

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16593

研究課題名（和文）早期胃癌におけるHER2不均一性の形成機序とトラスツズマブ治療抵抗性獲得の解明

研究課題名（英文）HER2 intratumoral heterogeneity and drug resistance to trastuzumab in early gastric cancer

研究代表者

金山 和樹（Kanayama, Kazuki）

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・准教授

研究者番号：20605943

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）：HER2不均一性胃癌では、早期の段階でHER2遺伝子増幅以外のドライバー変異や治療抵抗性変異を有するサブクローンが生じ、HER2非依存性経路の形成ならびにトラスツズマブ治療抵抗性が獲得されると推察する。本研究では、これらに関わるサブクローンの存在を明らかにすることを目的に、HER2不均一性早期胃癌の癌関連遺伝子について網羅的変異解析を行った。網羅的変異解析の結果より、HER2不均一性早期胃癌からPIK3CAなどの機能獲得型変異が検出された。このことより、HER2不均一性胃癌では早期の段階でHER2遺伝子増幅以外のドライバー変異を有するサブクローンが出現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トラスツズマブ療法はHER2陽性胃癌の重要な治療選択の一つであるが、HER2不均一性胃癌では治療抵抗性を示すことから、多くの患者が治療の恩恵を受けるためにもトラスツズマブ治療抵抗性を引き起こす分子メカニズムの解明が重要となる。本研究結果において腫瘍内のゲノム進化の一部が解明され、HER2不均一性胃癌では癌の早期段階でHER2遺伝子増幅と併存するドライバー変異や腫瘍全体で共通するドライバー変異の存在が明らかとなった。これにより、HER2非依存性経路を同時に遮断する治療法やドライバー変異を標的とした新規治療法の開発に繋がる可能性があることを示した。

研究成果の概要（英文）：In HER2 heterogeneous gastric cancer, we speculate that subclones harboring driver or treatment-resistant mutations other than HER2 gene amplification arise at an early stage, leading to the formation of HER2-independent pathways and the acquisition of trastuzumab treatment resistance. In this study, we performed a comprehensive mutational analysis of cancer-related genes in HER2 heterogeneous early gastric cancer with the aim of identifying the existence of subclones involved in these genes. Comprehensive mutation analysis revealed gain-of-function mutations such as PIK3CA from HER2 heterogeneous early gastric cancer. This suggests that subclones with driver mutations other than HER2 gene amplification appear at an early stage in HER2 heterogeneous gastric cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：HER2 腫瘍内不均一性 早期胃癌 トラスツズマブ 治療抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍内不均一性(Intratatumoral heterogeneity)は、1つの固形腫瘍内部において様々な形質を示す細胞集団が存在するもので、同一腫瘍組織内で互いに異なる遺伝子変異やタンパク発現を示す細胞集塊、孤立散在性細胞として観察される。この腫瘍内不均一性は、分子標的治療薬の治療抵抗性の原因の一つとして考えられており、乳癌ではHER2遺伝子増幅の腫瘍内不均一性(以下、HER2不均一性)を示す症例においてトラスツズマブ投与に対する不応性が報告されているが、その頻度は少ない。しかし、研究対象の胃癌では乳癌に比べHER2不均一性を示す症例が非常に多く、乳癌同様トラスツズマブ治療抵抗性を示し予後不良と報告されているため(1)、トラスツズマブの十分な治療効果を得るためにも胃癌でのHER2不均一性の形成機序ならびにトラスツズマブ治療抵抗性の分子メカニズムの解明が重要な課題とされている。しかし、それらの分子メカニズムの完全な解明には至っていない。

これらの背景を踏まえて我々は、胃癌におけるHER2不均一性の形成機序とトラスツズマブ治療抵抗性の分子メカニズムを解明するために、早期胃癌と進行胃癌の病理組織検体を用いてHER2不均一性の頻度や腫瘍内の発現分布について詳細な解析を行ってきた。その結果、HER2遺伝子増幅腫瘍細胞は癌の初期段階(粘膜内癌)から出現し不均一性を維持したまま腫瘍進展すること(2)、HER2不均一性の形成にサブクローン同士の非自律性増殖が関与し治療抵抗性に寄与する可能性があること(3)を突き止め、今回、癌の早期にHER2遺伝子増幅以外のドライバー変異や治療抵抗性変異を有するサブクローンが生じることで非自律性増殖が起こりHER2の不均一性が維持され、トラスツズマブ治療抵抗性が獲得されるという仮説を立て検証を行った。

