

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15229

研究課題名(和文) 低異型度腫瘍から発生する胃癌における、悪性化ドライバー変異の同定と層別化への応用

研究課題名(英文) Genetic events relevant to cancerous progression from gastric adenoma or neoplasia with low-grade atypia

研究代表者

六反 啓文 (ROKUTAN, Hirofumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00782559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、早期胃腫瘍のうち腺腫などへ分類される低異型度病変も増えている。これらの病変は一部が悪性度を増し癌化していくため、その分子基盤の解明や、リスク予測に資するマーカーが求められている。本研究においてターゲットDNAシーケンスを施行した結果、低異型度腫瘍を含む胃の分化型上皮内腫瘍が癌化していくか否かは、初期変異(APC, TP53)により概ね規定されていることが見出された。APC・ARID2共変異は低異型度上皮内腫瘍でしばしば見られる一方、この組み合わせが癌化しにくい低リスク群の特徴であることが示唆された。更に、APC変異陽性進行胃癌を対象とした検証やmulti-region解析も進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃の分化型上皮内腫瘍における初期変異が同定され、悪性度に関連するゲノム異常の理解が進んだ。また、悪性化しにくい変異の組み合わせも同定されたことから、個別化医療に役立つ可能性がある。更に、胃の腺腫と腺癌の診断基準が病理医間、あるいは日本と欧米で異なることが長年大きな問題となっているが、本研究結果はこの診断基準の標準化に向けても重要な知見となりうる。

研究成果の概要(英文)：Recently, we Japanese pathologists and gastroenterologists often encounter early gastric tumors with low-grade atypia, such as adenoma or dysplasia (intraepithelial neoplasia). This research project aimed to deepen the understanding of the molecular basis for occasional cancerous progression from such tumors. Targeted DNA sequencing revealed that initial and recurrent somatic mutations (APC and TP53) were related to, and deterministic of, the natural course of each tumor [Rokutan H et al., J Pathol 2019]. Combination of APC and ARID2 mutations was a feature of low-risk tumors. Also multi-region analyses were conducted.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：胃腫瘍 胃腺腫 悪性化 APC ARID2 体細胞変異 初期変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年では早期胃腫瘍を対象とした ESD 等の内視鏡的切除が普及し、切除対象として胃の低異型度腫瘍(腺腫、上皮内腫瘍など)も増加している。これらに相当する病変におけるゲノム異常として、2016年に高頻度(60-70%)の APC 変異が報告、再確認されたが、APC 変異陰性群におけるドライバー変異は未解明であった。また、腫瘍進展とともに悪性度を増していく一群に関連したゲノム異常の解明は不十分であった。

2. 研究の目的

本研究では早期胃腫瘍の個別化医療に資する知見を得ることを狙い、下記を研究の目的として据えた。

- (1) 低異型度腫瘍からの悪性化に必須な分子遺伝学的ドライバーイベントが有るとすればそれは何かを解明する。
- (2) 上記とは逆に、悪性化を起こさない低リスク症例群の特徴が有るとすれば、それは何かを解明する。

3. 研究の方法

胃粘膜内腫瘍については、東京大学医学部附属病院で内視鏡的に切除された分化型症例を対象とした。上皮内腫瘍は WHO 分類に則り low-grade adenoma (dysplasia/intraepithelial neoplasia) [ : 以下 LGD ] および high-grade adenoma (dysplasia/intraepithelial neoplasia) [ : 以下 HGD ] へと 2 分類した。ホルマリン固定標本より核酸を抽出し、67 遺伝子のエクソンを対象としたターゲット DNA シークエンスを行った (SureSelect カスタムパネル)。マーカー同定を狙い、体細胞変異が判明している症例群を対象として、代表的組織切片を用いた免疫染色を施行した。Multi-region 解析としては、APC・TP53 共変異進行胃癌における p53 変異陽性領域の確認を行うとともに、APC 変異陽性進行胃癌を対象とした multi-region RNA シークエンスを施行した。

