

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07007

研究課題名(和文) 原発巣とゼノグラフトにおけるゲノム情報比較による胃癌ドライバー変異の同定

研究課題名(英文) Identification of gastric cancer driver mutations by using PDX model

研究代表者

桑田 健 (Takeshi, Kuwata)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・部門長

研究者番号：00327321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自施設にて樹立したヒト患者由来ゼノグラフトモデル(PDX)34株および細胞株24株(計38症例)を用いて、原発巣・PDX・細胞株における遺伝子変異プロファイルと比較、ドライバー遺伝子の同定をおこなった。原発巣・PDX・細胞株いずれかで同定された遺伝子変異(単塩基置換もしくは挿入欠失)は47遺伝子、コピー数異常は7遺伝子であった。原発巣で認められた変異・コピー数異常がPDX・細胞株でも全例で保持されていた遺伝子として、TP53、KRAS、MYCなどが同定され、胃癌におけるドライバー遺伝子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胃癌について原発巣とヒト患者由来ゼノグラフトモデルおよび細胞株における遺伝子プロファイリングの結果比較より、ドライバー遺伝子の推定・同定が可能となることをしめすことができた。またPDX・細胞株にて新規発生した遺伝子変化についても、異なる環境に腫瘍細胞が適応するための意味のある変化、すなわち腫瘍の進展・転移に関連する遺伝子異常など、精密医療の発展にとって有用な情報となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To identify the driver alteration in gastric cancer (GC), we compared gene alteration profiles between primary tumor (PT), patient-derived xenograft mode (PDX) and cell lines (CL). For the analyses, we used 34 GC PDX and 24 GC cell line, all established in our institution. Gemo profiling analyses revealed total gene mutation (single nucleotide variant [SNV] and insertion/deletion [Indel]) in 47 genes and 7 copy number alteration in 7 genes. The gene、of which constitutive same alterations (SNV, Indel or CNV) between PT, PDX and CL were observed in all cases, include TP53, KRAS, MYC. We suppose these genes are the driver mutations in gastric cancer and could be the targets of precision oncology.

研究分野：診断病理学

キーワード：胃癌 遺伝子変異 ドライバー遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

米国 TCGA (The Comprehensive Genomic Atlas) による包括的ゲノム解析から、胃癌は EB ウィルス (EBV) 型, マイクルサテライト不安定 (MSI) 型, ゲノム安定性 (GS) 型, 染色体不安定 (CIN) 型の 4 亜型に分類される。EBV 型胃癌は EB ウィルス, MSI 型胃癌は DNA 二本鎖切断修復機構欠損, GS 型胃癌はエピジェネティックな遺伝子発現抑制が深く関与する。CIN 型胃癌では、いくつかの癌遺伝子・癌抑制遺伝子 (TP53, KRAS, ARID1A, PIK3CA, ERBB3, PTEN など) の活性化ないし欠失変異が反復して観察されるが、TP53 を除けばいずれも CIN 型の 5% 未満である。ゲノム不安定型胃癌は分化型胃癌に相当し、20% 程度で HER2 過剰発現・遺伝子増幅を有するが、腫瘍内不均一性が存在するなど発癌過程には必須の分子機構でない可能性がある。このように、それぞれの分子亜型におけるがん発症に関わるドライバー遺伝子は明らかでない。

2. 研究の目的

Golub らは、種々の癌種について腫瘍を免疫不全マウスに移植した患者由来ゼノグラフト (Patient-Derived Xenograft, PDX) モデルを用い、原発巣とゼノグラフトで共通して観察される遺伝子変異が真のドライバー変異である可能性を示した (Nature Genetics 2017 49: 1567)。我々は自施設で樹立した 40 種の胃癌ゼノグラフトを有しており、PDX における遺伝子変異プロファイルを由来となる原発巣のものと比較することで、これまで明らかにされていない胃癌における真のドライバー遺伝子変異を同定、分子標的治療薬の開発・適応より、胃癌に対する最適化医療 (プレジジョンメディシン) を目指す。

