

15 - 5 発がん機序に基づいた胃がんの予防に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 斉 藤 大 三

研究成果の要旨

MNU 誘発スナネズミ腺胃発がんモデルにおいて、*H. pylori* 感染と協調的に食塩は客量依存性に胃がん発生を促進した。胃切除例の検討から、日本人における *H. pylori* 陰性胃がんの頻度は胃がん全体の 2.0～10.4%と推定された。SAGE ライブラリーの比較から胃がん発現抑制されている遺伝子として *CLDN18* を同定し、この 5'UTR における G/A の SNP の存在による症例対照研究の結果から胃がんの発生リスクに関連する可能性が示唆された。*NEIL1* 遺伝子の変異あるいは発現低下と一部の胃発がん、*STK11* 遺伝子生殖細胞系列変異と胃がん合併の Peutz-Jeghers 症候群発症との関連性が見出された。内視鏡的粘膜切除術後の多発性胃がん例における背景粘膜のメチル化解析において、*p41Arc*、*p16* におけるメチル化の亢進が認められた。腹腔洗浄水沈渣から同定した 10 遺伝子によるミニチップアッセイにて複数の遺伝子が陽性となった場合、予後は不良でまた腹腔洗浄水沈渣から免疫染色陽性がん細胞を確認できることを見出した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
斉 藤 大 三	国立がんセンター中央病院 部長	異時性多発胃癌の遺伝子異常に関する研究
松 倉 則 夫	日本医科大学 助教授	残胃における発がん機序の解明と予防
溝 下 勤	愛知県がんセンター研究所 研究員	食塩による発がん促進機構の解析と胃がん予防への基礎的研究
安 井 弥	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授	遺伝子多型・遺伝子発現異常からみた胃発がんに関する研究
新 村 和 也	浜松医科大学医学部附属病院 医員	遺伝子多型と胃発がんリスクに関する研究
坂 本 裕 美	国立がんセンター研究所 室長	胃がんの再発予測と予防に関する研究

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、ヒト胃がんおよび動物モデルを用いて、胃がんの発生・進展に関する各リスクファクターを遺伝子、細胞、組織レベルの多面から検討し、その結果を踏まえて有効な胃がんの予防対策を追求することにある。今年度は 1) *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) に関する検討：a) 感染および食塩摂取と胃発がんとの関連、

b) *H. pylori* 陰性胃がんの頻度、2) 遺伝子発現異常・遺伝子多型と胃発がんとの関連、3) 胃がん多発患者の背景粘膜におけるメチル化解析、および 4) 腹腔内洗浄液の遺伝子解析による胃がん再発予測、について検討した。

