

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19060

研究課題名(和文)胃底腺型胃癌の発癌機序の解明

研究課題名(英文)Carcinogenesis mechanism of gastric adenocarcinoma of fundic gland type

研究代表者

上山 浩也(UEYAMA, Hiroya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60621935

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)：胃底腺型胃癌の発癌関連遺伝子の網羅的解析に向けて、胃底腺型胃癌症例の新分類を作成した。胃底腺型胃癌は、純粋な胃底腺型胃癌と胃底腺粘膜型胃癌の2群に分類され、組織構築による胃底腺型胃癌の組織学的分類が悪性度を予想する上で有用である可能性が示唆された。また、胃底腺型胃癌の次世代シーケンサを用いた網羅的な遺伝子変異解析を行い、GNAS mutationが胃底腺型胃癌の発癌・進展過程に関与している可能性が示唆された。今後は解析によって得られた遺伝子異常の特異性を検証し、遺伝子異常のデータを基にpathway解析を行い、胃底腺型胃癌の発癌に関連するシグナル伝達経路を推測する予定である。

研究成果の概要(英文)：Gastric adenocarcinoma of fundic gland type (GAFG) is classified into pure GAFG and gastric adenocarcinoma of fundic gland mucosal type (GAFGM) which exhibited differentiation toward gastric foveolar epithelium in addition to fundic gland differentiation, histopathologically. This histopathological classification of GAFG is useful to estimate its malignant potential. The comprehensive genetic analysis using next generation sequencing of GAFG identified that GAFG is a neoplasm with low-grade malignancy, and the frequent presence of GNAS mutation is a characteristic genetic feature of GAFG, both pure GAFG and GAFGM (GAFG: 21.4%, pure GAFG: 19.0%, GAFGM: 28.6%). We will verify the specificity of obtained oncogenic driver mutations and speculate the signaling pathway of carcinogenesis of GAFG.

研究分野：消化器癌の発癌

キーワード：胃癌 胃底腺型胃癌 次世代シーケンサ GNAS mutation

1. 研究開始当初の背景

近年、HP 感染のない胃癌が注目されるようになり、その中の一つに胃底腺型胃癌が挙げられる。胃底腺型胃癌は胃炎・萎縮・腸上皮化生のない胃底腺粘膜から発生し、実際に HP 感染を伴うものは少ないため、HP 感染と無関係な胃癌の一つと考えられている。今後 HP 感染と関連のない胃癌が増加する場合、その大部分を胃底腺型胃癌が占めると予想される。また、胃底腺型胃癌の分子生物学的研究はほとんどなされておらず、胃癌研究の残された課題である。

胃底腺への分化を示す胃癌は 2007 年に Tsukamoto らが最初に報告し、2010 年に筆者らが胃底腺への分化を示す低異型度分化型胃癌を胃底腺型胃癌(主細胞優位型)、gastric adenocarcinoma of the fundic gland type (chief cell predominant type) という名称で新しい概念として提唱した。胃底腺型胃癌は低異型度の胃型腺癌の中でも固有腺・体部腺型胃癌と考えられ、胃底腺に特異的である pepsinogen-I(主細胞に特異的なマーカー)または H+/K+-ATPase(壁細胞に特異的なマーカー)が陽性であるものを胃底腺型胃癌と定義した。胃底腺型胃癌は日本全国の施設で発見され(報告は 68 症例)、海外からも報告されるようになった(報告は 14 症例)。欧米ではその異型度・悪性度の低さから癌と診断しない報告例もみられるが、日本国内では症例の蓄積により悪性度の高い症例も散見され、一般的には低異型度の分化型胃癌として広く認識されている。胃底腺型胃癌には主細胞優位型、壁細胞優位型、頸部粘液細胞優位型、幽門腺型細胞の混在、胃底腺粘膜型(腺窩上皮型の混在)などの様々なタイプがあると予想され、現在のところ胃底腺型胃癌関連病変として捉えられているが統一された見解はない。また胃癌の前癌病変として注目されている粘液細胞化生(SPEM)との関連も示唆されており、比較検討のためにも細胞分化、異型度による詳細な分類を作成する必要がある。胃底腺型胃癌は稀な腫瘍であり希少価値が高く、今後は名称の統一化を含め、日本から新しいタイプの胃癌として更に発信していくことが重要である。

近年、様々な疾患においてその疾患感受性に個体の有する遺伝子型が関与している証拠が蓄積し、特に一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)と消化器癌発生との関連が明らかになってきた。遺伝子多型の探索研究において候補が絞られていない段階では、ゲノム全体から候補遺伝子多型をスクリーニングする必要があり、ゲノム網羅的関連解析(genome-wide association study: GWAS)が有用である。日本での GWAS を用いた胃癌における SNP 研究では PSCA(prostate stem cell antigen)と MUC1 遺伝子が胃癌(びまん型胃癌)との感受性があると報告されている(Study Group of Millennium Genome Project for Cancer et al.