3. 研究の方法

国立がん研究センター東病院および中央病院にて原発性胃癌に対する外科的切除検体 232 例から樹立された PDX45 株のうち 5 継代以上が可能となった 34 株および細胞株 24 株 (計 38 症例)、およびそれらの由来となった胃癌原発巣組織検体を用いた。胃癌原発巣・PDX・細胞株について NCC オンコパネルを用いた末梢血とのペア解析を実施し、体細胞変異のみからなる遺伝子変異プロファイルを同定した。遺伝子変異としては単塩基置換 (SNV)、挿入欠失変異 (short Indel)、コピー数異常 (CNV) を対象とした。同定された遺伝子プロファイリングを原発巣・PDX・細胞株で比較し、原発巣と PDX・細胞株で共通して認められる遺伝子変異を同定した。

またそれぞれの原発巣について、Epstein-Barr-virus-encoded RNA に対するハイブリダイゼーション (EBER-ISH) 法および DNA ミスマッチ修復遺伝子産物に対する免疫染色 (MMR-IHC) 法により EBV および MSI 分子サブタイプを同定した。

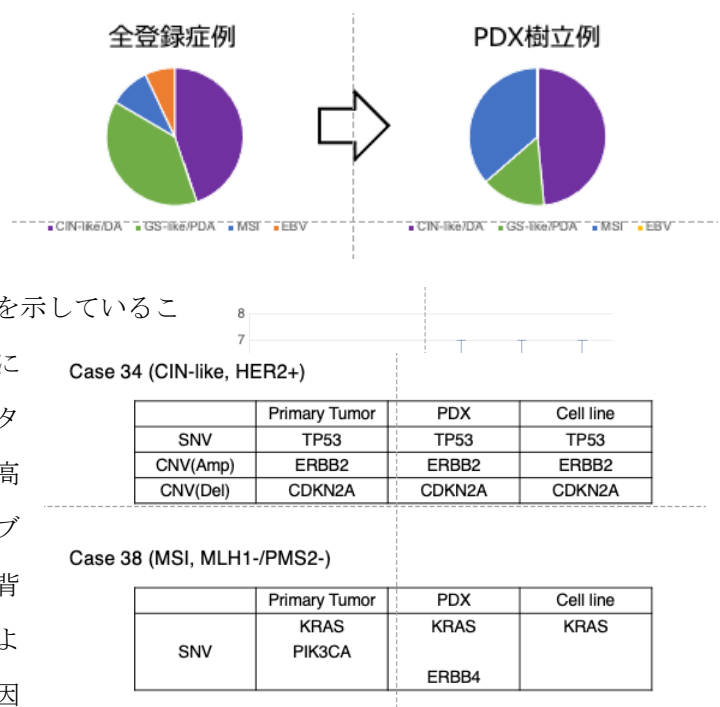
4. 研究成果

全体で 47 遺伝子の変異 (SNV もしくは Indel)、7 遺伝子の CNV を認めた。遺伝子変異のうち

12 遺伝子はがん遺伝子、35 遺伝子はがん抑制遺伝子であった。原発層で認められたがん遺伝子変異のうち最も頻度の高いものは PIK3CA、続いて ERBB2、KRAS であった。がん抑制遺伝子では TP53、ARID1A、APC の順であった。CNV については ERBB2、KRAS、MYC であった。

