

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19318

研究課題名(和文) 胃神経内分泌癌の発生原因となる遺伝子異常の同定

研究課題名(英文) Identification of molecular alteration in gastric neuroendocrine carcinoma

研究代表者

安藤 孝将 (Ando, Takayuki)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号：30600671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胃神経内分泌癌の病態成立に必要な遺伝子群の同定を行い、それを治療の標的とするために、胃腺癌と胃神経内分泌癌における遺伝子異常とメチル化異常の解析を行った。治療標的となる遺伝子の発現異常の解析から、神経内分泌癌においてはVEGFR2の発現レベルが極めて高いことが明らかとなった。進行胃癌においては、VEGFR2に対する抗体薬であるramcirumabが保険適応で使用されており、VEGFR2抗体薬を含む化学療法を施行したところ著効した。これまでの過程を論文として報告した。

研究成果の概要(英文)：Neuroendocrine cancer (NEC) of the stomach is a rare type of cancer, and its molecular characterization is poorly understood. Therefore, we aimed to find NEC-specific alterations in comparison with adenocarcinoma. Analysis of DNA methylation was performed using the Infinium HumanMethylation 450 BeadChip array, and sequence variations of 55 cancer-related genes was performed using the Ion AmpliSeq Panel Kit. Comprehensive methylation analysis of 20 gastric cancers revealed that the number of aberrantly methylated genes was highly variable between individual gastric NEC and adenocarcinoma. Among the hundreds of tumor-specific methylations discovered, 13 genes (RPL37, ZNF175, SLC7A5P1, HAPLN3, GNG7, CCDC126, ZFP3, EIF2C1, HFN1B, ZNF665, TLE1, TMC01, TMPRSS2) with promoter methylation were identified. Additionally, VEGFR2, which is controlled by one of identified genes, was highly expressed in gastric NEC. Indeed, paclitaxel and ramcirumab treatment was effective for advanced gastric NEC.

研究分野：消化器腫瘍

キーワード：胃神経内分泌がん DNAメチル化 血管新生

1. 研究開始当初の背景

1. 胃神経内分泌癌は、極めて悪性度が高い

胃神経内分泌癌 (neuroendocrine carcinoma:NEC)は、腺癌と比較しても増殖速度が早く、早期に転移を来す。治療は一般に小細胞肺癌に準じた全身化学療法が行われるが、治療は奏効しないことが多く、予後は6-8ヶ月程度と極めて悪いことが本邦における多施設共同観察研究で明らかになりつつある。

2. 発生や病態に関わる決定的な遺伝子異常は未だ明らかにされていない

病理学的に肺小細胞癌と同様の特徴を有するが、胃における特徴として、約半数は表層に腺癌の成分を有する。このことから、神経内分泌癌は、腺癌を構成する癌幹細胞に、新たな遺伝子変異や遺伝子発現異常を獲得して発生すると考えられる。実際に神経内分泌癌には、p53の過剰発現やKRAS変異、p16発現低下など腺癌や扁平上皮癌と共通する、幾つかの遺伝子異常が報告されている。

しかし、診断手法が最近まで確立されていなかったため、悪性度の高さを説明する遺伝子異常は、現在もほとんど知られていない。2010年度に新たに分類された消化管の神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor:NET)の分類では、神経内分泌細胞癌は最も悪性度の高いとされる、Grade3に該当する。

3. DNAメチル化異常を始めとするエピジェネティック異常は発癌及び、癌の進展の原因となる

現在までに、多くの癌抑制遺伝子がプロモーター領域のCpG island(CGI)のDNAメチル化異常により不活化(サイレンシング)されることが明らかとされてきた。例えば胃腺癌では、CDH1, MLH1, p16などの癌抑制遺伝子のサイレンシングが高頻度に認められる。申請者らは、これまでに胃及び、大腸腺癌におけるDNAメチル化異常を多数解析してきた。また、胃の癌組織、及び非癌組織におけるメチル化異常の解析から、DNAメチル化異常による遺伝子サイレンシングは、癌発生の素地を形成することも報告してきた。