## 2. 研究の目的

本研究ではHER2不均一性を示す早期胃癌の癌関連遺伝子について網羅的変異解析を行い、非自律性増殖および治療抵抗性に関わるサブクローンの存在を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) HER2不均一性早期胃癌とHER2均一性胃癌症例の選定

2015年～2019年の間に三重大学医学部附属病院で切除された早期胃癌組織を対象にHER2免疫組織化学染色を行い、HER2不均一性早期胃癌とHER2均一性早期胃癌を抽出した。抽出後、レーザーマイクロダイセクションならびにマクロダイセクションで腫瘍細胞をエンリッチメントし、DNA抽出を行った。DNA抽出後、AMPure XPでDNAを精製しリアルタイムPCR法で断片化解析を行った。

本研究では、HER2陽性(3+)細胞とHER2陰性(0)細胞が混在する腫瘍をHER2不均一性、HER2陽性細胞のみで構成されている腫瘍をHER2均一性と定義し解析を行った。

### 2) 次世代シーケンサーを用いた癌関連遺伝子変異網羅解析

1)で選定したHER2不均一性早期胃癌3症例4サンプル、HER2均一性早期胃癌2症例2サンプルについて次世代シーケンサーを用いて網羅的変異解析を行った。網羅的変異解析にはIon AmpliSeqのComprehensive Cancer Panel 409遺伝子を使用した。

### 3) 意義の高い遺伝子変異の抽出

検出された遺伝子変異はIon Reporterで意義の高い変異のみに絞込みを行った。絞込みの基準としてCoverageが100以上、タンパク機能への影響を予測するShift score、Polyphen2 scoreがそれぞれ0.0-0.05、0.15-1.0の範囲にあるものとした。さらにIGVでリード中の変異の位置を確認し、リードの端に存在する変異は除外した。また、遺伝子変異の腫瘍生物学的影響について、Clinvar、Cosmic、cBioPortal Cancer Genomicsのデータベースで確認を行った。

## 4. 研究成果

網羅的遺伝子変異解析の結果、HER2不均一性早期胃癌では3症例ともにTP53変異(C141Y、M237I、R158C)が検出された。これらの変異は検出アレル頻度から腫瘍内で共通する変異(Truncal driver mutation)と推定された。さらに機能獲得型変異としてPIK3CA変異(R108H、E453K、H1047Y、G1049S)、BRAF変異(G596D)、KRAS変異(V14I、G12D、G12S)、NOTCH2変異(R2400Ter)、HER2変異(S310F、G776S、V777M)が検出された。これらの変異はすべて検出アレル頻度が5%未満であったことからマイナー変異と推定され、HER2不均一性胃癌では早期の段階でHER2遺伝子増幅以外のドライバー変異を有するマイナーサブクローンが出現することが本研究で明らかとなった。またこの知見は、これらの機能獲得型変異がbranching driver

として働き HER2 非依存性経路を早期癌で形成することを示唆する結果でもあり、患者予後に影響を与える重要な知見と考える。

一方、HER2 均一性早期胃癌では 2 症例とも腫瘍内で共通する変異として *TP53* 変異(I251S、H296fs)が検出されたが、HER2 不均一性早期胃癌で検出された *PIK3CA* などの機能獲得型変異は認められなかった。このことから、HER2 均一性胃癌は早期の段階では HER2 依存性に増殖しており、HER2 不均一性胃癌と HER2 均一性胃癌では腫瘍特性が異なる可能性があることが示唆された。

また、近年、乳癌における *HER2V777L* と *PIK3CAH1047R* 変異の共存は pan-HER tyrosine kinase inhibitor に治療抵抗性を示すことが報告された(4)。*PIK3CAH1047R* 変異は我々が以前報告した進行胃癌の研究においてもマイナー変異として検出されている(5)。また、本研究でも、*PIK3CAH1047Y* 変異が検出されていることから、HER2 不均一性胃癌では治療抵抗性変異をもつサブクローンが早期の段階で存在し、マイナーサブクローンとして潜伏し続けることで治療抵抗性を獲得している可能性が示唆された。

今回、研究期間内では検出された機能獲得型変異とトラスツズマブ不応答性の関連性について十分に検証できなかったが、引き続き検証を行い研究成果を報告していく。

#### <引用文献>

(1) Wakatsuki et al. Clinical impact of intratumoral HER2 heterogeneity on trastuzumab efficacy in patients with HER2-positive gastric cancer. *J Gastroenterol.* 2018 Nov;53(11):1186-1195.