PIK3CA については 71% について原発巣で認められた変異が PDX もしくは細胞株で認められた。また 1 例において原発巣で認められない変異を PDX で認めた。ERBB2 については 80% について原発巣で認められた変異を PDX もしくは細胞株で認め、原発巣で認められない変異が PDX もしくは細胞株で認めることはなかった。KRAS については全例において原発巣で認められた変異を PDX もしくは細胞株で認め、1 例において原発巣で認められない変異を細胞株で認めた。TP53 については全例において原発巣で認められた変異を PDX もしくは細胞株で認め、原発巣で認められない変異を PDX もしくは細胞株で認めるものはなかった。ARID1A は 92% において原発巣で認められた変異を PDX で認め、3 例において原発巣で認めない変異を PDX もしくは細胞株で認めた。APC についても全例で原発巣で認められた変異を PDX もしくは細胞株で認め、4 例において原発巣で認めない変異を PDX もしくは細胞株で認めた。原発巣にて ERBB2 増幅をしめす症例については 83% で PDX もしくは細胞株で増幅をしめし、1 例では細胞株での増幅を認めた。原発巣にて KRAS 増幅を認める症例は全例で PDX もしくは細胞株でも増幅を認め、1 例では細胞株のみにおいて増幅を示した。原発巣にて MYC 増幅をしめす症例についても全例で PDX もしくは細胞株でも増幅を認め、1 例では細胞株のみにおいて増幅を示した。以上より、これらの原発巣において高頻度で変異を認める遺伝子についてはドライバー遺伝子の可能性が高いと予想される。一方、本検討において低頻度で認められた遺伝子 (CTNNB1, ERBB4, NOTCH3 など) はいずれも原発巣では同定されず、PDX もしくは細胞株でのみ同定された。このことより、これらの遺伝子はパッセンジャー遺伝子の可能性が考えられるが、もう一つの可能性として原発巣にて存在したマイナークローンがマウス皮下もしくは細胞培地といった異なる環境に適合することで増殖可能となった可能性もある。

PDX もしくは細胞株の樹立された 38 例のうち、12 例は原発巣での MMR-IHC 検査にて MSI サブタイプと判定された。対象とした 232 例と比較して MSI サブタイプの頻度は高く、PDX および細胞株の樹立において MSI サブタイプが高い適応性を示していることが予想された。また総遺伝子変異頻度について、MSI サブタイプは non-MSI サブタイプに比較して原発巣・PDX・細胞株とも高い変異頻度を示した。このことは、MSI サブタイプを示す胃癌が高い高い変異頻度を背景に腫瘍ない不均一性をしめすことにより、異なる環境に適応しやすいことが原因



である可能性を示唆する所見と考えた。実際、分化型の CIN サブタイプと考えられた症例では原発巣・PDX・細胞株で同一の遺伝子変異プロファイルをしめすものが多かったが、MSI サブタイプでは3者で異なる変異を認めることが観察された。例とした Case38 については KRAS が primary のドライバー遺伝子で、PIK3CA および ERBB4 はパッセンジャー変異もしくは異なる微小環境においてのみ適合したマイナークローンの可能性が考えられる。