4. 研究成果

(1) ターゲット DNA シークエンスを通して、LGD は全例が APC の短縮型変異を持ち (12/12)、分子遺伝学的に均一性の高い分類単位であることが判明した。これは既報と概ね一致する結果であり、東大病院で内視鏡的に切除された日本人腫瘍においても APC 変異の重要性が確認された。WHO 分類における LGD と HGD の関係はこれまで不明であったが、両者は高頻度に APC 変異を持ち、かつ多くの症例で共通の変異ホットスポット (R1450\*や E1554fs/\*) を持つことが今回初めて解明された。対照として集めた粘膜内浸潤癌においては、79%という高頻度で TP53 変異が検出され、径 1mm 或いは 3mm 大の顕微鏡的な分化型癌からも検出された。更に変異アレル頻度の比較に基き、体細胞変異が入る順序を確認したところ、多くの粘膜内浸潤癌症例で TP53 変異が最初に入る体細胞変異であることが判明した。進行胃癌データベース (Tumor Cancer Genome Atlas ; TCGA) における APC 変異の種類やコドンに着目して集計すると、APC 変異をもつ上皮内腫瘍から進展して生じた可能性のある進行胃癌は、分化型症例のうち多く見積もっても頻度 4.1%であることが示された (図 1)。また、WHO 分類における上皮内腫瘍 (LGD+HGD) において、APC 変異と TP53 変異は、ほぼ相互排他的に起こっていた ( $p = 0.031$ )。以上より、胃の分化型上皮内腫瘍が悪性化 (癌化) していくか否かは、概ね初期変異 (APC, TP53) により規定されていることが解明された (図 2)。

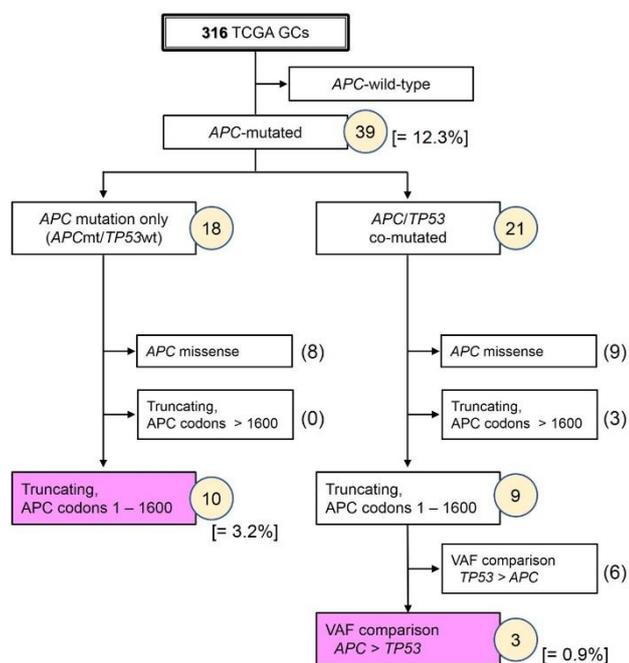


図 1. APC 変異陽性進行胃癌のうち何例が、APC 変異陽性上皮内腫瘍由来でありうるか、の推計。

(2) APC, TP53 体細胞変異の有無と相関する病理学的因子あるいは免疫組織化学マーカー (ないしマーカー群) の探索を行った。検討した免疫染色マーカー (CD10, p53,  $\beta$ -catenin など) の有効性は想定よりも限定的であり、むしろ腫瘍腺管における増殖帯の位置などの病理学的因

子に着目することが有用である可能性が示唆された。

(3) 低異型度上皮内腫瘍において *ARID2* 変異はしばしばみられ (LGD においては頻度 33%)、つねに *APC* 変異とともに検出された。一方で、*APC*・*ARID2* 共変異は進行胃癌では極めてまれ (頻度 0.8%) であることから、とくに *ARID2* 変異をもつ低異型度上皮内腫瘍は悪性化しにくいこと、或いは *APC*・*ARID2* 変異が悪性化 (癌化) しにくい combination であることが示唆された。胃上皮内腫瘍のうち低リスク群の特徴の 1 つとして浮上した *ARID2* 変異であるが、その短縮型変異の有無と一致した免疫染色の系の確立には難渋した。

