

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460420

研究課題名(和文) 低分化型胃癌における遺伝子異常の網羅的解析

研究課題名(英文) Screening of therapeutic targets in diffuse type gastric cancer

研究代表者

村上 和成 (Murakami, Kazunari)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00239485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌は日本で癌死亡率の第二位を占める。診断技術の進歩により、初期に発見される早期胃癌の治療成績は向上したが、悪性度が高まった進行胃癌の治療成績は良好ではない。特に分化度の低い低分化型胃癌は高分化型より、リンパ節や腹膜への転移の頻度が高く、抗癌剤による化学療法が治療成績を大きく左右する。本研究は予後不良な低分化型胃癌に対する分子標的治療の実現を目的とした。そのために、臨床検体および培養細胞株を用いて低分化型胃癌に特徴的な遺伝子異常を同定した。続いて、培養細胞を用いた機能解析により、低分化型胃癌の分子標的となる異常遺伝子を同定した。これらの結果を胃癌における効果的な分子標的治療の実現へ繋げたい。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancer (GC) remains one of the most common malignant diseases, with an estimated annual mortality of 700 000 worldwide, ranking third after lung and liver cancer. Despite a number of chemotherapy regimens using cytotoxic drugs, the prognosis of patients with advanced disease is still disappointing. Especially, diffuse type GC shows more malignant behavior, such as metastasis to lymph node or peritoneal and resistance to chemotherapy, than differentiated GC. In this study, we aimed to establish the molecular targeted therapy for diffuse type GC. For this aim, we first compared alterations in genomic copy number, gene expression profile and phosphorylation of several proteins between diffuse type and differentiated type GCs. Secondly, we analyzed the contribution of candidate alterations on the malignancy. In conclusion, we found several candidates for the molecular targeted therapy in diffuse type GC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：低分化型胃癌 アレイCGH 標的遺伝子

1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本における癌死亡率の第二位を占める。診断技術の進歩により、初期に発見される早期胃癌の治療成績は向上したが、悪性度が高まった進行胃癌の治療成績は良好ではない。この原因として、進行胃癌に対して外科治療以外に効果的な補助療法が確立されていないことが挙げられる。特に、分化度の低い低分化型胃癌は高分化型より、リンパ節や腹膜への転移の頻度が高く、抗癌剤による化学療法が治療成績を大きく左右する。近年、癌発症のメカニズム解明が大きく進み、癌は遺伝子異常の蓄積によって引き起こされることが明らかとなってきた。そしてその異常を標的とする分子標的治療が急速に進歩している。これまで多くの研究グループが胃癌の網羅的遺伝子異常解析を実施し、多数の標的候補分子を同定してきた。しかし、未だに胃癌の効果的な分子標的治療は確立されていない。この原因として、多数の標的候補の中から実際に胃癌の悪性化を促進させる遺伝子異常を選び出すのが困難であることが考えられる。早期胃癌は悪性度が低く、切除術が効果的であるのに対し、進行胃癌は転移・再発の頻度が高く、外科手術だけでなく補助的な治療も必要である。従って、胃癌において分子標的治療を確立させるためには、「複雑な遺伝子異常の中から、悪性化に直接関与する遺伝子異常を同定することが重要である。」と考えた。

このような視点で我々は、早期胃癌 20 症例と進行胃癌 30 症例についてアレイ CGH によりゲノムコピー数を網羅的に解析した。さらに進行胃癌 30 症例については、ゲノム異常に伴い異常発現する遺伝子およびマイクロ RNA を網羅的に解析した。これらの解析により、我々は胃癌の発生および進行時期に蓄積される様々な遺伝子異常の同定に成功した。しかし、これらの解析において早期胃癌として用いたサンプルは全て内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) で得ていたため、分化度の高い症例に限られていた。さらに進行胃癌についても半数以上は高分化型が占めていた。したがって、我々がこれまでに同定してきた遺伝子異常は主に分化型胃癌に特徴的なものであることが予想された。

