

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460428

研究課題名(和文) 胃底腺型胃癌発生におけるWnt系・Hedgehog系とGNAS遺伝子変異の関与

研究課題名(英文) Significance of Wnt-signal and hedgehog-signal pathways and GNS mutation in carcinogenesis of gastric adenocarcinoma of fundic gland type

研究代表者

八尾 隆史 (YA0, Takashi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20243933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：GNAS遺伝子変異は胃底腺型胃癌の発生あるいは進展に関与していることが再確認され、KRASとBRAF遺伝子変異は胃底腺型胃癌には関連がないことが初めて示された。胃底腺型胃癌の発生あるいは進展には、Wnt/ $\beta$ -catenin signalの活性化(とくにメチル化が関与)やGNAS遺伝子変異などに加え、Sonic hedgehog signalの抑制が関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：From the above results, it was re-confirmed that the GNAS gene mutation is involved in the carcinogenesis or progression of gastric fundus gland type gastric cancer, and it has been shown for the first time that KRAS and BRAF gene mutations are not related to gastric fundus gland type gastric cancer. It was. It is suggested that suppression of Sonic hedgehog signal may be involved in the development or progression of gastric fundus gland type gastric cancer in addition to activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signal (particularly methylation is involved in particular) and GNAS gene mutation. It was done.

研究分野：医学

キーワード：胃底腺型胃癌 GNAS Hedgehogシグナル伝達系 Wntシグナル伝達系

1. 研究開始当初の背景

1) これまでの粘液形質発現による胃癌研究と新たな組織型の胃底腺型胃癌の発見

免疫組織化学的手法により、胃型形質マーカー(胃腺窩上皮 = MUC5AC、胃幽門腺・腺頸部粘液細胞 = MUC6 抗体)、腸型マーカー(腸の杯細胞 = MUC2、小腸刷子縁 = CD10)を用いて、細胞分化に基づいた胃癌の分類(胃型、腸型、混合型、分類不能型)が可能となった。この分類法を用いてこれまで多くの知見が集積されている。胃型形質癌は腸型形質癌よりも腹膜再発が多く予後不良であること(Tajima Y, et al. *Oncology* 2001, Br J Cancer 2004)や、胃型形質癌では microsatellite instability (MSI) を示す頻度が高く、adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子変異の頻度は低いこと(Yamazaki K, et al. *World J Gastroenterol.* 2006)などが報告されていた。

近年我々は、上記のマーカーに加え主細胞マーカー(pepsinogen-I)と壁細胞のマーカー( $H^+/K^+$ -ATPase)が陽性で胃底腺への分化を示す分化型腺癌 10 例を収集し、明確な臨床病理学的特徴を有する新しい疾患概念として提唱した(Ueyama H, Yao T et al. *Am J Surg Pathol* 2010)。この胃底腺型胃癌の臨床病理学的として、全例胃上部に存在し、腫瘍径平均 8.6 mm と小さいながらもほとんどが粘膜下層浸潤癌であるが、脈管侵襲は全例陰性、細胞増殖活性は通常の粘膜下層浸潤癌に比べ低く、予後良好であることを示した。その後のさらなる症例の集積から、背景胃粘膜には活動性炎症や萎縮・腸上皮化生がほとんどの例でみられず、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の感染とは無関係に発生する可能性を示唆し(八尾隆史, 他。胃と腸 2010)、実際多くの症例は *H. pylori* 陰性患者に発生していることも明らかになってきた。我々の報告による認知度や診断能の向上などから、他施設からのコンサルト例も含め 50 例以上

が集積されるに至り、今後 *H. pylori* 感染者は低下していくことが予想され、将来的に更なる症例数の増加が予想され、その臨床病理学的重要性も増してくるものと考えられた。

これまで収集された胃底腺型胃癌において p53 蛋白過剰発現の有無を免疫染色により検討したが、ほとんどの例で過剰発現はみられず(Ueyama H, Yao T et al. *Am J Surg Pathol* 2010, 八尾隆史, 他。胃と腸 2010)、多くの癌で変異がみられる p53 遺伝子変異はこの癌の発生には関与していないことが予想され、発癌機序の解明にはそれ以外の遺伝子を調べる必要があると考えられた。

