

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20836

研究課題名（和文）腸上皮化生に対する網羅的解析を用いた新規の胃発癌関連遺伝子異常の同定

研究課題名（英文）New identification of genetic abnormalities associated with gastric carcinogenesis by comprehensive analysis of intestinal metaplasia

研究代表者

熊谷 健（Kumagai, Ken）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10912040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヘリコバクターピロリ菌感染を背景とした胃癌症例の化生上皮と非化生上皮を用いて、1腺管単位で1サンプルとしたDNA用の検体と、複数腺管をまとめたDNA/RNA用検体とを作成した。それぞれから抽出したDNA、RNAをもとに次世代シーケンサーを使用してDNA配列およびRNA発現量を解析し、得られたゲノムデータをもとにコピー数変化を算出した。腸上皮化生腺管は非化生腺管と比較して遺伝子変異数が非常に多く、腸上皮化生腺管は分裂を繰り返すことによりそのクローン領域を拡大していることがわかり、また腸上皮化生はおなじ症例においても非化生腺管と比較して遺伝子修復酵素の発現が低下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

腸上皮化生腺管が同一個人においても非化生腺管と比較して遺伝子変異数が多く、遺伝子修復酵素の発現が低下していることが分かった。これはヘリコバクターピロリ菌が感染した個人の胃粘膜において、腸上皮化生が見られた場合は胃癌の発癌リスクであることを示唆し、胃癌の定期スクリーニングを行う必要性の高い集団の選別に役立つ。ひいては医療資源の効率的な配分に寄与する。

研究成果の概要（英文）：We obtained metaplastic and non-metaplastic epithelium from gastric cancer cases with Helicobacter pylori infection. We used a gastric gland as a sample for DNA analysis and multiple glands as a sample for DNA and RNA analysis. We extracted DNA and RNA from each sample. DNA sequence and RNA expression level were analyzed using a next-generation sequencer, and copy number changes were calculated based on the obtained genomic data. We found that each metaplastic glands have a much higher number of genetic mutations than non-metaplastic glands. We also found that the gland of intestinal metaplasia clonally expands by repeating division. We also found that the expression of gene repair enzymes of metaplastic gland was lower than that of non-metaplastic glands even in the same cases.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃癌 腸上皮化生 遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な癌種において、慢性炎症を背景として背景粘膜に遺伝子異常が蓄積し、その細胞が領域を拡大することで前癌状態を形成していることが知られているが、胃癌においてそのような前癌状態に関する研究は乏しい。胃癌にはH. pylori 感染による胃癌のほかに、Epstein-Barr ウィルスの感染が原因となる胃癌、Germline の遺伝的異常を背景とした家族性の胃癌、H. pylori や Epstein-Barr ウィルス未感染胃に生じる孤発性の胃癌などがみられるが、本邦で圧倒的に多いのはH. pylori 感染胃を背景とした胃癌である。H. pylori 感染による慢性炎症が遷延すると、胃粘膜には萎縮性変化や腸上皮化生が目立つようになり胃癌が発生することが知られているが、胃癌の起源となる細胞や、発癌の初期段階で重要な遺伝子異常はわかっていない。

2. 研究の目的

H. pylori 感染胃を背景に生じた胃癌症例を対象とし、特に発癌リスクが高いとされている腸上皮化生に着目して、背景胃粘膜の化生上皮・非化生上皮の網羅的解析を行うことにより、胃癌発生に關するゲノム異常・エピゲノム異常および遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

H. pylori 感染胃粘膜を背景とした早期胃癌症例の内視鏡切除検体から上皮のみを分離し、Alcian Blue 染色により上皮を腸上皮化生と非化生に選別したのち、DNA および RNA を抽出し、既知の腫瘍関連遺伝子に蓄積された一塩基置換、染色体コピー数異常、DNA メチル化状態変化および遺伝子発現プロファイルについて、比較統合解析を行い、化生上皮における特徴的なゲノム異常や DNA メチル化異常、発現変動遺伝子群を同定する。対照として H. pylori 未感染胃粘膜および内視鏡手術した癌部の FFPE 検体の解析も行い、化生のゲノム変化を胃癌と比較することで化生の発癌リスクを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 単一腺管におけるゲノム異常の解析

