

## 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

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。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。残胃粘膜において IL-8、Cox-2 発現は胆汁逆流および *H. pylori* 感染の両者で誘導され、除菌により有意に減少した。早期胃がん EMR 後の異時性多発癌の頻度は 8.5%で、これらの背景粘膜のメチル化解析において *p41Arc*、*p16* におけるメチル化亢進可能性が示唆された。5 種類の胃がん組織の SAGE ライブラリーを用いて、胃がんの発生・進展に関する種々の特異的発現遺伝子および発現が抑制されている *CLDN18* を同定した。また、*NEIL1* 遺伝子の変異あるいは発現低下による活性低下や *HER2/c-erb2* の SNP などが胃がんの発生・進展に関わる可能性も示唆した。胃がん患者腹腔内洗浄液から得た 10 種類のマーカー遺伝子によるミニチップアッセイの再発予測に対する有用性を確認した。

### 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     | 細菌感染治療による胃がん予防に関する研究(H15)<br>異時性多発胃癌の遺伝子異常に関する研究(H16) |
| 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

胃がんによる死亡率の減少は世界的な現象である。西欧に比し遅れたものの、本邦においてもこの傾向は著しいが、男女を問わずいまだ胃がんは本邦のがん死亡の高位(男性 2 位、女性 1 位)にある。これまでの諸家の研究から宿主側、環境的あるいは微生物側の種々の胃がんの

リスクファクターが挙げられ、またその機序も解明・推測されつつあるが、胃がん予防の観点において具体的な対策は講じられていないのが現状である。本研究は、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整理かつ比較検討し、分子機序に基づいた予防対策を追求することを目的とする。

## 2 研究成績

## 1) 細菌感染と胃発がんとの関連

a) *Streptococcus anginosus* (*S. anginosus*)

通性嫌気性、グラム陽性菌である *S. anginosus* は、PCR 法においては組織中の感染頻度は食道がん約 70~90%、胃がん約 20~40%、また食道がん症例の唾液中にも本菌が見い出されるとされている。しかし、早期胃がん患者 9 例(M:F=7:2, 年齢 55-85 歳、深達度 m : sm=5 : 4, 占居初位 U : M : L = 2 : 5 : 2, 肉眼型平坦・陥凹 : 隆起 = 6 : 3)においては、その唾液中の本菌量は極めて少なく有効な成績は得られなかった。

b) *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)) *H. pylori* 陰性胃がん

*H. pylori* 感染が胃癌発生とリンクしているとする報告は多いが、*H. pylori* 陰性胃がんの頻度に関するデータは少ない。胃がん切除例で血清 pepsinogen(PG)と *H. pylori* 抗体価を測定した 782 例中、*H. pylori* 陰性は 113 例(14%)、また *H. pylori* 陰性胃がん中萎縮を全くみとめないもの(PG I>70( $\mu\text{g/l}$ )かつ PG I/ 比>3.0)は 16 例(15%)と全体の 2.0%であった。一方、*H. pylori* 陰性胃がんのなかで高度萎縮(PG I $\leq$ 30 かつ PG I/ 比 $\leq$ 2.0)を伴い、萎縮のために *H. pylori* が陰性化したと考えられる 31 例(全体の 4.3%)を除いた *H. pylori* 陰性胃がんは 81 例あり全体の 10.4%を占めた。つまり、日本人における *H. pylori* 陰性胃がん頻度は胃がん全体の 2.0%から 10.4%の間と推定された。

## ) 食塩による発がん促進

N-methyl-N-nitrosourea(MNU)誘発 *H. pylori* 感染スナネズミ腺胃発がんモデル(7 週令の雄スナネズミ、448 匹)において低濃度(2.5%)~高濃度(10%)の食塩が腺胃発がんおよび影響を検討した結果、MNU+*H. pylori*+NaCl 投与群においては食塩摂取量の増加に伴い腺胃発がん率は上昇した( $P<0.01$ )。また、食塩の胃炎に対する濃度依存性の影響に関しては、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が、*H. pylori* + NaCl 投与群では食塩摂取量により異所性増殖性腺管が有意に増加した( $P<0.05$ )。以上のことから、スナネズミ腺胃発がんモデルにおいて、持続的な食塩投与は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。

## ) 残胃がん

残胃のがんは残胃炎を発生母地として発生するが、内視鏡的に観察される発赤、びらん等は胆汁逆流と関連し、炎症細胞浸潤を示す組織学的な残胃炎は *H. pylori* 感染

と関連する。112 例の残胃(BI 法 77 ; 男 50、女 27、BI 法 27 ; 男 21、女 6)の吻合部、胃体上部大弯から生検組織を採取し、IL-8 およびそれらが誘導する COX-2、粘膜防御因子としての Trefoil Factor Family(TFF) 1 の残胃粘膜中 mRNA 発現量を解析した結果、吻合部では *H. pylori* の有無にかかわらず IL-8、COX-2 とともに高値を示し、体上部では *H. pylori* 陽性例が陰性例に比し有意に高い値を示した( $p<0.05$ )。また除菌治療により IL-8、COX-2 の発現も有意に減少した。IL-8 の発現には胆汁逆流と *H. pylori* 感染の両者が関与し、また除菌治療は IL-8、COX-2 の発現も激減させることから、胆汁逆流を防ぐ術式の工夫に加え、*H. pylori* 除菌治療が残胃炎の予防に有効で残胃のがん発生予防につながる可能性が示唆された。