2) Wnt 系・Hedgehog (Hh) シグナル伝達系および GNAS 遺伝子変異に着目した理由

胃病変における Wnt・Hh シグナル伝達系の活性化は、胃腺頸部幹細胞から胃底腺壁細胞への分化誘導のみならず、胃底腺ポリープの発生・増殖や胃癌の組織分化度及びその増殖能に関連するとされている。胃底腺壁細胞において Hh, patched, smoothened の発現がみられることから、胃腺頸部幹細胞から胃底腺壁細胞への分化誘導と Hh 系との関連性が示されており(Fukuya M, et al. *Gastroenterology* 2006;131:14-29)、胃癌においても Hh 系の活性化の証左として patched 及び smoothened mRNA の増幅や蛋白発現の亢進が報告されていた(Ma X, et al. *Carcinogenesis* 2005, Fukuya M, et al. *Gastroenterology* 2006)。胃低分化型癌細胞株を薬剤処理により高分化型癌に分化誘導すると、Wnt 系の  $\beta$ -catenin 蛋白発現の低下がみられる一方で、Hh 系の GLI-1 及び patched 1 mRNA の増幅が起こることから、胃癌の分化には Hh 系と Wnt 系の両者の関与が証明されている(Kim, et al. *Cancer Sci* 2010)。さらに、胃癌細胞株に Hh 系の GLI-1 を強制発現させると Wnt 系の  $\beta$ -catenin 核内蛋白発現の低下が起こり、強制発現させた GLI-1 を抑制すると  $\beta$ -catenin 発現が回復

すること (Yanai, et al. *Cancer Lett* 2008) から Hh 系と Wnt 系の相反性の crosstalk mechanism が明らかとなった。Wnt シグナル伝達系の遺伝子異常の頻度に関しては、familial adenomatous polyposis 関連の胃底腺ポリープでは、APC 変異による two-hit theory によって引き起こされる APC の不活性化が、一方、散在性の胃底腺ポリープでは Wnt 系の活性化に関与する  $\beta$ -catenin の変異が高率にみられるが (Abraham SC, et al. *Am J Pathol* 2001; Sekine S, et al. *Virchow Arch* 2002)、通常型胃癌では  $\beta$ -catenin, Axin, APC 変異の頻度は概ね低いことが示されている (Lee J et al. *PLoS One* 2012; Pan KF, et al. *World J Gastroenterol* 2008; Tajima Y, et al. *Clin Cancer Res* 2006)。さらに我々は最近、胃底腺との関連性から、胃底腺型胃癌における Wnt シグナル伝達系の活性化を予測し実験を行ったところ、胃底腺型胃癌では、 $\beta$ -catenin, Axin の遺伝子異常の頻度が通常型胃癌よりも有意に高く、また  $\beta$ -catenin の核内発現の程度も有意に高いことを報告した (Hidaka Y, Yao T et al. *Hum Pathol*. 2013 in press)。以上より、胃底腺型胃癌は胃底腺に関連した病変と遺伝学的に類似していることが示され、胃底腺に関連した病変における Wnt および Hh シグナル伝達系の関与を考慮すると、胃底腺型胃癌の発生においても Wnt および Hh シグナル伝達系の関与の crosstalk mechanism が働いている可能性が極めて高いことが予測される。

一方、GNAS とは、染色体 20q に位置する G タンパク サブユニット (Gs) をコードする遺伝子である。GNAS 遺伝子変異の関与が疑われる疾患としては、McCune-Albright 症候群、線維性骨異型性、偽性副甲状腺機能低下症といった疾患が挙げられる。また消化器系の疾患に限れば膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN)、Low-grade appendiceal mucinous tumor、大腸の絨毛腺腫、胃・十二指腸の幽

門腺腺腫で GNAS 変異の報告があるが、悪性疾患での報告はほとんど認められていない。胃に限って言えば、通常型胃癌 71 例に対して GNAS 遺伝子変異を調べた結果、1 例も変異を認めなかったという報告がある (Matsubara A, Kushima R, et al *J Pathol* 2013) が、胃底腺型胃癌では 3 例中 2 例に GNAS 遺伝子変異を認めた、との報告がある (Kushima R, et al. *Pathol Int* 2013)。

