氏　　　　名	田　原　沙佑美
学 位 の 種 類	博士(医学)
学 位 記 番 号	甲 第 1211 号
学位授与の日付	2020年3月8日
学 位 論 文 題 名	DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after *Helicobacter pylori* eradication 「ピロリ菌除菌後発生胃癌周囲胃粘膜におけるDNAメチル化の蓄積」 International Journal of Cancer. 2019;144:80-88
指　導　教　授	塚　本　徹　哉
論 文 審 査 委 員	主査　教授　杉　岡　　篤
	副査　教授　倉　橋　浩　樹
	教授　大　宮　直　木

論文内容の要旨

【緒言】

Helicobacter pylori(Hp)除菌は胃癌の発症リスクを低減することが期待されているが、除菌成功後にも胃癌を発症する例も認められ、除菌後に残存する胃粘膜の分子生物学的異常がそのメカニズムと考えられる。DNA promoter領域のCpG island(CGI)の高メチル化は発癌の重要なメカニズムであり、胃癌リスクに関連することが報告されている。

【目的】

除菌後胃癌発症における遺伝子メチル化の関わりを検討するために、除菌後に診断された早期胃癌の背景胃粘膜の遺伝子メチル化を包括的に検討した。

【対象】

2013-2016年に藤田医科大学病院にて上部消化管内視鏡検査を施行した、Hp未感染23人、6か月以上のHp除菌後期間を有す87人(うち44人は非担癌患者、43人は除菌後早期胃癌と診断され内視鏡治療目的で来院)。

【方法】

除菌後胃癌の腫瘍近傍胃粘膜(Early gastric cancer, adjacent; EGC ADJ, n=43)、非萎縮部の体部胃粘膜(Early gastric cancer body; EGC body, n=42)、非担癌患者の体部胃粘膜(cancer free body, n=48)の内視鏡下生検材料を用い、Hp感染胃炎において高度メチル化が報告されている5遺伝子(*MYOD1*、*SLC16A12*、*IGF2*、*RORA*、*PRDM5*)のプロモーターメチル化をバイサルファイトパイロシークエンスにて検討し、Hp未感染胃粘膜(Hp(-), n=23)と比較した。さらに、各種臨床病理学的因子とDNAメチル化の関係について単変量および多変量解析を行なった。

Illumina Infinium Methylation EPICを用い、85万CpG サイトのメチル化を網羅的に解析した。テロメア長、遺伝子発現に関してリアルタイムPCRを、タンパク発現状況に関して免疫組織学的手法により検索を行った。

【結果】

上記5遺伝子のメチル化レベルは、Hp(-)群において最も低く、EGC ADJ群では高度であった。一方、cancer free body群およびEGC body群は中間的なメチル化を示し、両群間に差はなかった。また、body群(cancer free body群+EGC body群)では除菌後経過期間の長いサンプルほど有意にメチル化が低くなったが、EGC ADJ群は除菌後期間に関わらず常に高メチル化の状態であった。除菌後の高メチル化胃粘膜においては、テロメア長の短縮やDNAメチルトランスフェラーゼ1(DNMT1)の高発現が認められた。多変量解析では腸上皮化生が除菌後胃粘膜の高メチル化に最も関与していた。

ゲノムワイド解析にて、EGC ADJ群ではCG配列が密に認められるCGIを中心に高度なメチル化を示し、高メチル化が認められるプロモーター CGIはnucleic acid binding、transcription factor activity等に有意な関連を認め、*ZNF611*、*ZNF274*等のzinc finger proteins familyをコードする遺伝子群を高頻度に含んでいた。

【考察】

EGC ADJ群では5遺伝子すべてが高いメチル化状態を示していた。Hp除菌により一部の遺伝子においてはメチル化が改善するという報告があるが、EGC ADJ群では除菌後期間に関わらず高度なメチル化が認められ、除菌後胃癌との関連が示唆された。除菌後胃粘膜の高メチル化のメカニズムとしては、テロメア長の短縮やDNMT1の高発現が関連している可能性がある。さらに、多変量解析により腸上皮化生が除菌後胃粘膜の高メチル化に関連する独立因子として同定され、本研究の一連の結果は除菌後に認める腸上皮化生が胃癌のリスクであることに対し、分子生物学的な根拠を示したと考えられる。

EGC ADJ群で高メチル化されていたプロモーター領域の多くはzinc finger proteinsをcodeする遺伝子群であることがゲノムワイド解析で同定され、これらのメチル化が炎症性発癌における重要なメカニズムであることが示唆された。

【結語】

除菌後胃癌において、遺伝子メチル化の分子生物学的癌発症予測因子としての有用性が確認された。さらに、Zinc finger proteinsをコードする遺伝子群が高頻度にメチル化されていたことより、これに特異的に反応する分子標的薬など、今後の治療発展の一助になるのではないかと期待する。

論文審査結果の要旨

ピロリ菌(Hp)感染による慢性胃炎は胃癌の発生母地であり、Hp除菌により胃癌の発生頻度を抑制できることが複数の論文で示されている。しかし除菌後発見胃癌は少なくなく、形態学的にも診断に難渋することがある。また、その分子生物学的メカニズムは十分解明されていない。

本研究では除菌後胃癌の分子生物学的メカニズムを検討するため、除菌後胃癌周囲粘膜のDNAメチル化を解析した。対象は、除菌後胃癌症例の腫瘍近傍胃粘膜(EGC ADJ, n=43)、非萎縮部の体部胃粘膜(EGC body, n=42)、非担癌患者の体部胃粘膜(cancer free body, n=48)の内視鏡下生検材料とした。結果はEGC ADJのメチル化レベルがその他粘膜と比較して有意に高く、除菌後期間に関わらず常に高メチル化状態であったことから、除菌後胃癌周囲粘膜における分子生物学的不可逆性変化が示唆された。高メチル化サンプルにおいてはDNMT1、DNMT3B、NF-κBのmRNA低発現およびタンパク高発現がみられた。多変量解析では腸上皮化生が唯一の独立した関連因子であった。ゲノムワイド解析では、CpG island領域におけるメチル化がEGC ADJのメチル化に影響していることが示された。さらに、EGC ADJでメチル化されている遺伝子は、高頻度にzinc finger protein familyをコードしていた。

本研究は、従来胃癌との関連性が指摘されていた、腸上皮化生からの除菌後発癌の分子生物学的メカニズムを初めて詳細に検討し、今後の除菌後発見胃癌の早期診断や予防法開発などの臨床応用も期待されることから、学位論文に値するものと評価された。