Nature genetics. 2008; 40:730-740. Saeki N et al. Gastroenterology. 2011; 140:892-902.)。胃癌は腸型(intestinal type)、びまん型(diffuse type)もしくは分化型(differentiated type)、未分化型(undifferentiated type)に分類される。腸型・分化型は HP 関連炎症による組織再構築の結果発生する癌であり、びまん型・未分化型は大部分が HP に関連せず正常粘膜を背景に de novo 的に発生する癌と考えられているが、HP 関連炎症の結果 de novo 的に発生する癌も含まれている。胃底腺型胃癌は HP と関連のない癌と考えられるが、組織学的には分化型胃癌であり、発生学的にはこれらの 2 つの type には当てはまらないと予想され、且つ宿主因子が発癌に関与している可能性もあるため、発癌機序を解明するには GWAS による候補の絞り込みが有効である可能性が高い。

また、胃底腺型胃癌の発癌機序は現時点では Wnt 系の活性化や GNAS mutation と関連があることが判明している(Hidaka Y et al. Human pathology. 2013; 44(11): 2438-48. Kushima R et al. Pathol Int. 2013; 63(6): 318-25. Nomura R et al. Human pathology. doi: 10.1016/j.humpath.2014.08.016.)。近年、Runt ファミリー転写因子(runt related transcription factor)の 1 つである RUNX3 が Wnt の癌化シグナルを抑制することが判明した。RUNX3 の不活性化が前癌病変を誘導し、そこに Wnt の癌化シグナルが活性化されると浸潤性胃癌が発症する可能性が示唆されており、胃底腺型胃癌の発癌機序においても RUNX3 の発現が関連する可能性がある(Ito K et al. GASTROENTEROLOGY 2011;140:1536-1546)。しかし、胃底腺型胃癌の発癌機序は本質的には未だ明らかになってはいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では胃底腺型胃癌の発癌関連遺伝子の網羅的解析(GWAS による胃底腺型胃癌 SNP の解析)を行い、胃底腺型胃癌の疾患感受性遺伝子多型を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

胃底腺型胃癌の発癌機序を解明するために、GWAS を用いて胃底腺型胃癌 SNP の解析をすることが目的である。共同研究施設として GWAS 研究で現在までに多くの実績がある国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センターの協力のもと研究計画を遂行した。胃底腺型胃癌症例の収集及び新分類の作成、GNAS mutation、Wnt/ -catenin signaling pathway、RUNX3 に関する検討、胃底腺型胃癌と現在までに報告されている候補遺伝子(PSCA、MUC1)との関連について、低異型度群と高異型度群の 2 群間での GWAS を用いた解析、胃底腺型胃癌と健常人での GWAS を用いた解析を行う予定であった。胃底腺型

胃癌の発癌関連遺伝子の網羅的解析に向けて、胃底腺型胃癌症例の収集と解析に着手したが、胃底腺型胃癌は非常に稀な腫瘍であり、目標症例数を収集することが困難であると判断した。

GWASによる胃底腺型胃癌 SNP の解析の実現は困難と予想されたため、次世代シーケンサを用いた網羅的な遺伝子変異解析を行うことにより胃底腺型胃癌の発癌・進展に関連する遺伝子変異を同定することを目的とした。胃底腺型胃癌の臨床検体 (FFPE 検体) を対象として、腫瘍組織をマイクロダイセクションにより分離し、腫瘍成分から DNA を抽出し、次世代シーケンサを用いた網羅的な遺伝子変異解析を行った (Ion AmpliSeq 疾患パネル等の Cancer Panel を用いた)。可能な限りペア正常検体についても解析を行い、後天的体細胞変異の絞り込みを行った。具体的には、次世代シーケンサのプラットフォームとしては、サーモフィッシャーサイエンティフィック社の Ion PGM システムを使用し、cancer パネルは Cancer Hotspot Panel v2 (50 遺伝子) を用いた。次世代シーケンサで得られた遺伝子変異をパブリックデータベース (The Cancer Genome Atlas (TCGA) www.cbioportal.org *Cancer Genome Atlas Research Network. Nature 2014) と比較し解析を行った。

Ion AmpliSeq™

Cancer Hotspot Panel v2 targets 50 genes

ABL1	EGFR	GNAS	KRAS	PTPN11
AKT1	ERBB2	GNAQ	MET	RB1
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1
BRAF	FGFR1	JAK2	NPM1	SMO
CDH1	FGFR2	JAK3	NRAS	SRC
CDKN2A	FGFR3	IDH2	PDGFRA	STK11
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL

4. 研究成果

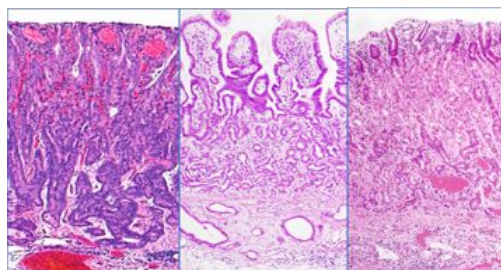
(1) 胃底腺型胃癌症例の新分類の作成

胃底腺型胃癌 (GAFG) の発癌関連遺伝子の網羅的解析に向けて、胃底腺型胃癌症例の収集と解析に着手した。収集された 80 症例をもとに胃底腺型胃癌の臨床病理学的因子の更なる解析と免疫染色による細胞分化・異型度による詳細な分類の作成を行い、胃底腺型胃癌の一組織亜型である胃底腺粘膜型胃癌 (GAFGM) の特徴を見出した。当院を含む 27 施設で GAFG と診断された 80 症例を対象に、純粋な GAFG (pure GAFG, n = 57) と GAFGM (n = 23) の 2 群に分類し、更に GAFGM を 組織構築保持 (腺窩上皮と胃底腺の層構造を保持) : 腫瘍表面露出 (n = 9)、組織構築喪失 (腺窩上皮と胃底腺の層構造が荒廃) : 腫瘍表面露出 (n = 10)、組織構築喪失 : 腫瘍表面非露出 (n = 4) の 3 つのタイプに組織学的に分類し、臨床病理学的に比較検討を行った。GAFGM は pure GAFG に比較して有意差をもって、男性

が多く、平均腫瘍径・平均 SM 浸潤距離が大きく、脈管侵襲陽性率が高かった。*H. pylori* 感染は pure GAFG/GAFGM (陽性 7/1, 陰性 33/10, 除菌後 3/1, p = 0.88)、*GNAS* mutation は pure GAFG/GAFGM (6.7%(1/15)/37.5%(3/8), p = 0.10) で差は認めなかった。GAFGM では、組織構築喪失 : 腫瘍表面露出のタイプが有意差をもって、平均腫瘍径が大きく、リンパ管侵襲陽性率が高かった。GAFGM は pure GAFG に比較して高悪性度と考えられ、組織構築により悪性度に違いがある可能性が示唆された。また、組織構築による GAFG 全体の組織学的分類が悪性度を予想する上で有用である可能性も示唆された。

胃底腺への分化を示す胃癌の分類 (案)

- A. 胃底腺型胃癌 (pure/classical type)
 - 組織構築保持、腫瘍表面非露出
- B. 胃底腺粘膜型胃癌
 - 組織構築保持、腫瘍表面露出
 - 組織構築喪失、腫瘍表面露出
 - 組織構築喪失、腫瘍表面非露出



現状ではこの分類は(案)ではあるが、今後さらに症例を集積し解析を行い、この分類の妥当性を評価する予定である。近年、海外からの報告も増えているが、定義や名称に関しては統一化されていないため、この分類が胃底腺型胃癌関連疾患の主要な分類となると予想される。

(2) 胃底腺型胃癌の次世代シーケンサを用いた網羅的な遺伝子変異解析

当院で治療を受けた原発性胃癌 2171 例のうち、胃底腺型胃癌と診断されたのは 41 例、頻度は 1.9%であった。純粋な胃底腺型胃癌は 34 例、胃底腺粘膜型胃癌は 7 例であった。その中で、SM 癌で 1cm 以上の症例、15 例を対象に次世代シーケンサで解析を行った。15 症例の内訳は、純粋な胃底腺型胃癌は 10 例、胃底腺粘膜型胃癌は 5 例であった。15 例中、5 例、33.3%に mutation を認めた。*GNAS* が 2 例、*KRAS* が 2 例、*STK11* が 1 例、*TP53* は 1 例も認めなかった。Sanger 法による解析を含めた結果、*GNAS* mutation が胃底腺型胃癌の発癌・進展過程に関与している可能性が示唆された (胃底腺型胃癌: 21.4%, 純粋な胃底腺型胃癌: 19.0%, 胃底腺粘膜型胃癌: 28.6%)。

現在は症例数を増やし、解析を継続中である。

今後は解析によって得られた胃底腺型胃癌の発癌・進展関連遺伝子異常の特異性を多数例の胃底腺型胃癌を用いて検証する。これらの検索には個々の遺伝子を対象としたPCR-direct sequence法を用いて検索する。さらに、通常型の消化管癌を対象として、同様の検索を行い、解析で得られた遺伝子変異が胃底腺型胃癌の発癌・進展過程に特異的なものか否かの確認を行う。あるいはTHE CANCER GENOME ATLAS (TCGA)等の網羅的解析データベースを参考に、多数の臨床検体と、その臨床データを用いて、胃底腺型胃癌発癌マーカーとして特定された遺伝子変異の有無、予後との関連の有無を統計的に解析する。遺伝子異常のデータを基に pathway解析を行い、胃底腺型胃癌の発癌に関連するシグナル伝達経路を推測する予定である。

