

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10580

研究課題名(和文)胃癌におけるBRCA1/2遺伝子変異解析およびタンパク質発現とその臨床的意義

研究課題名(英文)Clinical significance of pathogenic germline BRCA1/2 mutations in gastric cancer

研究代表者

滝沢 一泰 (Takizawa, Kazuyasu)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30706437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：BRCA1/2遺伝子異常を始めとしたDNA二本鎖損傷修復機構の異常は、放射線や抗癌剤の治療効果に関与すると考えられる。また、BRCA1/2は遺伝性乳癌卵巣癌症候群の原因遺伝子である。我々は、胃癌におけるBRCA1/2遺伝子変異の臨床的意義を明らかにすることを目的に研究を行った。胃癌腫瘍組織にBRCA2変異を認める症例の予後は良好であり、BRCA2変異は胃癌の予後良好な因子であることが明らかになった。また、BRCA1/2胚細胞性変異陽性例ではプラチナ系抗癌剤の治療効果が高い可能性や、この遺伝子変異が胃癌の家族集積性に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌におけるBRCA1/2遺伝子異常の臨床的意義については未だに未解明である。本研究では、胃癌におけるBRCA1/2遺伝子異常の臨床的意義について、治療効果や予後だけでなく罹患にも関与している可能性を示した。本研究は胃癌におけるBRCA1/2遺伝子異常に着目した個別化治療の発展の科学的基盤となる可能性が示唆された。また、BRCA1/2変異は胃癌の家族集積性の原因となる可能性が示唆され、胃癌サーベイランスの最適化に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Defective homologous recombination (HR) due to genetic aberrations of HR genes, such as BRCA1/2 contributes to a high response of platinum therapy. Hereditary breast and ovarian cancer is one of the best described inherited cancer pre-disposition syndromes, caused by pathogenic germline BRCA1 or BRCA2 (BRCA1/2) mutations. The aim of this study is to clarify the clinical significance of defective HR in platinum-based chemotherapy for gastric cancer (GC). BRCA2 mutation contributes to favorable patient outcome after surgery in GC. In this study, some of BRCA1/2-mutated GC have high sensitivity to platinum chemotherapy. BRCA1/2 mutations may predispose to familial GC. BRCA1/2 genetic testing in patients with GC with a familial component may help to optimize medical care, including cancer surveillance and the selection of treatment modalities in the era of precision medicine.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 BRCA ゲノムシーケンス 化学療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

切除不能進行再発胃癌患者の予後は不良であるが、近年の多剤併用治療や抗癌剤治療や分子標的薬の開発により、着実に患者の予後は改善している。特に、HER2 タンパク質過剰発現を呈する胃癌に対する trastuzumab の治療効果は高く、大規模臨床試験の結果では治療開始からの生存期間中央値は 16 ヶ月に達した。今後さらに切除不能進行胃癌の治療を進展させ患者予後を改善させるためには、新たな個別化治療の鍵となる胃癌の分子生物学的異常を明らかにすることが必要で、わが国で罹患率、死亡率ともに高い胃癌の治療において重要である。

米国の大規模がん遺伝子研究である The Cancer Genome Atlas (TCGA) の報告では、胃癌における BRCA1/2 遺伝子変異の頻度は 12%とされている。我々は先行研究として、日本人の胃癌 128 症例を対象に 435 遺伝子についてエキソーム解析を行った。その結果、DNA 二本鎖修復機構に関わる遺伝子の変異は 38%の症例に認められた。その中で、BRCA1/2 の遺伝子変異は 17%の症例に認められ、TCGA の報告と比較して高率であった。この結果は、胃癌における DNA 二本鎖修復機構の異常には BRCA1/2 遺伝子異常が大きく関わっている可能性を示唆している。

DNA 損傷修復はゲノム安定性を維持するために生体にとって重要な機構である。特に DNA 二本鎖損傷は重大な損傷であり、その修復には BRCA1/2、ATM、ATR、53BP1 を始めとした様々な分子が複合体を形成して関与する。DNA 二本鎖損傷修復機構の異常は遺伝性疾患や発癌の原因として着目されてきた。

