HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Helicobacter pylori除菌後異時性胃癌症例の臨床病理学的特徴とDNAメチル化異常に関する検討
Author(s)	田中, 一光
Description	配架番号：2702
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14962号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14962
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94727
Type	doctoral thesis
File Information	TANAKA_Ikko.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

Helicobacter pylori 除菌後異時性胃癌症例の臨床病理学的特徴と DNA メチル化異常に関する検討

(Evaluation of clinicopathological features and aberrant DNA methylation after *Helicobacter pylori* eradication focused on metachronous gastric cancer)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

田中　一光

学 位 論 文

Helicobacter pylori 除菌後異時性胃癌症例の臨床病理学的特徴と DNA メチル化異常に関する検討

(Evaluation of clinicopathological features and aberrant DNA methylation after *Helicobacter pylori* eradication focused on metachronous gastric cancer)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

田中　一光

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 頁

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10 頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29 頁

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に投稿中である。

1. Long-term changes in aberrant DNA methylation and gastritis after *Helicobacter pylori* eradication focused on metachronous gastric cancer
   Ikko Tanaka; Shoko Ono; Yoshiyuki Watanabe; Hiroyuki Yamamoto; Ritsuko Oikawa; Shogo Matsumoto; Marina Kubo; Yusuke Nishimura; Yoshihiko Shimoda; Masayoshi Ono; Keiko Yamamoto; Naoya Sakamoto
   Gastric Cancer

本研究の一部は以下の学会にて発表した

1. Ikko Tanaka, Shoko Ono, Sayoko Kinowaki, Masaki Inoue, Kana Matsuda, Marin Ishikawa, Momoko Tsuda, Keiko Yamamoto, Yuichi Shimizu, Naoya Sakamoto
   Clinical characteristics of multiple metachronous gastric cancers that were endoscopically resected
   Asian Pacific Digestive Week (APDW) 2018, 2018年11月15日-11月18日、SEOUL
2. 田中　一光、小野　尚子、久保　茉理奈、大野　正芳
   *Helicobacter pylori*除菌後の異時性胃癌発症リスクの検討
   第16回日本消化管学会総会、2021年2月19日、東京
3. 田中　一光、小野　尚子、西村　友佑、久保　茉理奈、霜田　佳彦、井上　雅貴、木脇　佐代子、山本　桂子、大野　正芳、清水　勇一、坂本　直哉
   *H. pylori*除菌後異時性胃癌症例の臨床病理学的特徴
   第101回日本消化器内視鏡学会総会、2021年5月14日 - 5月16日、京都
4. 田中　一光、小野　尚子、山本　桂子、大野　正芳、渡邉　嘉行、山本　博行、及川　律子
   *H. pylori*除菌後も異時性胃癌を繰り返す症例のDNAメチル化異常の検討
   第27回ヘリコバクター学会総会、2021年9月24日 - 9月26日、WEB開催

要旨

【背景と目的】

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は胃粘膜に感染することで慢性活動性胃炎を惹起し、それが進行した萎縮性胃炎や腸上皮化生は胃癌発生母地として知られている。*H. pylori* 除菌介入により胃発癌が抑制される効果が多くの臨床研究により示されている。*H. pylori* 除菌により慢性活動性胃炎は改善し、胃粘膜の萎縮や腸上皮化生も長期的には改善することが胃発癌の抑制に繋がると考えられている。一方で、除菌後も一定の割合で胃癌は発見され、稀ながら繰り返す症例も経験される。

分子学的機序として、DNA プロモーター領域のメチル化異常が胃発癌に関連していることが知られている。*H. pylori* 未感染胃粘膜では DNA メチル化異常は起こらないが、*H. pylori* 活動性胃炎粘膜はメチル化異常であり、*H. pylori* 除菌により特定の遺伝子のメチル化レベル（胃粘膜に蓄積した DNA メチル化異常の量）は低下する。また、除菌後に持続する胃粘膜メチル化異常は異時性胃癌 (Metachronous gastric cancer: MGC) 発生に関連することも報告されているが、MGC 症例において除菌後長期的なメチル化異常の変化と組織学的相関を検討した報告はない。

今回、我々は早期胃癌治療後かつ *H. pylori* 除菌後に MGC が発生した症例における胃癌の臨床病理学的特徴、背景胃粘膜メチル化レベルの除菌後長期における変化および組織学的胃炎との関連性について評価した。

【対象と方法】

すでに採取された病理組織検体を用いた単施設後方視的研究を行った。2004 年 1 月から 2018 年 12 月までの期間で、北海道大学病院において早期胃癌を内視鏡的切除 (ER：endoscopic resection) し *H. pylori* 除菌に成功した患者の中で、除菌後に MGC が発生した患者を MGC group、除菌後 5 年以上胃癌が発生しなかった患者を Non-MGC group と定義した。コントロール群として、胃癌の既往がなく除菌成功後 5 年以上胃癌が発生しなかった患者を HP group とした。胃前庭大弯の内視鏡的生検検体を用いて、除菌前後の updated Sydney system に準じ 4 つの項目における組織学的胃炎の評価(Mono(単核球浸潤)、Neutro(好中球浸潤)、Atrophy(萎縮)、IM(腸上皮化生))および DNA メチル化解析を行った。MGC group は除菌前および異時性胃癌発生時、Non-MGC group と HP group は除菌前および除菌後 5 年目の生検検体を使用した。DNA メチル化はパイロシークエンス法を用いて miR-124a-3、EMX1、NKX6-1 遺伝子のプロモーター領域における定量的メチル化解析を行った。評価項目として各群における患者背景および組織学的胃炎の違い、各群における除菌前後の背景胃粘膜メチル化レベルの変化、除菌後に 2 回以上異時性胃癌が発生した症例におけるメチル化レベルの経時的変化、

胃粘膜メチル化レベルと組織学的胃炎との相関を評価した。メチル化レベルは、Z-score 解析を用いて遺伝子毎に各サンプルのメチル化レベルを正規化し、3 遺伝子の平均値を Z-score とした。

【結果】

早期胃癌を ER 後に *H. pylori* の除菌療法に成功した症例は 184 名であり、その中で除菌後に胃癌を発生した MGC 症例は 38 例であった。累積胃癌発生率は除菌 5 年後で 19.7%、除菌 10 年後で 31.0%と算出された。条件を満たした MGC group25 名、Non-MGC group17 名、HP group29 名が解析された。MGC group の患者背景は男性 21 名(84%)、除菌時平均年齢は 70.8 歳であった。除菌前に癌が多発していた症例は MGC group で 8 名(32%)であり、Non-MGC group 0 名と比較し有意に多かった($P = 0.01$)。

背景胃粘膜の組織学的胃炎の評価では、除菌前の MGC group と HP group の Neutro, Atrophy および IM スコアで有意差が見られた (Neuro: 0.63 ± 0.82, 1.54 ± 0.88, $P < 0.001$, Atrophy: 1.66 ± 0.98, 0.95 ± 0.67, $P = 0.01$, IM : 1.21 ± 1.18, 0.54 ± 0.88, $P = 0.03$)。

胃粘膜の DNA メチル化レベルは、除菌前のメチル化レベルは 3 群間で有意な差はみられなかった。除菌後には HP group では miR-124a-3 と EMX1 の平均メチル化レベルが除菌後に有意に低下した(miR-124a-3: 32.9 ± 9.5%→24.6 ± 10.7%, $P < 0.01$、EMX1: 29.2 ± 16.2%→21.7 ± 5.4%, $P = 0.03$)。Non-MGC group では、miR-124a-3 の平均メチル化レベルのみが有意に低下した(37.9 ± 11.7%→29.4 ± 14.6%, $P < 0.01$)。MGC group では、NKX6-1 のメチル化レベルおよび 3 遺伝子の平均値(Z-score)は除菌後に上昇した(NKX6-1: 33.8 ± 13.2%, →36.9 ± 15.9%, P = 0.03、Z-score: -0.12 ± 0.71→0.30 ± 0.78, $P = 0.03$)。除菌後のメチル化レベルを 3 群で比較すると、MGC group では miR-124a-3、EMX1、Z-score のメチル化レベルが HP group よりも高値であった(それぞれ $P < 0.01$)。

さらに MGC group の中で、除菌後に 2 回以上 MGC が発生した症例 6 名のメチル化レベルは 4 名で除菌後経時的にメチル化レベルが上昇する傾向であった。

組織スコアとメチル化レベルには Neutro スコアおよび Mono スコアはいずれの遺伝子おいても胃粘膜のメチル化レベルとの相関はみられなかった。Atrophy および IM スコアは除菌前後ともにメチル化レベルと正の相関を認めた。

【考察】

MGC group では除菌前の Mono および Neutro スコアは低値で、Atrophy および IM スコアは高値であった。MGC group は除菌前の段階ですでに炎症は消退し、萎縮・腸上皮化生へと進展した胃癌の発生母地が完成している状態であった。

胃粘膜のメチル化異常の検討において、胃癌が発生しなかった HP group と初回の ER 後に MGC が発生しなかった Non-MGC group では除菌後にメチル化レベルは低下したが、MGC group では除菌後も胃粘膜のメチル化異常が長期的に改善しなかった。除菌成功後に高度なメチル化異常が持続することは、MGC 発生のリスク要因となると考えられた。特に除菌後に 2 回以上 MGC が発生した症例は除菌後も経時的にメチル化レベルは上昇傾向であることから、除菌後にメチル化異常の蓄積が抑制されないことが示唆された。

除菌後に MGC が発生する症例でメチル化異常が改善しない、あるいは増悪する原因は明らかではないが、このような症例では除菌前に多くの幹細胞がメチル化されており、*H. pylori* 除菌後に多くのメチル化された分化細胞が脱落したとしても、メチル化された幹細胞からの細胞分化が続いているため、除菌後もメチル化が改善されない可能性が考えられる。年齢、胃癌の家族歴、喫煙が胃粘膜のメチル化異常と関連していることも報告されており、*H. pylori* 以外の原因が影響している可能性が考えられる。

H. pylori 関連胃炎がある程度まで進展すると、*H. pylori* 除菌の効果が得られない「Point of no return」という概念が知られている。MGC group は除菌後も高度の萎縮および腸上皮化生は改善せず、メチル化異常が持続しており、それらには正の相関がみられた。組織学的にも遺伝子学的にも粘膜の障害が *H. pylori* 除菌により改善されないところまで達していると思われた。

【結論】

H. pylori 除菌後に MGC が発生する症例は、除菌後長期経過しても胃粘膜のメチル化異常は改善していなかった。胃粘膜に高レベルの異常な DNA メチル化異常が残存していることは、重度の組織学的萎縮と腸上皮化生を反映しており、長期的な異時 MGC の発生と関連していた。病態の解明には、症例の蓄積とさらなる分子生物学的な検討が必要と考える。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

H. pylori	*Helicobacter pylori*
MGC	metachronous gastric cancer
EMR	endoscopic mucosal resection
ER	endoscopic resection
ESD	endoscopic submucosal dissection
miR-124a-3	microRNA 124a-3
EMX1	empty spiracles homeobox 1
NKX6-1	NK6 homeobox 1
Mono	mononuclear cells
Neutro	neutrophils
IM	intestinal metaplasia
USS	updated Sydney system
PCR	polymerase chain reaction

緒言

胃癌は、3番目に死亡率の高いがんで、2018年の世界の死亡者数は783,000人、新規患者数は1,000,000人と推定されている。本邦においても、2013年の罹患数全国推定値は131,893人(男性90,851人、女性41,042人)であり、全がん罹患数の15.3%を占めている(GLOBOCAN 2018)。また、2015年の死亡数は4.7万人(全がん死亡の12.6%)であり、胃癌は肺癌、大腸癌に次いで3番目に多い。

Helicobacter pylori (*H. pylori*)は胃粘膜に感染することで、好中球・リンパ球浸潤を伴う *H. pylori* 感染胃炎と呼ばれる慢性活動性胃炎を引き起こす。*H. pylori* 感染胃炎は胃・十二指腸潰瘍や胃 Mucosa associated lymphoid tissue リンパ腫、機能性胃腸症、胃過形成性ポリープ、免疫性(特発性)血小板減少性紫斑病感染を引き起こす。さらに、*H. pylori* 感染胃炎は萎縮性胃炎、腸上皮化生へ進展し、胃癌の発生母地であることが明らかとなった(Kuipers et al., 1995; Uemura et al., 2001)。

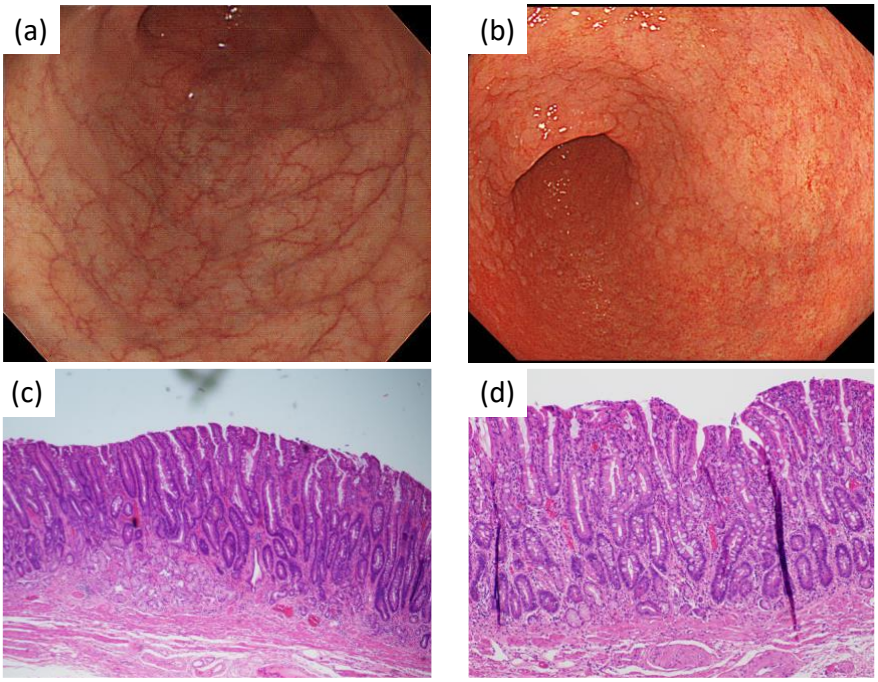


図1. 萎縮性胃炎と腸上皮化生の内視鏡所見および病理学的所見

(a)胃炎の内視鏡画像:胃角～体下部。血管透見が明らかで、粘膜襞が消失している。(b)腸上皮化生の内視鏡画像:前庭大弯。腸上皮化生は胃粘膜に腸型の細胞が出現することであり、萎縮の進行に伴って出現してくる。通常観察で敷石状に点在する灰白色扁平隆起として観察されることがあり、特異型と分類される。(c)萎縮性胃炎の病理画像:胃底腺や幽門腺といった固有腺の腺管数の減少や腺管丈の縮小を示す。(d) 腸上皮化生の病理画像: 杯細胞、パネート細胞など腸型の細胞が出現してくる。

