

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06882

研究課題名（和文）胎児形質胃癌の高悪性度に関わる遺伝子異常と治療標的の解明

研究課題名（英文）Molecular characterization and therapeutic target identification of gastric cancer with primitive 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）・教授

研究者番号：60376415

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌コホートのRNA-seq解析等により、胎児形質関連遺伝子発現の亢進している胎児形質胃癌を抽出した。胎児形質胃癌では、受容体型チロシンキナーゼの一つが特徴的に高発現していることを見出し、胃癌細胞株を用いた阻害薬投与実験では、胎児形質胃癌由来細胞株で濃度依存的に有意な増殖抑制効果が示され、有力な治療ターゲットと考えられた。さらに、胎児形質胃癌においては、PD-L1発現やHLA-classI分子の発現消失などの免疫回避機構が高頻度に用いられていることに加え、独自の免疫回避機構として胎児形質獲得に関連した免疫回避分子を特異的に高発現していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の予防や早期発見が進んでいるが、進行胃がんの予後はいまだ不良であり、胃癌撲滅のためには特に悪性度の高い胃癌の成り立ちを明らかにし、最適な治療方法を確立する必要がある。本研究では、悪性度の高い胃癌の代表である胎児形質胃癌に特徴的な細胞増殖に関連する分子、および腫瘍免疫回避機構の一端を明らかにした。今後はこれらを標的とした治療戦略を確立することで、胎児形質胃癌の個別化医療が推進されると期待される。

研究成果の概要（英文）：Based on RNA-seq analysis, we selected gastric carcinomas with a primitive phenotype, which showed increased expression of genes that characterize primitive cells. We found that one of the receptor-type tyrosine kinases is characteristically up-regulated in gastric carcinomas with primitive phenotype. Inhibitor experiments using gastric cancer cell lines showed significant concentration-dependent growth inhibition in cell lines derived from gastric carcinoma with primitive phenotype, and this molecule are considered as promising therapeutic targets. Furthermore, in addition to the frequent acquisition of immune evasion mechanisms such as PD-L1 expression and loss of HLA class I molecules, we discovered that gastric cancer with primitive phenotype specifically expressed high levels of immune evasion molecules associated with acquisition through primitive phenotype transformation as a unique immune evasion mechanism.

研究分野：病理学

キーワード：胃癌 胎児形質 免疫回避 治療標的

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

診断・治療技術の進歩により胃癌の治療成績は大きく向上したが、転移・再発例の予後は未だ不良である。胃癌の悪性度は実に様々で、極めて緩徐進行性の胃癌が存在する一方、進行が早くしばしば切除不能進行癌として発見される胃癌も存在する。したがって、胃癌の克服を目指すためには、特に悪性度の高い胃癌について早期発見や新規治療戦略開発を目指した病態解明や治療標的の同定が強く求められている。

がんゲノム研究が急速に進行し、胃癌の主な遺伝子変異が明らかとなり、胃癌の分子分類が提唱され、今後の胃癌研究・臨床応用の枠組みとなりつつある。代表的な The Cancer Genome Atlas (TCGA)分類では、CIN (染色体不安定)型、GS (ゲノム安定)型、EBV 陽性型、MSI 型に4分類される (TCGA, Nature 2014)。EBV 陽性型と MSI 型は特徴的な成り立ちを有する一群で、悪性度は比較的低く、免疫チェックポイント阻害薬の効果が期待される群である。GS 型は主にびまん型胃癌からなり進行癌では悪性度が高く、*CDH1* や *RHOA* の変異など比較的小数の特徴的遺伝子異常が知られている。高頻度コピー数異常を特徴とする CIN 型は胃癌の約半分を占める最大の群であり、最も不均一な群でもある。申請者はこれまで、AFP に加え *SALL4*, *GPC3*, *CLDN6* といった胎生初期の細胞マーカー遺伝子を高発現する胃癌の一群を同定し、胎生初期の幼若な細胞形質を有する“胎児形質胃癌”として提唱、この胃癌は AFP 産性胃癌を含む高悪性度の Intestinal-type 胃癌で、高頻度の *TP53* 異常を有し、TCGA 分子分類では CIN 型に分類されるなど、その特徴を明らかにしてきた (*Cancer Science* 2009, *Am J Surg Pathol* 2010, *Histopathology* 2012, *Am J Surg Pathol* 2017)。しかしながら、この群に特異的と言える遺伝子変異は見出せられておらず、この高悪性度胃癌の病態解明や新規の治療戦略開発研究はほとんどなされていない。

