

京都大学	博士 (医学)	氏名	前田 将宏
論文題目	Novel epigenetic markers for gastric cancer risk stratification in individuals after <i>Helicobacter pylori</i> eradication (ヘリコバクター・ピロリ菌除菌後健康人の胃発がんリスク層別化のための新規エピゲノムマーカー)		
(論文要約)			
<p>【背景】 リスク層別化は胃がん早期発見に非常に重要である。日本では胃がん予防を目的にピロリ菌関連慢性胃炎に対するピロリ菌除菌療法が保険適応となり、除菌後健康人が急増している[1]。これらの人々の定期的観察は個人的・社会的負担となっており、リスク層別化システムの構築は喫緊の課題である。</p> <p>DNA メチル化異常は、ピロリ菌感染により正常胃粘膜に誘発され[2]、その蓄積の程度は発がんリスクと強く相関することが知られてきた[3, 4]。その後、多施設共同前向き臨床研究において、胃粘膜に蓄積したメチル化異常の定量的解析 (<i>miR-124a-3</i>) により内視鏡治療後胃がん患者における異時性多発胃がんのリスク層別化が可能であることが証明された[5, 6]。このエピゲノムリスク診断は初発胃がんのリスク層別化にも有望と考えられる。</p> <p>【目的】 除菌後健康人における初発胃がんのリスク層別化のための有用性の高い新規エピゲノムマーカーを同定する。</p> <p>【方法】 胃幽門前庭部生検検体 (スクリーニングセット、バリデーションセット) をピロリ菌除菌後健康人の正常胃粘膜 (12 例、63 例) と胃がん高危険度群である胃がん患者の非がん部 (12 例、82 例) から採取した。またスクリーニングにおいて混入血球細胞および加齢の影響を除くため、健康人血液検体 3 検体とピロリ菌未感染者 (若年者・高齢者各 4 例) の胃粘膜検体を採取した。発現解析には若年者の現感染者、未感染者各 4 例の胃粘膜生検検体を用いた。</p> <p>ゲノム網羅的メチル化解析は BeadArray (Infinium 450K)、定量的個別メチル化解析はバイサルファイトパイロシークエンシング法及びメチル化特異的 PCR で行い、発現解析はマイクロアレイ (GeneChip) にて行った。</p> <p>【結果】</p> <p>1. マーカースクリーニング スクリーニングセットを用いてゲノム網羅的メチル化解析を行った。二つのアルゴリズム (Large difference method、iEVORA-based method) に基づいて、血液細胞で低メチル化を示し、若年者・高齢者のピロリ菌未感染者で共に低メチル化を示す、胃がん患者の胃粘膜に特異的な高メチル化領域を探索し、57 領域を新規マーカー候補として同定した。</p> <p>2. バリデーション</p>			

解析可能であった 9 領域 (*FLT3*, *LINC00643*, *RPRM*, *JAM2*, *ELMO1*, *BHLHE22*, *RIMS1*, *GUSBP5* および *ZNF93*) において、バリデーションセットを用いて定量的メチル化解析を行った。新規マーカーの除菌後のメチル化レベルは除菌前と比べ一定もしくは低下傾向を示した。除菌後のメチル化レベルは胃がん患者において健康人と比べ有意に高値を示した。また相関解析において、除菌後のメチル化レベルはマーカー同士で強い相関 (相関係数 = 0.74–0.97) を示した。

- 新規マーカーの高い性能
ROC 解析では新規マーカーは AUC: 0.70-0.80、オッズ比 (OR) : 5.43-23.41 と従来のマーカーである *miR-124a-3* (AUC: 0.74、OR: 8.0) と比べ同等もしくはそれ以上の性能を示した。
- マーカー遺伝子のメチル化の意義
新規マーカーの発がんへの関与の可能性を探るため、マーカー遺伝子の正常胃粘膜での発現を調べた。マーカー遺伝子の大部分は、正常胃粘膜でピロリ菌感染に関わらず非常に低発現であり passenger methylation と考えられた。一方で 2 マーカー遺伝子 (*JAM2*, *ELMO1*) においては中等度の発現を認め、標的部位が転写開始点近傍の CpG island に存在することからメチル化サイレンシングに関連している可能性が残った。
- 他の胃がんリスク因子との独立性
胃がんのリスク因子である胃粘膜萎縮範囲及び性別とマーカーのメチル化レベルは独立していた。また除菌後の健康人および胃がん患者において一部のマーカーのメチル化レベルは年齢と弱い正の相関を示した。

【考察】

本研究は網羅性の高いエピゲノム解析技術と多検体を用いて、ピロリ菌除菌後対象者の中で高危険度群である胃がん患者を高精度に識別できる有用性の高いエピゲノムマーカーを樹立した。加えて新規マーカーは影響因子を考慮したスクリーニングにより、加齢および血液細胞の混入による影響を受けにくい特徴を有する。

