

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460429

研究課題名(和文) 消化管腫瘍における変異GNASの解析

研究課題名(英文) GNAS mutations in gastrointestinal tumors

研究代表者

関根 茂樹 (Sekine, Shigeki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：10321879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：十二指腸における胃上皮化生、異所性胃粘膜および腺癌に高頻度の活性型GNASおよびKRAS変異を同定した。腺癌ではGNAS変異は胃型上皮形質を示す腫瘍に特徴的であり、胃上皮化生、異所性胃粘膜がこれらの胃型腺癌の前駆病変である可能性が示唆された。家族性大腸腺腫症に伴う胃病変として幽門腺腺腫が提唱されているが、この病変がGNAS変異を含む特徴的な遺伝子変異を有しており、疾患背景が異なるにもかかわらず、散発例と同様の分子異常を有する病変であることが明らかになった。大腸鋸歯状腺腫において低頻度のGNAS変異の存在を確認するとともに、特徴的な変異としてRSPO融合遺伝子およびRNF43変異を同定した。

研究成果の概要(英文)：We identified frequent GNAS mutations in gastric foveolar metaplasia, gastric heterotopia, and adenocarcinoma of the duodenum. GNAS mutations were exclusive to adenocarcinomas with gastric epithelial phenotypes, suggesting that gastric foveolar metaplasia and gastric heterotopia are precursors to these adenocarcinomas. Familial adenomatous polyposis (FAP)-associated pyloric gland adenomas were found to have frequent GNAS, KRAS, and APC mutations. This indicates that FAP-associated pyloric gland adenomas share common genetic features with sporadic cases despite their distinct clinical backgrounds. Mutational analyses of colorectal traditional serrated adenomas identified infrequent GNAS mutations as well as frequent RSPO fusions and RNF43 mutations as characteristic genetic alterations among colorectal polyps.

研究分野：病理学

キーワード：GNAS 消化管腫瘍

1. 研究開始当初の背景

GNAS は G 蛋白質の一つである stimulatory G-protein (Gs) のサブユニットをコードする遺伝子である。生理的には Gs は G 蛋白質共役型受容体の制御下にあり、受容体へのリガンド結合を受けてアデニル酸シクラーゼを活性化し、セカンドメッセンジャーである cAMP の細胞内濃度を上昇させる (図 1)。

ヒト腫瘍における *GNAS* 変異は 1989 年に下垂体腺腫で始めて報告された (Landis CA. *Nature* 1989)。腫瘍で認められる *GNAS* 変異は機能亢進型変異で、Gs の下流シグナルの活性化を通じて腫瘍発生を促進すると考えられている。ヒト腫瘍における *GNAS* 変異の存在は 20 年以上前から知られていたが、その後の *GNAS* 変異に関する報告は下垂体腺腫、甲状腺腺腫などの内分泌腫瘍および線維骨異形性などの病変に限られており (Weinstein LS. *Endocrinology* 2004)、消化器腫瘍では大腸癌の少数例に変異が報告されている以外にはほとんど認められないと考えられていた。しかし、2011 年に Wu, Furukawa らによって *GNAS* 変異が膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) に高頻度に存在することが報告された (Wu J. *Sci Transl Med* 2011; Furukawa T. *Sci Rep* 2011)。

申請者は IPMN と組織学的に類似する特徴を示す低異型度虫垂粘液性腫瘍、絨毛腺腫、幽門腺腺腫などの消化器腫瘍において同様の *GNAS* 活性化型変異が高頻度に認められる事を報告してきた。*GNAS* 変異は非常に組織型特異性が高く、また、これらの腫瘍にはいくつかの共通する性質が認められる。*GNAS* 変異を有する腫瘍は、いずれも良性または低悪性度で細胞異型が低い。また、粘液産生が目立ち、胃型粘液と呼ばれる MUC5AC や MUC6 の発現を示す。さらに、これらの腫瘍では *KRAS* 変異が併存する事が多い。