また、GNAS の遺伝子変異は、PKA を活性化する経路に加え、Wnt 系の活性化と介して腸管の腫瘍発生に関与するとの報告もされており (Wilson CH, et al. *Oncogene*. 2010)、これらの事実は、GNAS 遺伝子変異が Wnt シグナルを介して、直接もしくは間接的に腫瘍発生に関与している可能性を示唆する証左の 1 つである。

## 2. 研究の目的

胃底腺型胃癌は、免疫組織化学的に胃底腺主細胞マーカー (pepsinogen-I) ないし壁細胞マーカー ( $H^+/K^+$ -ATPase) が陽性を示す高分化腺癌で、胃上部に多く、小さいうちに粘膜下層に浸潤するが、細胞増殖活性は低い。また、背景胃粘膜には胃腺の萎縮・腸上皮化生や *H. pylori* 感染はみられない。このように胃底腺型胃癌は、通常の胃癌とは異なる臨床病理学的特徴を有する特殊型で、非常に興味深い胃癌と考えられるが、その詳細は不明である。特に癌発生機序に関して、我々は Wnt 系の活性化の関連 (Hidaka Y, Yao T et al. *Hum Pathol*. 2013) を報告したが、その一部が示されたにすぎない。胃底腺型胃癌発生における Wnt シグナル伝達系と Hedgehog (Hh) シグナル伝達系と GNAS 遺伝子変異の関与を研究課題とし、治療への応用も念頭において癌発生機序の解明を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 症例・対象症例の選択

当施設に集積されている、自施設と他施設症例 40 例の胃底腺型粘膜下層浸潤癌のうち、定量的 PCR 及び免疫染色が可能な症例を選択し使用する。対象としては、同じ Wnt シグナルによる発生増殖が関与しているとされている散発性の胃底腺ポリープと通常型高分化型胃癌を用いる。胃底腺ポリープに関しては、-catenin の変異のある胃底腺ポリープ症例 25 例、変異のない症例 25 例に区分し、高分化型通常胃癌 40 例を加えた総症例数 130 症例程度で検討する。

#### ( 2 ) GNAS, RAS, BRAF 遺伝子変異

ホルマリン固定パラフィン切片から、Laser capture microdissection (LCMD) 法で腫瘍部のみを選択的に採取して得られた DNA を用いて、GNAS exon8.9 の変異の有無を PCR-direct sequence 法を用いて解析する。KRAS は exon2、BRAF は exon15 の変異の有無を PCR-direct sequence 法を用いて解析する。

#### ( 3 ) Hh シグナル系活性化に関する検討

Hh 系 ligand として Sonic Hh, Indian Hh (IHH), Desert Hh の 3 種類、受容体として patched 1 (PTCH1), smoothened (Smo) の 2 種類、Hh 系下流の標的分子として GLI-1/2/3, FOXA2, ISL1, BMP4, FOXM1 の 7 種類、合計 12 種類のうち PTCH1, Smo, GLI-1 抗体を用いた免疫染色を施行し、h シグナル系蛋白発現のレベルに関する解析。

ホルマリン固定パラフィン切片から Laser capture microdissection (LCM) 法で腫瘍部のみから選択的に採取された RNA を用いて、GLI-1/2/3 をターゲットにして Hh 系の mRNA レベルの解析を行う。

同様に、GLI-1/2/3, IHH, PTCH1 等の遺伝子異常の解析も行う。

#### ( 4 ) Wnt・Hh シグナル系と GNAS 遺伝子との関連性

選択した症例においては、Wnt シグナル系活性化は既に多くの例で解析済みであり (Hidaka Y, et al 2013) 新規症例では同

様の手法で解析を行う。APC, SFRP, AXIN, MCC に加え、これまで解析していなかった PP2A (PPP2R1A) の変異についても解析し、さらに PCR 法を用いた APC, SFRP, AXIN, MCC のメチル化に関して、胃底腺型胃癌と通常型胃癌、胃底腺ポリープとの比較を行い、Wnt シグナル系の胃底腺型胃癌における関与の更なる解析を行う。その結果に加え、今回行う Hh シグナル系活性化の有無と GNAS 遺伝子変異の有無との間に関連性が認められるかを検討し、胃底腺型胃癌の発癌機序解明の一助とする。

