

令和 3 年 5 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06983

研究課題名(和文) 癌の胎児形質転換の臨床病理と分子機構

研究課題名(英文) Clinicopathological and molecular analyses of primitive phenotypic transformation in cancer development

研究代表者

牛久 哲男 (Ushiku, Tetsuo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：60376415

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)：胃癌の中でも特に悪性度の高いAFP産生胃癌、肝様腺癌、胎児消化管上皮類似癌などを含む一群である胎児形質胃癌の臨床病理学的特徴、遺伝子異常を検討した。網羅的遺伝子発現プロファイリングにより、胎児形質胃癌に特徴的に高発現する癌関連遺伝子や免疫回避機構関連遺伝子を抽出し、多数の胃癌臨床検体を対象に検討を行った。胎児形質胃癌は他の胃癌に比してより多彩な免疫回避機構を獲得していることが高悪性度形質に関連していることが示された。治療標的候補分子として複数の遺伝子群が胎児形質胃癌に特徴的に高発現することを見出した。AFP産生胃癌細胞株を用いた阻害薬投与実験では一定の増殖抑制効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の悪性度は様々であり、特に悪性度の高い胃癌の治療戦略を確立することが胃癌撲滅のために重要な課題である。本研究は「胎児形質胃癌」という最も悪性の高い胃癌の一群に注目し、治療標的候補や免疫回避機構を明らかにすることで、この胃癌に最も効果的な治療方法を確立することを目指して実施された。多数の胃癌組織を対象とした遺伝子発現解析等から、この胃癌で特異的に高発現している遺伝子群を発見、これらの阻害薬により胃癌細胞株の増殖が抑制された。また胎児形質胃癌は他の胃癌に比べてより多様な腫瘍免疫回避機構を獲得していることが分かり、治療戦略上重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aims to clarify clinicopathological and molecular characteristics of "gastric adenocarcinoma with primitive phenotype", the most aggressive subtype of gastric cancer, including AFP-producing, hepatoid, and fetal gut-like adenocarcinoma. We identified several cancer-related genes and genes associated with immune evasion specifically upregulated in this subtype from gene expression databases of gastric cancer. Further, expression profiles of these genes were tested using immunohistochemistry for a large cohort of stomach cancer. We demonstrated that some of these genes was specifically upregulated in this subtype and inhibition of these genes reduced growth of AFP-producing gastric cancer cell lines. Additionally, AFP-producing gastric cancers exhibited the highest level of PD-L1 expression, loss of HLA-class I expression, and HLA-G expression. Our observations would contribute to develop therapeutic strategy for this aggressive cancer.

研究分野：病理学

キーワード：胃癌 胎児形質 腫瘍免疫回避機構 分子標的

1. 研究開始当初の背景

検診の普及や診断・治療技術の進歩により胃癌の治療成績は大きく向上してきたが、進行・転移・再発例の予後は未だ不良である。胃癌の悪性度は様々で、何年間も粘膜内にとどまる胃癌が経験される一方、毎年内視鏡検査を受けても切除不能進行癌として発見される胃癌も存在する。したがって、胃癌の克服を目指すためには、特に悪性度の高い胃癌について早期発見や新規治療法開発に向けた腫瘍マーカーや治療標的の同定、病態解明を進めることが求められる。