癌治療においては DNA 二本鎖損傷修復機構の異常は放射線や抗癌剤の治療効果に関与すると考えられ、BRCA1/2 遺伝子変異を有する乳癌や卵巣癌ではシスプラチンやカルボプラチンといった白金製剤の効果が高い。また、合成致死という概念が提唱され、DNA 二本鎖損傷修復機構が破綻している腫瘍においては、代償性に活性化している塩基除去修復 (BER) を抑制する PARP 阻害剤の効果が高いことが明らかにされた。PARP 阻害剤については BRCA1/2 遺伝子変異を有する乳癌や卵巣癌を対象とした第 3 相試験が進行中である。

胃癌における PARP 阻害剤の第 2 相試験では DNA 二本鎖修復機構に関わる ATM の発現が低い症例で治療効果が高いことが示された。この結果を受けて現在 ATM タンパク質発現の低い胃癌を対象とした PARP 阻害剤の第 3 相試験が進行中である。しかしながら、胃癌における BRCA1/2 遺伝子変異やタンパク質発現低下と PARP 阻害剤の効果については明らかにされていない。

申請者らは、上述した学術的背景から、『胃癌における BRCA1/2 遺伝子異常を初めとした DNA 二本鎖修復機構破綻の状況を明らかにし、薬物治療の効果との関係を明らかにすることは、胃癌診療の向上のために重要な課題である』という着想に至った。申請者らは「胃癌における BRCA1/2 を初めとする DNA 二本鎖修復機構関連タンパク質発現は、PARP 阻害剤やプラチナ系抗癌剤の治療効果に関与している」という仮説を立て、本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

胃癌における BRCA1/2 遺伝子異常と DNA 二本鎖修復機構関連タンパク質発現状況、および PARP 阻害剤やプラチナ系抗癌剤の治療効果との関係を明らかにすること、また胃癌における DNA 二本鎖修復機構の異常に着目した個別化治療発展の科学的基盤を確立することである。

## 3. 研究の方法

### 胃癌における BRCA1/2 遺伝子変異とタンパク質発現の関係

BRCA1 変異陽性 5 例、変異陰性 5 例の胃癌腫瘍組織を対象とした。腫瘍細胞における核内の BRCA1 発現をモノクローナル抗体による免疫組織化学染色によって検出した。pH6 の citrate buffer にて抗原の賦活化を行い、BRCA1 monoclonal 抗体 (1:100, abcam) を 4 にて一晚反応させた。また、BRCA2 変異陽性 5 例、変異陰性 5 例の胃癌腫瘍組織を対象とし、BRCA2 monoclonal 抗体 (1:100, abcam) を用いた同様の手法で BRCA2 発現を評価した。

### BRCA1/2 遺伝子変異と胃癌患者の予後に関する検討

外科的切除が施行された胃癌患者 130 例を対象とした。次世代型シーケンサーによる腫瘍組織の遺伝子変異解析データから BRCA1/2 遺伝子変異を抽出した。これらの遺伝子変異の有無と、臨床病理学的因子や予後との関連を統計的に解析した。

### BRCA1/2 胚細胞性変異と胃癌家族集積性に関する検討

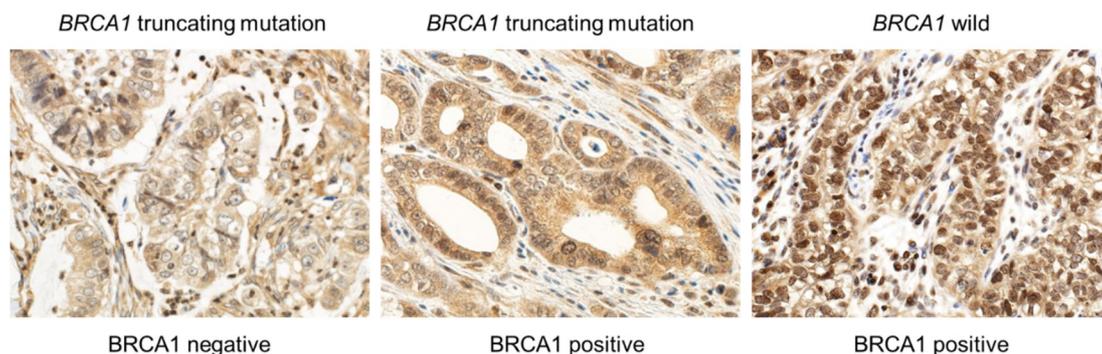
腫瘍組織中に BRCA1/2 遺伝子変異を認めた症例の中で同意を得られた患者の末梢血を採取し、BRCA1/2 胚細胞性遺伝子変異解析を施行した。変異の有無と家族歴や臨床経過の関係について検討を行った。

