

氏 名 なんじょう そうはち  
**南條 宗八**

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 128 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Identification of gastric cancer risk markers that are  
informative in individuals with past H. pylori infection.  
(Helicobacter pylori 除菌後状態で有用な胃がんリスクマーカー  
の同定)**

論文審査委員

(主査)	教授	北島 勲
(副査)	教授	井村 穰二
(副査)	教授	服部 裕一
(副査)	教授	戸邊 一之
(指導教員)	教授	杉山 敏郎

## 論文内容の要旨

### 【要旨】

#### 〔目的〕

*Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染は胃粘膜にエピゲノム障害を誘発し、感染胃粘膜ではエピゲノム障害が蓄積している。この蓄積したエピゲノム障害が胃発がんの素地を形成し、特定の CpG アイランドのメチル化レベルが胃がんリスクと関連していることが明らかにされてきた。*H.pylori* 除菌により胃がんリスクは減少するが、非感染者レベルまでは戻らず、残存する。そのため、感染者の除菌後の個人レベルでの発がんリスクマーカーの同定が臨床的に求められている。本研究では、除菌者で有用な胃がんリスクマーカーの同定を目的とした。

#### 〔方法〕

胃がん患者 27 人と健常者 34 人から内視鏡的胃粘膜生検により検体を採取した。*H.pylori* 感染は、健常者では血清抗 *H.pylori* IgG 抗体テストで、胃がん患者では尿素呼気試験で解析された。対象者は全員、*H.pylori* 試験陰性で胃粘膜萎縮があり、除菌後胃粘膜ではないが、感染胃粘膜の除菌後 1 年程度の胃粘膜に相当する（以下、除菌後近似状態）と推定して本研究結果を考察した。高メチル化 CpG アイランドをゲノムワイドに探索するために、メチル化 DNA 免疫沈降・CpG アイランドマイクロアレイを行った。各検体のメチル化参照比率およびメチル化レベルは、DNA をバイサルファイト変換した後にメチル化特異的 PCR 法で解析された。

#### 〔成績〕

除菌後近似状態の胃がん患者 3 人、除菌後近似状態の健常者 3 人の胃粘膜をそれぞれ集めて 1 検体とし計 2 検体で CpG アイランドマイクロアレイ解析を行い、前者で高メチル化状態の 15 個の CpG アイランドを単離した。次に、別の除菌後近似状態の胃がん患者 10 人と除菌後近似状態の健常者 10 人でメチル化参照比率を測定すると、7 個の CpG アイランドが、前者で高メチル化レベルであった。さらに、また別の除菌後近似状態の胃がん患者 21 人と除菌後近似状態の健常者 14 人の検証群でも、同様の結果が得られた。また、検証群で算出した ROC 曲線の曲線下面積やオッズ比は、それぞれ 0.78-0.84 と 12.7-36.0 で、現在利用可能なリスクマーカーの 0.60-0.65 と 5.0-5.7 を上回った。

#### 〔総括〕

今回、*H.pylori* 感染が胃粘膜に誘発するエピゲノム異常をゲノムワイドに解析し、除菌後近似状態で有用な、7 個の新規胃がんリスクマーカーを同定した。

今回同定した新規マーカーを利用することにより、*H.pylori* 除菌後患者の胃がんリスクを個人レベルで評価することができ、そのリスクに合わせて定期検査の施行間隔を設定するなど個別化医療が可能となる。

## 学位論文審査の要旨

### 【目的】

*Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染が胃がんリスクを 2.2~21 倍に増やすことが知られている。その機序として、*H.pylori* 感染により胃粘膜にエピゲノム障害が蓄積され、特定の CpG アイランドのメチル化レベルと胃がんリスクが関連することが明らかにされている。さらに、*H.pylori* 除菌により、CpG アイランドの DNA メチル化レベルは低下するが、非感染胃粘膜レベルまでは戻らず、個々人の残存メチル化レベルが除菌後の胃がんリスクと相関することが推定されている。そこで、南條宗八君は、*H.pylori* 除菌後の胃がんリスクを個人レベルで詳細に検討することが重要と考え、除菌者における DNA メチル化に関連する有用な胃がんリスクマーカーを同定することを目的に本研究を実施した。