北海道大学が主体となって全国の前向き介入試験として行われた*H. pylori*陽性患者を対象とした胃癌内視鏡治療後の除菌療法による胃癌異時再発予防効果をみる試験では、除菌介入により異時性胃癌の発生は1/3に減少することが示された(Fukase et al., 2008)。その後いくつかの前向き試験やメタ解析からも除菌による胃癌予防効果が示されている(Ford et al., 2014)。

その結果を受け、本邦では2013年2月に*H. pylori*感染胃炎に対する除菌治療が保険適応となり、除菌による胃癌予防が現実的になった。しかしながら、*H. pylori*除菌によってもその後の胃癌発生リスクは完全に消失することはなく、除菌後も初発癌で1.0-1.6%、異時癌で2.7-7.6%程度の胃癌が発見されている(Chen et al., 2016; Lee et al., 2016; Yoon et al., 2014)。また、胃癌内視鏡治療後の長期経過観察では、除菌後にも胃癌を複数回繰り返す異時性多発癌症例も稀に経験する。

*H. pylori*除菌後の胃癌発生のリスクとしては、高齢、男性、除菌前の組織学的腸上皮化生、高度な内視鏡的萎縮粘膜、除菌後地図状発赤、除菌前の胃癌多発など多数の因子が報告されている (Correa, 1992; Park and Kim, 2015)。特に、萎縮性胃炎および腸上皮化生は胃発癌において重要な背景因子であり、*H. pylori*を除菌により萎縮性胃炎や腸上皮化生が改善することが胃癌の発生を抑制すると考えられている(Kodama et al., 2012)。

しかし、*H. pylori*の除菌によって萎縮性胃炎および腸上皮化生が改善するか否かについては、相反する結果も示されており、明確ではない(Kang et al., 2012; Lahner et al., 2005; Wang et al., 2011)。特に腸上皮化生は、除菌後の改善に時間がかかるとする報告が散見される (Kodama et al., 2012; Toyokawa et al., 2010)。

研究分野ではゲノム研究における技術開発の著しい発展により、次世代シーケンサーやマイクロアレイなどを用いた胃癌に関する遺伝子異常についての包括的な研究報告が散見される。TP53、CDH1、KRAS等の遺伝子が突然変異し、胃癌に関連することが知られているが、癌化に重要な遺伝子パスウェイの多くはDNAメチル化異常によって変化すると報告されている(Ushijima and Sasako, 2004; Yamashita et al., 2011; Yousefi et al., 2019)。

DNAメチル化とは、DNA配列中のシトシン, グアニンの順に並んだ部位(CpG 部位)のシトシンにメチル基が付加されるエピジェネティックな遺伝子変化を指す。多くの遺伝子のプロモーター領域には, CpG部位を高頻度に含むCpGアイランドと呼ばれる領域が存在する。CpGアイランドが非メチル化状態だと下流の遺伝子は転写されるが、いったんメチル化されるとその遺伝子は転写不可能になり、発現が抑制される(メチル化サイレンシング)。癌抑制遺伝子がメチル化サイレンシングを受けると発癌の促進因子となる(図2)。

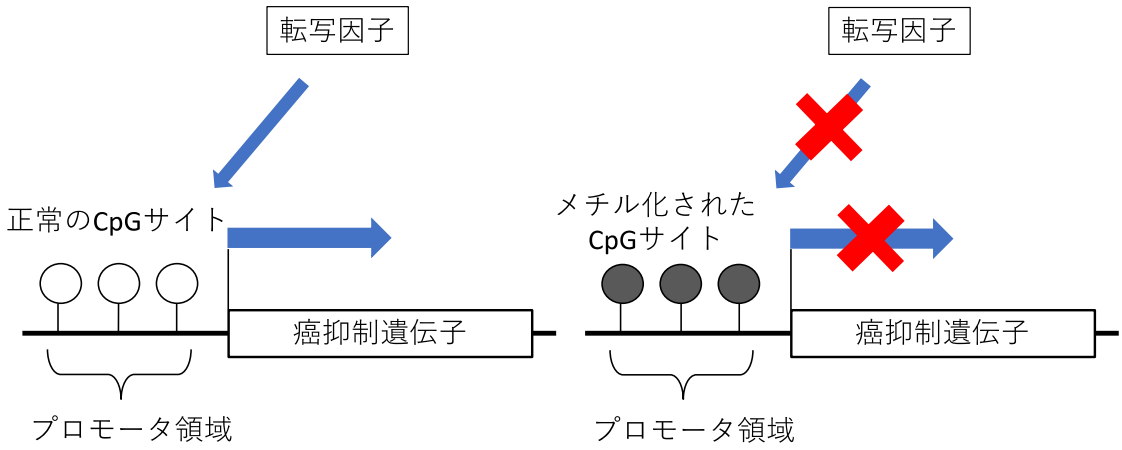


図 2. プロモータ領域の DNA メチル化異常

通常 DNA が転写されるときはプロモータ領域に転写因子が結合して転写が開始されるが、プロモータ領域 CpG アイランドなどがメチル化することで転写因子が結合されず転写が開始されないため、遺伝子の機能が働かない。胃癌に関しては *H. pylori* から炎症を介して癌抑制遺伝子のプロモータ領域のメチル化を引き起こすことが言われている。

慢性炎症を背景とした胃癌、肝癌、大腸癌などでは癌部のみならず非癌正常粘膜にもメチル化異常が集積しており、発癌リスクに関連することが報告されている (Yamashita et al., 2011; Yousefi et al., 2019, Maekita et al., 2006)。*H. pylori* 未感染胃粘膜では DNA メチル化異常はほとんど起こらないが、*H. pylori* 活動性胃炎粘膜はメチル化異常の蓄積量が高い状態であり、*H. pylori* を除菌することにより特定の遺伝子のメチル化異常が改善することが報告されている。除菌によるメチル化異常の改善が発癌抑制につながることが考えられている (Chan et al., 2006; Leung et al., 2006; Nakajima et al., 2010)。

Asada らは胃癌内視鏡治療後で *H. pylori* 陰性または除菌成功後の患者において特定の遺伝子における胃粘膜のメチル化異常を測定し、その後約 3 年間の異時性胃癌の発生を追跡したところ、miR-124a-3 遺伝子のメチル化レベル（胃粘膜に蓄積した DNA メチル化異常の量）の高い群は異時性胃癌の発生率が高かったことを報告した。異時性胃癌の発生には背景粘膜の miR-124a-3 遺伝子のメチル化異常が関係していたことを臨床的に示された(Asada et al., 2015)。その後の追加報告によると、5 年間のフォローアップでは EMX1、NKX6-1 遺伝子でも胃背景粘膜のメチル化レベルと異時性胃癌発生に関連性があることが報告された(Maeda et al., 2017a)(図 3)。

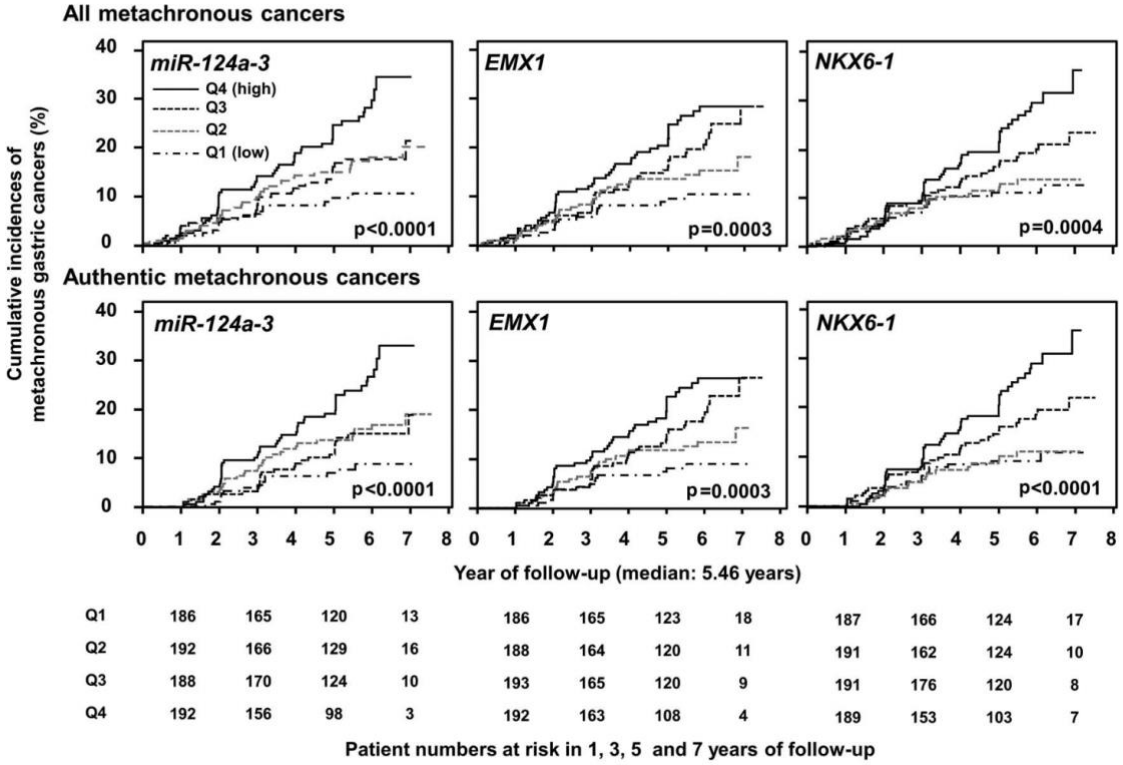


図 3. 胃粘膜メチル化異常と異時性胃癌発生率の関係

早期胃癌治療後に *H. pylori* 除菌成功した者もしくは陰性者を各遺伝子のメチル化レベル別に分け異時性胃癌発生を追跡した。メチル化レベルが最も高い群では異時性胃癌の発生率が高かった。Maeda M et al. Gut 2017;66:1721-1723.より引用

現時点では、除菌により大半の症例はメチル化レベルが低下し、除菌の発癌抑制効果が得られると予測されるが、除菌後も持続する高い胃粘膜メチル化レベルは異時性胃癌の発生リスクであると推察される(Ushijima et al., 2006)。しかし、これまで除菌後の長期的なメチル化レベルの変化に関する報告はほとんどなく、除菌後に異時性胃癌が発生する症例での長期的なメチル化の変化は明らかではない。また、組織学的萎縮/腸上皮化生と背景粘膜メチル化レベルには正の関連性があることが報告されているが、萎縮や腸上皮化生の改善には数年の時間を要するため、組織学的萎縮/腸上皮化生とメチル化の関連性を評価するには除菌後長期の経過を評価する必要がある(Shin et al., 2013)。

本研究の目的は、早期胃癌を内視鏡治療した後に *H. pylori* 除菌をした症例について、異時性胃癌の発生と発生症例における臨床病理学的特徴、胃粘膜メチル化レベルの除菌後長期における変化および組織学的胃炎との関連性を評価することである。

方法

1. 対象

北海道大学病院消化器内科において、2004年1月から 2018年12月までに、早期胃癌の初回ER時に*H. pylori*陽性であり、早期胃癌をER後に*H. pylori*の除菌療法に成功した症例は184名であった。その中で、除菌後に異時性胃癌が1回以上発生した症例をMGC groupとし、除菌後に5年以上異時性胃癌が発生しなかった症例をNon-MGC groupとして解析の対象とした(図4)。また、コントロール群として、胃癌の既往がない*H. pylori*陽性患者の中で、当院で除菌療法に成功し、除菌後5年以上胃癌が発生しなかった者からMGC groupと年齢・性別を合わせた症例をHP groupとした。全症例に対し、*H. pylori*除菌後は年1回以上の上部消化管内視鏡検査が施行された。

異時性胃癌の定義は、除菌療法に成功してから1年後以降に新たに発見された胃癌と定義する。また、異時性胃癌は下記の基準を満たすものとする(Moertel et al., 1957)。

1)各病変が病理組織学的に悪性であること
2)各病変が他の病変と分離していること
3)各病変が他の病変の局所的な進展や転移の結果ではないこと

以下の患者は対象から除外した。

1)最初のER時*H. pylori*陰性だった患者(未感染患者、自然消失した*H. pylori*既感染の患者、または以前に*H. pylori*を除菌した患者を含む)
2)除菌に失敗または未除菌の*H. pylori*陽性患者
3)生検標本が採取されなかったか、標本量が非常に少なかった患者
4)除菌後の追跡調査が5年未満の患者
5)局所再発した患者
6)除菌前もしくは除菌後の追跡中に外科的胃切除術が施行された患者

