

令和元年6月11日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06259

研究課題名(和文) 食道胃接合部腺癌におけるKRAS遺伝子増幅の意義とその悪性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanistic role of KRAS amplification in gastroesophageal adenocarcinoma

研究代表者

今村 裕 (Imamura, Yu)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・副医長

研究者番号：70583045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでKRAS遺伝子増幅は上部消化器腺癌や卵巣癌で頻度が高いが、その意義は不明である。我々は今回野生型KRAS遺伝子増幅に注目した。このKRAS遺伝子増幅を来した細胞ではKRASタンパクの過剰発現を来し、MEK阻害剤に抵抗性を示すことが判明した。Guanine交換因子であるSOS1, SOS2, SHP2阻害することでこの抵抗性の状態から脱することを明らかにした。KRAS遺伝子増幅を来す腫瘍においてはMEK阻害剤とSHP2阻害剤の併用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでKRAS遺伝子増幅は上部消化器腺癌や卵巣癌で頻度が高いが、その意義は不明である。我々は今回野生型KRAS遺伝子増幅に注目した。このKRAS遺伝子増幅を来した細胞ではKRASタンパクの過剰発現を来し、MEK阻害剤に抵抗性を示すことが判明した。Guanine交換因子であるSOS1, SOS2, SHP2阻害することでこの抵抗性の状態から脱することを明らかにした。KRAS遺伝子増幅を来す腫瘍においてはMEK阻害剤とSHP2阻害剤の併用が期待できる。KRAS遺伝子に関して変異だけでなく野生株遺伝子増幅の腫瘍悪性化メカニズムを初めて明らかにすることができ、新たな治療体系の確立が可能となる。

研究成果の概要(英文)：KRAS amplifications occur most commonly in esophageal, gastric and ovarian adenocarcinomas. KRAS-amplified gastric cancer models show marked overexpression of the KRAS protein and are insensitive to MAPK blockade owing to their capacity to adaptively respond by rapidly increasing KRAS-GTP levels. Here we demonstrate that inhibition of the guanine-exchange factors SOS1 and SOS2 or the protein tyrosine phosphatase SHP2 can attenuate this adaptive process and that targeting these factors, both genetically and pharmacologically, can enhance the sensitivity of KRAS-amplified models to MEK inhibition in both in vitro and in vivo settings. These data demonstrate the relevance of copy-number amplification as a mechanism of KRAS activation, and uncover the therapeutic potential for targeting of these tumors through combined SHP2 and MEK inhibition.

研究分野：消化器癌

キーワード：KRAS 遺伝子増幅 食道胃接合部腺癌 胃癌 食道腺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

食道胃接合部腺癌は、国際的に「食道胃接合部上下 5cm 以内に腫瘍の中心が存在する食道浸潤を来す腺癌」と定義される。衛生状況の改善によるピロリ菌感染率の減少に伴い通常型胃癌は減少する一方、本疾患は欧米諸国において、ここ 30 年で約 5 倍に急増している。疫学的研究によると、ライフスタイルの変化による肥満や胃食道逆流症[Gastroesophageal reflux disease (GERD)]の増加と共に急速な罹患率の上昇を認める。本疾患の 5 年生存率は依然として約 20%未満と非常に予後不良の疾患である (Gastroenterology. 2015)。

近年、我が国においても、欧米を追従するように、食道胃接合部腺癌が増加傾向にあり(J Gastroenterol Hepatol, 2008)、臨床的・基礎的研究の必要性が高まっている。しかしながら、我が国における食道胃接合部腺癌の臨床・基礎研究は、症例の蓄積が不十分であり、未だ発展途上である。

本疾患は、胃食道逆流症(GERD)による食道上皮の円柱上皮化生(バレット食道)を背景に、軽度～高度異型性上皮を経て癌化するのものと考えられている。この発癌分子メカニズムについては、これまで *KRAS* 遺伝子や *TP53* 遺伝子のヘテロ接合性の喪失 [Loss of heterozygosity(LOH)] や遺伝子変異によって説明されてきた(Nat Genet. 1999)。最近の次世代シーケンサーの登場により、癌遺伝子の増幅(amplification)が、食道胃接合部腺癌の発癌過程において、極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった[Bass AJ et al. Nat Genet. 2015]。我々はこれまでの食道胃接合部腺癌における次世代シーケンサーを用いた遺伝子異常の網羅的解析において、世界に先駆けて *KRAS* 遺伝子増幅が 21%もの頻度で生じていることを発見・報告した[Dulak AM, Imamura Y, and Bass AJ et al. Nat Genet. 2013]。さらにこの *KRAS* 遺伝子増幅は RAS-MAPK 系の中で最も頻度の高い遺伝子異常であった。しかし、その臨床的意義や悪性化メカニズムについては明らかになっていない。