4. 神経内分泌癌の悪性度にDNAメチル化異常の関与が考えられる

神経内分泌腫瘍におけるエピジェネティック異常として、最近DNAメチル化を触媒するDNA methyltransferase(DNMT)が過剰

発現しており、特に低分化型でその傾向が著しいことが報告された。また、膵臓の神経内分泌腫瘍においては、幾つかの遺伝子に高頻度にDNAメチル化異常が認められることも見いだされている。実際に申請者らも、p16やCDH1などの胃腺癌でDNAメチル化異常を受ける幾つかの遺伝子について、数例の神経内分泌癌のDNAメチル化解析を行い、DNAメチル化異常を認めることを確認した。

2. 研究の目的

胃癌は、不均一な組織型を有する癌種である。多くは、高分化型癌より発生するが、腫瘍増大と共に高頻度に低分化な細胞が併存し、一部は神経内分泌癌の成分を持つ。神経内分泌癌は、肺の小細胞癌に類似し、急速で広範な転移を来し、極めて予後が不良である。しかし、その発生メカニズムや、悪性度の高さを説明する遺伝子異常は明らかとされてない。本研究では、遺伝子不活化の原因となるDNAメチル化異常の観点から、神経内分泌癌の病態成立に関わる遺伝子を探査する。探索された遺伝子群は、増殖速度や転移に深く関わり、癌の悪性度を決定づけると考えられる。

3. 研究の方法

1. 胃の神経内分泌癌と腺癌の検体を用いて、ゲノム網羅的なDNAメチル化解析と発現解析を行い、前者で高頻度にサイレンシングされている遺伝子を絞り込む

2. 全症例の癌組織よりゲノムDNAおよびtotal RNAを抽出する。ゲノムDNAは、重亜硫酸ナトリウム(バイサルファイト)による処理を行う。この処理によりシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化シトシンは変換されないため、メチル化状態の違いが塩基配列の違いに変わる。

3. 神経内分泌癌5検体、腺癌5検体について、重亜硫酸処理DNAをInfinium HumanMethylation450 BeadChip(illumina)を用いて解析する。これにより、全ゲノム中約45万個のCpGサイトにおけるメチル化率(beta value = 0~1)が測定可能となる。

4. 同じ検体について、ゲノム網羅的なmRNA発現マイクロアレイ解析をHumanGenome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrics)を用いて行う。DNAメチル化およびmRNA発現解析結果を組み合わせることにより、プロモーター領域のCGIにDNAメチル化異常があり、発現抑制を受けたメチル化サイレンシング遺伝子が効率よく同定される。

5. これにより数十個のメチル化サイレンシング遺伝子が同定されると考えられる。申請者が採取した非癌部の検体を用いて、これらの遺伝子が、胃粘膜で一定以上の発現レベルを有し、かつ、非メチル化状態であることを real-time RT-PCR 法と methylation-specific PCR 法により確認する。更に、100 例程度の癌部の検体を用いて、神経内分泌癌でメチル化異常の頻度が高く、腺癌で頻度が低いことを検証する。これにより 10-20 個程度の遺伝子に絞り込まれると考えられる。

6. 絞り込まれた遺伝子について、細胞増殖や浸潤に関わるシグナルへの関与など、悪性度と関わる機能について文献的な評価を行う。

7. 上記の手法で絞り込まれた遺伝子で、更なる機能解析に意義があると予測される遺伝子について、細胞増殖、及び転移能の解析を行う。胃腺癌の細胞株を用いて、siRNA により標的遺伝子をノックダウンし、MTT アッセイによる細胞増殖能、及び、細胞遊走アッセイによる浸潤能について解析する。更に、差が著しい細胞については、ヌードマウスに移植し、コントロールと比較して、腫瘍重量、転移個数に差があるかどうかを解析する。