近年、大規模網羅的遺伝子解析に基づく胃癌の分子分類が提唱され、胃癌研究・臨床応用の新たな枠組みとなっている。代表的な The Cancer Genome Atlas (TCGA) 分類では、CIN (染色体不安定) 型、GS (ゲノム安定) 型、EBV 関連胃癌、MSI 胃癌に 4 分類される (TCGA, Nature 2014)。EBV 関連胃癌と MSI 胃癌は特徴的な成り立ちを有する一群で、悪性度は比較的低いとされる。GS 型は主にびまん型胃癌からなり進行癌では悪性度が高く、CDH1 や RHOA の変異など比較的少数の遺伝子異常が知られている。一方、他の群の除外で分類される面もあり、CIN 型は胃癌の約半分を占める最大の群で、最も不均一な群でもある。分化型組織像と高度のコピー数異常で特徴づけられ、特に受容体型チロシンキナーゼ (RTK)・RAS (FGFR2, KRAS, ERBB2, EGFR, MET) の増幅が相互排他的に見られることが報告されている (Deng et al. Gut 2012)。申請者はこれまで、ES/iPS 細胞研究成果に着目し、胎生初期の幼若な細胞マーカー遺伝子を同定 (Cancer Science 2009, Am J Surg Pathol 2010, Histopathology 2012)、これらを用いて胎児期の幼若な細胞形質を有する胃癌を「胎児形質胃癌」として提唱し、AFP 産性胃癌を含む高悪性度の分化型胃癌、TP53 異常が高頻度で TCGA 分子分類では CIN 型に分類されるなど、その特徴を明らかにした (Am J Surg Pathol 2017)。「胎児形質胃癌」で特異的に発現する GPC3、CLDN6、SALL4 は有力な治療標的分子であり、新規治療戦略としても期待される。

以上の事実から、胎児形質胃癌は最大の分子型である CIN 型の中で高悪性度群を形成し、その病態解明や治療戦略開発が強く求められる。しかしながら、胎児形質が高悪性度に関与する分子背景や胎児形質転換の機序、近年注目されている腫瘍免疫回避機構についてはほとんどわかっていない。本研究課題では、学術的には「癌の胎児形質転換はどのように悪性度亢進をもたらすのか?」を問い、臨床的応用を見据えた治療標的探索を通して高悪性度癌克服への貢献を目指す。

2. 研究の目的

胃癌撲滅のためには悪性度の高い癌の病態を解明し、その早期発見や新たな治療戦略開発に結び付けていく研究推進が不可欠である。これまでの研究で、胎児型形質を有する癌のマーカー遺伝子を複数同定し、これらのマーカーを用いることで分化型胃癌の一部は胎児形質転換を経てより悪性度の高い癌に変化し、AFP 産性胃癌を含め胃癌全体の約 1/4 が胎児型形質を有することを示してきた。本研究では、こうした「胎児形質胃癌」と高悪性度形質を関連付ける分子異常、胎児形質転換の分子機構を明らかにし、高悪性度胃癌に対する個別化医療を推進する基盤的知見を提供することを目的とする。治療標的候補分子については実際に胃癌細胞株を用いた阻害剤投与実験等により抗腫瘍効果の評価を行う。

3. 研究の方法

胎児形質胃癌の高悪性度因子・臨床病理学的意義

申請者のこれまでの検討結果から、胎児形質胃癌に特徴的な遺伝子変異は TP53 変異が 7 割程度と高頻度である以外、他の胃癌と比較して有意に高頻度にみられる遺伝子異常は見つからない。RNA-sequence 解析では、胎児形質胃癌症例は同一の遺伝子発現クラスターに分類され、AFP, SALL4, CLDN6 など胎児形質マーカー遺伝子の高発現を特徴とする他、数個の癌関連遺伝子の高発現が特徴的にみられた。これらの癌関連遺伝子が胎児形質癌の高悪性度形質に関与する可能性があり、多数の臨床検体における発現検討、臨床病理相関の解析を行う。

胎児形質転換の分子機構解析

胎児形質マーカー遺伝子のメチル化解析。胎児形質胃癌には TP53 異常以外の特徴的遺伝子異常は見出されず、エピジェネティックな機序がその成り立ちに関わる可能性が疑われる。DNA 脱メチル化と胎児形質マーカー発現亢進の相関が疑われるため、これを多数の臨床検体で検証する。通常型腺癌と胎児形質胃癌の併存例においては、成分ごとにメチル化状態を比較解析を行う。

RTK/RAS 解析。胎児形質胃癌が含まれる CIN 型胃癌の特徴である RTK/RAS の増幅・発現亢進について ISH 法や免疫染色法を用いて臨床検体で調べ、胎児形質や悪性度との関連を検討する。