#### ( 5 ) 胃底腺型胃癌の腫瘍発生経路の解明

適当な細胞株がなく、胃底腺型胃癌において活性化している特定のシグナル伝達経路の確認は困難である。そこで、網羅的な蛋白質の発現解析を行い、胃底腺ポリープ等と比較することにより腫瘍発生に関与しているシグナル伝達経路を推測してみる。

腫瘍発生機序を解析する際に key となる遺伝子/蛋白を抽出するのに、網羅的な蛋白質発現解析を行う。胃底腺ポリープ vs 高分化型胃癌 vs 胃底腺型胃癌の各々の病変/腫瘍部より蛋白質を抽出し、蛋白質発現の違いを I-TRAQ を用いた網羅的な蛋白質解析を行う。

上記で得られたデータを pathway 解析ツールにかけ、胃底腺型胃癌の腫瘍発生に関わっているシグナル伝達経路の推測を行う。この際に、pathway に関連した遺伝子に異常がある場合などは、pathway の動きに影響が出てくるので、A) の解析で認められた Wnt 系/Hh 系/GNAS を含む遺伝子異常等の情報も入れて解析を行う。

## 4. 研究成果

### ( 1 ) GNAS, KRAS, BRAF 遺伝子変異の解析

胃底腺型胃癌 27 例中 GNAS 遺伝子変異は 8 例 (30%) に認め、KRAS と BRAF 遺伝子変異は認めなかった。また、対照とした通常型高分化型腺癌では GNAS, KRAS, BRAF 遺伝子変異は認

めなかった。GNAS遺伝子変異は胃底腺型胃癌の発生あるいは進展に関与していることが再確認され、KRASとBRAF遺伝子変異は胃底腺型胃癌には関連がないことが初めて示された(Tajima Y et al. 2017 submitted/revsed)。(2) 胃底腺型胃癌における Wnt シグナル伝達系と Hedgehog(Hh) シグナル伝達系および GNAS 遺伝子変異の解析。

粘膜内に止まる胃底腺型胃癌(胃底腺型腫瘍/胃底腺主細胞異形成)に関して Wnt シグナル伝達系の関与を調べ、胃底腺主細胞異形成の浸潤能獲得には Wnt シグナル伝達系の活性化が必要である可能性が示唆された。また、脱リン酸化酵素である protein phosphatase 2A(PP2A) 遺伝子変異も胃底腺型腫瘍の発育進展に関与する可能性も初めて示された(Lee S-Y, et al. Virchow Arch 467:27-38, 2015)。

胃底腺型胃癌では通常型高分化型腺癌に比べ、Hhシグナル伝達系関連タンパクである GLI-1、PTCH、Smoの発現は低下しており、Hhシグナル伝達系の抑制が腫瘍の発生あるいは発育進展に関与していることが示唆された。GNAS変異とGLI-1発現の関連は、GNAS変異を認める8例中4例(50%)で発現を認めた。一方で、GNAS変異を認めない19例中1例(5%)のみにGLI-1発現を認め、有意差を認めた。有意差を認めなかったが、PTCH、Smoでも同じ傾向であった。

胃底腺型胃癌 27 例中 22 例(81%)で -catenin核内発現を認めた。その22例のうちPTCHは5例(23%)、Smoは7例(32%)、GLI-1は3例(14%)に発現を認めた。 -catenin核内発現を認めなかった5例(19%)では、PTCHは2例(40%)、Smo2例(40%)、GLI-1は2例(40%)に発現を認めた。以上の結果から、Hh関連タンパクと -catenin発現は関連がない可能性が示唆された。胃底腺型胃癌の発現は、Wnt/ -catenin signalの活性化やGNAS遺伝子変異などに加

え、Sonic hedgehog signal の抑制が関連している可能性が示唆された(Tajima Y et al. 2017 submitted/revsed)。