本研究では、*KRAS* 遺伝子増幅が食道胃接合部腺癌および胃腺癌の悪性化に関与するかどうか、さらにそのメカニズムを解明する事とした。

## 2. 研究の目的

*KRAS* 遺伝子増幅が食道胃接合部腺癌の予後における影響を明らかにする。*KRAS* 遺伝子増幅の悪性化メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) TCGA データベースによる様々な癌種における *KRAS* 遺伝子増幅の検討  
パブリックデータベースである cBioPortal for Cancer Genomics

(<https://www.cbioportal.org/>) を用いて、食道胃接合部腺癌(食道腺癌として記載されている)、胃腺癌(CIN 型)、卵巣漿液性嚢胞腺癌、子宮癌肉腫、肺腺癌、肺扁平上皮癌、膵腺癌、膀胱尿管癌、浸潤性乳がん、子宮内膜癌、肝細胞癌、胃腺癌(non-CIN 型)について、*KRAS* 遺伝子増幅の頻度を算出し比較検討を行う。

(2) 臨床サンプルを用いた *KRAS* 遺伝子増幅の有無による予後解析

我々の日本コホート、およびシカゴ大学消化器外科サンプルを用いた予後解析を Kaplan-Meier 法で行う。

(3) *KRAS* 遺伝子増幅の機能解析

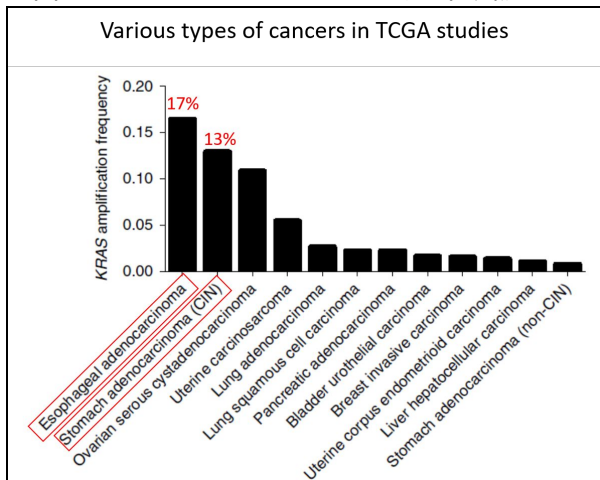
米国 Dana-Farber Cancer Institute との共同研究で推進する。*KRAS* 遺伝子に変異も増幅も認めない細胞株、*KRAS* 遺伝子変異のみ有する細胞株、*KRAS* 遺伝子増幅のみ有する胃腺癌細胞株を用いる。RAS-RAF-MAPK 系および PI3K-Akt-mTOR 系の抑制系を介して、*KRAS* 遺伝子増幅に特有のシグナリング異常を明らかにし、そこを標的とした治療体系の構築が可能になるかどうかを検討する。

## 4. 研究成果

(1) 他癌腫での *KRAS* 遺伝子増幅異常

前述の 12 種類の癌腫の中で、上部消化管腺癌に *KRAS* 遺伝子増幅異常の頻度が最も高かった。上部消化管腺癌はもともと 4 つの molecular subtype に分類 (Chromosomal instability:CIN, MSI-H; microsatellite instability-high, EBV 関連, Genomically stable:GS) されるが、食道胃接合部腺癌はその大部分が CIN 型を占めるとされている。胃腺癌 CIN 型では 13%の頻度で *KRAS* 遺伝子増幅を認めるが、それ以外の non-CIN 型では 1%程度であることから、CIN 型の上部消化管腺癌に最も高頻度で認める分子異常であることが判明した(図 1)。

