

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08340

研究課題名(和文) 高悪性胃癌の病態解明を目指す病理学的研究

研究課題名(英文) Pathological and molecular characterization of gastric cancer with aggressive phenotype

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)・准教授

研究者番号：60376415

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)：複数の胎児形質マーカー遺伝子発現を基に、386例の胃癌臨床検体を対象にクラスタ解析を行った。胃癌の約20%が胎児形質マーカー高発現群であり、この群にはAFP産生胃癌が含まれ、分化型優位、高頻度の脈管侵襲、高いリンパ節転移率、患者予後不良を示す高悪性度胃癌であった。遺伝子異常ではTP53異常が高頻度だが、マイクロサテライト不安定性やEBウイルス感染との関連は乏しく、TCGA分類では染色体不安定型に分類された。早期癌の解析でも悪性度が高い傾向があり、内視鏡的治療などの縮小治療の適応は慎重にすべき群である。悪性度の高いびまん型胃癌においてはRHOA変異陽性例の臨床病理学的特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of phenotypic markers characterizing primitive cells and its correlation with clinicopathologic and molecular characteristics in a series of gastric cancer (n = 386). On the basis of the expression profiles, 20% of tumors were identified as gastric cancer with primitive phenotype, and were characterized by intestinal type histology including AFP-producing adenocarcinoma, frequent vascular invasion and nodal metastasis. This subgroup was associated with patients' poor prognosis and was an independent risk factor for disease-free survival. In terms of molecular alteration, they showed frequent TP53 alterations and little association with Epstein-Barr virus or microsatellite instability, and were mostly classified as "chromosomal instability" subtype in the Cancer Genome Atlas' molecular classification. We also clarified clinicopathological characteristics of diffuse type gastric cancer with RHOA mutation.

研究分野：消化管病理学

キーワード：胃癌 胎児形質 びまん型胃癌

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞は自己複製能と分化多能性で特徴づけられ、これらは癌細胞が有する高い増殖能・細胞分化の可塑性と類似し、こういった性質には共通した遺伝子群の関与が想定される。実際に、肺腺癌、乳癌、神経膠腫、膀胱癌などでは、胚性幹細胞を特徴づける遺伝子群 (OCT4, SOX2, NANOG, c-MYC, SALL4, KLF4 など) やそのターゲット遺伝子群を高発現している腫瘍が存在し、術後生存率が低いなど、高悪性度形質に関連している。多くの胚性幹細胞関連因子は、成人の正常組織では発現がないかきわめて低いいため癌治療のターゲットとして理想的であり、その有効性も示されつつある。申請者はこれまで胃癌での SALL4 発現を検討し、代表的な高悪性胃癌である AFP 産生胃癌を含む 15% の胃癌で SALL4 が高発現していることを見出した。さらに、胚性幹細胞マーカーである接着因子 Claudin-6 (CLDN6) の検討では、10% の胃癌で CLDN6 の高発現がみられたが、AFP 産生胃癌で高発現がみられた点が SALL4 発現群と共通していた。AFP 産生胃癌を始め、これらの胚性幹細胞マーカー陽性の胃癌は高度の脈管浸襲を示し、転移をきたしやすい傾向がある。これらの知見から、胚性幹細胞関連因子が胃癌の高悪性度形質に関連している可能性が予想される。SALL4 や CLDN6 をはじめとする胚性幹細胞マーカーの発現と、患者予後との関係、詳細な臨床病理学的特徴、胃癌サブグループの中での位置づけやその他の癌関連遺伝子との関連、胃癌発生・進展における機能的役割、および治療標的としての有効性などは明らかになっておらず、解明すべき課題である。

一方、びまん型胃癌も腹膜播種を来しやすい高悪性度胃癌の代表であるが、CDH1 以外の特徴的な遺伝子異常は知られていない、HER2 陽性率が低く有効な分子標的薬が見るかっていない等の課題が多い。最近のゲノム解析により新たな遺伝子異常が分かりつつあり、治療標的としても期待されるものの、これらの異常を有する胃癌の臨床病理学的特徴はあきらかになっていない。

2. 研究の目的

胃癌撲滅のためには特に悪性度の高い胃癌の病態を解明し、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。本研究課題では高悪性度胃癌の双璧をなすびまん型胃癌と AFP 産生胃癌の病態解明を目指す。最近の研究から、びまん型胃癌においては RHOA シグナル異常 (RHOA 変異、CLDN18-ARHGAPs 融合遺伝子等)、AFP 産生胃癌では胎児形質マーカー遺伝子の異常発現がその成り立ちに重要な因子である可能性が示されている。本研究ではこれらの分子異常の解析を通し、高悪性度胃癌に対する個別化医療を加速させる基盤的知見を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胃癌臨床検体、患者データを用いて、胚性幹細胞関連因子 (OCT4, NANOG, SALL4, CLDN6) および癌胎児性マーカー (AFP, Glypican-3) の発現を検討し、これらを高発現する胃癌の詳細な臨床病理学的特徴をあきらかにする。

