様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　(共通)

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ５ 月 ２４ 日現在

機関番号：１７５０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2017
課題番号：２６４６０９４２

研究課題名（和文）H. pylori除菌後胃癌の網羅的遺伝子解析による胃癌危険因子の特定

研究課題名（英文）Identification of gastric cancer risk factors after H. pylori eradication by evaluating exhaustive genetic analysis with using next-generation sequencing.

研究代表者
兒玉　雅明（Kodama, Masaaki）

大分大学・福祉健康科学部・教授

研究者番号：２０３３２８９３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：網羅的遺伝子解析によるH. pylori除菌後胃癌危険因子の解明を行った。除菌後胃癌103例117病変(男性94例)中、次世代シーケンサーによって除菌前後別また分化度別に20例の遺伝子解析を行った。この結果、癌遺伝子APC, CSF1R, FGFR3, FLT3, KDR, PDGFRA, RET, STK11, TP53において80%以上に変異を認めた。分化型胃癌は有意にhotspot変異が少数であり、PDGFRAのhotspot変異は除菌後高分化群のみ全く認めなかった。これより除菌後胃癌は異なった特徴を有し、特に除菌後高分化型胃癌は遺伝子変異の相違から発癌機序が異なることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：Exhaustive genetic characteristics of gastric cancer (GC) after H. pylori eradication was elucidated with using next-generation sequencing. 20 subjects (5: well differentiated GC before eradication, 5: well differentiated GC after eradication, 6: undifferentiated GC before eradication, 4: undifferentiated after eradication) were evaluated with using the Ion Ampliseq V2 Cancer Hot spot panel (Life Technologies). Genetic mutation was found in more than 80% subjects in oncogene APC, CSF1R, FGFR3, FLT3, KDR, PDGFRA, RET, STK11, TP53. Number of hotspot mutation of well differentiated GC group showed significantly few than the other group. In addition, only well-differentiated GC after eradication group did not detect the hotspot mutation of PDGFRA at all. GC after H. pylori eradication had different characteristics. Especially, the present result showed that well differentiated GC after eradication was considered to have the different carcinogenic mechanism genetically.

研究分野：消化器内科

キーワード：Helicobacter pylori　除菌後胃癌　癌遺伝子　次世代シーケンサー解析　TP53　PDGFRA

## １．研究開始当初の背景

本邦は世界でも有数の胃癌多発国であり、胃癌の最大要因はヘリコバクターピロリ(HP)感染である。HP は胃粘膜に強い萎縮性胃炎と腸上皮化生を生じ、最終的に胃癌を引き起こす危険性の高い感染症である。

HP 除菌により胃粘膜萎縮・腸上皮化生の改善と胃癌抑制効果が報告され、2013 年にHP 感染胃炎が除菌治療の保険適用となった。これは胃癌予防の観点から大きな恩恵と思われる。しかし、除菌による胃癌抑制効果は3 分の２程度であり、除菌症例の増加によって除菌後発見胃癌の増加が今後大きな問題となることが予想される。

## ２．研究の目的

本研究では、多数の除菌後胃癌症例において網羅的遺伝子解析を行い、除菌後発見胃癌における遺伝子特異点の発見、除菌後胃癌発症のメカニズム解明をめざす。また臨床的、組織学的に除菌後胃癌の高危険群を抽出することで、全症例除菌時代に向け、除菌後胃癌の更なる抑制、また危険度に応じたスクリーニングを行うことで、的確な早期胃癌の発見、患者の負担軽減、医療経済への寄与を目的とする。

## ３．研究の方法

大分大学医学部附属病院および関連施設で認められた除菌後発見胃癌は 103 症例 117 病変(男 94 例､女 23 例､除菌時平均年齢 63.2±9.6 (45-80 歳)であった。また 2004 年 1 月から 2010 年 12 月まで当院および有田胃腸病院にて切除を受けた HP 陽性胃癌 210 例をあわせて対象とした。

