

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08448

研究課題名(和文) 臨床検体の網羅的遺伝子解析による胃癌不均一性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of gastric cancer heterogeneity by comprehensive genetic analysis of clinical specimens

研究代表者

芝田 渉 (SHIBATA, Wataru)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：00435819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：早期胃癌では純粋分化型癌が多いが、進行癌では未分化成分を含むようになるため、癌はその進展とともに分化型癌から未分化型癌へ変化すると考えられている。一方で、早期癌でも未分化成分のみの例も存在する。未分化混在早期癌の臨床病理学的検討では腫瘍径は純粋分化型でやや大きく(16.1mm vs 24.4mm)、SM浸潤癌が多かった(12.2% vs 45.7%)。未分化組織のマーカーとしてE-cadherinの染色は、純粋未分化例では癌細胞で欠損している例が多かったが、混在例では発現が減少しているものの、欠損している例はほとんどなかった。胃癌における未分化癌の発生には異なる経路が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の不均一性は胃癌の進行と関連しており、早期癌においても予後不良の因子と考えられている。本研究では早期胃癌においても、未分化成分の混在がその深部浸潤と関連する可能性を示した。また、未分化成分の出現には、分化型から発生するものと、未分化型として発生する経路があり、進行癌における治療法の選択にも考慮が必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Most early-stage gastric cancers are purely differentiated cancers, but advanced cancers contain undifferentiated components, and it is thought that the cancer changes from differentiated cancers to undifferentiated cancers as it progresses. On the other hand, there are cases of early stage cancer with only undifferentiated components. In the clinicopathological examination of undifferentiated mixed early stage cancer, the tumor diameter was slightly larger (16.1 mm vs 24.4 mm) and SM invasive cancer was more common (12.2% vs 45.7%). Staining of E-cadherin as a marker for undifferentiated tissue was deficient in cancer cells in many purely undifferentiated cases, but the expression was decreased in mixed cases, but there were few cases in which it was deficient. It was suggested that there are different pathways for the development of undifferentiated cancer in gastric cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃癌 未分化癌 分化型癌

1. 研究開始当初の背景

胃癌は世界で年間 70 万人が死亡する癌であり、特に日本ではその罹患率が高く、毎年約 5 万人が胃癌で死亡している。胃癌は *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染を契機として発症する慢性萎縮性胃炎を背景として、E-cadherin や Tp53 をはじめとした様々な遺伝子異常を経て発症するが、その機序は極めて複雑である。

癌の進展における変化として、病理学的な変化は最も認識しやすい。胃癌は病理学的に多くの組織型が存在するが、日本では腺管形成の明らかな differentiated type (分化型) と明らかでない undifferentiated type (未分化型) と分類されている。早期胃癌では純粋な分化型癌が多く症例で観察されるにも関わらず、進行癌においては分化型に加え、ほとんどすべての癌で未分化成分を含むようになるため、癌組織はその進展とともに分化型癌から未分化型癌へ変化すると考えられる。一方、早期癌において分化型を含まない純粋な未分化型も少数例ながら存在し、De novo の未分化癌と分類できる。すなわち未分化癌には分化型癌の進行により、未分化成分が混在するもの(不均一性の獲得)と、未分化癌として発生するものが存在する。

近年、胃癌はその分子遺伝学的特徴から、4 つの異なるタイプに分類できることが報告された (TCGA network, Nature 2014)。その中で、分化型癌として発生する癌は 50% 以上を占め、染色体不安定サブタイプ (CIN) に相当し、TP53 の異常と HER2 をはじめとする RTK タンパクの遺伝子増幅に特徴づけられている。また、未分化癌として発生する癌はゲノム安定サブタイプ (GS) に相当し、家族性胃癌の原因でもある E-cadherin 遺伝子の変異などが多く観察される。一方で、癌の進展に伴って分化型癌から未分化型へ変化するタイプの癌についてはその特徴は明らかとなっていない。これまでに癌の不均一性についての解析は広く行われつつあり、その獲得には癌のゲノム、エピゲノムによるもの、癌関連線維芽細胞などの癌間質の影響によるものなどが報告されている (Mozor T, Cancer Cell 2016, Liao Z, Cell Immunol 2018)。しかしながら、胃癌の進展に伴って分化型癌から未分化型へ変化するタイプ(不均一性)を解析したものはほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

胃癌の進行と癌の組織学的不均一性には大きな関連があることが推測され、その獲得メカニズムを明らかにすることは、胃癌進展を抑制する対策となりうると考えられる。本研究における胃癌における不均一性とは分化型胃癌において未分化型成分が混在してくと仮説を立て、検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 胃癌の不均一性の臨床病理学的検討

当教室で早期胃癌に内視鏡的粘膜下剥離術を施行した症例について、純粋分化型癌、純粋未分化型癌および分化型に未分化型が混在する癌(混在癌)に分け検討する。これらの年齢・性別、腫瘍径、肉眼型などの臨床病理学的特徴について検討する。これらの検体を用いてさまざまな癌に関連する免疫染色(E-cadherin, TP53, HER2, Ki67, -

cateninなど)や胃腸型形質(Muc1, 2, 5AC)を施行する。さらに微小環境における細胞浸潤について幾つかの細胞マーカー(CD3, CD20, CD45, α -SMAなど)による免疫染色にて、炎症、繊維化との関連を明らかとする。