胃癌の予後は組織型により異なっており、分化度の高い分化型より低分化型の方が、予後が悪い。しかし、低分化型胃癌に限定した網羅的遺伝子異常解析はほとんど行われていない。その理由として、多くの低分化型胃癌は通常の分化型と比較し、正常間質細胞 (線維芽細胞、炎症細胞など) を多く含んでおり癌細胞のみを効率よく回収することが困難である点が挙げられる。この課題に対し我々は、解析の精度が下がる原因となる正常細胞の混入を防ぐため、LCM を行い胃癌細胞のみを回収する。既に、低分化型胃癌に対して LCM により癌細胞を回収し遺伝子異常を網羅的に解析した実績がある。

2. 研究の目的

本研究では、低分化型胃癌に特徴的な遺伝子異常を同定し、治療標的としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 低分化型胃癌の組織切片よりゲノム DNA および RNA を抽出し、ゲノムアレイおよび遺伝子発現アレイ解析を行う。解析結果を分化型胃癌と比較し、低分化型胃癌に特異的な遺伝子異常を検出した。マイクロアレイ実験は全て大分大学医学部に設置されているアジレント社のシステムにより行った。

(2) 胃癌細胞株を使って高分化型と低分化型胃癌のゲノムコピー数異常、遺伝子発現異常を比較した。

(3) 高分化型と低分化型で差の認められたゲノム異常について、癌化に寄与するか明らかにするため、siRNA によるノックダウン後、MTS アッセイ (Promega 社) により細胞増殖への影響を解析した。

(4) 高分化型と低分化型胃癌細胞株のリン酸化強度を比較するため、Bio-plex (Bio-rad 社) を行った。

4. 研究成果

(1) 低分化型胃癌症例について LCM で癌細胞を回収し、DNA と RNA を抽出し、CGH array および Gene Expression microarray によりゲノム異常領域において異常発現する遺伝子の抽出を行った。いくつかの領域において低分化型胃癌特異的にゲノム異常を認めた。それらの中でも 16q22 領域の欠失がもっとも有意であった。さらに 16q22 領域の欠失により発現低下する遺伝子として、ATP6V0D1、CENPT、PSKH1、VPS4A、WWP2、ZNR1 を同定した。これらの遺伝子の異常発現が低分化型胃癌の悪性度に寄与しているかもしれない。

(2) 臨床検体を用いた網羅的解析と同時に、胃癌細胞 31 株についてもゲノムコピー数と遺伝子発現の異常を網羅的に解析し、ゲノム異常に伴い異常発現する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、低分化型胃癌に特徴的なゲノムコピー数異常と異常遺伝子の抽出に成功した (図 1)。

図 1. ゲノムコピー数異常とそれに伴い発現変動する遺伝子

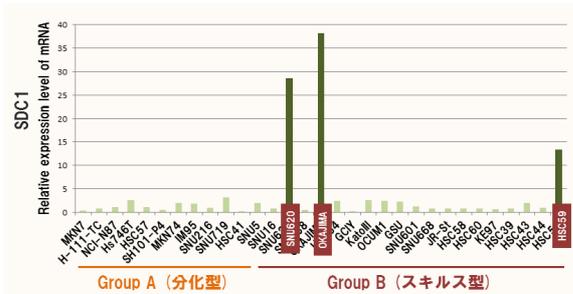
ゲノム異常領域	Group A n=11, (%)	Group B n=20, (%)	Fisher's P value	Differentially expressed genes
ゲノム増殖				
1p36	4 (36.4)	17 (85)	0.013	17 (NOC2L, SDF4, UBE2J2...)
1q21.1	0 (0)	8 (40)	0.028	5 (PDE4D, PEX11B, POL11B...)
1q21.3	3 (27.3)	14 (70)	0.031	10 (OTUD7B, APH1A, MRPS21...)
1q31.2	0 (0)	7 (35)	0.033	no genes
1q42.2	0 (0)	7 (35)	0.033	14 (ABC810, C1orf124, SPHAR...)
1q43-q44	0 (0)	7 (35)	0.033	8 (B3GALNT2, PPPDE1, ADSS...)
7q11.22	3 (27.3)	14 (70)	0.031	2 (RABGEF1, C7orf42)
7q11.23	5 (45.5)	17 (85)	0.038	17 (TYW1, TYW1B, SBD5...)
8q21.3	1 (9.1)	11 (55)	0.02	15 (INTS10, HR, FAM160B2...)
8q21.2	1 (9.1)	10 (50)	0.047	4 (PPP2R2A, TRIM35, PNMA2, ADAM28)
17q21.31	2 (18.2)	13 (65)	0.023	13 (CNP, NKIRAS2, STAT3...)
17q25.1	3 (27.3)	14 (70)	0.031	3 (C17orf80, COG1, CDC42EP4)
19q13.33	3 (27.3)	14 (70)	0.031	10 (RPL28, U2AF2, HSPBP1...)
ゲノム欠失				
5q35.1-q35.2	0 (0)	7 (35)	0.033	16 (ZNF346, CCDC99, UIMC1...)
16q23.1	0 (0)	7 (35)	0.033	no genes