このうち内視鏡切除術を施行し得た除菌後胃癌 50 症例 53 病変(男性 40 例､女性 10 例)、同時期に当院にて内視鏡的切除術を施行された HP 陽性胃癌 151 症例(男性 117 例、女性 34 例)にて臨床病理学的特徴を比較した。各々において性、年齢、除菌後経過観察の有無、内視鏡萎縮度、除菌前胃粘膜の updated Sydney system score､胃癌の肉眼的および病理組織学的特徴を比較した。免疫組織学的手法として、抗 Ki-67, p53, 8-OHdG, E-cadherin, cluadin18, MUC2, MUC5AC, MUC6, CD10, CDX2 抗体を用い、腫瘍の細胞動態、粘液特性などを比較した。両群比較の検定としてカイ二乗検定および t 検定を用いた。また Epstein-Barr virus(EBV)感染関連の可能性をみるため EBER に対するプローブをもちいた In situ hybridization（ISH）をおこなった。

次世代シーケンサー解析は、HP 陽性高分化型胃癌群(A 群)5 例（平均年齢 72.8 歳、男性 4 名女性 1 名)、除菌後高分化型胃癌群(B 群)5 例（平均年齢 65.0 歳、男性 4 名女性 1 名)、外科的切除を行った HP 陽性低分化型胃癌群(C 群)6 例(男性 3 例､女性 3 例､年齢 69.5 歳）除菌後低分化型胃癌群(D 群)4 例(男性 4 例､年齢 72.8 歳)の合計 20 症例を対象とした。各症例の 10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより 10 μm の厚さで 3-6 枚薄切し QIAamp DNA FFPE Tissue Kit56404 (キアゲン)を用い DNA 抽出を行った｡各 DNA サンプルの次世代シーケンスはタカラバイオ株式会社、バイオメディカルセンターに委託、品質検定、ライブラリー作製、シーケンス解析、情報解析 変異塩基候補の検出を行った。シーケンスライブラリーを作製、パネルとして Ion AmpliSeq Cancer Panel を用い 50 種類の癌関連遺伝子の DNA 変異解析を Ion Proton™シーケンサー (ライフテクノロジーズ社)による高速シーケンス解析にて実施しシーケンスデータを得た。

## ４．研究成果

【結果】内視鏡切除を行った群の比較では、除菌後群および HP 陽性群の比較で胃癌発見時年齢: 64.24 歳±9.22 vs 74.1±8.88 (P<0.001)、男女比 40/10 vs 117/34 (P=0.709)、腫瘍径

13.02±7.10 vs 16.53±11.12 (P=0.0019)、部位 U/M/L: 7/22/21 vs 29/63/59 (P=0.706)、形態 IIa/IIc/他: 18/28/0vs 77/59/6 (P=0.040)、深達度 M/SM/SM 以深: 41/9/0 vs 126/25/0 (P=0.813)、組織型分化型/未分化型: 46/4 vs 142/9 (P=0.696)であり、胃癌発見時年齢と腫瘍径、腫瘍形態に有意差を認めた。

表. 除菌後胃癌と *H. pylori* 陽性胃癌の臨床病理学的特徴

| | 除菌後胃癌群 | HP 陽性胃癌群 | *P* 値 |
|---|---|---|---|
| 症例数 | 50 | 151 | - |
| 性別（男性/女性） | 40 / 10 | 117 / 34 | 0.709[a] |
| *H. pylori* 除菌時年齢 | 64.24 ± 9.22 | - | - |
| 胃癌発見時年齢 | 68.45 ± 8.80 | 74.1 ± 8.88 | <0.001[b] |
| 除菌から胃癌発見の期間(月) | 4.90 ± 1.18 | 5.00 ± 1.18 | 0.389[b] |
| 腫瘍部位 | | | |
| U 領域 | 7 (14.0%) | 29 (19.2%) | 0.706[a] |
| M 領域 | 22 (44.0%) | 63 (41.7%) | |
| L 領域 | 21 (42.0%) | 59 (39.1%) | |
| 腫瘍形態（未分化型を除く） | | | |
| 隆起型 | 18 (39.1%) | 77 (54.2%) | 0.040[a] |
| 陥凹型 | 28 (60.9%) | 59 (41.6%) | |
| 他 | 0 | 6 (4.2%) | |
| 組織型 | | | |
| 分化型 | 46 (92.0%) | 142 (94.0%) | 0.696[a] |
| 未分化型 | 4 (8.0%) | 9 (6.0%) | |
| 深達度 | | | |
| M | 41 (82.09) | 126 (83.4%) | 0.813[a] |
| SM | 9 (18.0%) | 25 (16.6%) | |
| SM 以深 | 0 (0%) | 0 (0%) | |
| 腫瘍径（mm） | 13.02±7.10 | 16.53±11.12 | 0.0019[b] |