(2) 公開されている胃癌ゲノムデータベースを用いて、上記の遺伝子群の発現とゲノム異常との関連を解析し、その特徴をあきらかにする。

(3) 網羅的発現解析データベースから抽出された遺伝子のなかから、胚性幹細胞マーカーを高発現する胃癌で特徴的な遺伝子異常を明らかにする。

(4) 胃癌細胞株を用いて、SALL4 をはじめとする胚性幹細胞関連因子の胃癌における発現と癌幹細胞マーカーとの関連を解析する。

(5) びまん型胃癌における新規遺伝子異常として報告された RHOA 変異や CLDN18-ARHGAPs 融合遺伝子の臨床病理学的意義を明らかにするため、これらを有するびまん型胃癌の臨床検体を用いて病理学的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 胃癌症例の病理学的解析を目的とし、2007 年～2010 年の外科切除がなされた胃癌の連続症例のデータベース、および全症例を含む Tissue microarray (TMA) の作成を実施した。これを用いて多数の胎児形質マーカー遺伝子発現を免疫染色 (386 症例) により調べ、その結果を基にクラスター解析を実施した (下図)。胃癌の約 20% が胎児形質マーカー高発現群 (Group 1) であり、この群は他群 (Group 2, 3) に比して、分化型優位、高頻度の脈管侵襲、高いリンパ節転率が特徴で、生存解析では単変量および多変量解析で有意に予後不良を示す高悪性度胃癌であった (図 2)。遺伝子異常では TP53 異常が高頻度である一方、マイクロサテライト不安定性や EB ウイルス感染との関連は乏しいことが判明した。図 1 胎児形質マーカー発現に基づくクラスター解析結果 (文献 1 より改変)

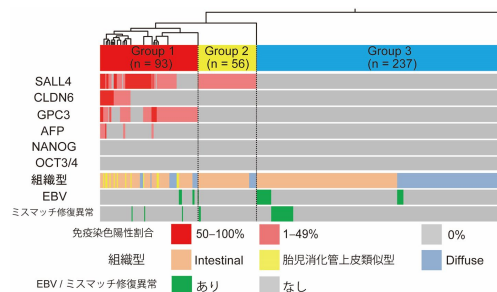
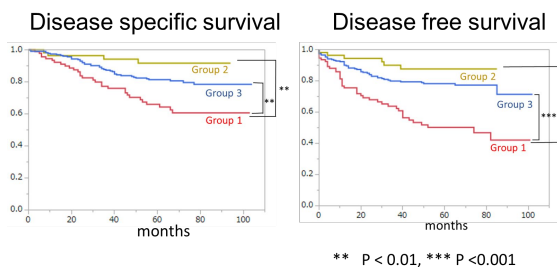


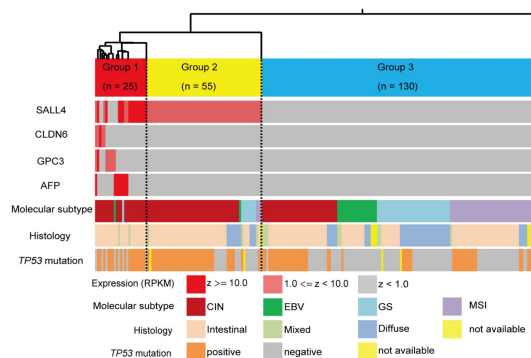
図2 胎児形質発現と予後の関係 (文献1より改変)



早期胃癌(n=282)を対象に同様の解析を実施した。早期胃癌の18%が胎児型形質を有し、他の群と比較して脈管侵襲が高度、TP53異常頻度が高く、早期より悪性度が高い群であり、内視鏡的治療などの縮小治療の適応は慎重にすべき群と考えられた。

(2) The Cancer Genome Atlas (TCGA)胃癌データベース(210症例)を用いて同様の胎児形質マーカー遺伝子発現を調べ、ゲノム異常との関係を解析した。TCGAによる分子分類では胎児形質マーカー高発現群は“chromosomal instability”(CIN)型に分類され、“EBV”型、“MSI”型、“genomically stable”型では胎児形質マーカー発現は乏しいことが明らかになった。特異的な治療標的分子としてCLDN6やGPC3が候補となり得ることを示した。

図3 TCGA胃癌データベースのクラスター解析結果(文献より改変)



(3) 網羅的遺伝子発現データベースから胎児形質マーカー高発現群に特異的に発現する癌関連遺伝子を同定。より多数の臨床検体でさらに解析中である(未発表データ)。

(4)胎児形質マーカー遺伝子を高発現する胃癌細胞株を同定した。癌幹細胞マーカー(CD44, CD24, CD133, ABCG2, LGR5, EpCAM, ALDH1A1)の発現を指標にこれらの細胞株をフローサイトメトリーにより分離した。癌幹細胞マーカー陽性群と陰性群における胎児形質マーカー遺伝子発現を調べたところ、一定の相関がみられ、この意義について今後さらに検討を予定している。

(5)びまん型胃癌に特徴的なRHOA変異やCLDN18-ARHGAPs融合遺伝子と臨床病理像の関係を明らかにした。びまん型胃癌87例中、RHOA変異が22例、CLDN18-ARHGAPs融合遺伝子は4例にみられ、既報告通り相互排他的であった。RHOA変異群はRHOA野生型群と比較して、粘膜内病変に対して浸潤巣の大きさが有意に小さい、粘膜内では浸透性浸潤をしやすいなどの病理組織像の特徴が認められた(文献)。予後解析では有意な差は認められなかった。