4 . 研究成果

1. 胃腺癌 10 例、胃神経内分泌癌 10 例の癌部及び、非癌部の内視鏡生検を用い、倫理委員会の承認を受けて、Ion AmpliSeq Panel Kit (Life Technologies)による 55 個の癌関連遺伝子における遺伝子変異解析及び、Infinium Human Methylation 450 BeadChip array (Illumina)によるゲノム網羅的メチル化解析を行った。

2. 癌関連遺伝子における変異解析
胃神経内分泌癌 10 例中 6 例において癌抑制遺伝子である *TP53* (5/10 例)、*CDKN2A* (1/10 例)に突然変異を認め、特に *TP53* で高頻度であった。癌遺伝子には突然変異を認めなかったが、2 例において *KRAS* (1/10 例)、*ERBB2* (1/10 例)の遺伝子増幅を認めた。これらは、いずれも胃腺癌で報告されている遺伝子異常であった。

3. ゲノム網羅的メチル化解析

次に、胃神経内分泌癌のゲノム網羅的メチル化解析の結果から、714 個の遺伝子のプロモーター領域に癌特異的なメチル化異常を受けることが明らかとされた。このうち胃腺癌と異なり、13 遺伝子(*RPL37*, *ZNF175*, *SLC7A5P1*, *HAPLN3*, *GNG7*, *CCDC126*, *ZFP3*, *EIF2C1*, *HFN1B*, *ZNF665*, *TLE1*,

TMCO1, *TMPRSS2*)は、神経内分泌癌のみでメチル化異常を受けていた。また Real-time RT-PCR 法では、このうち、特に *TLE1*、*RPL37*、*HFN1B*、*GNG7* で神経内分泌癌における発現抑制を認めた。これらは、細胞周期や細胞分化、および血管新生に関わる遺伝子を含んでいた。

以上より、胃神経内分泌癌において、少数であるが、治療標的と成り得る遺伝子増幅を認めた。

特に、このうち、血管新生に着目し、神経内分泌癌における VEGFR2 を始めとする複数の遺伝子発現レベルを周囲組織や胃腺癌と比較したところ、特に VEGFR2 が有意に高発現であった。これは、胃 NEC やにおいて、治療標的と成り得ると考えられた。こまでの過程を論文化して報告した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Matsubara Y, Ando T, Hosokawa A, et al., Neuroendocrine carcinoma of the stomach: a response to combination chemotherapy consisting of ramucirumab plus paclitaxel. Intern Med. 2018; 57: 671-675

2. Muhammad JS, Nanjo S, Ando T, et al., Autophagy impairment by helicobacter pylori-induced methylation silencing of MAP1LC3Av1 promotes gastric carcinogenesis. Int J Cancer. 2017 140: 2272-2283

[学会発表](計 件)

1. 安藤孝将, 前田将宏, 南條宗八, 山下 聡, 中島 健, 牛島俊和. DNA methylation as a marker for environmental exposure □ and cancer risk.

分子疫学的手法を用いたがんの原因究明から予防研究への展開. 第 15 回日本臨床腫瘍学会総会; 2017 Sep 29-Oct1; 横浜. □

2. 松原裕樹, 安藤孝将, 細川 歩, 植田 亮, 小川浩平, 三原 弘, 吉田啓紀, 梶浦新也, 藤浪 斗, 杉山敏郎. 胃 □神経内分泌癌に対し Paclitaxel+Ramucirumab 療法を施行し

た 3 症例の検討.第 15 回日本臨床腫瘍学
会総会;2017 Jul □27-29 神戸.

〔図書〕(計 1 件)
消化器疾患最新の治療 2015-2016、南江堂
(安藤 孝将は p283-286 を執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

(該当なし)

取得状況(計 件)

(該当なし)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者

安藤 孝将 (Ando, Takayuki)
富山大学・附属病院・講師

研究者番号 : 30600671