また、Wntシグナル伝達系に関する遺伝子であるAPC、SFPR、AXINは胃底腺型胃癌では胃底腺ポリープ(腫瘍化を伴うものも含む)より高頻度にメチル化を認めた。すなわち、胃底腺型胃癌の進展にWntシグナル伝達系に関する遺伝子の一部のメチル化が関与していることが示された(Murakami T, et al. Pathol Int 67: 147-155, 2017)。

(3) 胃底腺型胃癌における腫瘍発生経路の解明

現在、解析進行中で、解析可能なデータが十分得られていないため、引き続き解析を継続する。

#### < 参考文献 >

Tajima Y, Murakami T, Saito T, Hiromoto T, Akazawa Y, Sasahara N, Mitomi H, Yao T, Watanabe S. Distinct involvement of the Sonic hedgehog signaling pathway in gastric adenocarcinoma of fundic gland type and conventional gastric adenocarcinoma. Virchow Archiv 2017 submitted/revsed

Lee S-Y, Saito T, Mitomi H, Hidaka Y, Murakami T, Nomura R, Watanabe S, Yao T. Mutation spectrum in the Wnt/ -catenin signaling pathway in gastric fundic gland-associated neoplasms/polyps. Virchow Arch 467:27-38, 2015

Murakami T, Mitomi H, Yao T, Saito T, Shibuya T, Watanabe S. Epigenetic regulation of Wnt/ -catenin signal-associated genes in gastric neoplasia of the fundic

gland (chief cell-predominant) type.  
Pathol Int 67:147-155, 2017

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Ueyama H, Matsumoto K, Nagahara A, Hayashi T, Yao T, Watanabe S. Gastric adenocarcinoma of the fundic gland type (chief cell predominant type). Endosc査読有 46: 153-157, 2014.

Lee S-Y, Saito T, Mitomi H, Hidaka Y, Murakami T, Nomura R, Watanabe S, Yao T. Mutation spectrum in the Wnt/ -catenin signaling pathway in gastric fundic gland-associated neoplasms/polyps. Virchow Arch査読有 467:27-38, 2015

Gushima R, Yao T, Kurisaki-Arakawa A, Hara K, Hayashi T, Fukumura Y, Saito T, Arakawa A, Yao K, Sasaki Y. Expression of adipophilin in gastric epithelial neoplasia is associated with intestinal differentiation and discriminates between adenoma and adenocarcinoma. Virchow Arch査読有 468: 169-177, 2016

Murakami T, Mitomi H, Yao T, Saito T, Shibuya T, Watanabe. Epigenetic regulation of Wnt/ -catenin signal-associated genes in gastric neoplasia of the fundic gland (chief cell-predominant) type. Pathol Int査読有 67:147-155, 2017

Tajima Y, Murakami T, Saito T, Hiromoto T, Akazawa Y, Sasahara N, Mitomi H, Yao T, Watanabe S. Distinct involvement of the Sonic hedgehog signaling pathway in gastric adenocarcinoma of fundic gland type and conventional gastric

adenocarcinoma. Virchow Archiv査読有 2017 submitted/revised

〔学会発表〕(計4件)

上山浩也, 八尾隆史, 渡辺純夫。胃底腺型胃癌の現状と課題。日本消化器病学会雑誌 114(suppl-1): 30-30, 2017。(第103回日本消化器病学会・東京 シンポジウム)

上山浩也, 八尾隆史, 渡辺純夫。胃低腺型胃癌の高悪性度組織垂型・胃底腺粘膜型胃癌の臨床病理学的特徴。日本消化器病学会雑誌 113(suppl-2): 472-472, 2016。(第58回日本消化器病学会大会・神戸 シンポジウム)

八尾隆史, 上山浩也。病理学的視点からみたヘリコバクターピロリ陰性胃癌。日本消化器病学会雑誌 113(suppl-2): 472-472, 2016。

(第58回日本消化器病学会大会・神戸 シンポジウム)

上山浩也, 八尾隆史, 渡辺純夫。胃底腺型胃癌の臨床病理学的特徴。日本消化器病学会雑誌 112(suppl-2): 798-798, 2015。(第90回日本消化器内視鏡学会・東京 ワークショップ)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

八尾 隆史 (YAO, Takashi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 2024393

(2) 研究分担者

斎藤 剛 (SAITO, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 80439736