Group A; 分化型胃癌細胞株

Group B; 低分化型胃癌細胞株

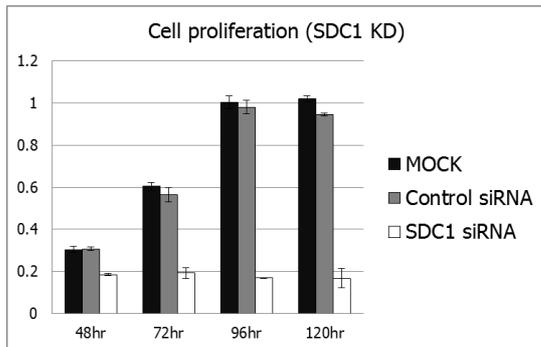
(3)低分化型胃癌細胞株の網羅的ゲノム異常解析から新規の胃癌ゲノム増幅領域 2p24.1を同定した。この領域には RHOB, SDC1, PUM2, RAP1A などが含まれていたが、遺伝子発現アレイ解析の結果から、SDC1 が最もゲノム増幅の影響を受けて過剰発現することが分かった(図2)。

図2. SDC1 のゲノム増幅は過剰発現を引き起こす



SDC1 のゲノム増幅は細胞株3株(9.7%)で検出された。SDC1 が治療標的となり得るのかが明らかにするために、siRNA による SDC1 発現抑制を行った後に MTS アッセイで細胞増殖への影響を解析した。その結果、コントロール細胞群では時間経過とともに細胞が増殖するのに対し、SDC1 の発現抑制は胃癌細胞の増殖を顕著に低下させることが分かった。(図2)。この結果から、SDC1 の遺伝子増幅を持つ低分化型胃癌において SDC1 が治療標的になる可能性が示唆された。今後、この可能性について検討する。

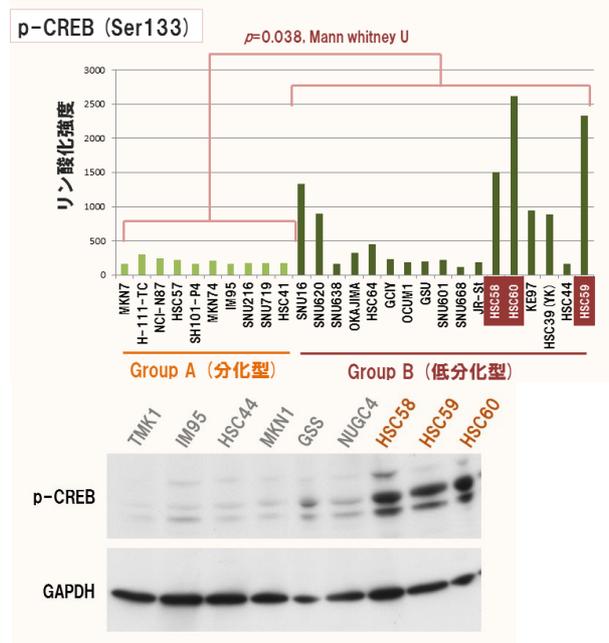
図2. SDC1 発現抑制は胃癌細胞の増殖を抑える



(4)分子標的治療薬は癌細胞内のシグナル伝達経路を遮断することにより、癌細胞の生存を抑制する。したがって、低分化が体に特異的に活性化するタンパク質を同定することができれば、それが治療標的となるかもしれない。我々は、代表的なシグナル伝達経路上のタンパク質 26 種類についてリン酸化強度を低分化型と高分化型で比較した。その結果、CREB タンパク質のリン酸化強度が低分化型胃癌特異的に亢進していることが分かった(図3)。