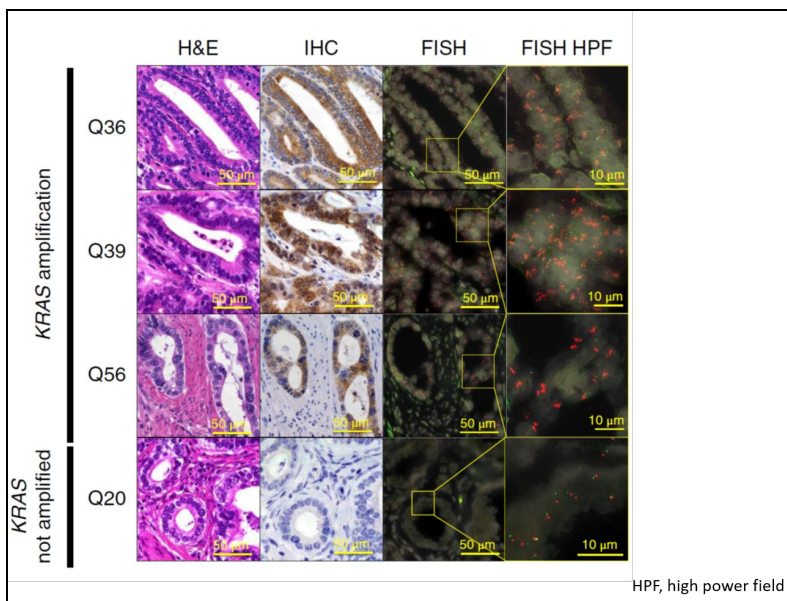
< 図 1. TCGA データベースにおける他癌腫での KRAS 遺伝子増幅異常頻度 >



(2) 臨床サンプルにおける KRAS 遺伝子増幅の確認および臨床的意義

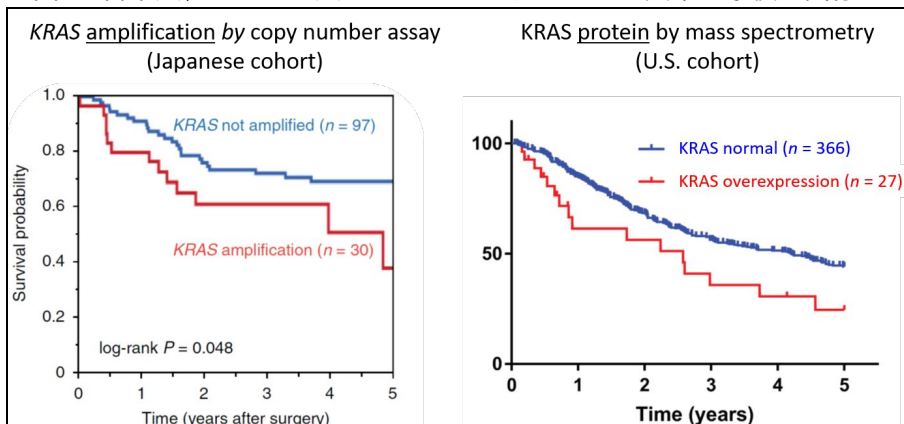
次いで、我々の食道胃接合部腺癌サンプルを用いて、KRAS 遺伝子増幅の細胞には KRAS タンパクが過剰発現している事を確認した (図 2)。

< 図 2. 日本人サンプルにおける KRAS 遺伝子増幅と KRAS タンパク過剰発現の確認 >



さらに、KRAS 遺伝子増幅を Real-time PCR 系で検出する方法を確立し、日本人コホート (N=127) で検討を行ったところ、KRAS 遺伝子増幅を来した群で有意に予後不良であった (P<0.05、図 3 左)。また同様に、米国人コホートでは、KRAS タンパクの過剰発現を mass spectrometry で検出したところ、過剰発現症例において有意に予後不良であった (P<0.05、図 3 右)。