2 研究成績

1) *H. pylori* 感染に関する検討

a) *H. pylori* 感染および食塩摂取と胃発がんとの関連

胃がん発生に *H. pylori* が重要な役割を担っていること、また食生活や喫煙といったさまざまな生活様式も胃発がんになんらかの影響を及ぼしていることが知られているが、なかでも高濃度の食塩摂取が胃発がん重要な役割を果たしていることが報告されている。動物実験においては、食塩が *H. pylori* 感染の有無に関わらず、N-methyl-N-nitrosourea(MNU) や N-methyl-N-nitrosoguanidine(MNNG)誘発胃がんを促進するとするラットでの報告や、また MNU 誘発スナネズミ腺胃発がんモデルでは、高濃度食塩投与が腺胃発がん促進的に働くことがすでに知られている。これらの研究結果を踏まえ、MNU 誘発スナネズミ腺胃発がんモデルを用いて、*H. pylori* 感染と低濃度～高濃度の食塩が腺胃発がんに及ぼす影響を検討した。7 週令の雄スナネズミ 448 匹を大きく 4 群(MNU + *H. pylori* + NaCl 投与群, MNU + NaCl 投与群, *H. pylori* + NaCl 投与群, NaCl 投与群)に分け、それぞれの群においてさらに NaCl 濃度(2.5%、5%、10%、飽和食塩水、コントロール)を振り分け計 20 群にて実験を行い、実験開始 50 週にて屠殺した。MNU は 20 ppm を間欠投与し、*H. pylori* は標準株 ATCC 435043 株を強制胃内投与した。スナネズミ腺胃癌の組織型は、ヒト胃癌の病理組織分類に、胃炎はヒトの Up-date Sydney system に準じて評価した。その結果、MNU + *H. pylori* + NaCl 投与群においては、食塩摂取量の 0%、2.5%、5%、10%の増量に伴い腺胃発がん率はそれぞれ 15%(6/40)、33%(8/24)、36%(9/25)、63%(19/30)と上昇した。しかし、飽和食塩水(濃度 29%)の間欠投与による胃発がん率の上昇は認められなかった。また、*H. pylori* 非感染群における食塩摂取量による発がん率の変化はなかった。なお、MNU 非投与の検討において、*H. pylori* + NaCl 投与群では食塩摂取により異所性増殖性腺管(HPGs)が有意に増加した($P < 0.05$)が、NaCl 単独投与群では食塩摂取による炎症所見はほとんど認められなかった。以上の結果より、持続的な食塩投与が容量依存的に胃がん発生を促進し、そのプロモーション作用は *H. pylori* 感染胃粘膜で顕著となることが確認された。

b) *H. pylori* 陰性胃がんの頻度

H. pylori 感染が高頻度であるにも関わらず胃がん発生頻度が低い地域があること(African enigma, Asian paradox)、*H. pylori* 陰性の胃がんの存在など、*H. pylori* と胃がんとの関連にはまだ解明すべき点が多い。そこで、*H. pylori* の既感染を除外した厳密な意味での *H. pylori* 陰性胃がんの頻度について検討した。*H. pylori* 陰性胃がんを検討する場合には、以前 *H. pylori* に感染してい

たが胃粘膜の高度萎縮や腸上皮化生により *H. pylori* が排除された胃がん症例を除外する必要がある。検討に際しては、*H. pylori* の感染の有無は *H. pylori* 血清抗体価で、胃粘膜萎縮の程度は血清 pepsinogen(PG)値で判定した。外科的に切除された胃がん 782 例中、*H. pylori* 陽性は 669 例、陰性は 113 例(14%)であった。胃がんを萎縮の程度別に分けると、高度萎縮(PG I 50 かつ PG I/比 2.0)をとまなう *H. pylori* 陰性胃がんは 31 例、中等度萎縮(PG I 50<~ 70 かつ PG I/II 比 2.0<~ 3.0)をとまなう *H. pylori* 陰性胃がんは 48 例、萎縮をとまなわない(PG I>70 かつ PG I/比>3.0) *H. pylori* 陰性胃がんは 16 例であった。すなわち、*H. pylori* 抗体価陰性かつ萎縮をとまなわない真の *H. pylori* 陰性胃がんは 16 例、一方萎縮のために *H. pylori* が陰性化したと考えられる 31 例をのぞいた *H. pylori* 陰性胃がんは 81 例であり、結論として、日本人における *H. pylori* 陰性胃がんの頻度は胃がん全体の 2.0%(16/786)から 10.4%(81/786)の間であると推定された。なお、厳密な意味での *H. pylori* 陰性胃がん 16 例の諸性状は、男性 69%、未分化がん 75%、進行がん 60%、胃体部から噴門部に多く、血中ガスリン値は低く、年齢は *H. pylori* 陽性胃がんと変わらなかった。