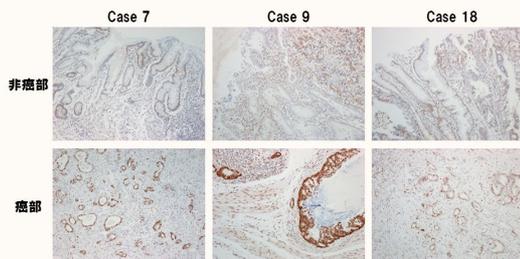
図3. 分化型および低分化型胃癌細胞におけ

る CREB リン酸化強度の比較(上段; バイオプレックス法、下段; ウェスタンブロット法)



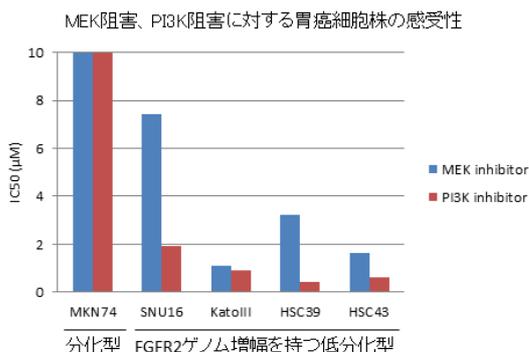
さらに、臨床胃癌検体の一部においてもリン酸化 CREB が発現亢進していることを発見した(図4)。

図4. 胃癌症例における CREB リン酸化の亢進



(5)若年性胃癌は、加齢に伴うゲノムコピー数異常の頻度が少ないため、悪性化に直接関与するドライバー遺伝子の検出頻度が高いと予想される。若年性低分化型胃癌6例について LCM により癌細胞を回収し、ゲノムコピー数異常を解析した。その結果、高レベルなゲノム異常領域として、FGFR2 が存在する 10q26 領域のゲノム増幅が6例中2例で検出された。FGFR2 のゲノム増幅が低分化型胃癌の悪性化に関与するのかが明らかにするため、まず FGFR2 ゲノム増幅を持つ胃癌細胞株を探した。その結果、31 細胞株中4株で FGFR2 ゲノム増幅が検出され、それらは全て低分化型細胞株であった。FGFR2 に対する分子標的治療薬は既に臨床試験が進められているが、いずれも臨床応用されていない。そこで、FGFR2 のシグナル伝達を標的とした分子標的治療の可能性を検討した。FGFR2 の下流シグナル伝達経路として RAS/MAPK 系と PI3K/AKT 系が知られている。我々は FGFR2 ゲノム増幅を持つ細胞株においてこれらの経路の抑制

が効果的であるか明らかにするために、RAS/MAPK 系を MEK 阻害剤 (PD0325901) で、PI3K/AKT 系を PI3K 阻害剤 (GDC0941) で抑制し、細胞増殖への影響を解析した。その結果、分化型胃癌細胞株 (MKN74) と比較して、FGFR2 ゲノム増幅を持つ細胞株では MEK 阻害剤もしくは PI3K 阻害剤が効果的であることが分かった (図 5)。



これらの結果は FGFR2 ゲノム増幅を持つ低分化型胃癌に対して「FGFR2 そのものではなく下流シグナル伝達系を標的とする」という新しい分子標的治療法の可能性を示唆する。

(6)まとめ

最近、各癌腫において、治療標的をもとにした亜型分類が注目されている。胃癌では ERBB2 ゲノム増幅を持つ症例が分類され、それらに対してハーセプチンという分子標的治療薬が適応されている。しかし、ERBB2 ゲノム増幅を持つ胃癌の多くは分化度が高く、悪性度のより高い低分化型胃癌に対する分子標的治療法はまだ開発されていない。

