

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15636

研究課題名(和文) CLDN18転座胃癌の浸潤・転移機構の解明と治療標的候補の探索

研究課題名(英文) Characterization of diffuse-type gastric cancer with CLDN18 fusion and drug discovery for it

研究代表者

田中 淳(Tanaka, Atsushi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80779687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：びまん型胃癌コホートとして多数の症例を用いて検討することにより、CLDN18転座胃癌が非転座胃癌と比較し、TNMステージが高く、遠隔転移が多いことを発見した。またサブグループ解析で若年転座胃癌がより悪性度が高く、積極的な治療介入が必要な群と明らかになった。また自施設データ及び公共データ(TCGA)を用いることでCLDN18転座胃癌で発現変動している遺伝子群、シグナル経路を同定、治療標的候補を複数発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌は組織学的に腸型とびまん型に大別される。びまん型胃癌は胃癌の40%程度を占め、進行の早い癌であり、5年生存率は20%弱と予後が悪い。しかし、HER2等の分子標的薬適応になる症例は少なく、分子標的薬を含めた新たな治療戦略が特に必要とされていた。近年びまん型にはRHOA変異、CLDN18転座が多くみられることが判明したが、その臨床的意義や病態は不明であった。本研究で得られた成果はこれらの問題を解決する基盤になるものであり、学術的意義、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using surgically resected gastric cancer, I uncovered that fusion-positive diffuse-gastric cancer (DGC) had high TNM stage and frequent metastasis compared with non-fusion DGC. In addition, fusion-positive DGC in young patient cohort showed aggressive phenotype, suggesting they might need more intensive treatment such as chemotherapy. Furthermore, I found many genes, pathways and potential therapeutic targets that are enriched in fusion-positive DGC.

研究分野：消化器癌及び肉腫

キーワード：びまん型胃癌 CLDN18転座 RHOA変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は近年減少傾向であるものの肺癌、肝癌に次いで世界の癌の死因第3位である。胃癌は組織学的に腸型とびまん型に大別される。びまん型は胃癌の40%程度を占め、腫瘍細胞が豊富な線維性間質を背景として個細胞性、小胞巣状に細かく浸潤する組織学的特徴を有している。肉眼的に胃壁のびまん性肥厚をともなった症例は特にスキルス胃癌と称される。びまん型胃癌は進行が早く、5年生存率は20%弱と腸型胃癌より予後不良である。治療法としては基本的に外科的切除と化学療法が一般に行われている。肺癌や大腸癌、乳癌と同様に最近胃癌にも分子標的薬である抗HER2抗体が使用されるようになったが、びまん型胃癌で同対象変異を有する症例は10%程度で、分子標的薬の恩恵を受けられる患者は少数である。それゆえ、分子標的薬を含む新たな治療戦略がびまん型胃癌では特に必要とされている。

2. 研究の目的

近年、筆者らはびまん型胃癌にRHOA変異が集積していることを発見した(Kakiuchi, Tanaka(5番目) et al. Nat genetics 2014)。その後びまん型胃癌にはRHOAシグナル経路に影響すると予想されるCLDN18-ARHGAP転座がRHOA変異と相互排他的に認められることが報告された(TCGA, Nature 2014)。現状ではRHOA変異胃癌、CLDN18-ARHGAP転座胃癌の臨床病理学的特徴や病態に関する報告はほとんどない。そこで筆者らは同遺伝子異常を有する胃癌の特徴を明らかにし、予後不良群の抽出及び病態解明を行うことを目的に基礎研究を開始した。

3. 研究の方法

CLDN18転座を有するびまん型胃癌の臨床病理学的特徴をまず明らかにするため、手術例を用いTNMステージや腫瘍の広がり、予後等について検討する。またCLDN18転座胃癌に特徴的なシグナル経路の同定をするため、当ラボで実施したびまん型胃癌のRNA発現解析データとTCGAデータを使用して、発現差解析、ReactomeやKEGG pathwayなどのエンリッチメント解析を行う。抽出された遺伝子の中で重要なものについては、その蛋白発現について手術検体コホートをを用い免疫組織学的に検討し、臨床所見との関連について検討する。次に治療標的探索のため、発現変動のあった遺伝子と小分子化合物のインタラクトーム解析を実施する。またCLDN18転座機能解析のため、in vitro解析を行う。