年齢、腫瘍径：平均± SD　a: カイ二乗検定　b: Student's t-test

除菌後群 18 例、HP 陽性群 19 例での免疫組織学的評価による粘液形質にて胃型/混合型/腸型比は除菌後群；8/4/6, HP 陽性群;4/5/10 であり除菌後群でやや胃型形質が多い傾向にあった(P=0.127)。CDX2 の発現は除菌後群で陽性 8/18、HP 陽性群で陽性 18/19 であり除菌後群にて有意に CDX２非発現例多数であり (P=0.00082)、除菌後胃癌での腸上皮化抑制が示唆された。Ki-67 の labeling index は除菌後群 32.03±22.15、HP 陽性群 79.20±14.87 と有意に除菌後群で値であった（P＜0.001）。これより除菌後胃癌群での細胞増殖能低下が示された。claudin18 発現は除菌後群で 0.73±0.75、HP 陽性群で 0.21±0.38 と除菌後群で有意に高発現であった（P=0.006）。p53, 8-OHdG 発現に有意な差は見られなかった。除菌後群で ISH による Epstein-Barr ウイルスに関連する EBER 発現は認められなかった。

次世代シーケンサー解析では、解析 50 遺伝子中、遺伝子座としてはいずれの群も *APC* chr5, *CSF1R* chr5, *FGFR3* chr4, *FLT3* chr13, *KDR* chr4, *PDGFRA* chr4, *STK11* chr19, *TP53* chr17 において 80%以上の症例に変異を認め、除菌前後、分化度に関わらず同傾向の変異が認められた。

全症例中80%以上の症例で認められた変異 (novel)

*APC, CSF1R, FGFR3, FLT3, KDR, PDGFRA, RET, STK11, TP53*

認められた変異 (Hotspot)

*CTNNB1, HRAS, IDH1, KIT, MET, MH1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, SMARCB1, TP53*

Hotspot 変異は *CTNNB1, HRAS, IDH1, KIT, MET, MH1, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, SMARCB1, TP53* に認められた。

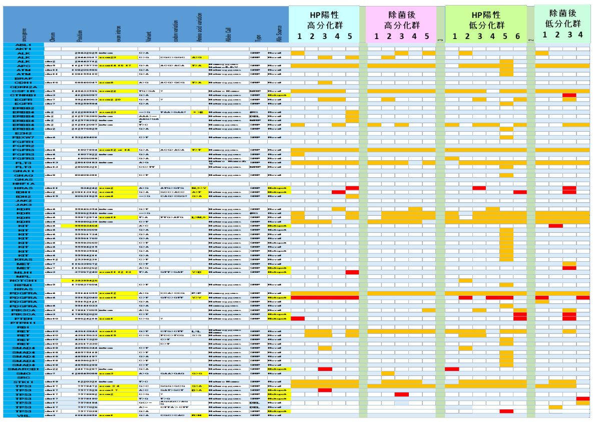


図 1　各症例における遺伝子異常の分布

各群の遺伝子変異数(novel/hotspot)は、除菌前高分化群(17.8/3)、除菌後高分化群(13.6/0.6)、除菌前低分化群(19.5/3)、除菌後低分化群(15/2.5)であり、hotspot 変異は除菌後高分化型群において HP 陽性高分化、HP 陽性低分化群より有意に少数であった(各 P=0.006)。