胃底腺型胃癌の次世代シーケンサを用いた網羅的な遺伝子変異解析の結果(途中経過)

Case	Genes	Results	Subtype
11		Not found	GAFGM
12	GNAS	R201C	GAFGM
15		Not found	pure GAFG
19		Not found	pure GAFG
21		Not found	pure GAFG
22	KRAS	A18D	pure GAFG
24	GNAS	R201C	GAFGM
25	KRAS	Q61H	pure GAFG
26		Not found	pure GAFG
27		Not found	pure GAFG
29		Not found	pure GAFG
30		Not found	GAFGM
31	STK11	I177N	pure GAFG
33		Not found	pure GAFG
38		Not found	GAFGM

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 11 件)

1. 上山浩也、八尾隆史、松本健史、池田厚、谷田貝昂、小森寛之、赤澤陽一、竹田努、松本紘平、北條麻理子、永原章仁. 『早期胃癌2018』9. 特殊な組織型を呈する早期胃癌4) 胃底腺型胃癌 胃と腸. 査読有 2018; 53 (5): 753-767.

2. 上山浩也、松本健史、永原章仁、八尾隆史、渡辺純夫. 手技の解説 胃底腺型胃癌の診断のコツ. Gastroenterol Endosc. 58: 6, 1169-1177, 2016.

3. 上山浩也、八尾隆史. 消化管 I-上部消化管- 胃底腺型胃癌. 病理と臨床. 34: 9, 946-953, 2016.

4. 上山浩也、八尾隆史、松本健史. 胃底腺

型胃癌の臨床的特徴 拡大内視鏡所見を中心に 胃底腺型胃癌の NBI 併用拡大内視鏡診断. 胃と腸. 査読有 2015; 50 (12): 1533-1547.

5. Akazawa Y, Saito T, Hayashi T, Yanai Y, Tsuyama S, Akaike K, Suehara Y, Takahashi F, Takamochi K, Ueyama H, Murakami T, Watanabe S, Nagahara A, Yao T. Next-generation sequencing analysis for gastric adenocarcinoma with enteroblastic differentiation: emphasis on the relationship with hepatoid adenocarcinoma. Hum Pathol. 2018. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.04.022.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 日本消化器関連学会集会(JDDW2015): 胃底腺型胃癌の臨床病理学的特徴、上山浩也、八尾隆史、渡辺純夫. 2015 年 10 月、東京.

2. 日本消化器関連学会集会(JDDW2016): 胃底腺型胃癌の高悪性度組織亜型・胃底腺粘膜型胃癌の臨床病理学的特徴、上山浩也、八尾隆史、渡辺純夫. 2016 年 11 月、神戸.

3. United European Gastroenterology Week (UEGW2015): Gastric Adenocarcinoma of the Fundic Gland Type (Chief Cell Predominant Type): Results from 70 Cases in a Multicenter Study, Hiroya Ueyama, Akihito Nagahara, Kenshi Matsumoto, Yoichi Akazawa, Hiroyuki Komori, Tsutomu Takeda, Kohei Matsumoto, Mariko Hojo, Takashi Yao, Sumio Watanabe. 2015 年 10 月、バルセロナ、スペイン.

4. United European Gastroenterology Week (UEGW2016): Proposal for a New Aggressive Variant of Gastric Adenocarcinoma of Fundic Gland Type (a Multicenter Study of 50 Cases). Hiroya Ueyama, Takashi Yao, Akihito Nagahara, Yoichi Akazawa, Hiroyuki Komori, Tsutomu Takeda, Kohei Matsumoto, Kenshi Matsumoto, Mariko Hojo, Sumio Watanabe. 2016 年 10 月、ウィーン、オーストリア.

5. United European Gastroenterology Week (UEGW2017): Gastric adenocarcinoma of fundic gland type: cancer genomic data, Hiroya Ueyama, Takuo Hayashi, Tsuyoshi Saito, Yoichi Akazawa, Hiroyuki Komori, Kohei Matsumoto, Kenshi Matsumoto, Mariko Hojo, Akihito Nagahara, Takashi Yao, Sumio Watanabe. 2017 年 10 月、バルセロナ、スペイン.

〔図書〕(計 1 件)

上山浩也、渡辺純夫. ピロリ菌陰性時代の

上部消化管内視鏡胃疾患アトラス ピロリ菌
未感染胃癌(胃底腺型胃癌)文光堂 142-145,
2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上山 浩也 (UEYAMA, Hiroya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60621935