本研究は、「ヘルシンキ宣言」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年文部科学省・構成労働省告示第3号)」に詳述されている倫理基準に基づいて実施され、北海道大学医学部医学科、医の倫理委員会の承認の下に行われた（医019-015)。同意取得については予め承認を得た方法（同意文書取得およびオプトアウト)にて承諾を得た。

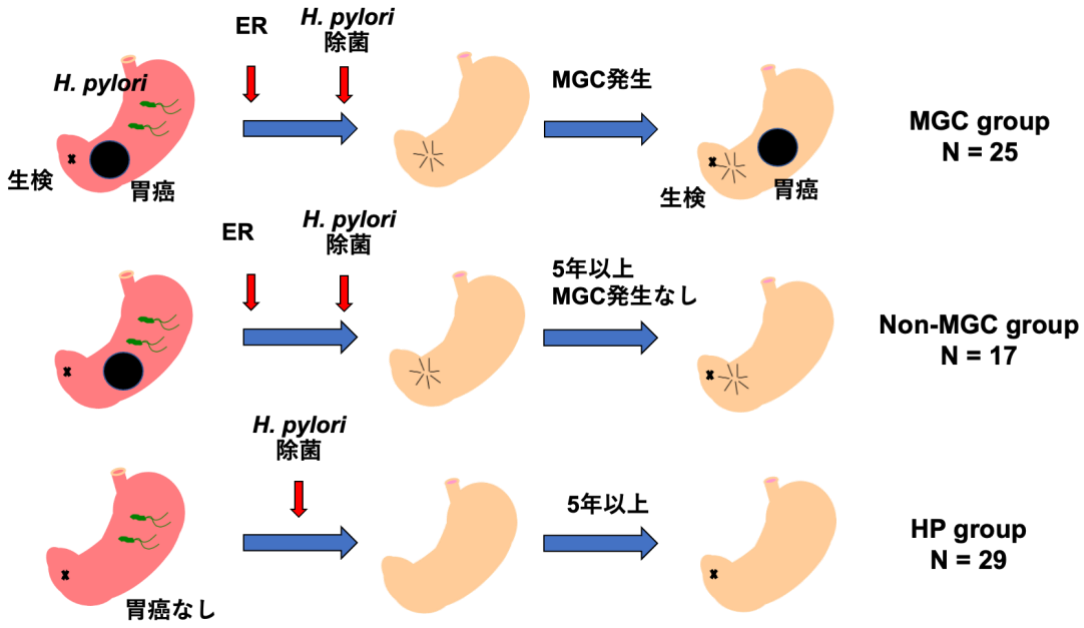


図 4.　研究対象者の概略

H. pylori の判定

H. pylori 感染は、尿素呼気試験(カットオフ値＜2.5‰, Ubit®, Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan)、血清抗 *H. pylori* 抗体検査(カットオフ値＜10U/ml, E-Plate Eiken *H. pylori* antibody, Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)、および胃前庭部と胃体部大弯からの病理組織学的検査を用いて調査した。少なくとも 1 つの検査項目が陽性の場合に *H. pylori* 陽性と定義した。除菌判定には、除菌療法終了後 8 週間以上経過してから少なくとも 2 法以上を用いて 2 回以上の検査で陰性を確認した。

内視鏡的生検検体

胃粘膜のメチル化異常の測定および組織学的評価には、胃前庭部大彎(幽門輪から 2cm)の非癌胃粘膜から採取した内視鏡生検標本を用いた。MGC group では、初回 ER 前(*H. pylori* 除菌前)および除菌成功後に異時性胃癌が発見されたときの内視鏡的生検検体を用いた。HP group と Non-MGC group では、除菌前と除菌後 5 年目の生検検体を用いた。生検検体は、採取された後にパラフィン包埋処理を施行され、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed, Paraffin- Embedded, FFPE) 組織として保管されている検体を使用した。

内視鏡的萎縮および組織学的胃炎の評価

内視鏡的な萎縮の広がりの評価は、木村-竹本分類に準じて評価した(Kimura K et al., 1996)。本分類では萎縮性胃炎の進展を胃粘膜の平面的な拡がりで評価し、内視鏡的萎縮境界が胃体部小彎側で噴門を越えない closed-type(C-1～C-3)と、それを越え大彎側に進展する open type(O-1～O-3)に分類される。C-1/ C-2 を Mild、C-3/ O-1 を Moderate、O-2/ O-3 を Severe と 3 つに分類した。

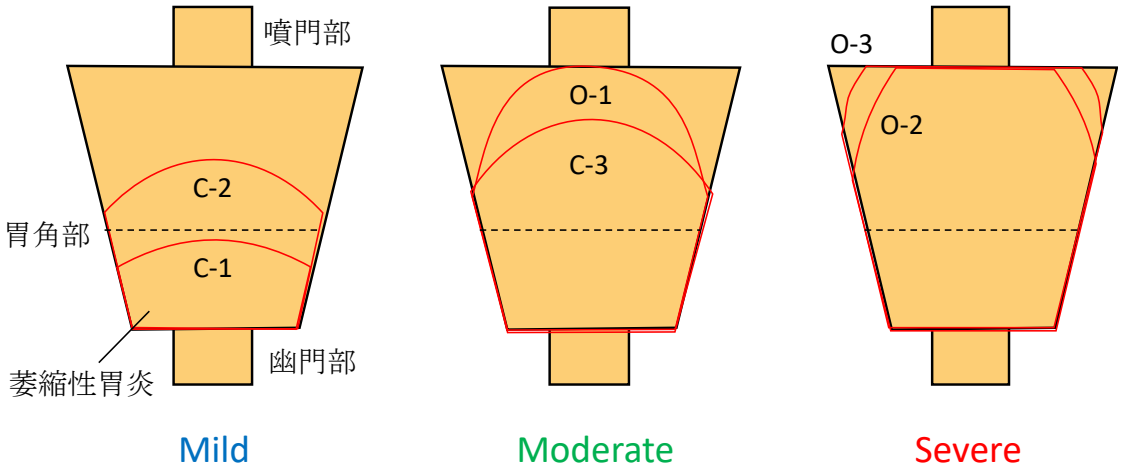


図 5. 内視鏡的萎縮の拡がり

木村竹本分類に準じて内視鏡的萎縮の平面の拡がりを 3 段階で分類した。
Kimura K et al. Scand. J. Gastroenterol. Suppl.2016;214:17-20.を参考に作成

組織学的胃炎の評価では、Mono(単核球浸潤)、Neutro(好中球浸潤)、Atrophy(萎縮)、IM(腸上皮化生)の 4 項目を評価する。全ての生検標本をヘマトキシリン・エオジン(HE)で染色し，内視鏡検査と *H. pylori* 検査の結果については情報を持たない病理医が，胃炎の国際的分類である updated Sydney system に従って評価した(Dixon et al., 1996)。Updated Sydney system (USS)に基づく visual analog scale は、0 = Normal、1 = Mild、2 = Moderate、3 = Marked のスコアに変換した。

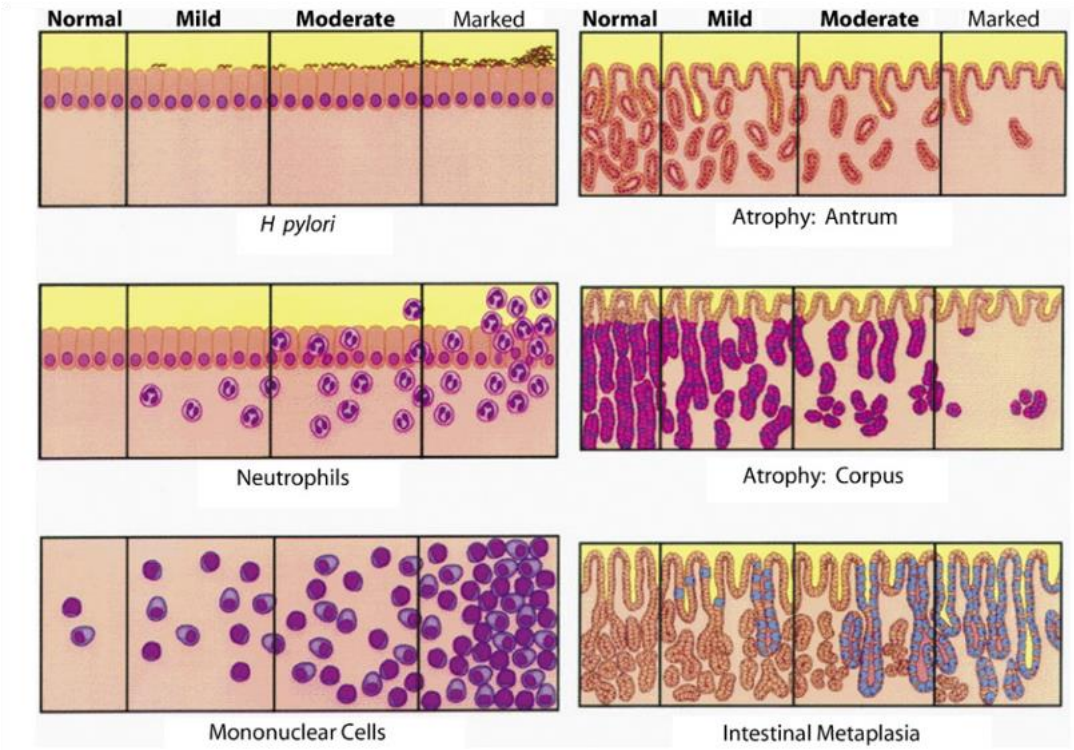


図 6. updated Sydney system に基づく組織学的胃炎の分類
Dixon MF et al. Am J Surg Pathol 1996;20:1161-81.より引用

DNA メチル化解析

FFPE 標本を 10μm の厚さに薄切したものを各標本で 20 枚、スライドガラス上に伸展させた。生検標本全ての組織を肉眼的にトリミングした。回収された組織は、DNA 抽出キットである QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて DNA を抽出した。

抽出された DNA は、EpiTect Bisulfite Kit(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて、バイサルファイト変換を行った。３遺伝子(miR-124a-3、EMX1、NKX6-1)における転写開始点を含む CpG アイランドが存在しているため、転写開始点の下流に位置する領域を対象に、３遺伝子におけるそれぞれのプロモーター領域 CpG アイランドに特異的な配列となるプライマーを設計使用し、ビオチン化 PCR(Biotinate Polymerase Chain Reaction)を行った(表 1)。すべての PCR は denaturation のステップを 95 度、30 秒とし、annualing のステップを 60 度、30 秒、extension のステップを 72 度、30 秒とした。ビオチン化された PCR 産物を streptavidin-coated beads (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)によりキャプチャーした後、シークエンスプライマーとともにイン

キュベートさせた。その後、試薬にPSQ HS 96 Gold single-nucleotide polymorphism reagents、パイロシークエンス解析装置(PyroMark Q24, Biotage, Uppsala, Sweden)を用いて各遺伝子のプロモーター領域CpGサイトのメチル化レベルを定量的に解析した(Colella et al., 2003; Watanabe et al., 2009; Yamamoto et al., 2016)。
得られた複数のCpGサイトにおけるメチル化されたシトシンの割合は、その近傍の割合と近似しており、その領域の平均メチル化されたシトシンの割合を算出することにより最終的なメチル化レベルとした。解析におけるコントロールには、複数健常人血液より抽出したDNAのミックス(ネガティブコントロール)および、このDNAをSssI処理したDNA(ポジティブコントロール)を用いて比較検証を行った。

表1. パイロシークエンス時のプライマー配列情報および条件

Gene Name	Location	Primer		PCR amplicon Temp	(bp)	CG sites
miR-124a-3	**Chr 8**	sense	GGAAAGGGGAGAAGTGTG	60c (35)	64	3
		anti-sense	CTCAACCRACTATACTATCCCAATC			
		sequence	AGAAGTGTGGGTTTT			
EMX1	**Chr 2**	sense	GGAAATTYGTTGGGTATTGAAGGAT	60c (35)	135	10
		anti-sense	CCCAACCCAAAAACCTAAC			
		sequence	ATTTTGTAGYGTTGTTGTTT			
NKX6-1	**Chr 4**	sense	GGGTGAGTTTATTGAAGATAGTTTAG	60c (35)	201	4
		anti-sense	TATCCCTTCATCTCACTCTTCTCC			
		sequence	TTTTGGGGGTTGGTA			

評価項目

主要評価項目

① MGC groupにおける除菌前後の背景胃粘膜メチル化レベル(他群との比較)

副次的評価項目

① 累積胃癌発生率および各群における患者背景の違い(内視鏡的萎縮、組織学的胃炎含む)
② 各群における胃粘膜メチル化レベルの除菌前後の変化
③ 除菌後に2回以上異時性胃癌が発生した症例におけるメチル化レベルの経時的変化
④ 胃粘膜メチル化レベルと組織学的胃炎 (updated Sydney system)との相関

統計

累積胃癌発生率は、Kaplan-Meier method を用いて解析した。メチル化レベル、年齢、期間などの連続変数は、Student's t-test または paired t-test を用いて比較した。組織学的胃炎の USS スコアは、Mann-Whitney U test または Wilcoxon's rank-sum test を用いて比較した。メチル化レベルと USS スコアとの相関関係は、Spearman's rank correlation coefficient.を用いて解析した。各サンプルの 3 つの遺伝子のメチル化レベルを正規化するために、Z-score 解析を用いた。各遺伝子の Z-score は以下のように算出した。

Z-score = (各サンプルのメチル化レベル - メチル化レベルの平均値)/メチル化レベルの標準偏差

各解析における P 値が < 0.05 の場合、統計的に有意であるとみなした。全ての分析は EZR software (Saitama Medical Center、Jichi Medical University、Saitama、Japan) を用いて行った(Kanda, 2013)。