胎児形質胃癌の成り立ちに重要と考えられる遺伝子についてその機能解析を実施する。胎児形質マーカー高発現胃癌細胞株を用いて、siRNA ノックダウンによる増殖能評価を行う。

胎児形質胃癌の形態的スペクトル

胎児形質胃癌では分化の可塑性が高まり、様々な細胞分化を示す症例が認められるため、自験例を Review し、組織型分類について整理を行う。

4. 研究成果

胎児形質胃癌の成り立ちに關与する因子・治療標的分子

RNA-sequence 解析により新規に同定された胎児形質胃癌で特異的に高発現する遺伝子群について、胎児形質胃癌、Epstein-Barr virus(EBV)胃癌、Microsatellite instability (MSI)胃癌、Chromosomal Instability (CIN)胃癌、Genomically stable (GS)胃癌をそれぞれ約 50 例含む胃癌症例コホート (n = 245) でその発現パターンや臨床病理学的因子、患者予後との關連を検討した。

治療標的候補となる複数の遺伝子が抽出され、いずれも胎児形質胃癌で特異的に高発現し、他のサブタイプの胃癌での高発現は稀であることが確認された。これらの遺伝子発現プロファイルから胃癌全体を高発現群と低発現に分けると、高発現群は予後不良な傾向がみられた。AFP 産生胃癌細胞株を用いた機能解析では、これらの標的分子の阻害剤により一定の増殖抑制効果が認められた。また治療標的薬の存在する HER2 発現は胎児形質胃癌で最も高頻度にみられることも確認した。

腫瘍免疫回避機構は免疫チェックポイント阻害薬をはじめ有力な治療標的となることが知られているが、胎児形質胃癌における腫瘍免疫回避機構についてはほとんど知られていなかった。主要な免疫回避機構である PD-L1 発現、HLA-classI 発現消失に加え、RNA-sequence データから抽出された HLA-G について上記と同コホートを用いて検討した。その結果、胎児形質胃癌は EBV 胃癌や MSI 胃癌のような免疫学的に "Hot" なサブタイプと同程度に PD-L1 発現が認められることがわかった。胎児形質胃癌は HLA-classI の発現消失も最も高頻度に見られ、さらに HLA-G 発現はほぼ胎児形質胃癌に特異的に認められる現象であった。以上のことから、胎児形質胃癌は、他のサブタイプと比較してより多くの免疫回避機構を駆使して生存アドバンテージを獲得していることが明らかとなった。