(2) 胃癌臨床検体異種移植モデルによる腫瘍細胞バンクの構築

患者固有の遺伝子変異やタンパク発現変化を網羅的に解析するため、生きた腫瘍細胞バンクを構築する。まず平成23年より着手している3次元胃幹細胞培養法をさらに発展させ、オルガノイドの培養を行う。分化型癌、未分化癌、混在癌と考えられる腫瘍検体よりオルガノイド培養を行う。これまでの報告では1オルガノイドは単クローン性であることが多いと考えられているため、オルガノイドをクローニングすることにより、分化型、未分化型を同一患者より分離培養する。

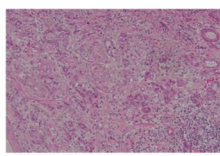
(3) 臨床検体のゲノム・エピゲノム解析

レーザーマイクロダイセクションを用いて、分化、未分化の腫瘍部、正常部よりサンプルを抽出する。DNAを抽出し、whole exonシーケンスまたは胃癌パネルを用いてシーケンス解析を施行する。同時に遺伝子コピー数解析により増幅、欠失の検討やメチル化アレイなどによる網羅的メチル化解析も行う。この解析によって、分化型癌と未分化型癌の共通点と相違点の同定を試みる。

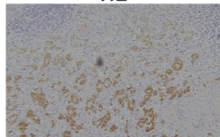
4. 研究成果

(1) 胃癌の不均一性の臨床病理学的検討

当教室で早期胃癌に対し内視鏡的粘膜下剥離術(ESD)を施行した症例について、純



HE



E-cadherin

粋分化型が2780例、純粋未分化型が87例、混在型が155例だった。混在型の特徴を分化型と比較すると、年齢、性別に差はなかったが、腫瘍径はやや大きく(16.1mm vs 24.4mm)、SM浸潤癌が多かった(12.2% vs 45.7%)。治療成績として、治癒切除率が低かった(92.0% vs 41.7%)。E-cadherinの染色においては、純粋未分化例では癌細胞で欠損している例が多かったが、混在例では未分化部分で発現が減少しているものの、欠損している例はほとんどなかった。 β -cateninの染色についても同様の傾向であった。TP53については核に染色されるものが半数程度あったが、分化度との関連性はなかった。E-cadherinのメチル化についての検討を行なったが、これまで明らかな差は見られなかった。

(2) オルガノイド細胞バンクの構築

オルガノイド細胞バンクの構築 患者固有の遺伝子変異やタンパク発現変化を効率よく網羅的に解析するため、生きた腫瘍細胞バンクを構築している。分化型癌、未分化癌、混在癌と考えられる腫瘍検体よりオルガノイド培養を行い、これまでに10例のオルガノイド培養に成功している。現在オルガノイドにおける分化型、未分化型の解析を行ったが、ほとんどが分化型であり、同一症例から文化、未分化を示すようなオルガノイドは観察されなかった。

(3) 遺伝子変異解析

高分化型腺癌20例のFFPE検体を用いて、10遺伝子(TP53, ARID1A, CDH1, PIK3CA, RHOA, KRAS, TGFBR2, APC, CTNNB1, SMAD4)についてのNGS分析、及びCINパターンの進行胃癌において高頻度のコピーナンバー変化が報告されている11遺伝子(EGFR, ERBB2など)についてのコピーナンバー解析を実施した。TP53の変異を20症例中12例(60%)

と高頻度に認めた。コピーナンバー解析ではERBB2の増幅を20症例中3例、Kras、METの増幅を1例に認めた。未分化型腺癌3例の解析も行い、2例にCDH1変異を認めた。

今回の検討からは胃純粹未分化と混在未分化癌における未分化成分の明らかな違いを示すことはできなかったが、E-cadherin の欠損については違うメカニズムによって起こる可能性が示唆される。さらなる検討によって *H. pylori* 感染に代表される慢性炎症反応の結果、胃粘膜に引き起こされる遺伝子の修飾や変異、それに引き続く遺伝子発現変化から癌に至るまでの段階への関与のみならず、さらに炎症細胞や間葉系細胞の浸潤がそれらの変化を加速し腫瘍の悪性化・未分化化を惹起する過程まで明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ozeki Y, Hirasawa K, Sawada A, Ikeda R, Nishio M, Fukuchi T, Kobayashi R, Makazu M, Sato C, Taguri M, Inayama Y, Maeda S.	4. 巻 32
2. 論文標題 Cite Share Mixed histology poses a greater risk for noncurative endoscopic resection in early gastric cancers regardless of the predominant histologic types.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 186-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MEG.0000000000001894	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ozeki Y, Hirasawa K, Kobayashi R, Sato C, Tateishi Y, Sawada A, Ikeda R, Nishio M, Fukuchi T, Makazu M, Taguri M, Maeda S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Cite Share Histopathological validation of magnifying endoscopy for diagnosis of mixed-histological-type early gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 5450-5462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v26.i36.5450	査読の有無 有
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0件

〔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	金子 裕明 (Kaneko Hiroaki) (20760078)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	
研究分担者	前田 慎 (Maeda Shin) (40415956)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

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