以上、本研究において自施設にて樹立した胃癌 PDX および細胞株を用い、原発巣・PDX・細胞株の遺伝子変異プロファイリングの比較からドライバー遺伝子・パッセンジャー遺伝子の同定が可能となることを示した。この知見は、胃癌における precision medicine 実施に向けた分子標的治療薬の開発に貢献すると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Watanabe Masahiro, Kuwata Takeshi, Setsuda Ayumi, Tokunaga Masanori, Kaito Akio, Sugita Shizuki, Tonouchi Akiko, Kinoshita Takahiro, Nagino Masato	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular and pathological analyses of gastric stump cancer by next-generation sequencing and immunohistochemistry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83711-1	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 Sugita Shizuki, Kuwata Takeshi, Tokunaga Masanori, Kaito Akio, Watanabe Masahiro, Tonouchi Akiko, Kinoshita Takahiro, Nagino Masato	4. 巻 122
2. 論文標題 Clinical significance of lymphatic invasion in the esophageal region in patients with adenocarcinoma of the esophagogastric junction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 433 ~ 441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jso.25964	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 -
1. 著者名 Tsumura Ryo, Koga Yoshikatsu, Hamada Akinobu, Kuwata Takeshi, Sasaki Hiroki, Doi Toshihiko, Aikawa Katsuji, Ohashi Akihiro, Katano Ikumi, Ikarashi Yoshinori, Ito Mamoru, Ochiai Atsushi	4. 巻 111
2. 論文標題 Report of the use of patient derived xenograft models in the development of anticancer drugs in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3386 ~ 3394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14564	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 Kuwata Takeshi, Wakabayashi Masashi, Hatanaka Yutaka, Morii Eiichi, Oda Yoshinao, Taguchi Kenichi, Noguchi Masayuki, Ishikawa Yuichi, Nakajima Takashi, Sekine Shigeki, Nomura Shogo, Okamoto Wataru, Fujii Satoshi, Yoshino Takayuki, SCRUM Japan GI SCREEN Pathology Group	4. 巻 70
2. 論文標題 Impact of DNA integrity on the success rate of tissue based next generation sequencing: Lessons from nationwide cancer genome screening project SCRUM Japan GI SCREEN	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 932 ~ 942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13029	査読の有無 無
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 Akagi Kiwamu, Oki Eiji, Taniguchi Hiroya, Nakatani Kaname, Aoki Daisuke, Kuwata Takeshi, Yoshino Takayuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Real world data on microsatellite instability status in various unresectable or metastatic solid tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1105 ~ 1113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14798	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 Kubota Yohei, Kawazoe Akihito, Sasaki Akinori, Mishima Saori, Sawada Kentaro, Nakamura Yoshiaki, Kotani Daisuke, Kuboki Yasutoshi, Taniguchi Hiroya, Kojima Takashi, Doi Toshihiko, Yoshino Takayuki, Ishii Genichiro, Kuwata Takeshi, Shitara Kohei	4. 巻 26
2. 論文標題 The Impact of Molecular Subtype on Efficacy of Chemotherapy and Checkpoint Inhibition in Advanced Gastric Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3784 ~ 3790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-20-0075	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 -

1. 著者名 Kaito Akio, Kuwata Takeshi, Tokunaga Masanori, Shitara Kohei, Sato Reo, Akimoto Tetsuo, Kinoshita Takahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 HER2 heterogeneity is a poor prognosticator for HER2-positive gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Clinical Cases	6. 最初と最後の頁 1964 ~ 1977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12998/wjcc.v7.i15.1964	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kuwata Takeshi, Yanagihara Kazuyoshi, Iino Yuki, Komatsu Teruo, Ochiai Atsushi, Sekine Shigeki, Taniguchi Hirokazu, Katai Hitoshi, Kinoshita Takahiro, Ohtsu Atsushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Establishment of Novel Gastric Cancer Patient-Derived Xenografts and Cell Lines: Pathological Comparison between Primary Tumor, Patient-Derived, and Cell-Line Derived Xenografts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 585 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8060585	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kawazoe Akihito, Shitara Kohei, Kuboki Yasutoshi, Bando Hideaki, Kojima Takashi, Yoshino Takayuki, Ohtsu Atsushi, Ochiai Atsushi, Togashi Yosuke, Nishikawa Hiroyoshi, Doi Toshihiko, Kuwata Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Clinicopathological features of 22C3 PD-L1 expression with mismatch repair, Epstein-Barr virus status, and cancer genome alterations in metastatic gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 69 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-018-0843-9	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 桑田健
2. 発表標題 精密医療の実現を目指した胃癌における分子プロファイルとその不均一性に関する検討
3. 学会等名 第66回日本病理学会秋季特別総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Kuwata
2. 発表標題 Clinicopathological factors associated with establishment of gastric cancer PDXs and cell lines
3. 学会等名 AACR-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯野由貴, 桑田健, 小松輝夫, 柳原五吉, 落合淳志
2. 発表標題 胃癌治療のための新しい薬物開発プラットフォーム
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑田 健
2. 発表標題 研究・新薬開発における病理学： 国立がん研究センター東病院における 胃癌PDX/細胞株樹立プロジェクト
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関