## 4. 研究成果

### 胃癌における BRCA1/2 遺伝子変異とタンパク質発現の関係

BRCA1 変異陽性 5 例のうち 3 例は truncating mutation、2 例は nonsynonymous mutation

であった。Truncating mutation の 1 例で BRCA1 の核内における発現低下を認めたが、残りの 9 例 ( truncating mutation 2 例、nonsynonymous mutation 2 例、wild 5 例 ) では発現低下は認められなかった ( 図 1 )。そのため、BRCA1 変異を免疫染色によるタンパク質発現で評価することは困難であると結論づけた。また、BRCA2 の検討では、10 例全てで核内における染色が認められなかった。非腫瘍細胞においても BRCA2 の核内における染色が認められないことから、今回用いた抗体では胃癌腫瘍組織における BRCA2 発現を正しく評価することはできないと結論づけた。

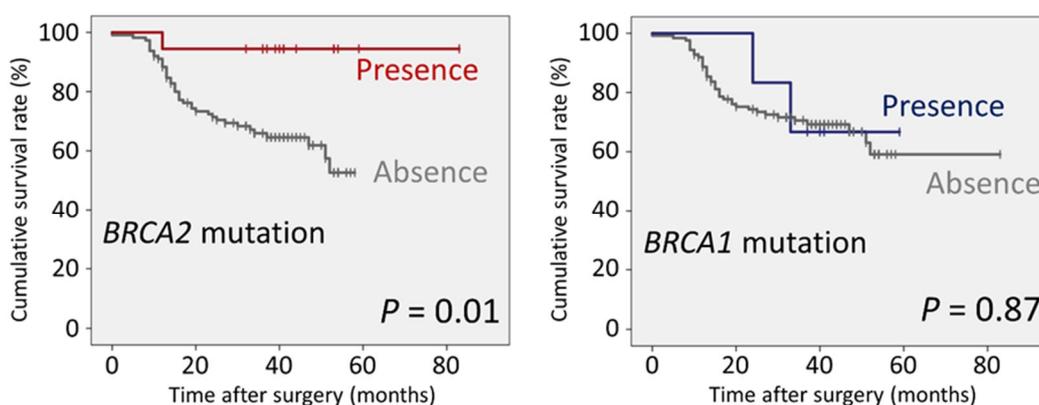


( 図 1 ) 胃癌における BRCA1/2 遺伝子変異とタンパク質発現の関係

BRCA1/2 タンパク質発現の臨床的な意義を明らかにすることを予定していたが、胃癌における BRCA1/2 の遺伝子レベルでの異常に焦点を絞って、研究を行った。

#### BRCA1/2 遺伝子変異と胃癌患者の予後に関する検討

外科的切除が施行された胃癌患者 130 例の腫瘍組織を用いた次世代型シーケンサーによる遺伝子変異解析の結果、BRCA1 変異は 6 例 ( 4.6% ) に、BRCA2 変異は 18 例 ( 13.8% ) に同定された。これらの変異と、年齢、性別、腫瘍局在、Lauren 分類、pTNM、リンパ管侵襲、静脈侵襲との関連は認められなかった。BRCA2 変異は MSI-high 症例の 33% に認められ、MSI-low や MSS 症例の 6% と比較して有意に頻度が高かった (  $P < 0.01$  )。BRCA2 変異陽性例の術後 5 年全生存率は 94.4% であり、BRCA2 変異陰性例の 65.9% と比較して有意に予後が良好であった (  $P = 0.01$  )。一方、BRCA1 変異の有無と全生存に有意な関連は認められなかった。多変量解析では、BRCA2 変異は独立した予後良好な因子であった ( Hazard ratio = 0.1, 95% confidence interval (CI): 0.02-0.80 ) ( 図 2 )。