4. 研究成果

以下研究成果の一部はTanaka A, et al, Oncotarget, 2018 や学会等で報告した。

254例の胃癌手術症例を用いて、CLDN18転座有無をFISH法およびRT-PCR法にて検討した(Fig.1)。その結果、CLDN18転座びまん型胃癌ではTNMステージが高く、特に遠隔転移が多いことが明らかになった)。予後解析では有意差はなかったものの、転座群が非転座群より予後不良である点が見られた(Fig.2)。転座サブセット解析では転座胃癌の中でも若年発症例がより臨床的悪性度が高いことが判明し、転座有無が遠隔転移の独立予測因子であることが明らかとなった。

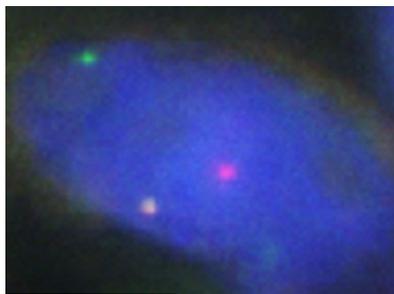


Figure 1 FISH

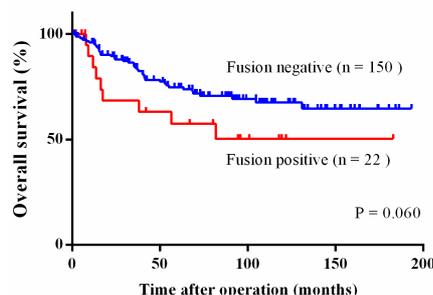


Figure 2 Overall survival analysis

ホルマリン固定パラフィン包埋された手術検体を用いたCLDN18転座のスクリーニング系を構築するため、CLDN18抗体とARHGAP抗体による免疫組織化学染色法で検討した。その結果、ARHGAP染色は有用でなかったが、CLDN18染色はCLDN18転座例で高い陽性率を示し、スクリーニングに有用と考えられた。

びまん型胃癌の重要なドライバー変異としてRHOA、CLDN18転座、CDH1等があり、TCGAデータでは概ね相互排他的である(Fig.3)。ただし、これらは遺伝子レベルの情報であり、蛋白質レベルでの確認はなされていなかった。本研究ではCLDN18転座有無と家族性びまん型胃癌の原因遺伝子であるCDH1(E-cadherin)の発現の相関について検討した。その結果、転座例ではEカドヘリン発現がほぼ全例で保持されているのに対し、非転座例では有意にEカドヘリン発現が低下し

ており、TCGA の遺伝子レベルデータと一致する (Fig.4)。これらは個々の経路がびまん型胃癌において強力な oncogenic pathway であることを再度示している。

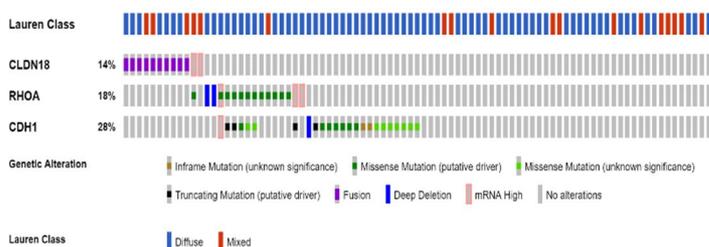


Figure 3 Oncoprint of TCGA dataset

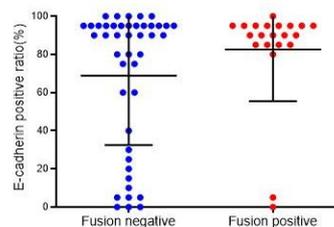


Figure 4 E-cadherin positivity

次に転座胃癌を特徴づける遺伝子発現プロファイルを同定するため、in-house RNAseq データと TCGA データを用いて発現解析を実施した (Fig.5)。また転座群で高発現している遺伝子上位 200 個を用い、シグナル経路エンリッチメント解析を実施した。その結果、細胞接着等に関連する経路が複数同定され、転座胃癌の高浸潤能、遠隔転移能等に寄与していると推測された (Fig.6)。

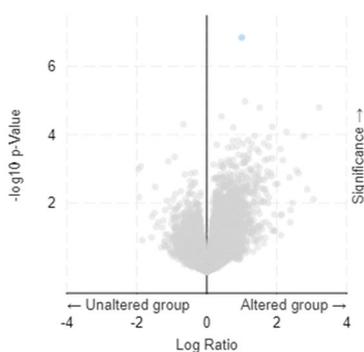


Figure 5 Volcano plot. Altered group is fusion group.