結果

対象

2004 年 1 月～2018 年 12 月の期間、当施設で胃 ESD/EMR を施行した患者は 826 名であった。初回 ER 時に *H. pylori* 陰性や追加外科切除が施行された者等を除外し初回 ER 時に *H. pylori* 現感染であった者は 400 名であった。その中で、ER 後に *H. pylori* 除菌療法に成功し 1 年以上内視鏡フォローされた症例は 184 名いた。

184 名における累積胃癌発生率を図 7 に示す。累積胃癌発生率は除菌 5 年後で 19.7%除菌 10 年後で 31.0%であった。

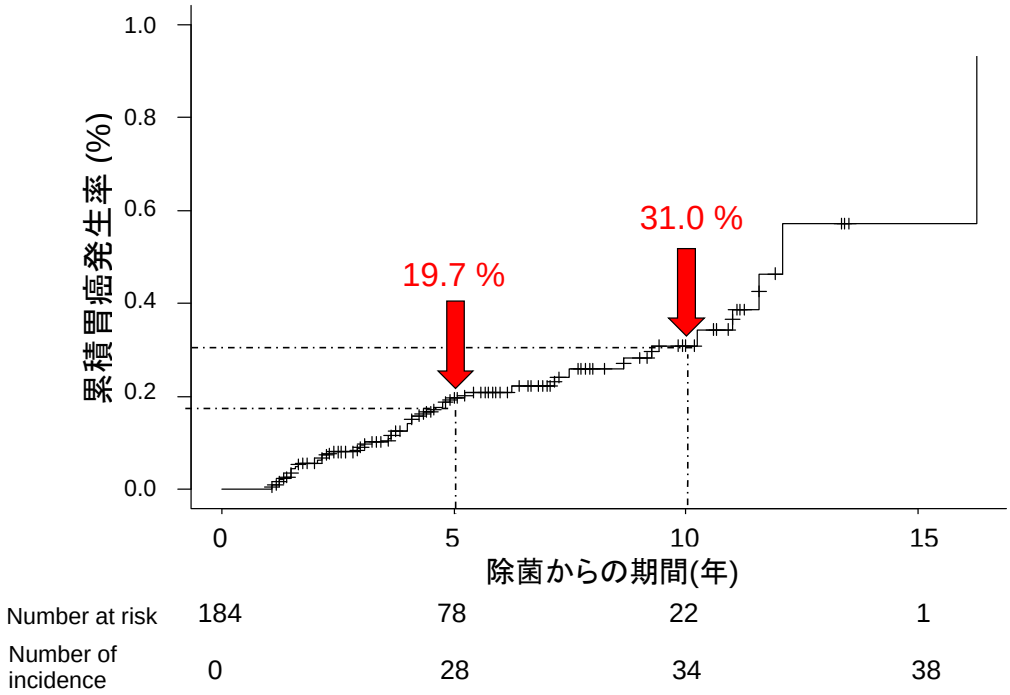


図 7. 除菌後累積胃癌発生率

除菌後のフォロー期間が 5 年未満の者 78 名、局所再発した者 2 名を除外し、除菌後に 1 回以上異時性胃癌が発生した症例は 38 名、除菌後 5 年以上異時性胃癌が発生しなかった症例は 66 名いた。その中で、適切に生検検体が採取されていなかったもしくは検体量が非常に少なく解析において不適切と判断した症例を除外し、MGC group の条件を満たす症例は 25 名、Non-MGC group の条件を満たす例は 17 名であった。

なお、胃癌の既往がなく *H. pylori* 陽性で除菌療法に成功し、除菌後も 5 年以上胃癌が発生しなかった症例は当院では 135 名いた。その中で、MGC group と性別・年齢を一致させた 29 名をコントロール群(HP group)とした(図 8)。

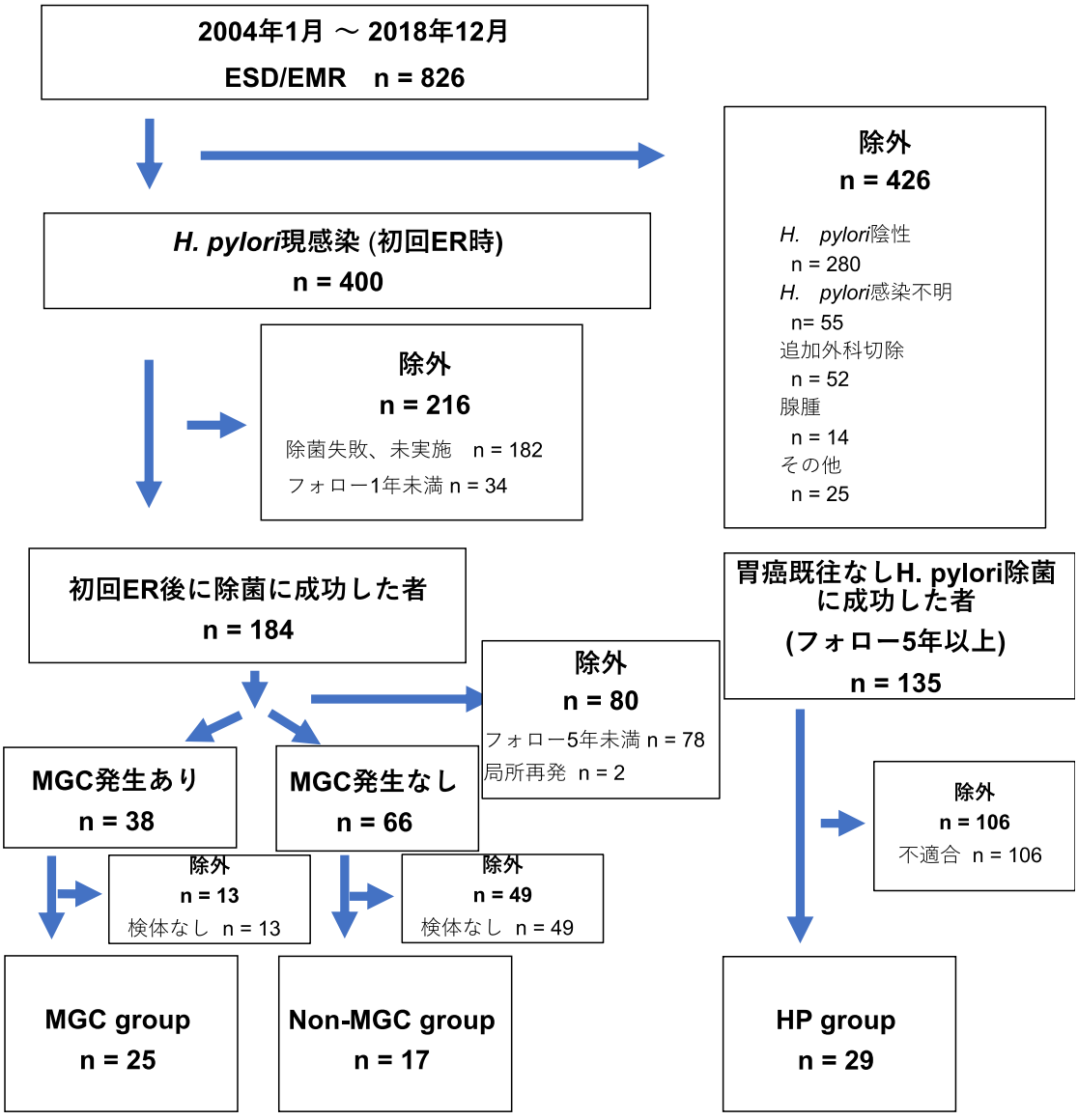


図 8. 研究対象者のフローチャート

患者背景

各群における患者背景を表 2 に示す。MGC group は男性 21 名(84%)、除菌時平均年齢は 70.8 歳であった。除菌前に癌が多発していた症例は 8 名(32%)であり、Non-MGC group 0 名と比較し有意に多かった(P = 0.01)。内視鏡的な萎縮は、MGC group で除菌前に 20 名(80%)、除菌 5 年後で 13 名(52%)に高度な萎縮を認めた。
除菌前多発癌の項目以外では、3 群間で有意差は認めなかった。

表 2. 患者背景

	HP group N = 29	Non-MGC group N = 17	MGC group N = 25
性別, 男性: 女性	22: 7	14: 3	21: 4
初回 ER 時の年齢, 平均 ± 標準偏差, 年	−	66.2 ± 8.8	69.3 ± 6.9
除菌年齢, 平均 ± 標準偏差, 年	67.5 ± 5.5	66.8 ± 8.9	70.8 ± 7.0
除菌後フォローアップ期間, 平均 ± 標準偏差, 月	83.2 ± 18	102.5 ± 29	97.4 ± 37
初回 ER 時から除菌後サンプリングまでの期間, 平均 ± 標準偏差, 月	−	67.9 ± 10.2	83.8 ± 44.3
初回 ER 時から除菌後サンプリングまでの期間, 平均 ± 標準偏差, 月	61.1 ± 2.7	62.2 ± 3.6	67.0 ± 37.2
喫煙, n (%)	12 (41.4)	7 (41.2)	12 (48.0)
飲酒, n (%)	7 (24.1)	3 (17.6)	8 (32.0)
胃癌の家族歴, n (%)	2 (6.9)	4 (23.5)	6 (24.0)
除菌前多発胃癌, n (%)	-	0	8 (32.0) †
除菌前内視鏡的萎縮 Mild/ Moderate/ Severe	6/ 7/ 16	1/ 2/ 14	2/ 3/ 20
除菌 5 年後内視鏡的萎縮 Mild/ Moderate/ Severe	7/ 10/ 12	1 /6/ 10	2 /9/ 13

†Non-MGC group vs MGC group, P = 0.01

組織学的胃炎の評価

除菌前の Neturo スコアは MGC group で HP group と比較し有意に低値であった(0.63 ± 0.82, 1.54 ± 0.88, $P < 0.001$)。除菌前の Atrophy および IM スコアは、MGC group で HP group と比較し有意に高値であった(Atrophy：1.66 ± 0.98, 0.95 ± 0.67, $P = 0.01$, IM：1.21 ± 1.18, 0.54 ± 0.88, $P = 0.03$)。除菌後では Mono、Neutro、Atrophy スコアは 3 群間で有意な差は見られなかったが、IM スコアは MGC group で HP group と比較し有意に高値であった(1.42 ± 1.21, 0.45 ± 0.78, $P = 0.02$)。除菌前後で比較した場合、全ての群で Mono スコアと Neutro スコアで除菌後に有意な低下を認めた。Atrophy および IM スコアは除菌前後で有意差は認めなかった。

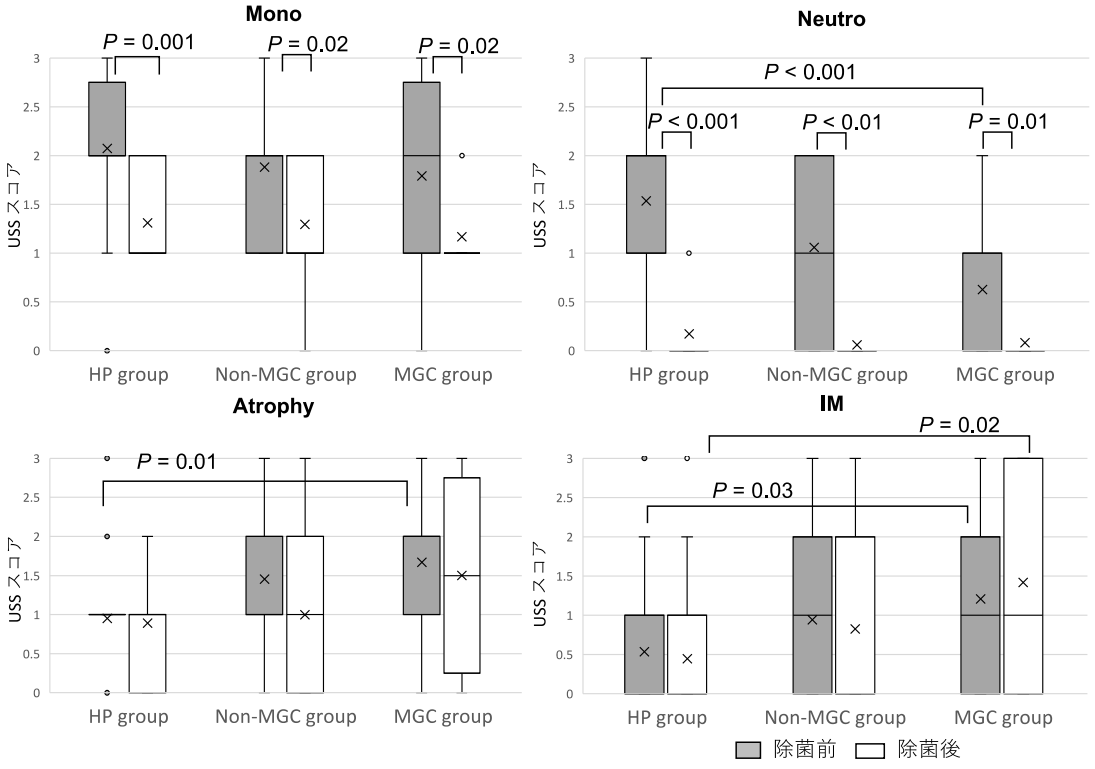


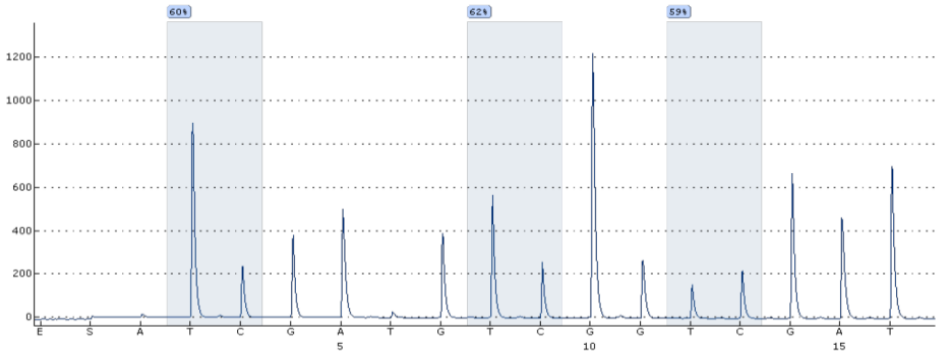
図 9. 除菌前後の組織学的胃炎の変化

主に炎症を反映する Mono スコア、Neutro スコアはいずれの群も除菌後に平均値は有意に改善した。除菌前において Mono スコアは有意差を認めなかったが、Neutro スコアは Hp group と比較し MGC group は有意に低値であった。Atrophy/IM スコアは除菌前後でどの郡も有意な変化はなかったが、除菌前の Atrophy において MGC group の平均値は HP group よりも有意に高値であった。IM スコアは除菌前後とも MGC group の平均値が HP group よりも有意に高値であった。