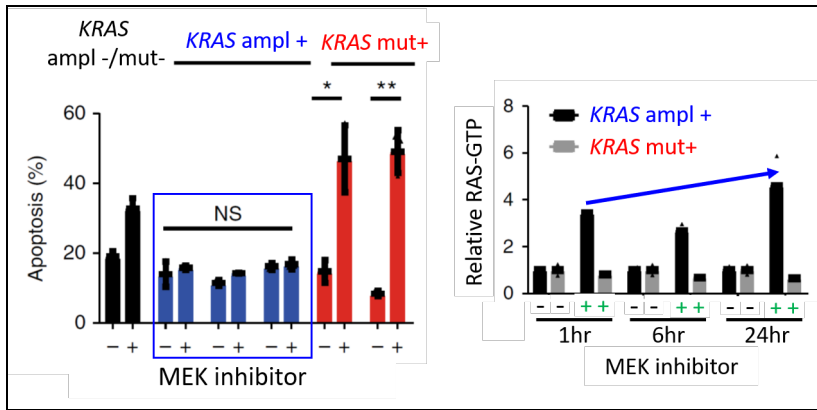
< 図 3. 日本人、アメリカ人コホートにおける KRAS 異常と予後の関係 >



(3) KRAS 遺伝子増幅の機能解析

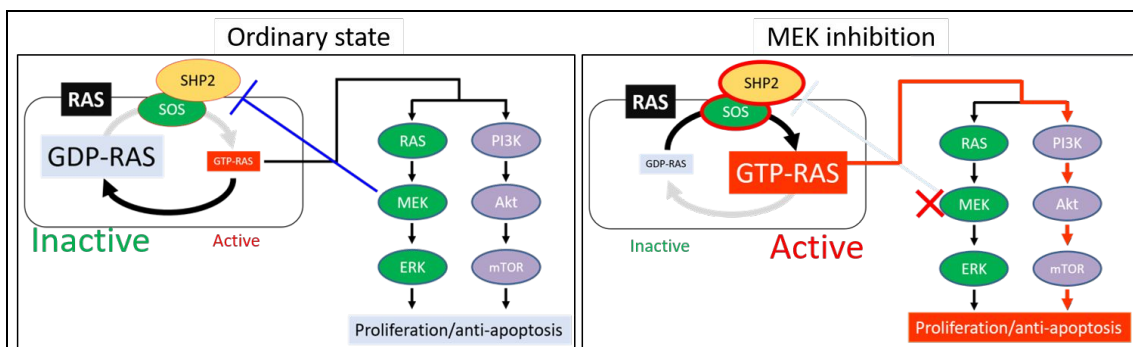
KRAS 遺伝子増幅特異的な変化を見いだすために、RAS-RAF-MAPK 系および PI3K-Akt-mTOR 系をそれぞれのレベルで阻害剤を用いて検討した。最も注目すべき変化は、MEK 阻害剤を投与した際に、KRAS 遺伝子変異なし・増幅なしの細胞株、および KRAS 遺伝子変異細胞株ではアポトーシスが誘導されたが、KRAS 遺伝子増幅異常のみの細胞株ではアポトーシスの誘導が見られなかった (図 4 左)。

< 図 4 . KRAS 遺伝子増幅 or 変異細胞における MEK 阻害剤投与時のアポトーシス変化 >



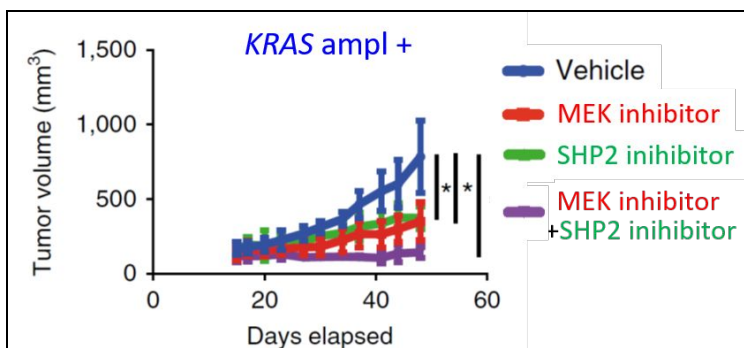
さらに興味深いこととして、MEK 阻害剤投与後の活性化型 RAS(RAS-GTP)の割合を経時的に測定したところ、KRAS 遺伝子増幅細胞株ではその割合が上昇していた (図 4 右)。この変化は KRAS 遺伝子変異細胞株では認められなかった。この結果を受け、図 5 に示すような仮説を立てた。つまり、通常時では KRAS 遺伝子増幅細胞株では、下流の MEK の feedback により Guanine exchanging factor (GEF)である SOS やその活性化分子である SHP2 が抑制された状態にあり、不活性化型である RAS-GDP が多くなる (図 5 左)。しかしながら MEK 阻害剤投与時ではその feedback 機構が失われることにより、SOS や SHP2 の働きにより不活性化型 RAS-GDP から活性化型 RAS-GTP に変換され、その結果、PIK3 や他の系を介して細胞増殖に傾く。