胎児形質胃癌は、胎生初期における細胞の高い細胞増殖能や分化の可塑性を実現するための遺伝子プログラムが再活性化されることによって、悪性度形質を獲得していると考えられていることから、遺伝子発現プロファイルからこの胃癌を特徴づける遺伝子の同定を試みた。その結果、胎児形質胃癌の診断マーカーでもある AFP, *SALL4*, *CLDN6* 等に加え、いくつかの癌種で増殖能や浸潤能との関連が報告されている特定の受容体型チロシンキナーゼや RNA 結合タンパクがこの群に特異的に高発現していることを見出した。両者とも正常では発生初期細胞で高発現する遺伝子であり、胃癌の胎児型形質転換に伴い発現が高まり、高悪性度形質に寄与している可能性、そして有効な治療標的となる可能性が予想される。

さらに、近年では胃癌においても免疫チェックポイント阻害薬などの免疫療法が実用化されているが、胎児形質胃癌に対する効果は明らかになっていない。また胎児形質胃癌の腫瘍免疫環境や免疫回避機構についてはほとんど検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、胃癌のなかでも特に高悪性度の胎児形質胃癌の病態解明と新たな治療戦略確立のための基盤知見を得ることを目指す。胎児形質胃癌は病理像や遺伝子発現所見から規定される胃癌であるため、近年の大規模変異解析データのみからは見出すことが困難なサブタイプである。本研究では、病理所見と網羅的遺伝子発現プロファイル、エキソームシーケンスデータ等を組み合わせることで、これまでに報告のない、この群に特異的な高発現遺伝子、腫瘍免疫の特徴を明らかにし、高悪性度胃癌である胎児形質胃癌の病態理解が進め、新たな癌治療戦略の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) 遺伝子発現プロファイルをもとにした治療標的分子の探索

胎児形質胃癌 39 症例を含む計 232 例の進行胃癌症例を対象とした RNA-seq データを基に遺伝子発現プロファイリングを行う。胎児形質胃癌に特徴的な遺伝子群を抽出し、特に治療標的となる遺伝子を同定する。同定された遺伝子に対して、病理検体を用いた免疫組織化学にてタンパクレベルでの発現を検討し、臨床・病理学的因子との関連を検討する。既存の治療標的分子である HER2 との関係も調べる。

#### (2) 細胞株・オルガノイドモデルを用いた機能解析、阻害薬感受性評価

(1)で同定した治療標的分子の阻害薬効果を検討する。胎児形質マーカー高発現胃癌細胞株 (FU97, Takigawa, IGC1Y, Ist-1) および対照胃癌細胞株 (MKN7, AGS, MKN45) を用いて、阻害薬投与による増殖・浸潤能、腫瘍形成・転移能 (マウス xenograft モデル) 等の解析を行い、胎児型形質胃癌におけるこれらの標的分子の機能や治療標的としての有効性の検証を実施する。

#### (3) 胎児形質胃癌の腫瘍免疫環境の解析

胎児型形質胃癌、EBV 関連胃癌、MSI 胃癌、その他の Intestinal-type 胃癌、Diffuse-type 胃癌

の5つのサブタイプの胃癌症例各50-100例(全350例程度)を抽出し、サブタイプごとの免疫回避機構や免疫微小環境の特徴を明らかにする。胎児形質胃癌の抽出には病理組織学的評価と胎児形質マーカー(AFP, SALL4, GPC3)免疫染色を用いる。各サブタイプにおける既知の免疫回避機構(PD-L1発現やHLA-classI欠損)に加え、(1)で同定された胎児形質胃癌に特徴的な免疫回避関連分子の検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) RNA-seqデータが得られている大規模胃癌コホートから、病理学的評価と胎児形質関連遺伝子発現プロファイルを基に胎児形質胃癌群を抽出した。この群で特徴的に高発現しているがん関連遺伝子についてタンパクレベルでの発現を確認するため、同コホートの180例の胃癌について免疫組織化学的染色によるタンパク発現の評価を行った。胎児形質胃癌で特徴的に高発現している遺伝子として、阻害薬の存在する受容体型チロシンキナーゼの一つを見出した。免疫組織化学での検討でもこの分子は胎児形質胃癌に特徴的に高発現していることが確認された。この受容体型チロシンキナーゼは、正常組織においては胎生初期の前腸細胞で高発現していることも確認し、胎児形質胃癌の胎児形質転換に伴い発現が亢進している可能性が考えられ、その機序についてさらに検討中である。