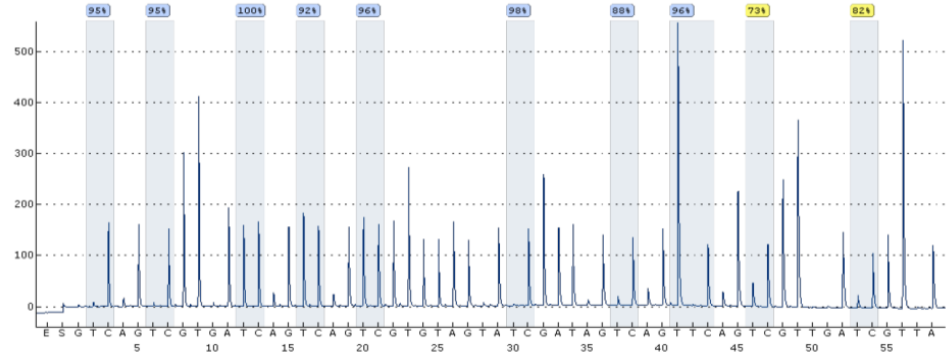
DNA メチル化解析

図 10 はメチル化測定の Pyrogram、図 11 は各群の除菌前後のメチル化レベルの変化を示す。HP group では、miR-124a-3 と EMX1 遺伝子の平均メチル化レベルが除菌後に有意に低下した(miR-124a-3：32.9 ± 9.5%→24.6 ± 10.7%, $P < 0.01$、EMX1：29.2 ± 16.2%→21.7 ± 5.4%, $P = 0.03$)。Non-MGC group では、miR-124a-3 遺伝子の平均メチル化レベルのみが有意に低下した(37.9 ± 11.7%→29.4 ± 14.6%, $P < 0.01$)。MGC group では、NKX6-1 の平均メチル化レベルが除菌後に上昇した(33.8 ± 13.2%,→36.9 ± 15.9%, $P = 0.04$)。3 遺伝子の Z-score 平均値は、HP group では除菌後に低下したが(0.13±0.59→-0.31 ± 0.56, $P < 0.01$)、MGC group では上昇した(-0.12 ± 0.71→0.30 ± 0.78, $P = 0.03$)。除菌前の各遺伝子のメチル化レベルと Z-score は、3 群間で有意な差は認めなかった。*H. pylori* 除菌後の miR-124a-3 と EMX1 の平均メチル化レベルと Z-score は、MGC group が HP group でより有意に高値であった(各々$P < 0.01$)。

miR-124a-3



EMX1



NKX6-1

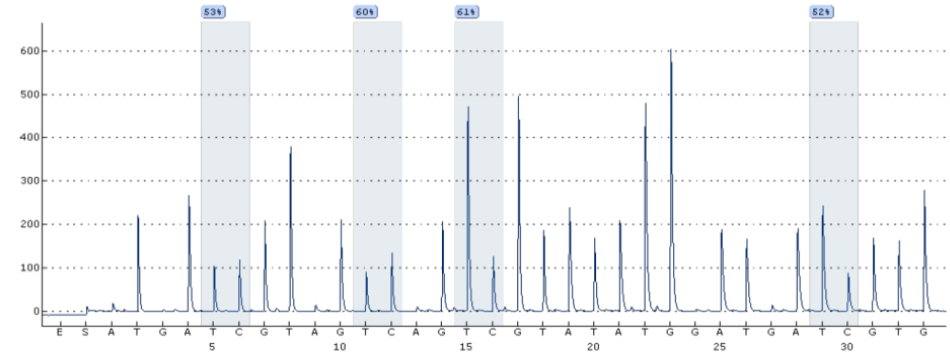


図 10. Pyrogram

実際に測定された Pyrogram の例である。得られた複数の CpG サイトにおけるメチル化されたシトシンの割合は、その近傍のメチル化の割合と近似しており、その領域の平均メチル化値を算出することにより最終的なメチル化レベルとした。

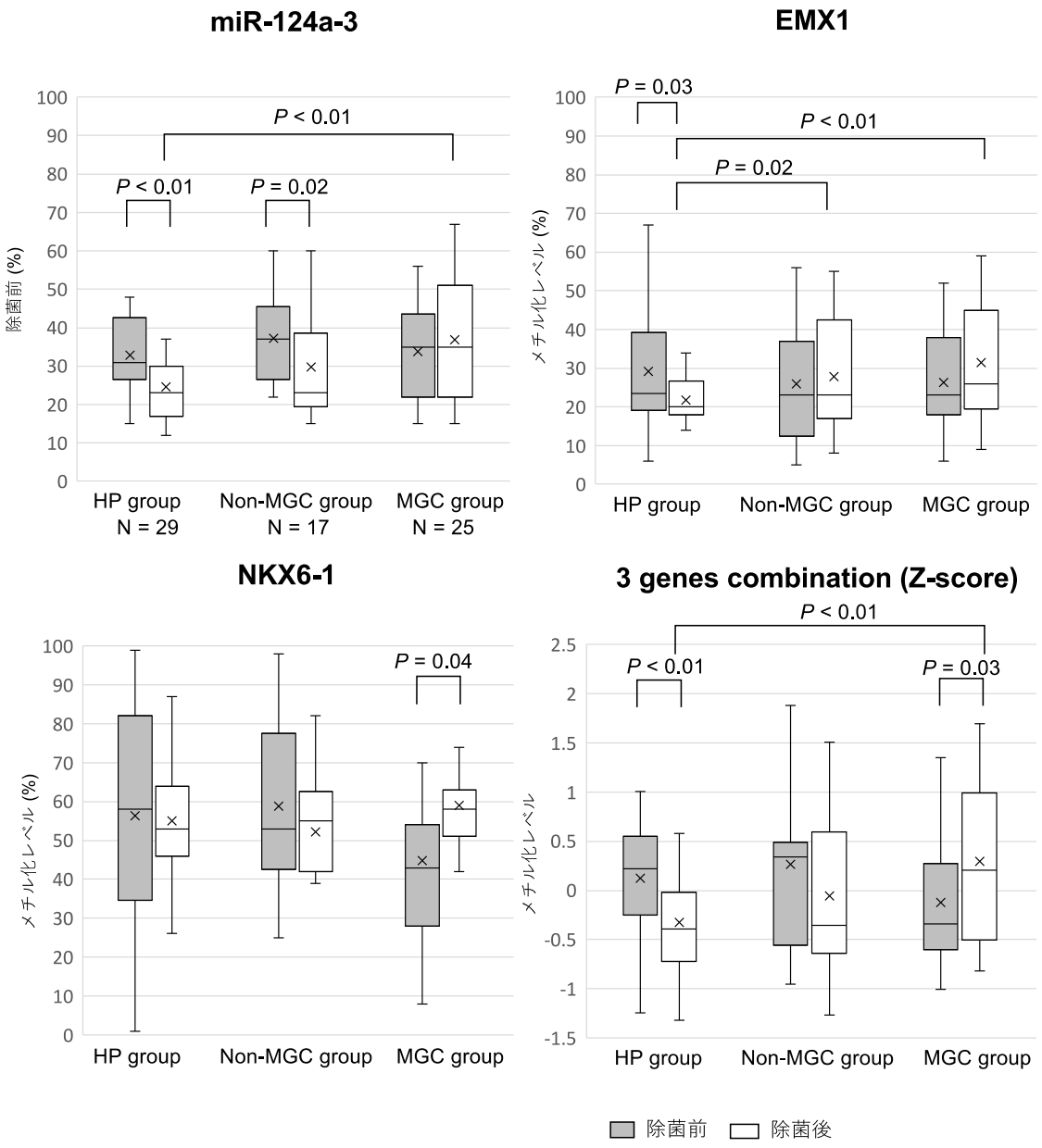


図 11. 除菌前後のメチル化レベルの変化

除菌前はどの遺伝子においても 3 群間でメチル化レベルに有意差はなかったが、除菌後は miR-124a-3 および EMX1 遺伝子において HP group と比較し MGC group の平均値は高値であった。各遺伝子のメチル化レベルを Z-score に変換し、3 遺伝子の Z-score 平均値では HP group は除菌後に低下、MGC group では除菌後に上昇、除菌後の平均値は MGC group が HP group と比べ高値であった。

同一症例におけるメチル化レベルの除菌前後の変化

個々の症例における除菌前後のメチル化レベルの変化を図 12 に示す。同一症例内で除菌前と比べて除菌後に miR-124a-3 遺伝子のメチル化レベルが低下した症例は、HP group 24 症例(83%)、Non-MGC group 12 症例(71%)、MGC group 12 症例(48%)であり、MGC group は HP group と比較し低下した症例の割合が有意に少なかった($P < 0.01$)。EMX1 および NKX6-1 遺伝子のメチル化レベルが低下した症例は、MGC group では各々9 症例(36%)、6 症例(26%)であり、他の群と比べ改善した割合に有意な差は見られなかった。

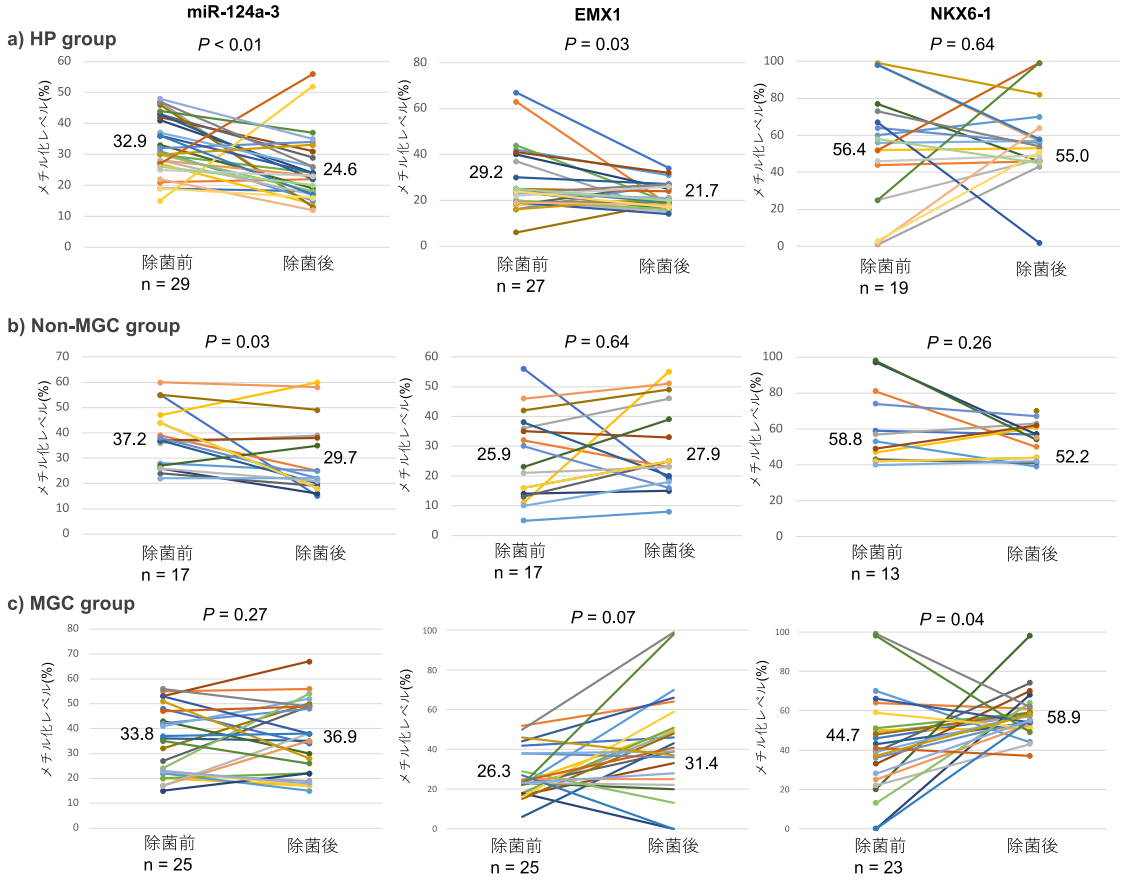


図 12. 各症例における除菌前後のメチル化レベルの変化

メチル化レベルが測定できなかった症例は除外している。数値はメチル化レベルの平均値を示す。

a)HP group：miR-124a-3 および EMX1 遺伝子ではメチル化レベルは除菌後に有意に低下した。

b)Non-MGC group：miR-124a-3 遺伝子ではメチル化レベルは除菌後に有意に低下した。

c)MGC group：NKX6-1 遺伝子ではメチル化レベルは除菌後に有意に増加した。

表 3. 除菌後にメチル化レベルが増加・減少した割合

	HP group N = 29	Non-MGC group N = 17	MGC- group N = 25	P 値 HP group vs MGC group	P 値 Non-MGC group vs MGC group	P 値 HP group vs Non-MGC group
miR-124a-3						
減少	24 (83%)	12 (71%)	12 (48%)	< 0.01	0.21	0.46
増加	5 (17%)	5 (29%)	13 (52%)			
除外	0	0	0			
EMX1						
減少	18 (67%)	6 (35%)	9 (36%)	0.051	1	0.06
増加	9 (33%)	11 (65%)	16 (64%)			
除外	2	0	0			
NKX6-1						
減少	8 (42%)	7 (54%)	6 (26%)	0.34	0.15	0.72
増加	11 (58%)	6 (46%)	17 (74%)			
除外	10	4	2			