(4) *APC* 変異陽性の低異型度腫瘍から進行胃癌へと進展していく経路については、前述の通り稀であることを示すことができた。これは胃腫瘍における *APC* 体細胞変異と *TP53* 体細胞変異の相互排他性に裏付けられたものであり、また、Vogelstein model としても理解されていた大腸腫瘍との大きな相違点として理解された。その一方で、Vogelstein model に沿う進展経路が胃腫瘍においてもごく稀に存在する (皆無ではない) ことが、予備検討などから想定され、同経路において重要なゲノム異常蓄積過程の解明を、multi-region 解析を通して試みた。まず進行胃癌データベース (TCGA) を参照すると、*APC* 変異陽性進行胃癌において、最も頻度の高い変異遺伝子は (*APC* を除くと) *TP53* であった。それを受け、*APC*・*TP53* 共変異進行胃癌を選出し、p53 免疫染色で染色異常 (変異パターン) となる最も浅い腫瘍内領域を探索したところ、粘膜層であることが比較的多かった。別のアプローチとして、*APC* 変異陽性進行胃癌を対象として、数症例の multi-region RNA-seq を行ったところであり、今後解析を進める予定である。

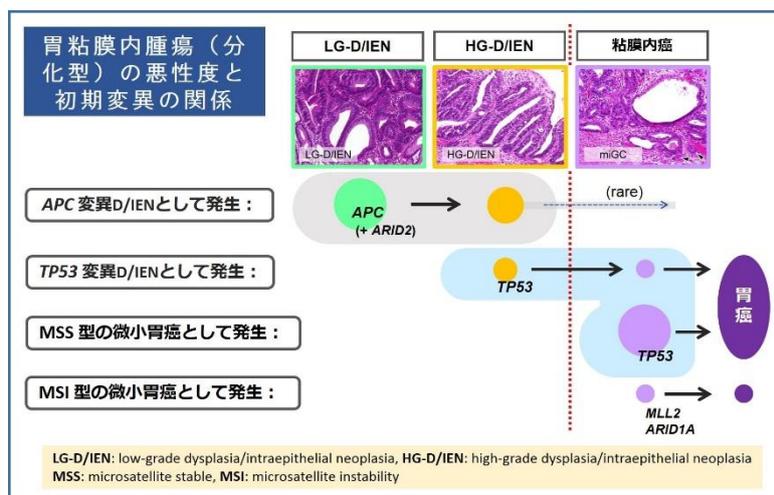


図 2. 初期変異に基づいた、分化型胃粘膜内腫瘍の分類

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rokutan H, Abe H, Nakamura H, Ushiku T, Arakawa E, Hosoda F, Yachida S, Tsuji Y, Fujishiro M, Koike K, Totoki Y, Fukayama M, Shibata T	4. 巻 247(4)
2. 論文標題 Initial and crucial genetic events in intestinal-type gastric intramucosal neoplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 494-504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5208	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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hirofumi Rokutan, Tetsuo Ushiku, Hiroyuki Abe, Hiromi Nakamura, Fumie Hosoda, Masashi Fukayama, Tatsuhiro Shibata
2. 発表標題 Deep sequencing uncovered initial and fate-determining mutations in well-differentiated neoplasias of the stomach
3. 学会等名 38th Sapporo International Cancer Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 六反啓文, 阿部浩幸, 中村浩実, 牛久哲男, 細田文恵, 谷内田真一, 辻陽介, 藤城光弘, 小池和彦, 十時泰, 深山正久, 柴田龍弘
2. 発表標題 Initial mutations in well-differentiated intramucosal neoplasias of the stomach（分化型の胃粘膜内腫瘍における初期体細胞変異）
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 六反啓文, 阿部浩幸, 中村浩実, 牛久哲男, 荒川えりか, 細田文恵, 谷内田真一, 辻陽介, 藤城光弘, 小池和彦, 十時泰, 深山正久, 柴田龍弘
2. 発表標題 早期胃がんのゲノム解析
3. 学会等名 第29回 日本消化器癌発生学会総会（招待講演）
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
--	---------------------------	-----------------------	----