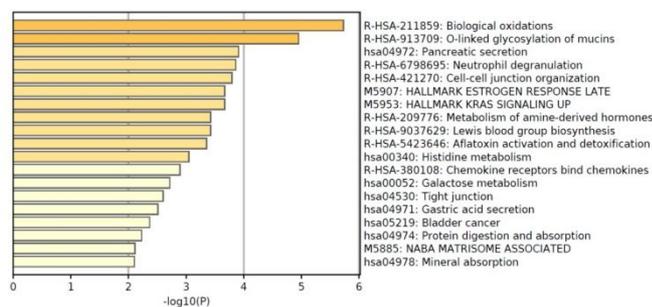


Figure 6 Pathway enrichment analysis.

次に若年転座群において悪性度が高くなる現象に寄与している経路を同定するため、RNAseq 結果を再解析し、発現変化を示す数十の関連遺伝子を同定した。今回我々は、癌患者の年齢によって発現が異なることが大腸癌などの他癌腫で報告されている CA9 に注目し、その発現量を同手術例コホートをを用いて免疫組織化学的に検討した。その結果、蛋白質レベルでも若年転座癌 (vs 高齢転座群) において CA9 が有意に高いことが判明し、CLDN18 転座の下流シグナル modulator として CA9 が機能している可能性が示唆された (Fig.7)。

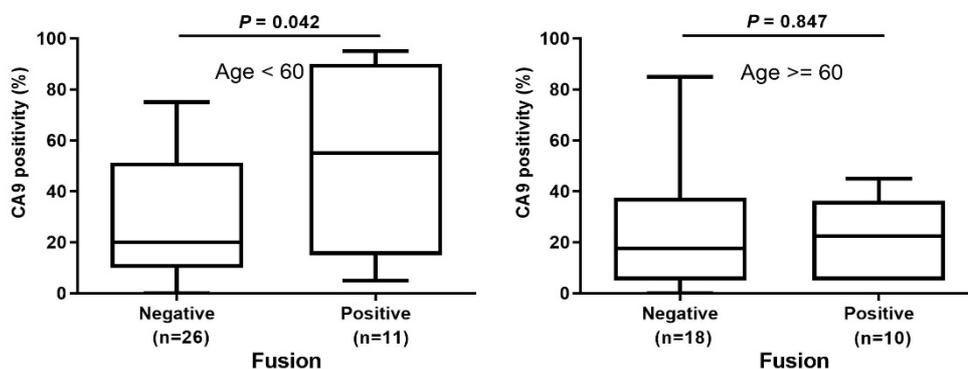


Figure 7 CA9 expression

以上のように CLDN18 転座びまん型胃癌は臨床的悪性度が高く、積極的な治療介入が望まれるが、治療標的候補は多くはない。そこで転座胃癌で高発現が認められた遺伝子上位 200 個を対象として、既存薬物・小分子化合物による治療可能性について Drug Gene Interaction database を用いて in silico 解析を実施した。その結果、100 個以上の阻害薬が同定され、その一部は FDA 承認薬であり、drug repositioning の可能性が示唆された (Fig.8)。