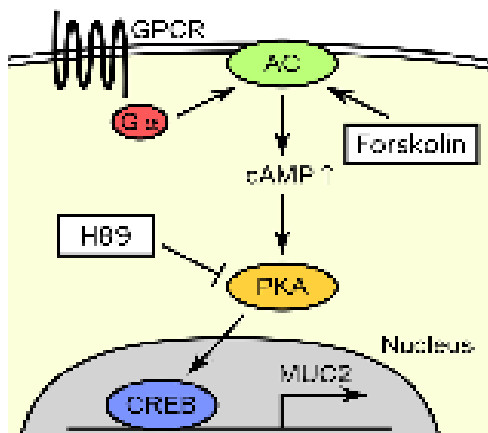


図 1 : Gs-PKA シグナル経路の活性化と MUC2 の誘導

2. 研究の目的

活性化型 *GNAS* 変異は G 蛋白質の一つである Gs を恒常的に活性化させ、cAMP 濃度の上昇を介して腫瘍発生に寄与していると考えられている。これまでの研究から、腫瘍における変異 *GNAS* は極めて組織型特異性が高く、粘液産生の目立つ腫瘍に多く認められるなどの共通する病理学的特徴存在することが明らかになってきている。本研究ではヒト消化管腫瘍における変異 *GNAS* 関与の全体像を明らかにするとともに、腫瘍発生およびその特性に変異 *GNAS* が果たす役割について解析する。

3. 研究の方法

内視鏡切除または手術によって得られた消化管を中心とした組織検体のうち、病理診断に用いた後、余剰となったパラフィン包埋標本を用い、DNA および RNA を抽出し、変異解析および発現解析を行った。本研究ではこれまでの研究から示唆される胃型形質を呈する腫瘍性・化生性病変に注目し、これらの病変を中心として解析を行った。

変異解析には主に Sanger sequencing で行ったが、必要に応じて次世代シーケンサーを用いた amplicon sequencing を行った。発現解析には通常の RT-PCR による融合遺伝子の同定および定量 PCR による関連遺伝子の解析を行った。また、 β -catenin, MLH1 を始めとする腫瘍関連タンパク質に対する免疫染色をおこなった。これらの分子病理学的な所見との関連を検索する目的で複数の病理医による組織所見の再評価を行った。

4. 研究成果

十二指腸における胃上皮化生、異所性胃粘膜および腺癌計 177 病変を対象に遺伝子変異解析を行い、活性化型 *GNAS* 変異を胃上皮化生の 41%、異所性胃粘膜の 28%、腺癌の 17% に同定した。また、活性化型 *KRAS* 変異を胃上皮化生の 26%、異所性胃粘膜の 2%、腺癌の 37% に認めた。さらに、腺癌を対象として免疫染色を行ったところ、活性化型 *GNAS* 変異を有する腫瘍は全て MUC5AC をびまん性に発現していた。MUC5AC は胃腺窩上皮に特徴的な分泌型粘液であり、正常の十二指腸では認められないこと、さらに *GNAS* 変異を共通の遺伝子異常として有している事から、胃上皮化生および異所性胃粘膜は十二指腸における胃型腺癌の前駆病変である可能性が示唆された (論文 1、図 2)。

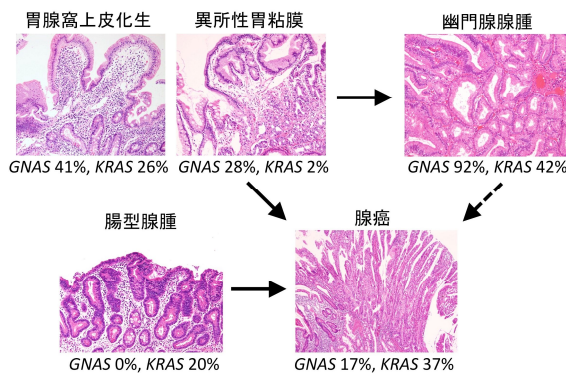


図2：GNAS, KRAS 変異頻度から想定される十二指腸における腫瘍発生経路

近年、幽門腺腺腫が家族性大腸腺腫症 (FAP) における胃病変として新たに提唱されている。しかしながら、散発性の幽門腺腺腫は炎症や萎縮を伴う粘膜に発生するのに対して、FAP に伴う幽門腺腺腫は炎症や萎縮の無い粘膜に発生するという異なる背景を有している。本研究では FAP に伴う胃病変を対象として遺伝子変異解析を行い、活性化型 GNAS, KRAS 変異を高頻度に同定し、これら異なる背景に伴う幽門腺腺腫が共通の遺伝子変異を有している事を明らかにした。さらに、FAP の原因遺伝子である APC 変異を解析し、散発性および FAP に伴う幽門腺腺腫がともに高頻度に不活化型変異を有している事を示した (論文 2)。