(2) Kanayama et al. Association of HER2 gene amplification and tumor progression in early gastric cancer. *Virchows Arch.* 2018 Nov;473(5):559-565.

(3) Kanayama et al. Significant intratumoral heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 status in gastric cancer: A comparative study of immunohistochemistry, FISH, and dual-color in situ hybridization. *Cancer Sci.* 2016 Apr;107(4):536-42.

(4) Cheng et al. Breast cancer mutations HER2 V777L and PIK3CA H1047R activate the p21-CDK4/6 -Cyclin D1 axis driving tumorigenesis and drug resistance. *Cancer Res.* 2023 Jun 5;CAN-22-3558.

(5) Kanayama et al. Cancer-related gene mutations and intratumoral genetic heterogeneity in human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneous gastric cancer. *Pathol Int.* 2020 Nov;70(11):865-870.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirokawa YS, Kanayama K, Kagaya M, Shimojo N, Uchida K, Imai H, Ishii K, Watanabe M.	4. 巻 117
2. 論文標題 SOX11-induced decrease in vimentin and an increase in prostate cancer cell migration attributed to cofilin activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Pathology	6. 最初と最後の頁 104542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexmp.2020.104542.	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 該当する

1. 著者名 Kanayama K, Imai H, Usugi E, Matsuda C, Ichishi M, Hirokawa YS, Watanabe M.	4. 巻 70(11)
2. 論文標題 Cancer-related gene mutations and intratumoral genetic heterogeneity in human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneous gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 865-870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13004.	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 泉標準也、金山和樹
2. 発表標題 膀胱細胞を用いたLBC保存液の検討 形態学的・分子生物学的評価
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会総会(春期大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 知世、釘宮 弥里、金山 和樹、今井 裕、小塚 祐司、橋詰 令太郎、渡邊 昌俊
2. 発表標題 EUS-FNAで診断に苦慮したWild type GISTの1例
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会総会(春期大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 知世、石井 健一朗、中川 泰久、白井 拓、広川 佳史、金山 和樹、井口 和弘、渡邊 昌俊
2. 発表標題 Cancer-restraining CAFs produce soluble factors targeting upregulation of NKX3-1 in prostate cancer cells
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金山 和樹、今井 裕、松田 知世、広川 佳史、渡邊 昌俊
2. 発表標題 The relationship between double minute amplification of HER2 and HER2 genetic heterogeneity in gastric cancer
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広川 佳史、金山 和樹、松田 知世、今井 裕、渡邊 昌俊
2. 発表標題 Cofilin activity is affected by cellular density in the prostate cancer cell lines
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広川 佳史、石井 健一朗、金山 和樹、林 昭伸、内田 克典、小塚 祐司、今井 裕、湯淺 博登、渡邊 昌俊
2. 発表標題 SOX11による前立腺癌細胞の浸潤、運動能亢進機構
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金山 和樹、今井 裕、松田知世、広川 佳史、渡邊昌俊
2. 発表標題 HER2陽性胃癌におけるHER2 Double minuteとHER2 genetic heterogeneityの関連性
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広川 佳史、金山 和樹、松田知世、湯浅 博登、林 昭伸、内田 克典、小塚 祐司、今井 裕、石井 健一朗、渡邊 昌俊
2. 発表標題 前立腺癌細胞におけるCofilin活性化に関わる因子
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 臼杵 恵梨、石井 健一朗、広川 佳史、金山 和樹、松田 知世、渡邊 昌俊
2. 発表標題 Anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses proliferation of human pancreatic cancer cells by inducing cell cycle arrest
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 広川 佳史、石井 健一朗、金山 和樹、林 昭伸、内田 克典、小塚 祐司、今井 裕、福留 寿生、湯浅 博登、渡邊 昌俊
2. 発表標題 前立腺癌細胞株におけるMUC-4の機能解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山 和樹, 矢野 孝明, 坂本 未来, 今野 和治, 伊藤 英樹, 森 正美, 米田 操, 白石 泰三
2. 発表標題 泌尿器細胞診の精度管理をどう進めるか 画像解析ソフトを用いた精度管理 細胞所見定量化解析と「異型細胞」診断への応用(会議録)
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会総会
4. 発表年 2019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
---------	---------