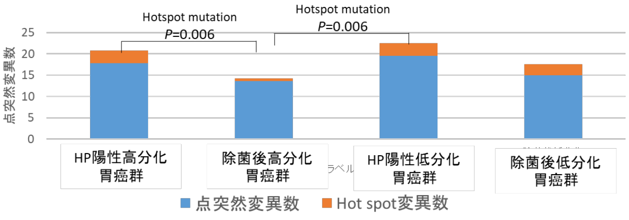


図 2　各群における点突然変位数

*ATM* chr11 中の変異は高分化群で多数例認めるが低分化群では発生比率低下が見られ

た。除菌後低分化群では *RET* chr10, *STK11* chr19 の変異症例が少なく、*KIT, TP53* において他群にない変異また欠失が認められた。*PDGFRA* における exon18 の hotspot 変異は HP 陽性高分化および低分化群、除菌後低分化群で多数例に点突然変異を認めたが、除菌後高分化群のみ全く変異を認めなかった。

【考案】HP 陽性胃癌例に比し除菌後胃癌例において有意に陥凹型が多くみられ、腫瘍径は小さく、Ki-67 発現は低く、胃型形質が多い傾向にあった。除菌後胃癌において EBV 関連胃癌は認めなかった。これより除菌後胃癌では HP 陽性胃癌とは異なる臨床病理学的特徴が見られ、これらの特性に注意した除菌後サーベイランスの重要性が示唆された。除菌前後の高分化、低分化型各胃癌において遺伝子変異は解析内においては概ね同様の傾向が認められた。しかし除菌後高分化型胃癌では、他群より有意に Hotspot 変異が少なく、除菌後高分化胃癌群における発癌機序の genetic な相違が考慮された。また *PDGFRA* 内に除菌後高分化型のみで認めない変異部位の存在、除菌後低分化型胃癌で異なる変異部位の存在など除菌、分化度別で異なる癌遺伝子変異の関与も考慮された。

特に変異が高頻度に認められた *APC, CSF1R,FGFR3, FLT3, HRAS, KDR, PDGFRA, RET, STK11, TP53* の変異は除菌後胃癌リスクを示す genetic なマーカーとなる可能性が示唆された。今後、より多数例の解析により更に絞り込んだ除菌後胃癌標的遺伝子抽出の可能性が示唆された。

【結語】今回の結果より、除菌後胃癌において腫瘍形態、腫瘍径、粘液形質、増殖傾向に HP 陽性胃癌と異なる特徴を認めた。また次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析にて変異数の多い遺伝子部位、また除菌後高分化型胃癌にて特徴的遺伝子変異傾向が認められた。これら除菌後胃癌の特徴を更に追求することが *H. pylori* 除菌後胃癌の早期発見、治療につながる危険因子の同定につながることが示唆された。

## ５．主な発表論文等
**（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）**

〔雑誌論文〕（計 40 件）


1. Kodama M, Okimoto T, Mizukami K, Abe H, Ogawa R, Okamoto K, Shuto M, Matsunari O, Hirashita Y, Sato R, Abe T, Nagai T, Arita T, Murakami K. Endoscopic and Immunohistochemical Characteristics of Gastric Cancer with versus without *Helicobacter pylori* Eradication. Digestion. 査読有、2018;97: 288-297, doi: 10.1159/000485504.
2. Shuto M, Fujioka T, Matsunari O, Okamoto K, Mizukami K, Okimoto T, Kodama M, Takigami S, Seguchi C, Nonaka Y, Sato R, Yamaoka Y, Murakami K. Association between Gastric Cancer Risk and Serum *Helicobacter pylori* Antibody Titers. Gastroenterol Res Pract. 査読有、2017: 1286198. Epub 2017 Jun 11. doi: 10.1155/2017/1286198.
3. Mizukami K, Ogawa R, Okamoto K, Shuto M, Fukuda K, Sonoda A, Matsunari O, Hirashita Y, Okimoto T, Kodama M, Murakami K. Objective Endoscopic Analysis with Linked Color Imaging regarding Gastric Mucosal Atrophy: A Pilot Study. Gastroenterol Res Pract. 査読有、2017: 5054237. Epub 2017 Nov 15. doi: 10.1155/2017/5054237.
4. Hirashita Y, Tsukamoto Y, Yanagihara K, Fumoto S, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Kodama M, Okimoto T, Daa T, Seike M, Iha H, Shirao K, Murakami K, Moriyama M. Reduced phosphorylation of ribosomal protein S6 is associated with sensitivity to MEK inhibition in gastric cancer cells. Cancer Sci. 査読有、107:1919-1928, doi: 10.1111/cas.13094.
5. Okimoto T, Mizukami K, Ogawa R, Okamoto K, Shuto M, Fukuda K, Kodama M, Murakami K. Esomeprazole- or rabeprazole-based triple therapy eradicated *Helicobacter pylori* comparably regardless of clarithromycin susceptibility and CYP2C19 genotypes. J Clin Biochem Nutr. 査読有、2016, 59:149-153. DOI: 10.3164/jcbn.16-18
6. Hashinaga M, Suzuki R, Akada J, Matsumoto T, Kido Y, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Yamaoka Y. Differences in amino acid frequency in CagA and VacA sequences of *Helicobacter pylori* distinguish gastric cancer

