

胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発

研究分担者 塚本 徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染とそれに伴って誘発される慢性炎症は、様々な遺伝子異常や発現異常を誘発する。本研究では、ヒト胃癌症例より組織アレイを作製し、胃発がん過程における γ -H2AX などの種々の DNA 損傷マーカーの有用性を検討した。術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy, NAC)を施行していない症例 79 例、NAC を施行した症例 52 例において、胃がんの胃型・腸型形質発現、NAC の有無との相関を検討した。その結果、一部で γ -H2AX を高発現する胃がん症例があったが、ATM、Mre11、NBS1 に関しては有意な相関は見られなかった。発がん初期の遺伝子異常に対する反応とがんの進展時の発現が同じ機構なのか、異なる機構なのかを見極め、発がん初期応答の解明が、腫瘍進展への指標となり得るか、さらに検討が必要と考えた。

A . 研究目的

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は胃発がんの重要なリスクファクターである。活性酸素による DNA 損傷、胃上皮細胞における Activation induced cytidine deaminase (AID) の異所性発現、遺伝子のメチル化等による発現異常等が重要な因子であるが、胃発がん初期過程における遺伝子変異、遺伝子発現異常、さらにはそれに伴う形態変化は十分明らかにされていない。

H. pylori 感染による炎症に伴って発生する活性酸素による DNA 損傷によって、Ser139 がリン酸化されたヒストン H2AX (γ -H2AX) がフォーカスを形成するが、発がん初期応答から発がんに至る過程における γ -H2AX の役割は十分解明されていない。本研究ではヒト胃癌を用いて γ -H2AX の発現を検討した。

B . 研究方法

ヒト胃癌において、術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy, NAC)の有無、胃型・腸型形質発現と γ -H2AX の発現を検討した。胃癌ブロックより直径 8mm のパンチ生検用器具を用いがん部分を採取し、合計 18 個の 5x2 組織アレイを作製した。それらを用いて、遺伝子損傷および修復のマーカーとして、 γ -H2AX、activation-induced cytidine deaminase (AID)、p53、ATM (ataxia telangiectasia mutated)、Mre11 (meiotic recombination 11)、NBS1 (Nijmegen breakage syndrome)、胃型腸型マーカーとして、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、CDX2 の発現を検討した。MUC5AC あるいは MUC6 陽性の腫瘍を胃型、MUC2 あるいは CD10 陽性のものを腸型、胃型(G)および腸型(I)マーカーのいずれも

が陽性のものを胃腸混合型(GI)、いずれのマーカーも陰性のものをヌル型(N)と判定した。 γ -H2AX に関しては、Allred scoring system により Proportion score (PS) : 0 (陰性) 1 ($\leq 1\%$) 2 (1-10%) 3 (11-33%) 4 (34-66%) 5 (67-100%陽性); Intensity score (IS) : 0 (陰性) 1 (弱陽性) 2 (中等度陽性) 3 (強陽性) にスコアリングし、PS と IS の積 > 5 を陽性とし、統計学的に解析した。他のマーカーは 0~3 の 4 段階にスコアリングした。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、藤田保健衛生大学医学部倫理審査委員会の承認を得、インフォームド・コンセントの得られた検体を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

C . 研究結果

組織アレイを作製したヒト胃癌のうち、140 例の進行胃癌を対象とした。そのうち NAC を施行していない症例が 79 例、NAC をした症例が 52 例であった。残りは未確認のため除外した。NAC なし症例の γ -H2AX 陽性/陰性例比は、G 3/8, GI 1/22, I 3/27, GI 3/27, N 2/13、NAC あり症例では、G 3/10, GI 0/18, I 4/12, N 1/4 と、胃型腸型形質と明らかな相関性が確認できなかった。また、NAC ありなしで有意な差は確認できなかった。

ATM、Mre11 は全体に発現量が多く、NBS は逆に全体に発現量が少なく有意な差は得られなかった。

現在、腫瘍全体でなく、 γ -H2AX 陽性局在部位について胃型腸型形質、細胞増殖能等との相関性について、検索中である。

D . 考察

がんと γ -H2AX との関係を見た報告では、肝臓で、前がん病変からがんに進展するに従って、その発現が増加するとの報告がある一方で、白血病や頭頸部扁平上皮癌で H2AX 遺伝子 (*H2AFX*) の存在する染色体 11q23 領域の変異や欠失が起こるとの報告もある。また、*H2afx*(-/-)マウスでは、DNA 二重鎖切断の修復に障害が発生するとの報告もあり、がん抑制遺伝子としての側面を持つと考えられている。

本研究で解析した胃がんにおいても、一部で γ -H2AX を高発現する症例があった。発がん初期の遺伝子異常に対する反応とがんの進展時の発現が同じ機構なのか、異なる機構なのかを見極め、発がん初期応答の解明が、腫瘍進展への指標となり得るか、さらに検討が必要と考えた。

E . 結論

γ -H2AX の DNA 損傷刺激に対する応答とがん進展時の発現が同じ機構なのか、異なる機構なのかを見極め、発がん初期応答マーカーの同定が、腫瘍進展への指標となり得るか、さらに検討が必要と考えた。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okochi-Takada, E., Hattori, N., Tsukamoto, T., Miyamoto, K., Ando, T., Ito, S., Yamamura, Y., Wakabayashi, M., Nobeyama, Y., Ushijima, T. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene* 33: 2273-2278, 2014.
- 2) Toyoda, T., Yamamoto, M., Takasu, S., Ogawa, K., Tatematsu, M., Tsukamoto, T. Molecular mechanism of gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected rodent models. *Diseases* 2: 168-186, 2014.
- 3) Tsukamoto, T., Tatematsu, M. Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Neoplasia. *Curr Infect Dis Rep* 16: 402, 2014.

- 4) 塚本徹哉, 桐山諭和, 柴田知行 【ヘリコバクター・ピロリ感染胃炎を診る、治す】 *H.pylori* 胃炎除菌による胃内環境への影響 除菌による病理組織学的所見の変化. *臨牀消化器内科* 29: 337-344, 2014.
- 5) 塚本徹哉, 桐山諭和, 立松正衛. 3. 胃癌ハイリスクの病理学的背景— 発癌仮説, 前癌病変, 前癌状態—. In: 一瀬雅夫, 岡政志, 齋藤博 編. *胃癌リスクファクターとリスク診断— とくにABC検診の現状と問題点の正しい理解のために* -. 東京: 日本メディカルセンター, 2014; 29-37.

2 . 学会発表

- 1) 桐山諭和, 塚本徹哉, Expression of γ -H2AX in gastric carcinogenesis in human and rodent models, 第 73 回日本癌学会総会, 2014 年, 横浜
- 2) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Kiriya, Y., Tatematsu, M., Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model. The 8th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, 2014, Fukuoka

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

なし。

2 . 実用新案登録

なし。

3 . その他

なし。