### 【方法】

1) 検体サンプリングと *H.pylori* 感染状態検査：内視鏡検査で胃がんのないことが確認された 27 名と病理学的に胃がんが確認された 34 名を対象に、前庭部より内視鏡的生検下で胃粘膜が採取された。*H.pylori* 感染は血清抗 *H.pylori* IgG 抗体テスト (SRL、東京)、胃がん患者は、尿素呼気試験 (大塚製薬、徳島) で診断した。*H.pylori* 試験陰性で胃粘膜萎縮のある検体を除菌後 1 年程度の胃粘膜に相当すると推定し、「除菌後近似状態」とした。

2) DNA メチル化解析：メチル化 DNA 沈降 - CpG アイランドマイクロアレイ解析を行った。完全メチル化 DNA と非メチル化 DNA をそれぞれ *SSI* メチル化酵素によりメチル化ゲノム DNA とゲノム GenomiPhi amplification system (GE Healthcare, UK) で増幅された DNA を利用した。各検体のメチル化参照比率およびメチル化レベルは、既報に従いバイサルファイト変換後、メチル化特異的 PCR 法で解析した。

## 【結果】

1) 胃癌患者非がん部における高メチル化状態 CpG アイランドの単離：除菌後近似状態胃癌患者 3 人、保菌後近似状態健常者 3 名の胃粘膜をそれぞれまとめて 1 検体とし、計 2 検体で CpG アイランドマイクロアレイ解析を行った結果、胃癌患者群から 15 個の高メチル化状態 CpG アイランドを単離した。

2) 7 個の新規マーカー同定：15 個の CpG アイランドにつき、除菌後近似状態 10 名と除菌後近似状態胃癌患者 10 名からなるスクリーニングセットにより再評価し、7 個の CpG アイランドが健常者より胃癌患者で有意にメチル化が高値を示した。さらに、有用性を健常者 14 名、胃癌患者 21 名の独立した個体群でメチル化レベルを検証した。単離した遺伝子シンボルと胃癌患者における健常者との CpG アイランドメチル化レベルは、

*EMX1* (2.8 倍)、*miR663* (1.5 倍)、*NKX6-1* (3.8 倍)、*OPT* (2.3 倍)、*OPLAH* (2.5 倍)、*CYP11B1* (1.8 倍)、*NFFM* (3.8 倍)であった。

3) 新規マーカーの胃癌リスクマーカーの有用性検証：検証群のうち健常者と胃癌患者を区別した ROC 曲線解析により、7 個のマーカーは全て曲線下面積 0.78～0.84 の範囲に入り、オッズ比でも 12.7～36 の範囲にあった。この結果は、現在、臨床的に利用されている胃癌リスクマーカー (*FLNc* と *THBD*) の ROC 曲線下面積 0.6～0.65, オッズ比 5.0～5.7 を上回った。

## 【総括】

本研究では、*H.pylori* 除菌後近似状態の健常者胃粘膜と除菌後近似状態胃癌患者非がん部胃粘膜のゲノムワイドメチル化解析により、7 個の新規胃癌リスクマーカーを単離・同定した。本マーカーは、現在利用されている *FLNc* と *THBD* よりも胃癌リスクの検出力が強いことが示された。本委員会は、臨床検体から CpG アイランドメチル化関連

分子を同定し、その検証と臨床的有用性の解析に対して綿密に研究が計画され、成果が詳細に検証されている点に学術的価値を認める。また、本研究は、除菌後またはその近似状態におけるエピジェネティックな胃癌リスクマーカーを新規に見出した初めての成果であることに新規性が認められる。近年、*H.pylori* 除菌治療患者が増加しているが、血清抗 *H.pylori* 抗体と血清ペプシノゲン試験組み合わせによる除菌後状態の評価が確立していないため、本研究で見出された新規マーカー導入による多数症例での前向き臨床研究での今後の成果に臨床的発展性が期待できる。

以上、本審査委員会は、本研究が本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。