除菌前後で正確なメチル化レベルの値が検出されなかった症例は除外している。

異時性胃癌多発症例におけるメチル化レベルの経時的変化

MGC group の中で、除菌後に 2 回以上異時性胃癌が発生した症例のメチル化レベルの変化を検討した。該当する症例は 6 名いた。図 13 は 6 名における異時性胃癌が発生した時の胃粘膜メチル化レベルをプロットしたものである。いずれの遺伝子において除菌後経時的にメチル化レベルは上昇傾向であった。6 名のうち、4 名がフォロー期間中に 3 遺伝子の Z-score 平均値が上昇傾向であった。

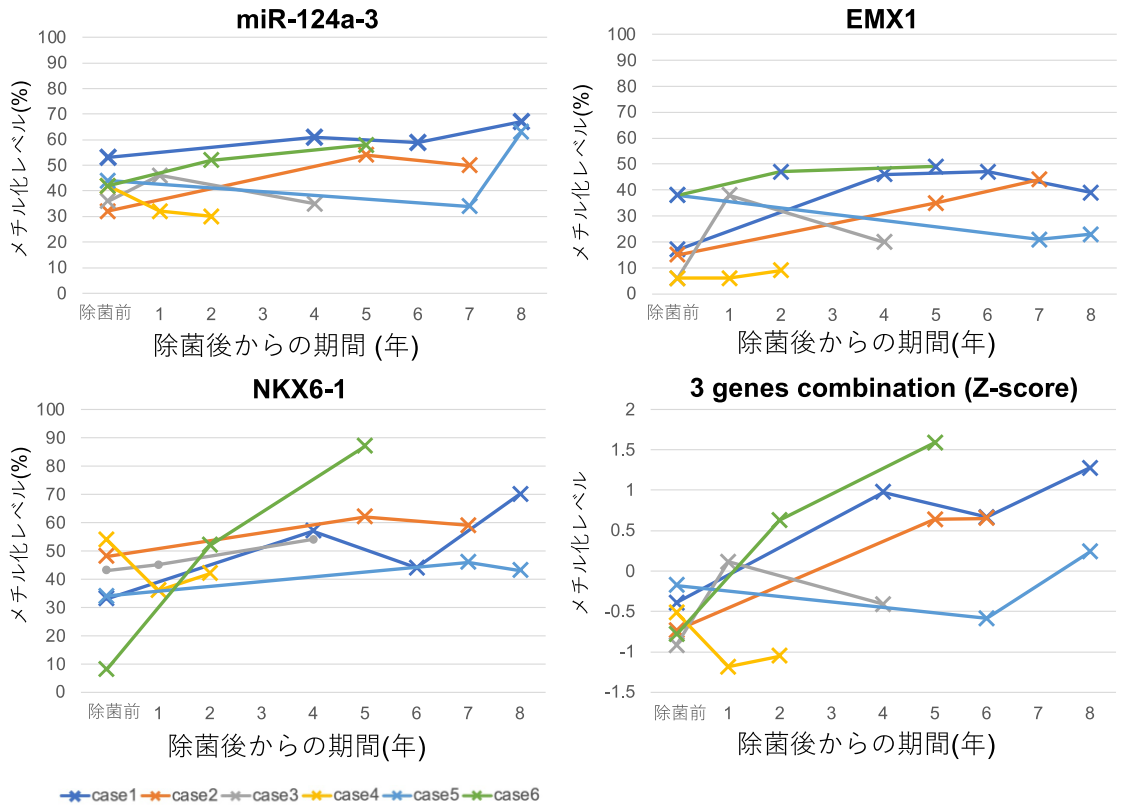


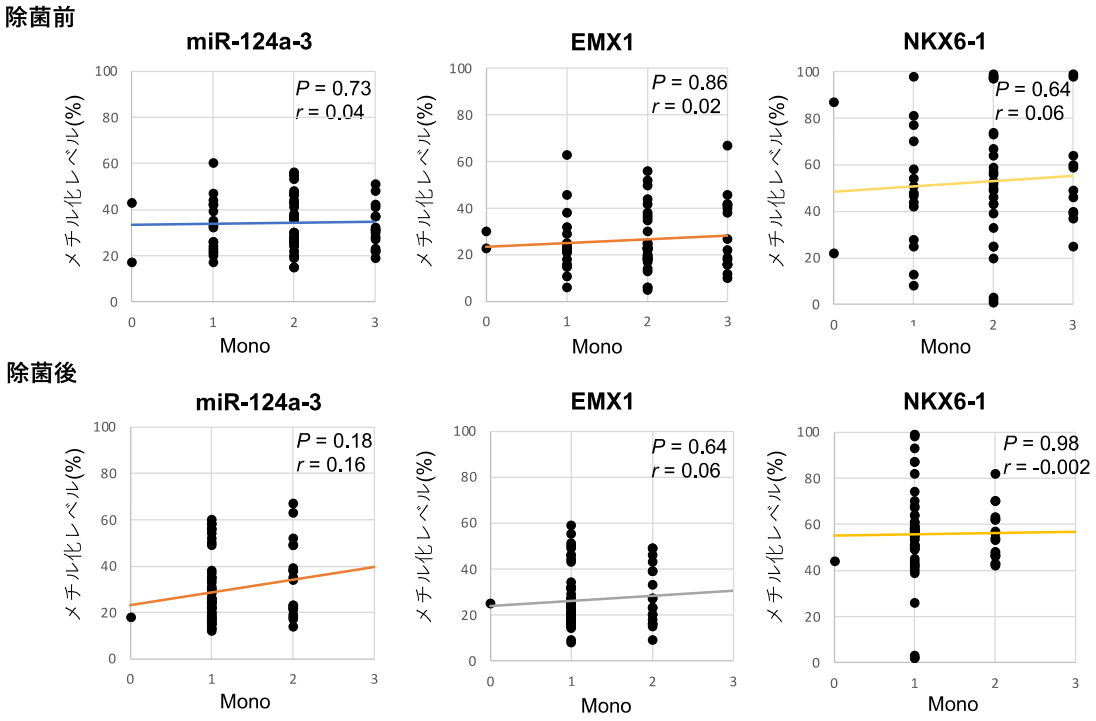
図 13. 除菌後に 2 回以上異時性胃癌が発生した症例のメチル化レベルの経時的変化
除菌後のメチル化レベルは異時性胃癌発生時の値を示す。3 遺伝子の Z-score 平均値は 6 名中 4 名が除菌後経時的にメチル化レベルが上昇した。

組織学的胃炎と DNA メチル化レベルの相関

Neutro スコアおよび Mono スコアに関しては除菌前後ともにいずれの遺伝子においても胃粘膜の DMA メチル化レベルと相関性はみられなかった。

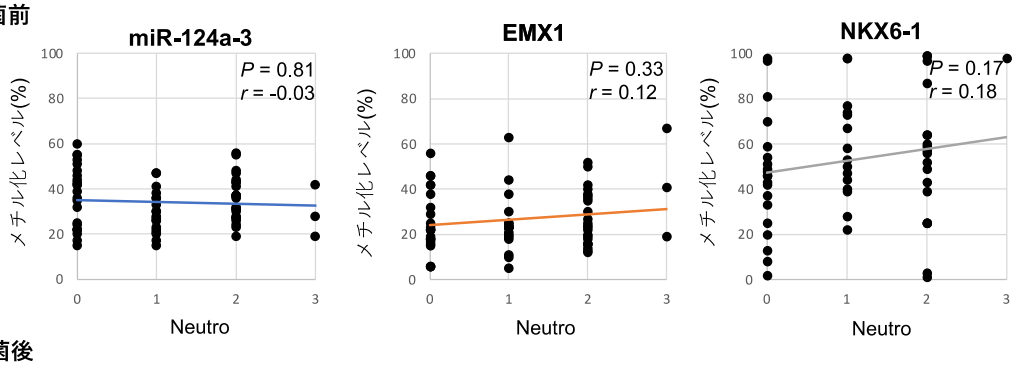
miR-124a-3 遺伝子のメチル化レベルと除菌前後の Atrophy および IM スコアでは全て正の相関性がみられ、特に除菌後の IM スコアでは強い正の相関性がみられた($P < 0.01$, $r = 0.82$)。また、EMX1 遺伝子のメチル化レベルでは、除菌後の Atrophy および IM スコアと中程度の相関を示した($P < 0.001$, $r = 0.64$: $P < 0.001$, $r = 0.59$)。NKX6-1 遺伝子のメチル化レベルは除菌後の IM スコアとのみ正の相関がみられた($P < 0.001$, $r = 0.40$)。

a) Monoとメチル化レベルの相関

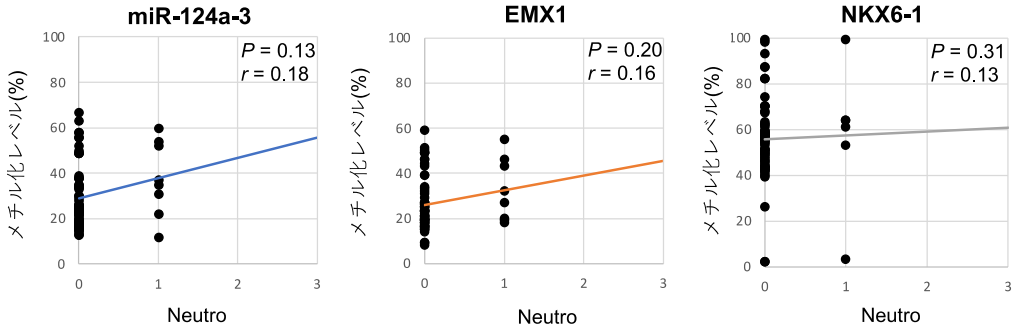


b) Neutroとメチル化レベルの相関

除菌前

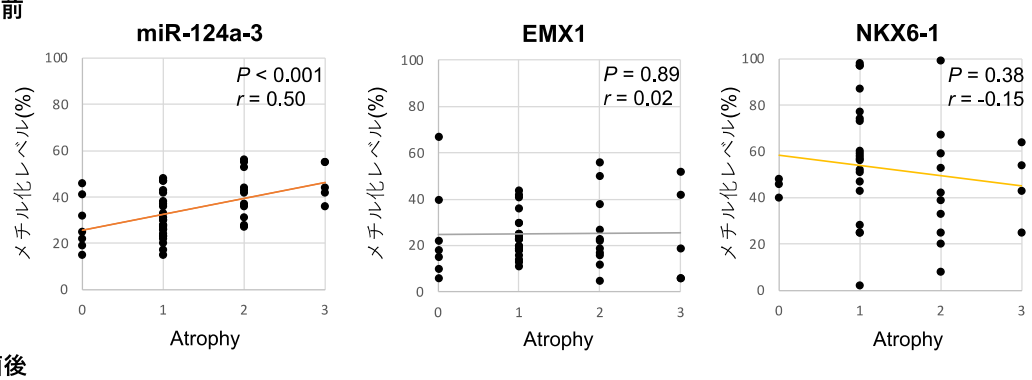


除菌後

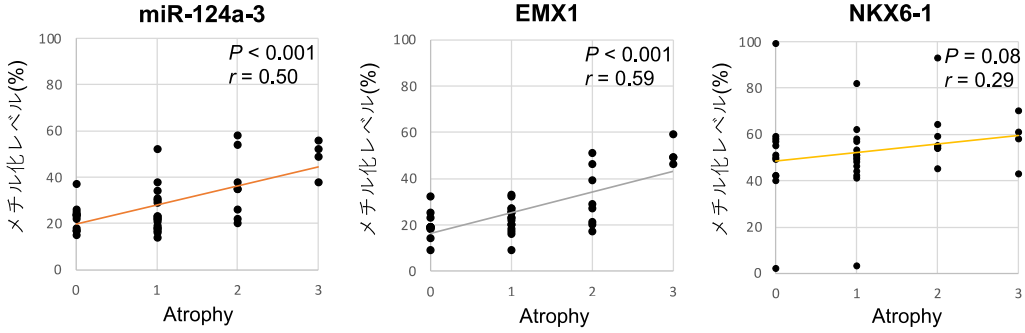


c) Atrophyとメチル化レベルの相関

除菌前



除菌後



d) IMとメチル化レベルの相関

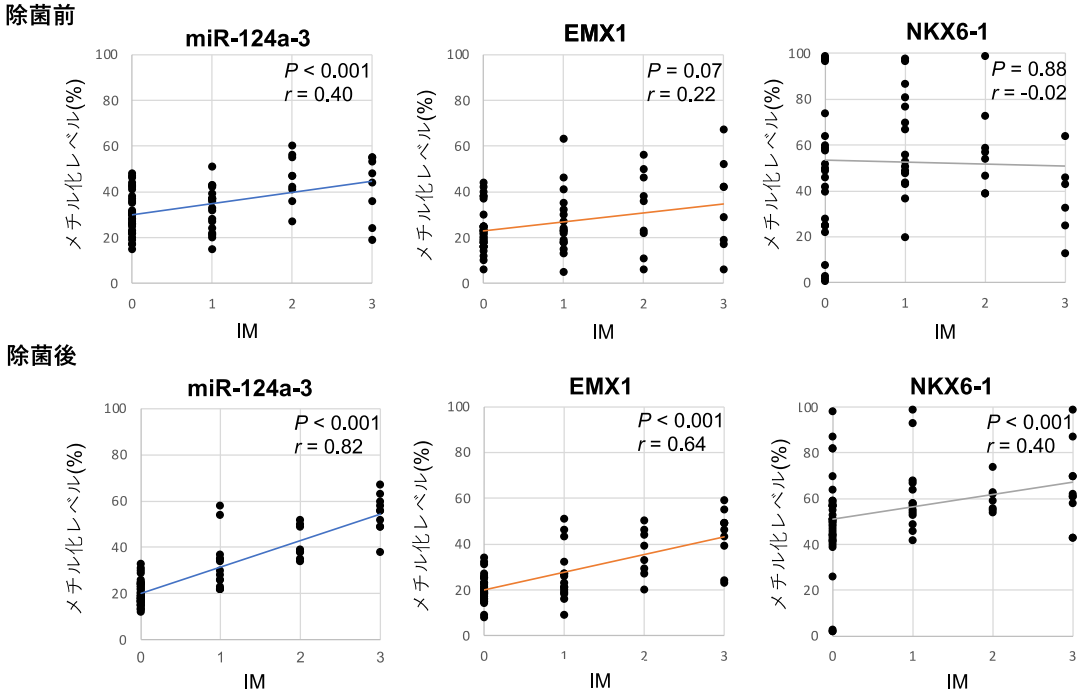


図 14.　組織学的胃炎と胃粘膜メチル化レベルの相関

a) Mono(単核球浸潤)とメチル化レベルの相関：除菌前後で有意な相関性はみられなかった。

b) Neutro(好中球浸潤)とメチル化レベルの相関：除菌前後で有意な相関性はみられなかった。

c) Atrophy とメチル化レベルの相関：除菌前では miR-124a-3 遺伝子、除菌後では miR-124a-3 および EMX1 遺伝子において正の相関性がみられた。