from gastric MALT lymphoma. Gut Pathog. 査読有、 2016, 8:54. eCollection 2016. DOI: 10.1186/s13099-016-0137-x

7. Kodama M, Okimoto T, Ogawa R, Mizukami K, Murakami K. Endoscopic atrophic classification before and after *H. pylori* eradication is closely associated with histological atrophy and intestinal metaplasia. Endoscopy International Open. 査読有、3: E311-7, 2015. doi: 10.1055/s-0034- 1392090.
8. Shiota S, Murakami K, Okimoto T, Kodama M, Yamaoka Y. Serum *Helicobacter pylori* CagA antibody titer was a useful marker for advanced inflammation in the stomach in Japan. J Gastroenterol Helatol, 査読有、2014, 29:67-73, doi: 10.1111/jgh.12359.
9. 兒玉雅明、沖本忠義、村上和成. 今月のテーマ: *H. pylori* 感染症-最近の知見と診療の進歩- 胃炎の改善と除菌後胃癌. 日本消化器病学会雑誌、査読有、2015, 112: 1006-1015.
10. 兒玉雅明, 沖本忠義, 小川竜, 岡本和久, 水上一弘, 村上和成. *Helicobacter pylori* IgG 型抗体検出 EIA キットの有用性の検討. 医学と薬学. 査読有、2015, 72: 753-759.

〔学会発表〕（計 105 件）

1. Kodama M, Okimoto T, Abe H, Mizukami K, Ogawa R, Okamoto K, Murakami K. Clinicopathological Features of Gastric Mucosa Prior to *Helicobacter pylori* eradication May Predict Gastric Cancer. World Congress of Gastroenterology (WCOG) ACG, 2017.10.14. Orlando, USA.
2. Mizukami K, Matsunari O, Ogawa R, Okimoto T, Kodama M, Murakami K The availability of Linked Color Imaging, which is a new image-enhanced endoscopy can discriminate the astric mucosal status, especially gastric mucosal atrophic borders. Digestive Disease Week (DDW)2017. 2017.5.6. Chicago, USA.
3. 兒玉雅明、沖本忠義、村上和成. *H. pylori* 除菌前後に発見された低分化型および高分化型各胃癌における次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異の比較. 第104回日本消化器病学会総会. (パネルディスカッション) 2018.4.19. 東京都.
4. 兒玉雅明、岡本和久、村上和成. *H. pylori* 除菌後胃癌の臨床病理学的および分子生物学的特徴の検討.（シンポジウム）第 103 回日本消化器病学会総会. 2017.4.20. 東京.
5. 兒玉雅明、沖本忠義、岡本和久、小川竜、阿部寿徳、水上一弘、相馬渉、安部高志、永井敬之、有田毅、村上和成. *H. pylori* 除菌後発見胃癌における内視鏡的および組織学的萎縮、腸上皮化生の除菌後経時変化の検討. 第 93 回日本消化器内視鏡学会総会. 2017.5.11. 大阪市.
6. 兒玉雅明、沖本忠義、小川竜、岡本和久、水上一弘、首藤充孝、阿部寿徳、相馬渉、安部高志、永井敬之、有田毅、村上和成. *H. pylori* 除菌後胃癌における内視鏡的および組織学的萎縮、腸上皮化生の除菌後経時的変化の検討. 第 23 回日本ヘリコバクター学会学術集会. 2017.7.1 函館市.
7. 兒玉雅明、沖本忠義、村上和成. 次世代シーケンサーを用いた *H. pylori* 除菌後胃癌の網羅的遺伝子解析による除菌後胃癌 危険因子の検討. 第102回日本消化器病学会総会. 2016.4.21.東京都.
8. 兒玉雅明、沖本忠義、村上和成. *H. pylori* 除菌後胃癌における早期癌と進行癌の臨床病理学的差異の検討. 第 91 回日本消化器内視鏡学会総会. 2016.5.13. 東京都.
9. 兒玉雅明、村上和成. *Helicobacter pylori* 感染と胃癌(特別講演)第 92 回日本消化器内視鏡学会総会. 2016.11.5.神戸市.
10. 兒玉雅明、沖本忠義、阿部寿徳、安部高志、小川 竜、岡本和久、水 上一弘、首藤充