内視鏡的粘膜下層剥離術により粘膜下層まで採取した胃組織から、内視鏡下かつ実体顕微鏡下に腸上皮化生と判断した部位を採取し上皮のみを分離した。Alcian Blue 染色により杯細胞を染色することで腸上皮化生腺管を非化生腺管と識別し、一腺管単位で分離した。一腺管単位の全エクソン解析を行うために、同一腺管の溶解液を2つに分割し、全ゲノム増幅行程を並行して行った。次世代シーケンサーを用いてそれぞれの全エクソン解析を行い、97.7% (258/264) の変異が一致したことで解析の質が高いことを確認した。H. pylori 感染早期胃癌患者 11 症例、H. pylori 感染非胃癌患者 4 症例、H. pylori 未感染患者 3 症例から 56 腺管を分離し、粘膜内癌 11 検体とともに全エクソン解析を行った。また同様の手法を用いた既報の H. pylori 未感染患者 8 症例 13 腺管由来の次世代シーケンサー解析生データ、および公開データベースの胃癌データを再解析した (図 1)。平均変異数は腸上皮化生で 80.8、非化生腺管で 29.8、H. pylori 未感染の正常腺管で 17.8 と腸上皮化生に有意に変異が多く ($p < 0.05$)、変異数はいずれの群も年齢と強く相関した ($R^2 = 0.934, 0.825, 0.894$) (図 1a)。腸上皮化生の変異数は粘膜内癌 (89.65) および Stage A 胃癌 (81.4) と同等であった (図 1b)。この結果は、腸上皮化生は変異を獲得しやすいことを示唆する。また各変異を確認すると同一粘膜から得られた腺管の変異が一部共通しており、起源を同一とした腺管が領域を拡大していることを示唆する結果であった。

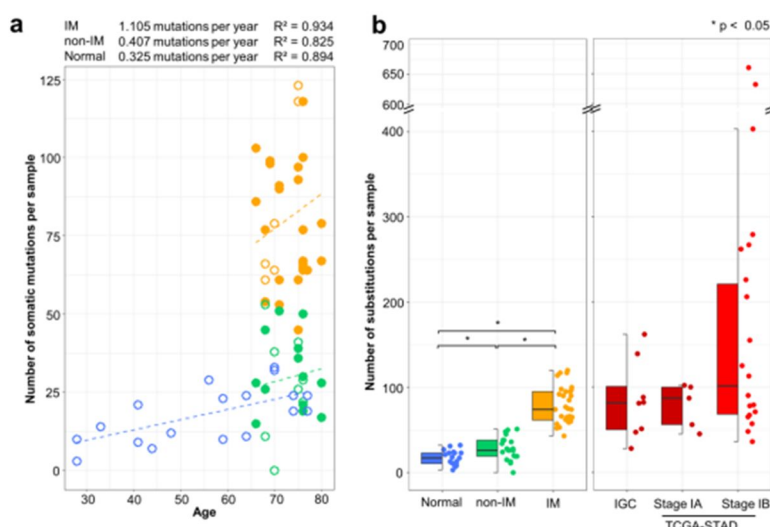


図 1

(2) 腺管集塊におけるゲノム異常の解析

腸上皮化生で高頻度に獲得される変異を調べるために、同一患者から分離した多数の腺管集塊を1サンプルとして、胃癌で高頻度に変異が見られる98遺伝子に絞って26症例96検体でTarget sequencingを行った。MUC6は非化生腺管集塊で多く変異が見られたが、腸上皮化生で多く変異が見られた遺伝子やアレル頻度が高い変異は認めなかった。遺伝子変異が腸上皮化生を形成する原因ではなく、腸上皮化生の領域進展にも寄与していないことを示唆する。