われわれの先行研究で 234 例の大腸腫瘍において GNAS 変異を検索し、GNAS 変異は絨毛腺腫に高頻度かつ特異的に認められるという結果を得ていた (Yamada M. *J Pathol.* 2012)。しかし、その後、変異 GNAS が鋸歯状腺腫の一部 (8%) にも認められるという報告がされた (Wiland HO. *4th Am J Surg Pathol.* 2014)。これらの知見に基づき、今回、より多くの症例で大腸ポリープにおける GNAS 変異と組織型の相関を確認するため、70 例の鋸歯状腺腫を含む計 188 例の大腸ポリープを対象として、次世代シーケンサーを用いた変異解析を行った。GNAS 変異は 8 例 (11%) の鋸歯状腺腫で認められたが、過形成性ポリープ、sessile serrated adenoma/polyp、管状腺腫、管状絨毛腺腫では全く認められなかった (図 3)。

これらの結果から、GNAS 変異は大腸腫瘍において絨毛腺腫のみならず、低頻度では有るが鋸歯状腺腫の一部にも認められる事が確認された。大腸ポリープのうち鋸歯状病変は高頻度に胃型粘液の発現を伴っており、胃・十二指腸で認められた胃型粘液の発現する病変に GNAS 変異を多く認めるという所見との共通性が示され、興味深い所見と考えられた。GNAS 変異とその他の遺伝子変異の相関について明らかなものは

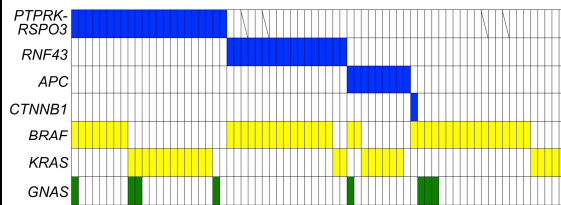


図3：鋸歯状腺腫における遺伝子変異の相関

認められなかった。また、この変異検索の中で、鋸歯状腺腫に特徴的な遺伝子変異として、PTPRK-RSPO3 融合遺伝子および RNF43 の不活化型変異が存在する事を見出した (論文 3)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- Comprehensive characterization of RSP0 fusions in colorectal traditional serrated adenomas.
Sekine S, Ogawa R, Hashimoto T, Kojima M, Yoshida H, Taniguchi H, Saito Y, Ohno Y, Ochiai A, Hiraoka N.
Histopathology. 2017. in press. doi: 10.1111/his.13265.
- Mismatch repair deficiency commonly precedes adenoma formation in Lynch Syndrome-Associated colorectal tumorigenesis.
Sekine S, Mori T, Ogawa R, Tanaka M, Yoshida H, Taniguchi H, Nakajima T, Sugano K, Yoshida T, Kato M, Furukawa E, Ochiai A, Hiraoka N.
Mod Pathol. 2017. in press. doi: 10.1038/modpathol.2017.39.
- Cytoplasmic MSH2 immunoreactivity in a patient with Lynch syndrome with an EPCAM-MSH2 fusion.
Sekine S, Ogawa R, Saito S, Ushijima M, Shida D, Nakajima T, Taniguchi H, Hiraoka N, Yoshida T, Sugano K.
Histopathology. 2017 Mar;70(4):664-669. doi: 10.1111/his.13104.
- Frequent PTPRK-RSPO3 fusions and RNF43 mutations in colorectal traditional serrated adenoma.
Sekine S, Yamashita S, Tanabe T, Hashimoto T, Yoshida H, Taniguchi H, Kojima M, Shinmura K, Saito Y, Hiraoka N, Ushijima T, Ochiai A.
J Pathol. 2016 Jun;239(2):133-8. doi: 10.1002/path.4709.
- Activating GNAS and KRAS mutations in

gastric foveolar metaplasia, gastric heterotopia, and adenocarcinoma of the duodenum.

Matsubara A, Ogawa R, Suzuki H, Oda I, Taniguchi H, Kanai Y, Kushima R, Sekine S.

Br J Cancer. 2015 Apr 14;112(8):1398-404. doi: 10.1038/bjc.2015.104.

6. Familial adenomatous polyposis-associated and sporadic pyloric gland adenomas of the upper gastrointestinal tract share common genetic features.

Hashimoto T, Ogawa R, Matsubara A, Taniguchi H, Sugano K, Ushima M, Yoshida T, Kanai Y, Sekine S.

Histopathology. 2015 Nov;67(5):689-98. doi: 10.1111/his.12705.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関根茂樹 (SEKINE, Shigeki)

国立がん研究センター中央病院・病理科・
医長

研究者番号 : 10321879