本課題において我々は、全ての低分化型胃癌に共通する治療法ではなく、まずは低分化型胃癌を亜型分類し、それぞれの亜型に対する治療法の開発を目指した。その結果、SDC1 や FGFR2 の高レベルなゲノム増幅や CREB リン酸化の亢進といった検出頻度は少ないが、癌化に強く関与することが予想される顕著な異常を発見した。実際、SDC1 と FGFR2 についてはそれ自体もしくはそれに関連するシグナルを抑制することで細胞増殖が低下することを明らかにした。さらに、高分化型と低分化型胃癌のゲノム異常を比較し、発現異常解析と組み合わせることで、多数の低分化型胃癌特異的な遺伝子発現異常を検出した。これらの異常が癌化にどのように寄与するか明らかにすることで、今後新たな治療法の開発につながると確信している。

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 5 件)

Hirashita Y, Kodama M, Okimoto T, Murakami K, Moriyama M 他. Reduced phosphorylation of ribosomal protein S6 is

associated with sensitivity to MEK inhibition in gastric cancer cells. *Cancer Science*, 査読有, 107(12), 2016, 1919-1928 DOI: 10.1111/cas.13094

Hijiya N, Tsukamoto Y, Moriyama M 他. Genomic Loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma. *Cancer Research*, 査読有, 76(9), 2016, 2612-2615 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1846

Murakami K, Sakurai Y, Shiino M 他. Vonoprazan, a novel potassium-competitive acid blocker, as a component of first-line and second-line triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a phase III, randomised, double-blind study. *Gut*, 査読有, 65(9), 2016, 1439-1446 DOI: 10.1136/gutjnl-2015-311304

Okimoto T, Kodama M, Murakami K 他. Esomeprazole- or rabeprazole-based triple therapy eradicated *Helicobacter pylori* comparably regardless of clarithromycin susceptibility and CYP2C19 genotypes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 査読有, 59(2), 2016, 149-153 DOI: 10.3164/jcbn.16-18

Kodama M, Okimoto T, Murakami K 他. Endoscopic atrophic classification before and after *H. pylori* eradication is closely associated with histological atrophy and intestinal metaplasia. *Endoscopy International Open*, 査読有, 03(04), 2015, 311-317 DOI: 10.1055/s-0034-1392090

〔学会発表〕(計 4 件)

兒玉雅明、沖本忠義、村上和成. 次世代シーケンサーを用いた *H. pylori* 除菌後胃癌の網羅的遺伝子解析による除菌後胃癌危険因子の検討. 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016 年 4 月 21 日-4 月 23 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)

平下有香、沖本忠義、兒玉雅明、守山正胤、村上和成. 胃癌における MEK 阻害剤への感受性予測因子の探索. 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016 年 4 月 21 日-4 月 23 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)

兒玉雅明、沖本忠義、村上和成. *H. pylori* 除菌後発見胃癌における内視鏡的および免疫組織学的特徴の検討. 第 89 回日本消化器内視鏡学会総会, 2015 年 5 月 29 日-5 月 31 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Murakami K, Skurai Y, Shiino M 他. A Phase 3, Double-Blind Study of a Triple Therapy with TAK-438, Amoxicillin, and Clarithromycin As First Line Eradication of H. pylori and a Triple Therapy With TAK-438, Amoxicillin, and Metronidazole As Second Line Eradication of H. pylori. Digestive Disease Week 2014, 2014年5月3日-5月6日, McCormick Place(アメリカ合衆国)

(3)連携研究者

(4)研究協力者

〔図書〕(計 1 件)

村上和成. 中山書店, 消化管の細菌学的検査, 内科学書 改訂第8版, vol. 4, 2016, 57-60

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 和成(MURAKAMI, Kazunari)
大分大学・医学部消化器内科学講座・教授
研究者番号: 00239485

(2)研究分担者

兒玉 雅明(KODAMA, Masaaki)
大分大学・福祉健康科学部・教授
研究者番号: 20332893

守山 正胤(MORIYAMA, Masatsugu)
大分大学・医学部分子病理学講座・教授
研究者番号: 90239707

沖本 忠義(OKIMOTO, Tadayoshi)
大分大学・医学部消化器内科学講座・講師
研究者番号: 90381037