< 図 5 . KRAS 遺伝子増幅細胞株における MEK 阻害剤投与時の変化 >



これを証明するために、in vivo にて腫瘍細胞を注入し、MEK 阻害剤と SHP2 阻害剤を併用し、腫瘍 volume を観察したところ、その併用効果は明らかであった (図 6)。さらに、同様の結果が SOS iRNA でも観察された。

< 図 6 . MEK 阻害剤と SHP2 阻害剤の併用における KRAS 遺伝子増幅細胞の増殖抑制効果 >



本研究より、KRAS 遺伝子増幅を来す腫瘍に対して、MEK 阻害剤と SHP2 阻害剤の併用治療は有効であることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

(1) **Imamura Y**, Watanabe M, Toihata T, Takamatsu M, Kawachi H, Haraguchi I, Ogata Y, Yoshida N, Saeki H, Oki E, Taguchi K, Yamamoto M, Morita M, Mine S, Hiki N, Baba H, Sano T. Recent incidence trend of surgically resected esophagogastric junction adenocarcinoma, and microsatellite instability status in Japanese patients. *Digestion*. 2019, 99(1):6-13

DOI: 10.1159/000494406

(2) Bahcall M, Awad MM, Sholl LM, Wilson FH, Xu M, Wang S, Palakurthi S, Choi J, Ivanova E, Leonardi GC, Ulrich BC, Paweletz CP, Kirschmeier PT, Watanabe M, Baba H, Nishino M, Nagy RJ, Lanman RB, Capelletti M, Chambers ES, Redig AJ, VanderLaan PA, Costa DB, **Imamura Y**, Janne PA. Amplification of wild type KRAS imparts resistance to crizotinib in MET exon 14 mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018, 24(23):5963-5976

DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-18-0876

(3) Cañadas I, Thummalapalli R, Kim JW, Kitajima S, Jenkins RW, Christensen CL, Campisi M, Kuang Y, Zhang G, Gjini E, Zhang G, Tian T, Sen DR, Miao D, **Imamura Y**, Thai T, Piel B, Terai H, Aref AR, Hagan T, Koyama S, Watanabe M, Baba H, Adeni AE, Lydon CA, Tamayo P, Wei Z, Herlyn M, Barbie TU, Uppaluri R, Sholl LM, Sicinska E, Sands J, Rodig S, Wong KK, Paweletz CP, Watanabe H, Barbie DA. Tumor innate immunity primed by specific interferon-stimulated endogenous retroviruses. *Nat Med*. 2018, 24(8):1143-1150

DOI: 10.1038/s41591-018-0116-5

(4) Wong GS, Zhou J, Liu JB, Wu Z, Xu X, Li T, Xu D, Schumacher SE, Puschhof J, McFarland J, Zou C, Dulak A, Henderson L, Xu P, O'Day E, Rendak R, Liao WL, Cecchi F, Hembrough T, Schwartz S, Szeto C, Rustgi AK, Wong KK, Diehl JA, Jensen K, Graziano F, Ruzzo A, Fereshetian S, Mertins P, Carr SA, Beroukhi R, Nakamura K, Oki E, Watanabe M, Baba H, **Imamura Y**, Catenacci D, Bass AJ. Targeting wild-type KRAS-amplified gastroesophageal cancer through combined MEK and SHP2 inhibition. *Nat Med*. 2018, 24(7):968-977