マーカーのメチル化レベルは除菌前後で一定もしくは低下傾向を示し、従来の報告[7, 8]と同様であった。除菌後は炎症血液細胞の浸潤が減少するが、マーカーは血液細胞では低メチル化を示すことから、除菌前後のメチル化レベルの低下はメチル化誘発低下に伴う非メチル化幹細胞からの新しい前駆細胞の供給に伴う結果と考えられる[9]。一方で、炎症血液細胞の低下は上皮細胞の割合を相対的に増加させることからメチル化レベルの低下が相殺され、一部のマーカーでは一定傾向を示したと考えられる。

一般的に低発現の遺伝子にはメチル化が誘導されやすいことが知られる[10, 11]。実際、我々が樹立したマーカー遺伝子の大部分は正常胃粘膜で低発現を示し、発がんに寄与しない passenger methylation と考えられた。一方で、細胞接着に関連す

る *JAM2* と細胞移動に関連する *ELMO1* の 2 遺伝子はメチル化サイレンシングに関連している可能性が残った。実際この 2 遺伝子は大腸癌でのメチル化サイレンシングが報告されている[12-14]。しかし、より重要なのは、これらのマーカーが高い相関を示すことから、単一の現象、つまりエピゲノム傷害全体を反映していると考えられ、また個別の機能に関わらずメチル化高感受性によって高い性能を発揮していると考えられる点である。

本研究の考えられる限界点は、サンプルが二つの研究から集められたことによるサンプルバイアスである。横断的採取の結果、除菌後健康人の中には潜在的ながん患者が含まれるため、マーカーの感度・特異度が予想よりも低かった可能性がある。また胃癌患者には性別や胃粘膜萎縮範囲において健康人と比べ偏りが生じた。しかしサブグループ解析では共にマーカーのメチル化レベルとの相関は認められなかった。またメチル化レベルは感染期間を反映し上昇することが知られている[15]。除菌後の健康人と胃癌患者において一部のマーカーで年齢と弱い正の相関が認められたのはそのためと考えられる。

これらのマーカーは現在進行中のピロリ菌除菌後健康人を対象とした多施設前向き臨床研究に用いる予定である。エピゲノムリスク診断による胃癌高危険度群の層別化は、がん検診の最適化に役立つと期待される。

【引用文献】

1. Tsuda M, Asaka M, Kato M, Matsushima R, Fujimori K, Akino K, et al. Effect on *Helicobacter pylori* eradication therapy against gastric cancer in Japan. *Helicobacter*. 2017;22.
2. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res*. 2010;70:1430-40.
3. Nakajima T, Maekita T, Oda I, Gotoda T, Yamamoto S, Umemura S, et al. Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:2317-21.
4. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2006;12:989-95.
5. Asada K, Nakajima T, Shimazu T, Yamamichi N, Maekita T, Yokoi C, et al. Demonstration of the usefulness of epigenetic cancer risk prediction by a multicentre prospective cohort study. *Gut*. 2015;64:388-96.
6. Maeda M, Nakajima T, Oda I, Shimazu T, Yamamichi N, Maekita T, et al. High impact of methylation accumulation on metachronous gastric cancer: 5-year follow-up of a multicentre prospective cohort study. *Gut*. 2017;66:1721-3.
7. Shin CM, Kim N, Lee HS, Park JH, Ahn S, Kang GH, et al. Changes in aberrant DNA methylation after *Helicobacter pylori* eradication: a long-term follow-up study. *Int J Cancer*. 2013;133:2034-42.
8. Nakajima T, Enomoto S, Yamashita S, Ando T, Nakanishi Y, Nakazawa K, et al. Persistence

of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol*. 2010;45:37-44.

9. Maeda M, Moro H, Ushijima T. Mechanisms for the induction of gastric cancer by *Helicobacter pylori* infection: aberrant DNA methylation pathway. *Gastric Cancer*. 2017;20:8-15.
10. Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T, Niwa T, Ushijima T. The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands. *Genome Res*. 2009;19:1974-82.
11. Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, Rand E, Hecht M, Segal E, et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet*. 2006;38:149-53.
12. Kok-Sin T, Mokhtar NM, Ali Hassan NZ, Sagap I, Mohamed Rose I, Harun R, et al. Identification of diagnostic markers in colorectal cancer via integrative epigenomics and genomics data. *Oncol Rep*. 2015;34:22-32.
13. Oster B, Thorsen K, Lamy P, Wojdacz TK, Hansen LL, Birkenkamp-Demtroder K, et al. Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer*. 2011;129:2855-66.
14. Yagi K, Akagi K, Hayashi H, Nagae G, Tsuji S, Isagawa T, et al. Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16:21-33.
15. Takeshima H, Niwa T, Toyoda T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T. Degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer Sci*. 2017;108:316-21.