2) 遺伝子発現異常・遺伝子多型と胃発がんとの関連

胃がんの発生を減少させるには、環境要因を明らかにするとともに、環境要因に対する個々人の胃発がんリスクの遺伝的な相違を明らかにしそのリスクに応じた対策を講ずることが大切である。日本人の胃発がん感受性に関与する遺伝子および遺伝子多型を明らかにし、これらを利用した胃がんのリスク診断は胃がんの予防法の確立にもつながると考えられる。

a) 遺伝子発現解析からみた胃がんの発生・進展

① 発現が抑制されている新規遺伝子の探索

これまでに組織型や進行度の異なる 5 種類の胃癌組織の SAGE(serial analysis of gene expression)ライブラリー(GEO accession no. GSE545)を完成し、胃癌の発生・進展に関与する多くの遺伝子を同定してきた。本年度は、胃癌の新しいがん抑制遺伝子を抽出する目的で、個々の胃がんと NCBI のデータベース中の正常胃粘膜 SAGE ライブラリーを比較した結果、胃がんにおいて発現が低下あるいは消失している遺伝子として *arrestin-beta 2*、*peroxiredoxin 5*、*chemokine-like factor superfamily 6*、*18 kDa antrum mucosa protein* などがリストアップされた。これらについて、胃がん細胞 8 株・大腸がん細胞 8 株を材料とし RT-PCR 法にて発現の消失している遺伝子を探る

た結果、*Claudin-18*(*CLDN18*)遺伝子は MKN-45、MKN-74、KATO-III において明瞭な発現が認められるのみで、その他の 13 細胞株では発現が消失していることが明かとなった。なお、Claudin は、Tight junction strand の主要な構成蛋白質で、現在まで CLDN1 から CLDN24 までのファミリーメンバーが知られているが、*CLDN18* 遺伝子は転写因子 TTF1 の標的遺伝子として同定されたものである。胃がん症例における *CLDN18* の発現を定量的 RT-PCR 法にて検討すると、23 例中 15 例 (65%) に発現の抑制が認められた。また、胃がん症例 (154 例) と健常対照症例 (304 例) におけるジェノタイプ解析をでは、A/G および G/G 型が胃がん症例で有意に高頻度であり ($P=0.00005$)、Odds ratio は 5.17 (2.01-13.3) であった。

胃がんにて特異的な発現態度を示す遺伝子の抽出法の検討も必要である。そこで、スキルス胃がん (S219T) と正常胃粘膜の同一サンプルについて、SAGE 法およびマイクロアレイ (Affimetrix 社、GeneChip) による遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、両方法で共通してがんにおいて発現が亢進していたのは TFF3 のみで、一方、発現が抑制されていた遺伝子のトップ 20 中 40% が共通して同定された。なお、unigene number によると、両方法をあわせて約 44000 種の mRNA の発現解析が可能であるが、その内 54% は両法で解析可能であり、34% は SAGE のみで、12% は GeneChip のみで解析し得ることから、SAGE 法は新たな特異的な発現遺伝子を同定する有力な手段であることも検証し得た。

Ⅲ) SAGE に基づいたオリゴ DNA カスタムアレイによる発現解析の診断への応用

SAGE で抽出した特異的な発現態度を示す 164 遺伝子、既にがんとの関連が明らかとなっている 120 遺伝子 (*CDH1*、*VEGF*、*MMP1* 等) および他のグループが抽出した悪性度あるいは薬剤感受性に関連している 110 遺伝子 (*TGFB3*、*CTGF*、*KRT6B*、*ABP1*、*YAMP2* 等) の計 395 遺伝子を搭載したカスタムアレイを作成し、実際の診断への応用を試みた。20 例の胃がん組織について遺伝子発現を解析した結果、GeneSpring の 1-way ANOVA により T grade、N grade、Histology などを判別する有意な遺伝子群を抽出し得た。今後、薬剤感受性との関連も解析し、その成果に基づいて、マーカー遺伝子を絞り込み、診断用ミニアレイを作成する計画である。

Ⅳ) 遺伝子多型と胃がんの発生・進展

Ⅰ) 塩基除去修復酵素遺伝子 *NEIL1* の胃がんへの関与
75 例の原発性胃がんおよび胃がん細胞株における *NEIL1* 遺伝子異常を検索した結果、3 例の変異