本研究成果によって、胎児型形質胃癌やびまん型胃癌のゲノム異常とそれに対応する臨床病理学的特徴の一端が明らかとなり、これらの高悪性度胃癌の治療戦略に向けて基盤となる知見を示すことが出来たと考えられる。

<引用文献>

Yamazawa S, Ushiku T (co-1st author), Shinozaki-Ushiku A, et al. Gastric Cancer With Primitive Enterocyte Phenotype: An Aggressive Subgroup of Intestinal-type Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2017;41:989-997.

Ushiku T, Ishikawa S, Kakiuchi M, et al. RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. *Gastric Cancer* 2016;19:403-11.

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 6件)

Katoh H, Komura D, Konishi H, Suzuki R, Yamamoto A, Kakiuchi M, Sato R, Ushiku T, Yamamoto S, Tatsuno K, Oshima T, Nomura S, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. Immunogenetic Profiling for Gastric Cancers Identifies Sulfated Glycosaminoglycans as Major and Functional B Cell Antigens in Human Malignancies. *Cell Rep.* (査読有) 2017;20:1073-1087. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.016.

Yamazawa S, Ushiku T (co-first author), Shinozaki-Ushiku A, Hayashi A, Iwasaki A, Abe H, Tagashira A, Yamashita H, Seto Y, Aburatani H, Fukayama M. Gastric Cancer With Primitive Enterocyte Phenotype: An Aggressive Subgroup of Intestinal-type Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* (査読有) 2017;41:989-997. doi: 10.1097/PAS.0000000000000869.

Ushiku T, Ishikawa S, Kakiuchi M, Tanaka A, Katoh H, Aburatani H, Lauwers GY, Fukayama M. RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. Gastric Cancer.(査読有) 2016;19:403-11. doi: 10.1007/s10120-015-0493-0.

牛久 哲男, 山澤 翔, 深山 正久, 胚細胞腫瘍に類似した体細胞腫瘍の組織発生と分化、病理と臨床(査読なし)、2017;35:1126-1132

牛久 哲男, 胎児消化管上皮類似癌、病理と臨床(査読なし)、2016;34:954-958

牛久 哲男, 癌の分子病理診断の現状と将来 胃癌、病理と臨床(査読なし)、2016;34:280-286

〔学会発表〕(計 9 件)

牛久 哲男, Moving towards gastric cancer subtyping for precision medicine: molecular classification and beyond、第 90 回日本胃癌学会総会、2018.

牛久 哲男, ゲノム医療時代の胃癌病理学研究 基礎研究成果を生かし個別化医療の実現を目指す、第 63 回日本病理学会秋期特別総会、2017

Ushiku T, Yamazawa S, Shinozaki-Ushiku A, Fukayama M, Gastric Cancer with Primitive Enterocyte Phenotype: An Aggressive Subgroup of Intestinal-Type Adenocarcinoma, 10th Joint Meeting of the British Division of the International Academy of Pathology and the Pathological Society of Great Britain, 2017.

山澤 翔, 牛久 哲男, 岩崎 晶子, 牛久 綾, 瀬戸 泰之, 深山 正久胎児型形質を有する胃癌の臨床病理学的検討、第 106 回日本病理学会総会、2017

牛久 哲男, 山澤 翔, 岩崎 晶子, 林 玲 匡, 牛久 綾, 瀬戸 泰之, 深山 正久 Carcinoma with primitive phenotype: an aggressive subgroup of intestinal-type gastric cancer、第 89 回日本胃癌学会総会、2017

田中 淳, 牛久 哲男, 国田 朱子, 石川 俊平, 深山 正久、びまん型胃癌における RHOA 変異と CLDN18 転座の臨床病理学的意義、第 75 回日本癌学会学術総会、2016

山澤 翔, 牛久 綾, 牛久 哲男, 深山 正久、胃癌における Claudin6 の発現とその臨

床病理学的意義についての検討、第 105 回日本病理学会総会、2016

牛久 哲男, 石川 俊平, 垣内 美和子, 油谷 浩幸, 深山 正久、特異な変異シグネチャーを有するびまん型胃癌の 1 例、第 105 回日本病理学会総会、2016

田中 淳, 牛久 哲男, 国田 朱子, 石川 俊平, 深山 正久、びまん型胃癌における RHOA 変異と CLDN18-ARHGAP 転座の意義、第 105 回日本病理学会総会、2016

〔図書〕(計 1 件)

牛久 哲男, 深山 正久, AFP 産生胃癌 腫瘍病理鑑別診断アトラス第 2 版、2015: 117-123

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕

ホームページ等
東京大学人体病理学・病理診断学分野ホームページ
<http://pathol.umin.ac.jp/index.shtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛久 哲男 (USHIKU, Tetsuo)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 60376415

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

山澤 翔 (YAMAZAWA, Sho)

田中 淳 (TANAKA, Atsushi)