( 図 2 ) BRCA1/2 遺伝子変異の有無と生存解析

#### BRCA1/2 胚細胞性変異と胃癌家族集積性に関する検討

BRCA1/2 遺伝子は遺伝性乳癌卵巣癌症候群 ( hereditary breast and ovarian cancer; HBOC ) の原因遺伝子として有名である。胃癌の多くは孤発性であるが、5% から 10% は家族集積性があり、3% から 5% は癌抑制遺伝子等の胚細胞性変異を原因とした遺伝性腫瘍症候群の一部として発症する ( NCCN Guidelines, Gastric Cancer )。本検討では、腫瘍組織に BRCA1/2 体細胞性変異を認めた患者のうち同意が得られた 7 例を対象とし、BRCA1/2 胚細胞性変異解析を施行した。7 例中 6 例に何らかの胃癌家族歴を認めた。遺伝子変異解析の結果、3 例に BRCA1/2 の病的な胚細胞性変異が同定された。そのうち 2 例は家族性胃癌の定義を満たす家族歴を有していた ( Kluijdt, I. et al. Fam. Cancer. 2012;11:363-369 )。さらにプラチナ系抗癌剤に対する治療効果が高い症例が確認された。以上より、BRCA1/2 変異は胃癌の家族集積性の原因となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ichikawa H, Wakai T, Nagahashi M, Shimada Y, Hanyu T, Kano Y, Muneoka Y, Ishikawa T, Takizawa K, Tajima Y, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Yabusaki H, Nakagawa S, Sato N, Kawasaki T, Homma K, Okuda S, Lyle S, Takabe K	4. 巻 5
2. 論文標題 Pathogenic Germline BRCA1/2 Mutations and Familial Predisposition to Gastric Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCO precision oncology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e13618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Ichikawa, Hiroshi Yabusaki, Takaaki Hanyu, Yoshifumi Shimada, Masayuki Nagahashi, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Satoru Nakagawa, Hitoshi Kameyama, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Genomic alteration spectrum and future direction of targeted therapy for gastric cancer
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ichikawa, Yoshifumi Shimada, Masayuki Nagahashi, Takaaki Hanyu, Yosuke Kano, Yusuke Muneoka, Takashi Ishikawa, Yuki Hirose, Kohei Miura, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Satoru Nakagawa, Hiroshi Yabusaki, Hitoshi Kameyama, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Tumor location and alteration spectrum of actionable genes in gastroesophageal cancer
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 剛, 市川 寛, 羽入 隆晃, 石川 卓, 白井 賢司, 根本 万理子, 廣瀬 雄己, 堅田 朋大, 三浦 宏平, 田島 陽介, 滝沢 一泰, 中野 雅人, 島田 能史, 永橋 昌幸, 坂田 純, 小林 隆, 亀山 仁史, 若井 俊文
2. 発表標題 日本人ゲノム安定型胃癌の特徴
3. 学会等名 第27回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ichikawa H, Nagahashi M, Shimada Y, Hanyu T, Ishikawa T, Muneoka Y, Kano Y, Takizawa K, Miura K, Hirose Y, Yuza K, Tsuchida J, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Yabusaki H, Nakagawa S, Okuda S, Takabe K, Wakai T
2. 発表標題 Pathogenic germline BRCA1/2 mutations and familial predisposition to gastric cancer
3. 学会等名 2018 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ichikawa H, Hanyu T, Ishikawa T, Katada T, Shimada Y, Sakata J, Kobayashi T, Nakagawa S, Kameyama H, Wakai T
2. 発表標題 Chemotherapeutic biomarkers for predicting tumor response in patients with gastric cancer: Defective homologous
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川 寛, 羽入 隆晃, 石川 卓, 加納 陽介, 宗岡 悠介, 堅田 朋大, 島田 能史, 永橋 昌幸, 坂田 純, 小林 隆, 亀山 仁史, 中川 悟, 若井 俊文
2. 発表標題 胃癌における相同組換え修復機構の破綻と予後
3. 学会等名 第26回日本消化器関連学会週間JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川寛
2. 発表標題 Pathogenic germline BRCA1/2 mutations and familial predisposition to gastric cancer
3. 学会等名 第90回日本胃癌学会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	若井 俊文 (Wakai Toshifumi) (50372470)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	羽入 隆晃 (Hanyu Takaaki) (50719705)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	
研究分担者	市川 寛 (Ichikawa Hiroshi) (50721875)	新潟大学・医歯学系・助教  (13101)	
研究分担者	田澤 立之 (Tazawa Ryushi) (70301041)	新潟大学・医歯学総合病院・准教授  (13101)	
研究分担者	中田 光 (Nakata Koh) (80207802)	新潟大学・医歯学総合病院・教授  (13101)	
研究分担者	小杉 伸一 (Kosugi Shinichi) (90401736)	新潟大学・医歯学総合病院・特任教授  (13101)	