d) IM とメチル化レベルの相関：除菌前では miR-124a-3 遺伝子、除菌後では 3 遺伝子全てにおいて正の相関性がみられた。

考察

本研究において異時性胃癌が発生する症例は患者背景として、除菌前に胃癌が多発していた。また、組織学的な胃炎の変化に関する検討において、単核球・好中球はいずれの群においても除菌により有意にスコアの改善が得られ、炎症の改善に関しては差が見られなかった。しかし、好中球スコアは、除菌前MGC groupではHP groupよりも低値であり、除菌前の萎縮・腸上皮化生スコアはMGC groupがHP groupよりも高値であった。これらの結果は、MGC groupでは除菌前の段階ですでに炎症は消退し、萎縮・腸上皮化生へと進行し、胃癌が発生する母地が完成している状態であることが示唆された。

胃粘膜のDNAメチル化異常の検討において、除菌後に胃癌が発生しなかった群(HP group、Non-MGC group)では除菌後、メチル化レベルは低下したが、異時性胃癌が発症したMGC groupでは*H. pylori*除菌後に胃粘膜のメチル化異常が長期的に改善しなかった。また、除菌前は胃粘膜のメチル化レベルに差はみられなかったが、除菌後はMGC groupはHP groupよりもメチル化レベルが高くなっていた。
除菌前のメチル化異常は、炎症などの一時的な要因と慢性胃炎などの永続的な要因の両方を反映していることが報告されており、除菌前のメチル化レベルは必ずしも胃癌リスクと関連しないとされている。本検討の結果も除菌前の胃粘膜のメチル化レベルでは除菌後の胃癌発がんの予測は困難であり既報と一致する(Asada et al., 2015; Ushijima et al., 2006)。

一方で、除菌後のメチル化レベルは異時性胃癌発生と関連性があった。*H. pylori*除菌後の高いメチル化レベルは、異時性胃癌の危険因子の一つであること(Asada et al., 2015; Maeda et al., 2017, Maekita et al., 2006; Shin et al., 2013; Suzuki et al., 2014)、*H. pylori*の除菌はメチル化レベルを減少させ、発癌を抑制することが報告されている(Chan et al., 2006; Leung et al., 2006; Nakajima et al., 2010)。除菌成功後にメチル化異常が改善せずメチル化レベルが高い状態が長期間持続することは、異時性胃癌発生のリスク要因となると考えられた。とくに、除菌後に2回以上異時性胃癌が発生した症例では除菌後も経時的にメチル化レベルが上昇傾向であることが確かめられた。

除菌後にメチル化異常が改善するメカニズムは未だ明らかとなっていないが、以下のように推測されている(Maeda et al., 2017b; Ushijima et al., 2006)。まず、*H. pylori*の感染により、分化した細胞のメチル化が主に誘導される。*H. pylori*除菌後、メチル化した分化した細胞は時間の経過とともに脱落し、メチル化していない幹細胞由来の正常な分化した細胞に置き換わり、除菌後のメチル化は改善する。一方、

幹細胞がメチル化されている場合、腺管全体はその幹細胞のメチル化状態を反映しており、幹細胞のメチル化状態は保存され複製されるため、その腺管内の分化細胞のメチル化は除菌後も改善しない。そのため、除菌後もメチル化異常が一定のレベルで残存する。除菌後に異時性胃癌が発生した症例では、除菌前に多くの幹細胞がメチル化されており、*H. pylori* 除菌後もメチル化された幹細胞からの細胞分化が続くため、除菌後もメチル化が改善されない可能性がある

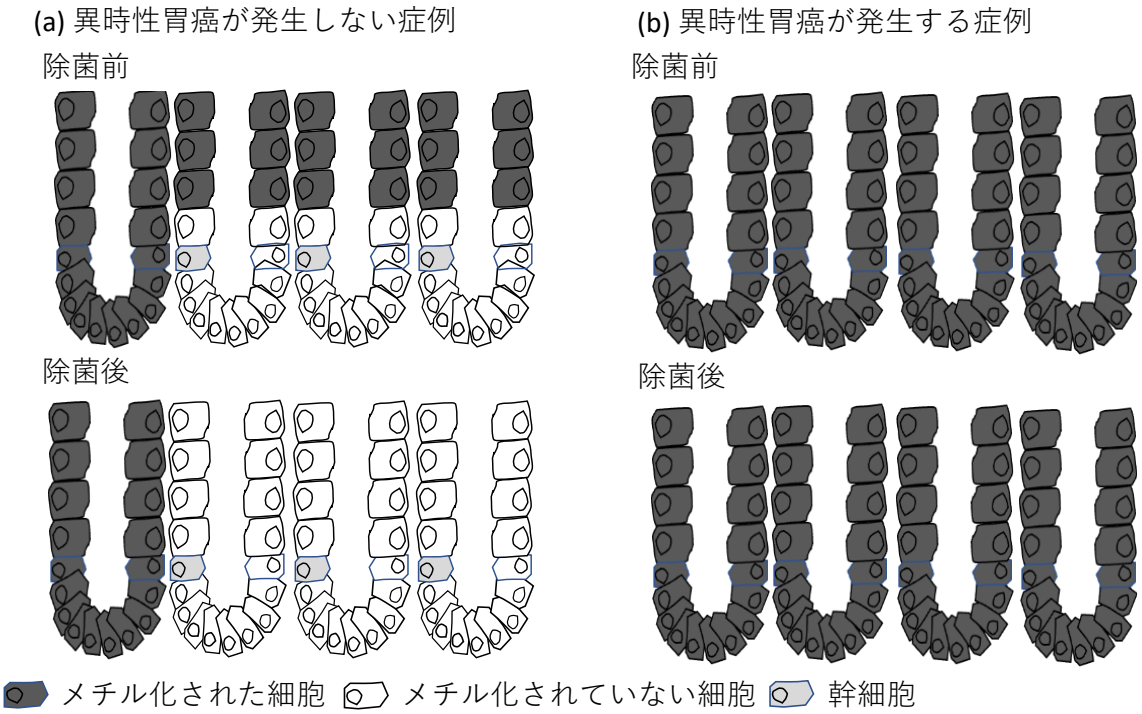


図 15. *H. pylori* 除菌後にメチル化異常が改善する機序
(a)除菌後に異時性胃癌が発生しない症例は、メチル化された分化細胞が時間とともに脱落し、正常な幹細胞からメチル化されていない分化細胞が再生し、メチル化異常が改善する。
(b)除菌後に異時性胃癌が発生する症例は、除菌前に多くの幹細胞がメチル化されており、その腺管は除菌後もメチル化異常が維持されるため、メチル化異常が改善しない。

しかし、異時性胃癌を繰り返す患者ではメチル化レベルが除菌後も上昇する傾向があり、上記の機序のみでは *H. pylori* が消失しているにもかかわらずメチル化異常が蓄積される原因としては説明がつかない。*H. pylori* 以外にも年齢、胃癌の家族歴、喫煙が胃粘膜のメチル化異常と関連していることが報告されている(Kim et al.,

2021; Shimazu et al., 2015; Yamashita et al., 2019)。

H. pylori が DNA をメチル化する分子的機序として、*H. pylori* が Cag A(Cytotoxin-associated gene A)や Vac A(Vacuolating cytotoxin A)などの分子を胃上皮細胞内に注入し、慢性炎症の要因である炎症細胞から IL-1β (interleukin 1 beta)、Nos2(nitric oxide synthase 2)、TNF-α(Tumour Necrosis Factor alpha)等の分子が発現し、これにより上皮細胞で NF-κB(nuclear factor-kappa B)が活性化され、種々の DNA メチル化異常が引き起こされることが知られている(Keun et al., 2011; Takeshima et al., 2020)。DNA メチル化を促進する遺伝子として、DNA methyltransferase (DNMT)遺伝子群などが報告されているが、現状では *H. pylori* 感染による胃腺窩上皮細胞での DNA メチル化異常の機序は明らかではない(Pan et al., 2016)。組織学的な炎症は MGC group では除菌前に少ない傾向にあったが、分子機序としてメチル化誘導分子の発現に違いがあった可能性も考えられる。

Wong らは、*H. pylori* 関連胃炎がある程度の程度に達すると、*H. pylori* 除菌の効果が減少するという「Point of no return」という概念を提唱している(Wong et al., 2004)。また、Kiriyama らは、*H. pylori* の除菌を行っても、腸上皮化生による粘膜の損傷は組織学的には「Point of no return」で正常な胃型粘膜に回復しない可能性があると述べている(Kiriyama et al., 2016)。特に胃粘膜の miR-124a-3 遺伝子のメチル化レベルは除菌後の腸上皮化生と正の相関があった。これらの結果は、除菌後の萎縮や腸上皮化生が、エピジェネティックな変化に応じて発がんと関連していることを支持していると考えられる。また、今回の結果は、異時性胃癌が発生した症例では、組織学的にも遺伝子学的にも粘膜の損傷が除菌をしても改善されないところまで蓄積していることを示している。

本研究の limitation として、第一に本研究はサンプル数の少ない単施設後方視的検討であることがあげられる。第二に、胃粘膜の DNA メチル化異常および組織学的胃炎は、前庭大彎の 1 箇所のみで評価している。生検組織は内視鏡所見によらず定点で生検された検体を使用しているが、得られた組織に選択バイアスが存在する可能性がある。また繰り返す異時性胃癌 6 名を除く症例は除菌後のメチル化異常と組織学的胃炎は 1 時点でのみで評価したことが挙げられる。しかし、これまでの研究では、個々のメチル化異常のデータは経時的測定はされておらず、観察期間も除菌後数年と短期間の検討が多い(Michigami et al., 2018; Shin et al., 2013)。今回の研究の強みは、除菌成功後の長期的なメチル化レベルおよび組織像の変化を検討したことである。第三に、メチル化測定には上皮細胞だけではなく炎症細胞を含む全ての生検組織を使用し解析を行った。炎症細胞のメチル化異常も共に検出されている可能性はあるが、本検討ではメチル化レベルと組織学的な炎症に関してはいずれの遺伝子においても相関

性はなかった。また除菌後では炎症はいずれの群においてもほとんど消失していたため、特に除菌後の上皮細胞のメチル化異常解析に対して大きく影響はしていないと考える。最後に、本検討ではコントロール群(Non-MGC group、HP group)を、除菌後5年以上胃癌を発生していない患者とした。除菌後5年以上経過してから胃癌が発見された例も報告されているが、本検討の対象者は除菌成功後も年1回の内視鏡検査を継続しており、現在までに胃癌の発生がないことを遡及的に確認している(Choi et al., 2018; Take et al., 2011)。今後、多施設での大規模なサンプルサイズを用いたさらなる研究を行う必要がある。

結論として、*H. pylori*除菌後に異時性胃癌が発生した症例は、除菌後長期経過しても胃粘膜のメチル化レベルは改善していなかった。また、*H. pylori*除菌後の胃粘膜に高レベルの異常なDNAメチル化が残存していることは、不可逆性で高度な萎縮と腸上皮化生を反映し、長期的な異時性胃癌の発生と関連していた。

結論

本研究では以下の知見が得られた。

1) 早期胃癌内視鏡的治療後に *H. pylori* 除菌に成功した後に異時性胃癌が発生した症例は、除菌前に胃癌が多発している特徴がみられた。

2) 異時性胃癌が発生した症例は、除菌前に組織学的好中球・単核球浸潤といった炎症は消退していたが、高度な萎縮性胃炎・腸上皮化生へとすでに進展していた。

3) 異時性胃癌が発生した症例の胃粘膜の DNA メチル化レベルは、除菌後長期間を経ても低下しない、あるいは上昇していた。特に、2回以上異時性胃癌が発生した症例はメチル化レベルが除菌後も経時的に上昇していた。

4) 胃粘膜のメチル化レベルは、組織学的萎縮・腸上皮化生と正の相関がみられ、特に除菌後では強い相関がみられた。

今後の展望

除菌後異時性胃癌が発生する病態の解明には、症例の蓄積とメチル化異常に関連する分子の発現の違いなど、さらなる分子生物学的な検討が必要と考える。

H. pylori 除菌が慢性胃炎に保険適用され、多くの人が早期に除菌治療を受けられるようになった。胃癌発生のリスクは減ってきているものの、除菌後に発生する胃癌に対する内視鏡サーベイランスは推奨される。一方で、毎年の内視鏡検査は患者および内視鏡医の負担が大きく、胃癌リスクの層別化も必要である。近年、胃粘膜に蓄積した DNA メチル化異常を測定することで発癌リスク診断が可能であることが示されている(Asada et al., 2015)。また、内視鏡的生検検体だけではなく、内視鏡検査時に回収できる胃洗浄廃液から上皮細胞のメチル化異常を測定することで早期胃癌の有無が測定できることも報告されている(Oishi et al., 2012)。このように胃粘膜のメチル化は病態の解明のみならず、早期診断や再発予測のマーカーとして利用可能で、今後は異時性胃癌の発生予測に簡便な方法として臨床応用されることが期待される。

謝辞

本研究の機会を与えて下さった、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室　坂本直哉教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行する貴重な機会を与えていただき、研究方法の指導から論文作成まで、御指導・御支援を賜りました、北海道大学病院光学医療診療部　小野尚子准教授に心より感謝申し上げます。

本検討の実施に関連して検討内容に関する助言やご協力をいただいた総合川崎臨港病院/ 聖マリアンナ医科大学　消化器科・肝臓内科　渡邉嘉行先生、聖マリアンナ医科大学　バイオインフォマティクス学　山本博行先生、聖マリアンナ医科大学消化器科・肝臓内科　及川律子先生に深く御礼申し上げます。

また、本研究を支えて下さった消化器内科学分野の皆様に感謝申し上げます。

2022 年 3 月
田中　一光

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Asada, K., Nakajima, T., Shimazu, T., Yamamichi, N., Maekita, T., Yokoi, C., Oda, I., Ando, T., Yoshida, T., Nanjo, S., et al. (2015). Demonstration of the usefulness of epigenetic cancer risk prediction by a multicentre prospective cohort study. Gut *64*, 388–396.