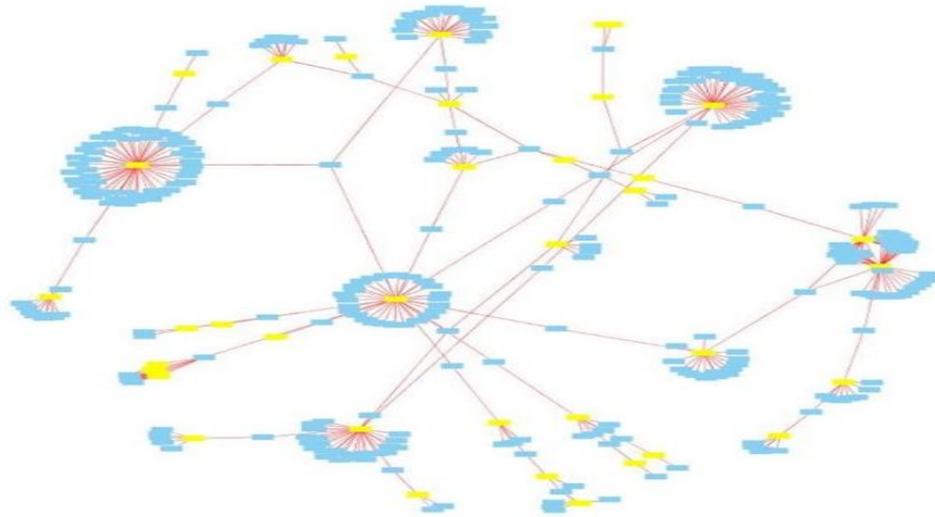


Figure 8 Drug gene interaction map. Yellow dot, gene; blue dot, drugs

また CLDN18 転座機能解析のため、ベクターを作成、胃癌細胞株に導入し、浸潤能等の検討を実施した。転座導入細胞株はコントロールと比較し、細胞接着が弱く、アノキス耐性がみられた。また細胞増殖能に大きな差は見られなかったが、高い浸潤能を転座導入細胞株は示した。今後上記で同定された候補薬物を用い、阻害実験等を実施し、治療応用について検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Atsushi, Zhou Yihua, Ogawa Makiko, Shia Jinru, Klimstra David S., Wang Julia Y., Roehrl Michael H.	4. 巻 15
2. 論文標題 STAT1 as a potential prognosis marker for poor outcomes of early stage colorectal cancer with microsatellite instability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0229252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Atsushi, Zhou Yihua, Shia Jinru, Ginty Fiona, Ogawa Makiko, Klimstra David S., Hendrickson Ronald C., Wang Julia Y., Roehrl Michael H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prolyl 4-hydroxylase alpha 1 protein expression risk-stratifies early stage colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 813-824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Atsushi Tanaka, Shumpei Ishikawa, Tetsuo Ushiku, Sho Yamazawa, Hiroto Katoh, Akimasa Hayashi, Akiko Kunita and Masashi Fukayama	4. 巻 9(50)
2. 論文標題 Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29336-29350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka M, Shibahara J, Ishikawa S, Ushiku T, Morikawa T, Shinozaki-Ushiku A, Hayashi A, Misumi K, Tanaka A, Katoh H, Sakuma K, Kokudo T, Inagaki Y, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Fukayama M	4. 巻 474(1)
2. 論文標題 EVI1 expression is associated with aggressive behavior in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 39-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-018-2476-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Atsushi Tanaka, Makiko Ogawa, Julia Wang, David Klimstra, Michael H. Roehrl
2. 発表標題 Deep Proteomics of Diffuse-Type Gastric Cancer Uncovers New Therapeutic Targets and Accelerates Drug Repositioning
3. 学会等名 Annual USCAP meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Tanaka, Makiko Ogawa, Julia Wang, Ronald Hendrickson, David Klimstra, Michael H. Roehrl
2. 発表標題 Deep Proteomics of Colorectal Cancer Liver Metastases Uncovers New Tumor Subtypes and Therapeutic Targets
3. 学会等名 Annual USCAP meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makiko Ogawa, Atsushi Tanaka, Julia Wang, Ronald Hendrickson, David Klimstra, Michael H. Roehrl
2. 発表標題 Towards Biomarkers and Therapeutic Targets for Dedifferentiated Chondrosarcoma Discovered by Fourier Transform Mass Spectrometry Proteomics
3. 学会等名 Annual USCAP meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tanaka A, Zhou Y, Wang J, Hendrickson R, Roehrl M
2. 発表標題 Deep proteomics of colorectal cancer liver metastases uncover prognostic factors and highly promising therapeutic targets
3. 学会等名 Annual USCAP meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka A, Zhou Y, Wang J, Hendrickson R, Roehrl M
2. 発表標題 Deep proteomics of gastrointestinal cancers can distinguish tumor location, histology, and new post-genomic subtypes
3. 学会等名 Annual USCAP meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 淳
2. 発表標題 Clinicopathological significance of CLDN18 fusion in diffuse-type gastric cancer
3. 学会等名 JMSA New York Life Science Forum 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考