(2) 胃癌細胞株(胎児形質胃癌由来細胞株および非胎児形質胃癌由来細胞株)を用いて、上記の受容体型チロシンキナーゼに対する阻害薬投与実験を実施した所、胎児形質胃癌由来細胞株で濃度依存的に有意な増殖抑制効果が示された。

今回同定した受容体型チロシンキナーゼを標的とした阻害薬は既に一部の固形がん で実用化されているものがあり、胎児形質胃癌治療にも有効である可能性が示された。また、この受容体型チロシンキナーゼ発現は、HER2発現との共発現傾向や相互排他性はみられなかった。胎児形質胃癌でのHER2陽性率は3割強と比較的高く、抗HER2抗体薬の適応になりやすいと言えるが、HER2陰性症例に対しては今回同定した受容体型チロシンキナーゼを標的とした阻害薬が新たな選択肢として期待される。

(3) 胎児形質胃癌を含め、それぞれ腫瘍免疫環境に特徴があることが知られている計5つのサブタイプ(胎児形質胃癌、EBV関連胃癌、MSI胃癌、その他のIntestinal-type胃癌、Diffuse-type胃癌)各50例程度を対象として、PD-L1発現、HLA-classIの欠損について免疫組織化学的に検討を行った。その結果、HLA-classI欠損は、MSI胃癌と胎児形質胃癌で最も高頻度に認められ、その他のサブタイプでは比較的稀な現象であることが分かった。MSI胃癌においては、この腫瘍は変異頻度が高く免疫原性の高い腫瘍特異抗原を有する頻度が高いことから、HLA-classI欠損により腫瘍特異抗原を免疫細胞に抗原提示できなくなることが腫瘍免疫回避に重要な役割を担っていると考えられた。一方、胎児形質胃癌の変異頻度は平均的であり、遺伝子変異に基づく腫瘍特異抗原は少ないものの、様々な癌胎児性抗原の発現が高いことが特徴である。癌胎児性抗原も免疫原性が高いことが知られており、胎児形質胃癌においては、HLA-classI欠損により癌胎児性抗原を抗原提示する機能が損なわれることによって、腫瘍免疫回避に役立っている可能性が考えられた。

代表的な免疫チェックポイント分子であるPD-L1はEBV関連胃癌やMSI胃癌で発現頻度が高く、これらの癌に対しては免疫チェックポイント阻害薬が有効であることが知られており、今回のコホートでもこれらのサブタイプでPD-L1発現頻度が高いことが確認された。注目すべきことに、胎児形質胃癌でもPD-L1発現頻度は比較的高く、EBV関連胃癌やMSI胃癌よりはやや低頻度であるが、その他の2つのサブタイプよりは高い頻度であった。胎児形質胃癌に対しても、免疫チェックポイント阻害薬の一定の効果が期待される結果と考えられる。

さらに、(1)のRNA-seqデータ解析から抽出された胎児形質胃癌に特徴的な高発現遺伝子の中で、免疫回避関連遺伝子の一つを見出した。この遺伝子の高発現が胎児形質胃癌の免疫回避機構の一端を担っている可能性を考え、上述の5つのサブタイプの胃癌症例群を対象として、免疫組織化学的に発現レベルを調べた。その結果、この免疫回避関連分子は胎児形質胃癌に特異的に高発現しており、その他のサブタイプでの発現は極めて稀であることが明らかとなった。

以上の結果から、胎児形質胃癌は、代表的な免疫回避機構であるPD-L1発現やHLA-classI欠損に加え、独自の免疫回避関連分子を特異的に高発現することで、腫瘍免疫から回避し、生存アドバンテージを獲得していることが分かった。