(3) 単一腺管および腺管集塊における発現解析

腸上皮化生が多くの変異を獲得する原因を調べるため、腸上皮化生および非化生腺管集塊由来のRNAを用いてTranscriptome解析を行ったところ、腸上皮化生はDNA修復、G2/Mチェックポイントおよび有糸分裂紡錘体に関する発現が低下していた(図2)。腸上皮化生は修復機構の働きが减弱することにより変異が蓄積しやすいことを示唆するとともに、コピー数変化が出現しやすいことを示唆する。

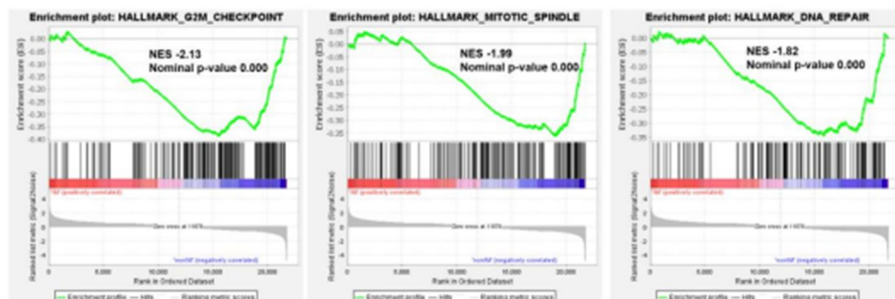
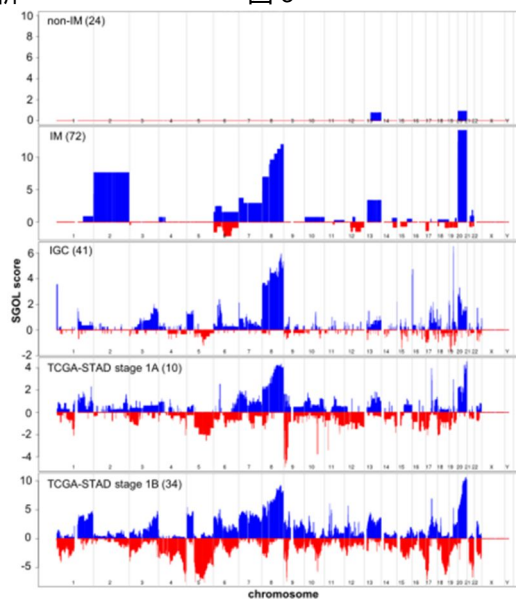


図2

(4) 単一腺管および腺管集塊におけるコピー数解析

単一腺管および腺管集塊の次世代シーケンサーから得られたリードカウントデータを用いてコピー数の解析を行い、既報および公開データベースの胃癌データと比較した。腸上皮化生腺管の24%(7/29)、非化生腺管の19%(4/21)にコピー数増加を認め、正常腺管には認めなかった。腸上皮化生腺管集塊の45.8%(33/72)で胃癌と同様の部位にコピー数増加を認め、非化生腺管集塊では8.3%(2/24)にとどまった(図3)。腸上皮化生腺管集塊でみられたコピー数変化の49%(42/86)はサンプル内の50%以上の細胞に共有されており、コピー数変化は腸上皮化生の領域拡大に寄与していることを示唆する。

図3



以上の結果より、腸上皮化生腺管はゲノム修復に関する機能が低下することで癌と同程度に多くの変異やコピー数変化が蓄積したそれ自体が高いリスクな腺管であり、コピー数変化を有する腺管が領域をもって拡大することで発癌の素地を形成していることが示された。上記結果は論文としてCancer Research誌にacceptされている。

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 Ken Kumagai | 4. 巻 - |
| 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 - |
| 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 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 熊谷 健 |
| 2. 発表標題 Study of high-risk gastric glands for gastric cancer by genome analysis of each gland in the gastric mucosa |
| 3. 学会等名 第29回日本消化器病学会関連週間 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|