## 2) 早期胃がん EMR 例における異時性多発がん

早期胃癌に対する内視鏡的粘膜切除術(EMR・ESD)は良好な QOL から広く普及してきているが、局所切除術のため切除後の残胃粘膜からの異時性癌発生のリスクも高い。国立がんセンター中央病院にて EMR・ESD を受け治療切除と判定された 633 例のうち「初回治療から 1 年後以降に発見されたがん」を異時性多発癌と定義すると、その頻度は 8.5%(54 例)であり、また異時性癌の発見までの期間の中央値は 2.7 年(1-8.7 年)、年次別の発生率は平均 2.6%(2.3-2.8%)であった。

異時性多発がんの分子機構として、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が知られているが、エピジェネティックな変化として背景粘膜の DNA メチル化異常を検討すると、今回評価した *p16*, *HRASLS*, *p41arc*, *FNLC*, *TM*, *LOX*, *HAND1A* のうち *p41Arc*, *p16* において多発胃癌患者の背景粘膜では健常群に比し、メチル化亢進の傾向が認められた。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。

## 3) 包括的遺伝子発現解析からみた胃がんの発生・進展

SAGE(serial analysis of gene expression)法によって、組織型や進行度の異なる 5 種類の胃がん組織の SAGE ライブラリー(GEO accession no. GSE545)を完成し、がんの発生・進展に関与する種々の遺伝子を同定した。*COL1A1*, *CDH17*, *APOC1*, *COL1A2*, *YF13H12*, *CEACAM6*, *APOE*, *REGIV*, *FUS* などが胃がんを高頻度に過剰発現し、特に *CDH17*, *APOE*, *COL1A1*, *COL1A2*, *FUS* などは浸潤・転移と関連した発現態度を示すこと、*REGIV* の細胞外への分

泌、浸潤能の促進、アポトーシスの抑制が明らかとなった。一方、SAGE ライブラリーの比較から胃がんで発現が抑制されている *Claudin-18(CLDN18)* 遺伝子を同定し、また胃がん 23 例中 15 例(65%)に発現の抑制が認められた。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。

さらに、臨床診断への応用を目指した SAGE で抽出した 164 の特異遺伝子、既知のがん関連遺伝子、悪性度や薬剤感受性のマーカー遺伝子を含む 395 遺伝子を搭載したアレイを用いた検討において、20 例の胃がん組織の解析から、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。

#### 4) 遺伝子多型と胃がんの発生・進展

胃がん症例において、HER2/c-erbB2 の膜貫通ドメインの SNP(655G: Ile/Val)は深達度、リンパ節転移、ステージ、MMP-1 のプロモーター領域(-1607)の SNP(1G/2G)は組織型、MMP-9 の-1562 の SNP(C/T)は深達度とステージとの間に有意な関連が認められた。また、前述の *Claudin-18* 遺伝子の 5'UTR に G/A の SNP が存在することを新規に見出し、胃がん症例(154 例)と健常対照症例(304 例)のジェノタイプ解析では A/G および G/G 型が胃がん症例で有意に高頻度、OR5.17(95%CI: 2.01-13.3)であった。

酸化的損傷塩基の修復に関わる DNA 修復酵素遺伝子に関しては、*MYH* では新規スプライス部位 variant IVS10-2A>G を同定し、低修復を示す truncated 型蛋白質の産生につながることを明らかにした。胃がん症例対照研究では、IVS10-2G/G 遺伝子型を有する胃がん患者が 1 名認められ、日本人集団においては本 variant により DNA 修復活性が低いヒトが存在することが示唆された。75 例の原発性胃がんおよび胃がん細胞株における *NEIL1* 遺伝子異常の検索においては、3 例の変異および 2 種類の遺伝子多型を同定した。このうち、p.Glu28del 型変異および c.936G>A 変異は、低修復能を示すことを機能解析により明らかにした。また、定量的 PCR により胃がん部での mRNA レベルでの発現低下が 6/13 症例(46%)で示され、*NEIL1* 遺伝子ではその変異あるいは発現低下による活性低下が一部の胃発がんに関与することが示唆された。

#### 5) 腹腔内洗浄瘻の遺伝子解析による胃がん再発の予測

進行胃がんの再発形式の 8 割が腹膜播種であり、腹腔内洗浄細胞診を胃がんの予後因子として活用するためには、現行の細胞診の感受性を向上し、均一化する必要が

ある。

#### a) マーカー・遺伝子の同定作業

8 例の早期胃がん手術症例において得られた洗浄水サンプルおよび 12 種の胃がん培養細胞株に対する Affimetrix 社のマイクロアレイ(12,625 遺伝子および 22,284 遺伝子)による発現解析にて、早期胃がん症例の洗浄水では発現を認めず、かつ胃がん細胞株では少なくとも 1 株以上が著明に高発現なものとして約 80 種の候補遺伝子を得た。さらに、早期胃がん症例 8 検体、細胞診陽性 8 検体における RT-PCR で評価し、最終的に 9 遺伝子(*TFF1*, *TFF2*, *MUC2*, *FABP1*, *CK20*, *MASPIN*, *GW112*, *TACSTD1*, *PRSS4*)を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 例において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

カスタムアレイは 50-60mer のオリゴプローブを 10 遺伝子の PCR 増幅領域に設計した。Multiplex-PCR によってアミノアリル dUTP 標識、増幅した cDNA に 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 ACTB(ベータアクチン)の信号値によって補正し、ACTB 比で評価する。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が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する。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。細胞診では検出できない程微量な腫瘍細胞を検出し得る本法は、予防的化学療法による治療成績の向上に寄与するものと考えられた。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。