DOI: 10.1038/s41591-018-0022-x

(5) Pectasides E, Stachler MD, Derks S, Liu Y, Maron S, Islam M, Alpert L, Kwak H, Kindler H, Polite B, Sharma MR, Allen K, O'Day E, Lomnicki S, Maranto M, Kanteti R, Fitzpatrick C, Weber C, Setia N, Xiao SY, Hart J, Nagy RJ, Kim KM, Choi MG, Min BH, Nason KS, O'Keefe L, Watanabe M, Baba H, Lanman R, Agoston AT, Oh DJ, Dunford A, Thorner AR, Ducar MD, Wollison BM, Coleman HA, Ji Y, Posner MC, Roggin K, Turaga K, Chang P, Hogarth K, Siddiqui U, Gelrud A, Ha G, Freeman SS, Rhoades J, Reed S, Gydush G, Rotem D, Davison J, **Imamura Y**, Adalsteinsson V, Lee J, Bass AJ, Catenacci DV. Genomic Heterogeneity as a Barrier to Precision Medicine in Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018, 8(1):37-48

DOI: 10.1158/2159-8290.cd-17-0395

(6) Yang S, **Imamura Y (as co-first author)**, Jenkins R, Cañadas I, Kitajima S, Aref AR, Brannon AL, Oki E, Castoreno A, Zhu Z, Thai TC, Reibel J, Qian Z, Ogino S, Wong KK, Baba H, Kimmelman AC, di Magliano MP, Barbie DA. Autophagy inhibition dysregulates TBK1 signaling and promotes pancreatic inflammation. *Cancer Immunol Res*. 2016, 4(6):520-30

DOI: 10.1158/2326-6066.cir-15-0235

(7) Tokunaga R, **Imamura Y (as co-first author)**, Nakamura K, Ishimoto T, Nakagawa S, Miyake K, Nakaji Y, Tsuda Y, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Saeki H, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Oda Y, Bass AJ, Maehara Y, Baba H. Fibroblast growth factor receptor 2 expression, but not its genetic amplification is associated with tumor growth and worse survival in esophagogastric junction adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016, 12;7(15):19748-61

〔学会発表〕(計 14 件)

(1) 今村裕、食道胃接合部腺癌における MSI-low 腫瘍の特徴、第 91 回日本胃癌学会総会、2019 年

(2) Imamura Y, MSI-L tumors exhibited an intermediate tumor immune microenvironment between MSI-H and MSS in esophagogastric junction adenocarcinoma. 11th AACR-JCA Joint Conference. 2019 年

(3) Imamura Y, MSI-low is an intermediate type between MSI-high and MSS in esophagogastric junction adenocarcinoma. Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI). 2019 年

(4) 今村裕、食道胃接合部腺癌における TP53 免疫染色による mutation 検出能の検討、JDDW、2018 年

(5) 今村裕、食道胃接合部腺癌の腫瘍占居別 molecular status の特徴、第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年

(6) 今村裕、臨床応用に向けた TP53 免疫染色による mutation 検出能の検討、第 72 回日本食道学会学術集会、2018 年

(7) 今村裕、食道胃接合部腺癌の遠隔転移の特徴と肝転移の治療成績、第 118 回日本外科学会定期学術集会、2018 年

(8) 今村裕、食道胃接合部腺癌の遠隔転移の検討、第 90 回日本胃癌学会総会、2018 年

(9) Imamura Y, Molecular status changes according to tumor location in EGJ adenocarcinoma. The 11th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2018 年

(10) 今村裕、食道胃接合部腺癌は腫瘍占居部位により heterogeneous な genetic status を呈する、第 72 回日本消化器外科学会総会、2017 年

(11) 今村裕、食道胃接合部腺癌におけるマイクロサテライト不安定性の検討、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年

(12) 今村裕、食道胃接合部腺癌におけるマイクロサテライト不安定性の特徴と予後解析、第 89 回日本胃癌学会総会、2017 年

(13) 今村裕、食道胃接合部腺癌の臨床病理学的特徴と治療成績の検討、第 71 回日本消化器外科学会総会、2016 年

(14) 今村裕、Siewert type I-II 食道胃接合部腺癌における郭清効果 index の検討、第 70 回日本食道学会学術集会、2016 年

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：アダム・バス (米国 Dana-Faber Cancer Institute)

ローマ字氏名：Adam J. Bass

研究協力者氏名：原口 郁実 (公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんゲノム研究部)

ローマ字氏名：Haraguchi Ikumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。