[c.82_84delGAG(p.Glu28del)、c.1000A>G(p.Arg334Gly)、c.936G>A] および 2 種類の遺伝子多型が認められた。そこで、各 variant 型の組換え蛋白質を発現精製し、酸化的損傷塩基チミングリコールを含む二本鎖オリゴヌクレオチド基質に対する切断活性を比較検討すると、p.Glu28del 型で著明な切断活性の低下が認められ低修復能が示唆された。また、c.936G>A 変異を有する細胞株においては、異常 mRNA 転写産物が検出され、これは *in vivo* スプライシングアッセイにより c.936A による異常スプライシングが原因であることが示された。また、この異常スプライシングに基づく truncated 型 NEIL1 蛋白質は、細胞内において核への局在を示さないことから、染色体 DNA に存在する酸化的損傷塩基に対する修復が不十分であることが推測された。さらに、定量的 PCR により *NEIL1* 遺伝子の胃がんにおける mRNA 発現を検討すると、6/13 症例 (46%) で胃がん部での発現低下が認められた。以上のことより、*NEIL1* 遺伝子の変異あるいは発現低下による活性低下が一部の胃がんに関与することが示唆された。

Ⅱ) *CDH1* 遺伝子多型と胃がんとの関連

Diffuse 型胃がんの原因遺伝子である *CDH1* の -160C>A 多型は胃がんリスクと関係があるという報告があるが、また逆に C 型の方が関連するという報告もあり一定しない。そこで、30 例の日本人非がん者検体を用い、11 個の *CDH1* 多型の遺伝子型を決定し、EM (Expectation-Maximization) アルゴリズムを用いて頻度の高いハプロタイプ 7 種類を推定した。その ht (haplotype tagging) 多型 5 種類の遺伝子型を決定することにより、現在、胃がん罹患者および非がん者間での症例対照研究を進めている。

Ⅲ) *STK11* 遺伝子生殖細胞系列変異と胃がんとの関連

Peutz-Jeghers 症候群 (PJS) 患者では胃がんのリスクが高いことが報告されているが、これまでに同定されている *STK11* 遺伝子の生殖細胞系列変異と胃がんリスクとの関連は不明である。今回、胃がんを合併した PJS である同胞 (姉妹) の遺伝子検索において、*CDH1*、*TP53* 遺伝子には pathogenic な異常は認められなかったが、*STK11* 遺伝子において c.890delG 生殖細胞系列変異を同定した。この変異は、STK11 蛋白質のキナーゼドメインやリン酸化部位の一部を欠く truncated 型蛋白質 (p.Arg297fsX38) 産生に繋がる。一方、がん部における野性型アレルの体細胞変異、染色体欠失、また 5' -CpG サイトの過メチル化による失活は認められなかった。以上より、*STK11* 遺伝子生殖細胞系列変異と、胃がん合併の

PJS 発症との関連性が示唆された。

3) 胃癌多発患者背の景粘膜におけるメチル化解析

早期胃がんに対する内視鏡的粘膜切除術(EMR, ESD)の普及に伴いその後の異時性多発がんが重要な課題となってきたが、異時性多発の分子機構として背景粘膜にすでに突然変異およびエピジェネティックな異常が蓄積していること、またエピジェネティックな変化の中では DNA メチル化異常が胃がんに関与することが知られている。そこで、この胃多発がん症例の背景粘膜に蓄積した DNA メチル化異常を定量することにより、胃がん発症のリスクを予測し得るか否かを検討した。