孝、相馬　渉、永井敬之、有田　毅、村上和成. *H. pylori* 除菌後発見胃癌における除菌時高リスク因子による除菌後胃癌リスクスコアの策 定. 第22回日本ヘリコバクター学会学術集会. 2016.6.24.別府市.

11. 兒玉雅明、沖本忠義、小川　竜、岡本和久、松成　修、水上一弘、村上和成. *H. pylori* 除菌前後における内視鏡学的胃粘膜萎縮分類と組織学的萎縮・腸上皮化生との相関の変化に関する検討. 第 22 回日本ヘリコバクター学会学術集会. 2016.6.24.別府市.
12. Kodama M, Okimoto T, Abe H, Ogawa R, Okamoto K, Mizukami K, Soma W, Abe T, Nagai T, Arita T, Murakami K. Relationship between endoscopic atrophic classification and histological atrophy and intestinal metaplasia before and after *H. pylori* eradication. APDW 2016; Asian Pacific Digestive Week. 2016. 11.3. Kobe, Japan.
13. Okamoto K, Kodama M, Okimoto T, Ogawa R, Fukuda K, Matsunari O, Mistutaka S, Mizukami K, Murakami K. 17 cases of *Helicobacter pylori* infection negative gastric cancer. World Congress of Gastrointestinal Endoscopy ENDO 2017. 2017.2.16, Hyderabad, India.
14. 兒玉雅明、沖本忠義、小川竜、水上一弘、阿部壽徳、有田毅、村上和成. 内視鏡および組織所見を用いた *H. pylori* 除菌後派遣胃癌高リスク群の検討. 第 11 回日本消化管学会総会学術集会. 2015. 2.13. 東京都.
15. 兒玉雅明, 小川 竜, 村上和成. ピロリ菌除菌後の問題点　*H. pylori* 除菌は胃癌発症を抑制するか *H. pylori* 除菌後経過期間による除菌後胃癌の形態学的および免疫組織学的形質差異の検討.（パネルディスカッション）第 101 回日本消化器病学会総会. 2015.4.23-25. 仙台市.
16. 兒玉雅明、沖本忠義、村上和成. *H. pylori* 除菌後発見胃癌における内視鏡的および免疫組織学的特徴の検討（シンポジウム）. 第 89 回日本消化器内視鏡学会総会. 2015.5.29-31.名古屋市.

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
大分大学医学部・医学系研究科
http://www.med.oita-u.ac.jp/index.html
大分大学医学部消化器内科学講座
http://www.med.oita-u.ac.jp/shoukaki/

６．研究組織
(1)研究代表者
兒玉雅明（KODAMA Masaaki）
大分大学・福祉健康科学部・教授
研究者番号：20332893

(2)研究分担者
村上和成（MURAKAMI Kazunari）
大分大学・医学部・教授
研究者番号： 00239485

沖本忠義（OKIMOTO Tadayoshi）
大分大学・医学部・講師
研究者番号： 90381037

(3)連携研究者
（　　　）
研究者番号：
(4)研究協力者
（　　　）