinal metaplasia with copy number aberrations contributes to field cancerization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1712-1723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-1523	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 -

1. 著者名 Takeuchi Yasuhide, Arakawa Yoshiki, Yokoo Hideaki, Mikami Yoshiki, Terada Yukinori, Yoshida Kazumichi, Miyamoto Susumu, Haga Hironori	4. 巻 22
2. 論文標題 Intra-cerebellar schwannoma with various degenerative changes: a case report and a systematic review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 66-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-022-02596-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Yoichi, Sato Yusuke, Suzuki Hiromichi, Kakiuchi Nobuyuki, Yoshizato Tetsuichi, Lenis Andrew T., Maekawa Shigekatsu, Yokoyama Akira, Takeuchi Yasuhide, (omit), Ogawa Seishi	4. 巻 39
2. 論文標題 Molecular classification and diagnostics of upper urinary tract urothelial carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 793 ~ 809.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccell.2021.05.008	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 該当する

1. 著者名 Nikaido Mitsuhiro, Kakiuchi Nobuyuki, Miyamoto Shin'ichi, Hirano Tomonori, Takeuchi Yasuhide, (omit), Seno Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Indolent feature of Helicobacter pylori-uninfected intramucosal signet ring cell carcinomas with CDH1 mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 1102 ~ 1114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-021-01191-8	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 筑後 孝紀ら
2. 発表標題 Helicobacter pylori感染の影響を受けた非癌部胃粘膜のゲノム解析(Genomic analysis of non-cancerous gastric mucosa affected by Helicobacter pylori infection)
3. 学会等名 日本癌学会（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------