早期胃がん多発患者(同時性、異時性を問わない)で EMR・ESD が施行され治癒切除の判定が得られた 8 例と健常者 40 例を対象とし、上部消化管内視鏡検査において胃前庭部小弯、胃体下部小弯、胃体上部小弯からの計 3 個の生検材料を得た。DNA 抽出にはフェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿法を、特定領域の DNA メチル化の解析方法には Bisulfite 処理による方法を用いた。今回の検討では *p16*, *HRASLS*, *p41arc*, *FNLC*, *TM*, *LOX*, *HAND1A* を評価の遺伝子領域としたが、胃がん群と健常群での体上部からの検体におけるメチル化インデックスの中央値は *p41Arc*, *p16* それぞれ 0.023/0.002($p=0.11$)、0.114/0.114($p=0.22$)となり、多発胃癌患者の背景粘膜においては健常群と比較してこの二つの遺伝子におけるメチル化の亢進傾向が認められた。この結果を踏まえて、平成 17 年 1 月に国立がんセンター倫理委員会にて承認を得た。早期胃癌単発群(100 例)、早期胃癌多発群(50 例)および健常者(100 例)を対象とした「多発胃がん患者の非癌粘膜におけるメチル化解析」の研究が進められている。

4) 腹腔内洗浄液の遺伝子解析による胃がん再発予測

胃がん治療において外科的手術はその中心的役割を担っており現在も唯一の根治的療法となっている。しかし、進行胃がんの再発形式の 8 割が腹膜播種であり、この克服の一つの手段として、腹腔内洗浄細胞診の感受性を向上かつ均一化したうえでの補助的治療法がある。この目的において細胞診より感度の高い腹腔内洗浄水中の遺伝子解析による胃がん再発の予測を検討した。

a) マーカー・遺伝子の同定

昨年までに、9 遺伝子(*TFF1*, *TFF2*, *MUC2*, *FABP1*, *CK20*, *MASPIN*, *GW112*, *TACSTD1*, *PRSS4*)を腹腔内洗浄水検体に含まれる微量な胃癌細胞のマーカー遺伝子として同定した。このうち nested PCR による定性的な解析が可能な 5 遺伝子に関しては、切除胃癌 108 例での RT-PCR による発現解析から、これら遺伝子発現の腹腔内洗浄水中におけ

る検出が胃癌再発に対する特異性が高いことを確認した。

b) 高感度診断システムの構築

洗浄水サンプルに対し複数の遺伝子の発現を指標に、予後を正確に予測するシステムを構築することを目的とした。これには 10 以上ある複数マーカー遺伝子での multiplex PCR を導入することになるが、キャピラリー電気泳動など精密なシステムを用いても電気泳動だけでは非常に評価が困難であった(十分なバンドの描出には比較的高い PCR サイクルが必要であり、Multiplex-RT-PCR では高サイクルでの非特異的バンドを抑制することが困難であるため)。このため、比較的低サイクルで PCR を行い生成物をカスタムアレイにハイブリダイズすることにより、生成物の評価を行う方法を採用した。カスタムアレイは 50-60mer のオリゴプローブを各マーカー遺伝子の PCR 増幅領域に設計し作製した。Multiplex-PCR によってアミノアリル dUTP 標識、増幅した cDNA と Cy3 色素をカップリングして、このカスタムアレイにハイブリダイズし PCR 産物を定量評価する。測定された信号値はカップリング効率、ハイブリダイゼーション効率による影響を軽減するために ACTB の信号値によって補正し、ACTB 比で評価した。この方法では一つの腹腔内洗浄水検体への解析において、9 種の新規同定マーカーに CEA を加えた 10 種のマーカーにおける測定結果から再発危険度評価を行うことになる。10 種の測定値を一つのベクトル値として捉え線形判別式など数理的な方法を通じて評価を行うことも試みたが、論理的にはすべてのマーカーにおいて再発危険度に対して正の相関が推定されることから、各々のマーカーに関してその測定値(ACTB 比)にカットオフ値を設定し 10 種のマーカーのうち何種類が検出されるかを再発危険度予測のためのパラメーターと捉えることにした。