以上の解析を通して、胎児形質胃癌の発生・進展過程におけるドライバーとなる受容体型チロシンキナーゼの発現と治療標的としての可能性、ならびに免疫回避機構の特徴の一端を明らかにすることができた。今回得た知見を基に、胎児形質胃癌の成り立ちについて分子レベルでのメカニズムの解明をさらに進めるとともに、新たな治療介入ポイントを探索し、この高悪性度胃癌の克服に向けた治療戦略の確立への貢献を目指したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Totoki Yasushi、(中略)、Ushiku Tetsuo、Nakajima Atsushi、Katai Hitoshi、Tan Patrick、Ishikawa Shumpei、Aburatani Hiroyuki、Shibata Tatsuhiro | 4. 巻<br>55                |
| 2. 論文標題<br>Multiancestry genomic and transcriptomic analysis of gastric cancer   | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Nature Genetics  | 6. 最初と最後の頁<br>581 ~ 594   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41588-023-01333-x   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Yamazawa Sho、Ushiku Tetsuo   | 4. 巻<br>480               |
| 2. 論文標題<br>Carcinosarcoma of the stomach: four cases that expand the morphologic spectrum of gastric cancer with a primitive phenotype       | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Virchows Archiv  | 6. 最初と最後の頁<br>1051 ~ 1062 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00428-022-03307-6   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Yamazawa Sho、Ushiku Tetsuo   | 4. 巻<br>480               |
| 2. 論文標題<br>Carcinosarcoma of the stomach: four cases that expand the morphologic spectrum of gastric cancer with a primitive phenotype       | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Virchows Archiv  | 6. 最初と最後の頁<br>1051-1062   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00428-022-03307-6   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>牛久哲男   | 4. 巻<br>57                |
| 2. 論文標題<br>高悪性度胃癌の分子病理学的特徴   | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>胃と腸  | 6. 最初と最後の頁<br>434-439     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし   | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>牛久哲男                            |
| 2. 発表標題<br>PD-L1 Testing in Gastric Cancer |
| 3. 学会等名<br>第20回日本臨床腫瘍学会学術集会（招待講演）          |
| 4. 発表年<br>2023年                            |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>牛久哲男               |
| 2. 発表標題<br>ゲノム医療の基礎と実際        |
| 3. 学会等名<br>第95回日本胃癌学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2023年               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>牛久哲男  |
| 2. 発表標題<br>知っておきたい！胃がんBiomarkerの基礎知識 ～Her2からClaudin18.2まで～ |
| 3. 学会等名<br>第95回日本胃癌学会総会（招待講演）                              |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>牛久哲男                            |
| 2. 発表標題<br>症例から学び、最先端に触れ、病理医の力を発揮する腫瘍病理学研究 |
| 3. 学会等名<br>第111回日本病理学会総会（招待講演）             |
| 4. 発表年<br>2023年                            |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>牛久哲男               |
| 2. 発表標題<br>胃癌診療におけるバイオマーカーの基礎 |
| 3. 学会等名<br>第96回日本胃癌学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2024年               |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>鯉沼代造, 山本周, 牛久哲男.        |
| 2. 発表標題<br>胎児形質胃がんのクロマチンアクセシビリティ解析 |
| 3. 学会等名<br>第82回日本癌学会学術総会           |
| 4. 発表年<br>2023年                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| <p>東京大学 人体病理学・病理診断学分野ホームページ<br/> <a href="https://www.pathology.m.u-tokyo.ac.jp/">https://www.pathology.m.u-tokyo.ac.jp/</a></p> |
|--|

| 6. 研究組織 |                              |                       |    |
|---------|------------------------------|-----------------------|----|
|         | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
| 研究協力者   | 鯉沼 代造<br><br>(Koinuma Daizo) |                       |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 牛久 綾<br><br>(Ushiku Aya)         |                       |    |
| 研究協力者 | 国田 朱子<br><br>(Kunita Akiko)      |                       |    |
| 研究協力者 | 山澤 翔<br><br>(Yamazawa Sho)       |                       |    |
| 研究協力者 | 近藤 篤史<br><br>(Kondo Atsushi)     |                       |    |
| 研究協力者 | 岩崎 晶子<br><br>(Iwasaki Akiko)     |                       |    |
| 研究協力者 | 中山 敦仁<br><br>(Nakayama Atsuhito) |                       |    |

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 |
|---------|---------|