Chan, A.O.O., Peng, J.Z., Lam, S.K., Lai, K.C., Yuen, M.F., Cheung, H.K.L., Kwong, Y.L., Rashid, A., Chan, C.K., and Wong, B.C.Y. (2006). Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses E-cadherin promoter hypermethylation. Gut *55*.

Chen, H.N., Wang, Z., Li, X., and Zhou, Z.G. (2016). *Helicobacter pylori* eradication cannot reduce the risk of gastric cancer in patients with intestinal metaplasia and dysplasia: evidence from a meta-analysis. Gastric Cancer *19*, 166–175.

Choi, I.J., Kook, M.-C., Kim, Y.-I., Cho, S.-J., Lee, J.Y., Kim, C.G., Park, B., and Nam, B.-H. (2018). *Helicobacter pylori* Therapy for the Prevention of Metachronous Gastric Cancer . N. Engl. J. Med. *378*, 1085–1095.

Colella, S., Shen, L., Baggerly, K.A., Issa, J.P.J., and Krahe, R. (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing™ methylation analysis of CpG sites. Biotechniques *35*, 146–150.

Correa, P. (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Cancer

Res *52*, 6735–6740.

Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., Correa, P., Batts, K.P., Dahms, B.B., Filipe, M.I., Haggitt, R.C., Haot, J., Hui, P.K., et al. (1996). Classification and grading of Gastritis: The updated Sydney system. Am. J. Surg. Pathol. *20*, 1161–1181.

Ford, A.C., Forman, D., Hunt, R.H., Yuan, Y., and Moayyedi, P. (2014). *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. Bmj *348*, g3174.

Fukase, K., Kato, M., Kikuchi, S., Inoue, K., Uemura, N., Okamoto, S., Terao, S., Amagai, K., Hayashi, S., and Asaka, M. (2008). Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. Lancet *372*, 392–397.

K Hur., T, Niwa., T, Toyoda., T, TsukamotoM, Tatematsu (2011). Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction and involvement of specific types of inflammation. Carcinogenesis *32*, 35–41.

Kimura, K., Satoh, K., Ido, K., Taniguchi, Y., Takimoto, T. (1996). Gastritis in the Japanese stomach. Scand. J. Gastroenterol. Suppl. *214*, 17–20.

Kang, J.M., Kim, N., Shin, C.M., Lee, H.S., Lee, D.H., Jung, H.C., and Song, I.S. (2012).

Predictive factors for improvement of atrophic gastritis and intestinal metaplasia after *Helicobacter pylori* eradication: a three-year follow-up study in Korea. Helicobacter *17*, 86–95.

Kim, H.J., Kim, N., Kim, H.W., Park, J.H., Shin, C.M., and Lee, D.H. (2021). Promising aberrant DNA methylation marker to predict gastric cancer development in individuals with family history and long-term effects of H. pylori eradication on DNA methylation. Gastric Cancer *24*, 302–313.

Kiriyama, Y., Tahara, T., Shibata, T., Okubo, M., Nakagawa, M., Okabe, A., Ohmiya, N., Kuroda, M., Sugioka, A., Ichinose, M., et al. (2016). Gastric-and-Intestinal Mixed Intestinal Metaplasia Is Irreversible Point with Eradication of *Helicobacter pylori*; Open J. Pathol. *06*, 93–104.

Kodama, M., Murakami, K., Okimoto, T., Sato, R., Uchida, M., Abe, T., Shiota, S., Nakagawa, Y., Mizukami, K., and Fujioka, T. (2012). Ten-year prospective follow-up of histological changes at five points on the gastric mucosa as recommended by the updated Sydney system after *Helicobacter pylori* eradication. J. Gastroenterol. *47*, 394–403.

Kuipers, E.J., Uyterlinde, A.M., Peña, A.S., Roosendaal, R., Pals, G., Nelis, G.F., Festen, H.P., and Meuwissen, S.G. (1995). Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. Lancet *345*, 1525–1528.

Lahner, E., Bordi, C., Cattaruzza, M.S., Iannoni, C., Milione, M., Delle Fave, G., and Annibale, B. (2005). Long-term follow-up in atrophic body gastritis patients: atrophy and intestinal metaplasia are persistent lesions irrespective of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther *22*, 471–481.

Lee, Y.C., Chiang, T.H., Chou, C.K., Tu, Y.K., Liao, W.C., Wu, M.S., and Graham, D.Y. (2016). Association Between *Helicobacter pylori* Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology *150*, 1113-1124.e5.

Leung, W.K., Man, E.P., Yu, J., Go, M.Y., To, K.F., Yamaoka, Y., Cheng, V.Y., Ng, E.K., and Sung, J.J. (2006). Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of E-cadherin gene in noncancerous stomach. Clin Cancer Res *12*, 3216–3221.

Maeda, M., Nakajima, T., Oda, I., Shimazu, T., Yamamichi, N., Maekita, T., Asada, K., Yokoi, C., Ando, T., Yoshida, T., et al. (2017). High impact of methylation accumulation on metachronous gastric cancer: 5-year follow-up of a multicentre prospective cohort study. In Gut *66*, 1721–1723.

Maeda, M., Moro, H., and Ushijima, T. (2017). Mechanisms for the induction of gastric cancer by *Helicobacter pylori* infection: aberrant DNA methylation pathway. Gastric Cancer *20*, 8–15.

Maekita, T., Nakazawa, K., Mihara, M., Nakajima, T., Yanaoka, K., Iguchi, M., Arii, K.,

Kaneda, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., et al. (2006). High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. Clin Cancer Res *12*, 989–995.

Michigami, Y., Watari, J., Ito, C., Nakai, K., Yamasaki, T., Kondo, T., Kono, T., Tozawa, K., Tomita, T., Oshima, T., et al. (2018). Long-term effects of H. pylori eradication on epigenetic alterations related to gastric carcinogenesis. Sci. Rep. *8*, 1–13.

Moertel, C.G., Bargen, J.A., and Soule, E.H. (1957). Multiple gastric cancers; review of the literature and study of 42 cases. Gastroenterology *32*, 1095–1103.

Nakajima, T., Enomoto, S., Yamashita, S., Ando, T., Nakanishi, Y., Nakazawa, K., Oda, I., GLOBOCAN 2018 https://www.uicc.org/news/global-cancer-data-globocan-2018

Gotoda, T., and Ushijima, T. (2010). Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. J Gastroenterol *45*, 37–44.

Oishi, Y., Watanabe, Y., Yoshida, Y., Sato, Y., Hiraishi, T., Oikawa, R., Maehata, T., Suzuki, H., Toyota, M., Niwa, H., et al. (2012). Hypermethylation of Sox17 gene is useful as a molecular diagnostic application in early gastric cancer. Tumor Biol. *33*, 383–393.

Pan, Y.-M., Wang, C.-G., Zhu, M., Xing, R., Cui, J.-T., Li, W.-M., Yu, D.-D., Wang, S.-B., Zhu, W., Ye, Y.-J., et al. (2016). STAT3 signaling drives EZH2 transcriptional activation and mediates poor prognosis in gastric cancer. Mol. Cancer *15,* 79.

Park, Y.H., and Kim, N. (2015). Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer. J Cancer Prev *20*, 25–40.

Shimazu, T., Asada, K., Charvat, H., Kusano, C., Otake, Y., Kakugawa, Y., Watanabe, H., Gotoda, T., Ushijima, T., and Tsugane, S. (2015). Association of gastric cancer risk factors with DNA methylation levels in gastric mucosa of healthy Japanese: a cross-sectional study. Carcinogenesis *36*, 1291–1298.

Shin, C.M., Kim, N., Lee, H.S., Park, J.H., Ahn, S., Kang, G.H., Kim, J.M., Kim, J.S., Lee, D.H., and Jung, H.C. (2013). Changes in aberrant DNA methylation after *Helicobacter pylori* eradication: a long-term follow-up study. Int J Cancer *133*, 2034–2042.

Suzuki, R., Yamamoto, E., Nojima, M., Maruyama, R., Yamano, H.O., Yoshikawa, K., Kimura, T., Harada, T., Ashida, M., Niinuma, T., et al. (2014). Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. J. Gastroenterol. *49*, 1135–1144.

Take, S., Mizuno, M., Ishiki, K., Yoshida, T., Ohara, N., Yokota, K., Oguma, K., Okada, H., and Yamamoto, K. (2011). The long-term risk of gastric cancer after the successful eradication of *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol *46*, 318–324.

Takeshima, H., Niwa, T., Yamashita, S., Takamura-Enya, T., Iida, N., Wakabayashi, M.,

Nanjo, S., Abe, M., Sugiyama, T., Kim, Y.-J., et al. (2020). TET repression and increased DNMT activity synergistically induce aberrant DNA methylation. J. Clin. Invest. *130*, 5370.

Toyokawa, T., Suwaki, K., Miyake, Y., Nakatsu, M., and Ando, M. (2010). Eradication of *Helicobacter pylori* infection improved gastric mucosal atrophy and prevented progression of intestinal metaplasia, especially in the elderly population: a long-term prospective cohort study. J Gastroenterol Hepatol *25*, 544–547.

Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., and Schlemper, R.J. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med *345*, 784–789.

Ushijima, T., and Sasako, M. (2004). Focus on gastric cancer. Cancer Cell *5*, 121–125.

Ushijima, T., Nakajima, T., and Maekita, T. (2006). DNA methylation as a marker for the past and future. J. Gastroenterol. *41*, 401–407.

Wang, J., Xu, L., Shi, R., Huang, X., Li, S.W., Huang, Z., and Zhang, G. (2011). Gastric atrophy and intestinal metaplasia before and after *Helicobacter pylori* eradication: a meta-analysis. Digestion *83*, 253–260.

Watanabe, Y., Kim, H.S., Castoro, R.J., Chung, W., Estecio, M.R.H., Kondo, K., Guo, Y., Ahmed, S.S., Toyota, M., Itoh, F., et al. (2009). Sensitive and Specific Detection of Early

Gastric Cancer with DNA Methylation Analysis of Gastric Washes. Gastroenterology *136*, 2149–2158.

Wong, B.C., Lam, S.K., Wong, W.M., Chen, J.S., Zheng, T.T., Feng, R.E., Lai, K.C., Hu, W.H., Yuen, S.T., Leung, S.Y., et al. (2004). *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. Jama *291*, 187–194.

Yamamoto, H., Watanabe, Y., Oikawa, R., Morita, R., Yoshida, Y., Maehata, T., Yasuda, H., and Itoh, F. (2016). BARHL2 Methylation Using Gastric Wash DNA or Gastric Juice Exosomal DNA is a Useful Marker For Early Detection of Gastric Cancer in an *H. pylori*-Independent Manner. Clin. Transl. Gastroenterol. *7*, e184.

Yamashita, K., Sakuramoto, S., and Watanabe, M. (2011). Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. Surg Today *41*, 24–38.

Yamashita, S., Nanjo, S., Rehnberg, E., Iida, N., Takeshima, H., Ando, T., Maekita, T., Sugiyama, T., and Ushijima, T. (2019). Distinct DNA methylation targets by aging and chronic inflammation: a pilot study using gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. Clin Epigenetics *11*, 191.

Yoon, S.B., Park, J.M., Lim, C.H., Cho, Y.K., and Choi, M.G. (2014). Effect of *Helicobacter pylori* eradication on metachronous gastric cancer after endoscopic resection of gastric tumors:

a meta-analysis. *Helicobacter 19*, 243–248.

Yousefi, B., Mohammadlou, M., Abdollahi, M., Salek Farrokhi, A., Karbalaei, M., Keikha, M., Kokhaei, P., Valizadeh, S., Rezaiemanesh, A., Arabkari, V., et al. (2019). Epigenetic changes in gastric cancer induction by *Helicobacter pylori*. J Cell Physiol *234*, 21770–21784.