このアッセイ法にて再発危険度を検証した結果、2 種以上のマーカーが陽性となった症例のすべてにおいて転移が認められ(19/19、陽性的中率 100%)、また細胞診陰性でも RT-PCR 陽性の症例は細胞診陽性症例とほぼ同じ予後を示した。なお、興味深いことに、腹腔内洗浄水の RT-PCR で陽性となった症例に腹膜外再発症例が複数含まれていた。今後、2005 年 3 月までに約 500 症例の集積を完了し、その検索を予定している。

3 倫理面への配慮

臨床研究は、患者よりインフォームド・コンセントを得た後に各機関の倫理委員会の基準に従い遂行した。特にヒト由来試料を遺伝子解析に用いる場合は「ヒトゲノ

ム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、また動物実験の場合においては各機関の「実験動物委員会の定める規則」に従い遂行した。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Rie Yamasaki, Daizo Saito, et al., Immune response in *Helicobacter pylori*-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) lymphoma. *Journal of Medical Microbiology*, 53:21-29, 2004.
2. Ichiro Oda, Daizo Saito, et al., Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: Technical feasibility, operation time and complications from a large consecutive series. *Digestive Endoscopy*, 17:54-58, 2005.
3. Matsuhisa T. Matsukura N., Topography of chronic active gastritis in *Helicobacter pylori* positive Asian populations: Age-, gender- and endoscopic diagnosis- matched study. *J Gastroenterol*, 39:324-328, 2004.
4. Lee Y, Matsukura N. Inflammation of the gastric remnant after gastrectomy: mucosal erythema is associated with bile reflux and inflammatory cellular infiltration is associated with *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol*, 39:520-526, 2004.
5. Cao, X., Mizoshita, T., et al., Beta-catenin gene alteration in glandular stomach adenocarcinomas in N-methyl-N-nitrosourea-treated and *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci*, 95:487-90, 2004.
6. Cao, X., Mizoshita, T., et al., Eradication of *Helicobacter pylori* induces apoptosis and inhibits proliferation of heterotopic proliferative glands in infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci*, 95:872-7, 2004.
7. Matsumura S, Yasui W, et al., A single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter is correlated with histological differentiation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130:259-265, 2004.
8. Oue N, Yasui W, et al., Gene expression profile

of gastric carcinoma: Identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res*, 64:2397-2405 2004.

9. Yasui W, et al., Search for new biomarkers of gastric cancer through serial analysis of gene expression and its clinical implication. *Cancer Sci*, 95:385-392, 2004.
10. Matsumura S, Yasui W, et al., A single nucleotide polymorphism of the MMP9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131:19-25, 2005.
11. Tao H, Shinmura K et al., A novel splice-site variant of the base excision repair gene *MYH* is associated with production of an aberrant mRNA transcript encoding a truncated MYH protein not localized in the nucleus. *Carcinogenesis*, 25:1859-1866, 2004.
12. Shinmura K et al., Inactivating mutations of the human base excision repair gene *NEIL1* in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 25:2311-2317, 2004.
13. Shinmura K et al., A novel *STK11* germline mutation in two siblings with Peutz-Jeghers syndrome complicated by primary gastric cancer *Clinical Genetics*, 67:81-86, 2005.
14. Narikiyo, M., Sakamoto, H., et al., Frequent and preferential infection of *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus anginosus* in esophageal cancers. *Cancer Sci*, 95:569-574, 2004.
15. Kuwahara, Y., Sakamoto, H., et al., Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, 41:152-132, 2004.

日本語論文

1. 斉藤大三、胃癌のリスクファクター、微生物、臨床消化器内科、19:371-373, 2004.
2. 斉藤大三、*H. pylori* 発癌の intervention study: *H. pylori* 発癌のエビデンス、菅野健太郎、榊信廣(編) 医学書院、東京、2004.
3. 松倉則夫、*H. pylori* 感染率の減少により疾病構造は変化するのか? 肝胆道系疾患(脂肪肝、胆石、肝硬変など) *Helicobacter Res*, 8:505-507, 2004.