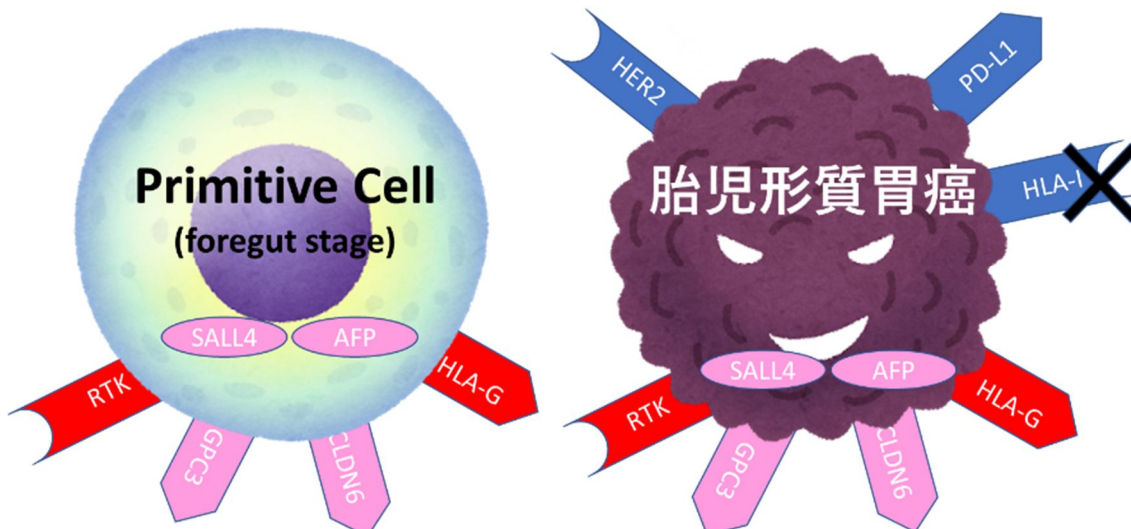
胎児形質胃癌形成の分子機構

胎児形質マーカーである SALL4 と CLDN6 について、発現と脱メチル化の關が強い CpG 配列を同定し、この CpG 配列についてパイロシーケンス法を用いてメチル化状態を解析した。対象は SALL4 や CLDN6 の高発現が確認されている胎児形質胃癌と正常胃粘膜のペア 5 症例を用いた。その結果、SALL4 や CLDN6 の発現と脱メチル化の關が確認された。特に、同一症例で SALL4 発現胎児形質胃癌と SALL4 陰性通常型胃癌の混在例では前者でのみ脱メチル化を生じている症例が存在し、胎児形質マーカー遺伝子発現の少なくとも一部は DNA メチル化をはじめとしたエピジェネティックな制御が關与していることが示唆された。

形態的多様性

胎児形質胃癌の主な組織型は、胎児消化管上皮類似癌、肝様腺癌が多くを占め、卵黄囊腫瘍類似癌や絨毛癌分化を示す例が少数認められた。この他、内分泌細胞分化を示す例が少なからず認められ、特に領域性を持って内分泌細胞癌の形態を示す症例が複数例発見された。さらに、これまで癌肉腫として分類されていた自験例 4 例を詳細に評価すると、腺癌成分には胎児消化管上皮類似癌が全例で見られ、肝様腺癌、卵黄囊腫瘍類似癌や絨毛癌分化を示す例も存在した。以上のことから、胃癌における癌肉腫の少なくとも一部は胎児形質胃癌であり、その分化の可塑性の高さから間葉系分化を示す例が癌肉腫として認識されていた可能性が示唆された。

以上の結果から、下図に示すごとく、胎児形質胃癌では他のサブタイプでも見られる HER2 増幅や PD-L1 発現等に加え、胎生初期の幼若な細胞で用いられている細胞増殖や腫瘍免疫回避に關連した遺伝子群を高発現することで、高悪性度形質を獲得している可能性が考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 牛久哲男	4. 巻 38
2. 論文標題 消化器腫瘍I 新WHO分類のポイント 消化管編 胃浸潤性病変	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 990-996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 深澤京, 山澤翔, 岩崎晶子, 国田朱子, 牛久綾, 牛久哲男.
2. 発表標題 AFP産生胃癌におけるHLA-G発現の検討.
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 牛久哲男
2. 発表標題 Precision treatment for gastric cancer in the era of genomic medicine “Precision treatment for early gastric cancer”
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牛久哲男
2. 発表標題 Pathology of the gastric cancer; WHO classification “Special subtypes of gastric cancer”
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牛久哲男
2. 発表標題 胎兒型形質胃癌
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牛久哲男
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬時代の消化管病理学
3. 学会等名 第15回日本消化管学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牛久哲男
2. 発表標題 Early events in the molecular pathogenesis of gastric cancer: Precision medicine for early cancer.
3. 学会等名 9th China Annual Pathology Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山澤翔、山下裕玄、瀬戸泰之、牛久哲男
2. 発表標題 胃原発癌肉腫4例の検討
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科 人体病理学・病理診断学ホームページ
<http://pathol.umin.ac.jp/>

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
研究協力者	国田 朱子 (Kunita Akiko)		
研究協力者	山澤 翔 (Yamazawa Sho)		
研究協力者	深澤 京 (Fukasawa Miyako)		

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
---------	---------