

論文の内容の要旨

論文題目 胎児形質胃癌の分子病理学的特徴および治療標的分子の探索

氏名 近藤 篤史

RNA シークエンス(RNAseq)、全エクソン解析を施行した胃癌の手術症例(n=185)について、RNAseq のクラスター解析にて胎児性分子の再活性化を伴う特徴的な症例群(胎児形質胃癌クラスター)を見出したため、分子病理学的特徴の解明、治療標的分子探索を目的として本研究を行った。胎児胃癌症例について臨床病理学的因子、遺伝子変異、変異シグネチャー、高発現遺伝子、メチル化解析を実施し、治療標的分子の探索のため胃癌細胞株(AFP 産生胃癌細胞株、非 AFP 産生胃癌細胞株)を用いた阻害剤投与による増殖抑制試験も施行した。

胎児形質胃癌症例は 17 例で、TCGA の胃癌分子分類では全例が染色体不安定性(CIN)型であった。胎児形質胃癌症例は Lauren 分類で腸型の組織型を呈する例が多く、静脈侵襲が有意に多かった。病理組織学的には胎児消化管上皮類似(Fetal gut like)や肝様(Hepatoid)の形態を呈するものが多く、免疫組織化学的にも胎児性分子である SALL4、GPC3、AFP の発現を示した。また RNAseq のクラスター解析にて、胎児形質胃癌で高発現が確認された胎児性分子として IGF2BP1 を見出し免疫染色の検討を行ったところ、IGF2BP1 の高発現症例は胎児形質胃癌に高頻度(感度:94.1%)かつ特異的(特異度: 89.8%)に認められ、非常に有用な免疫染色マーカーであると考えられた。体細胞変異は TP53 変異が最も高頻度(82.4%)であったが、その他の CIN 胃癌と差は無かった。次に高頻度な体細胞変異は FBXW7(17.6%)で、その他の CIN 胃癌と比べ胎児形質胃癌にて有意に高頻度であった。予後解析では、胎児形質胃癌で無増悪生存期間が有意に短い傾向にあった。全生存期間も短い傾向にあった。

変異シグネチャー解析では、胎児形質胃癌で二本鎖切断相同組み換え修復の異常(HRD)に関係する変異シグネチャーである signature 3 の要素を有する症例が多い結果であり、実際に HRD の関与が高ければ PARP 阻害薬等の有効性が期待されるため、HRD 関連因子についてより詳細な検討を進めた。まず、二本鎖切断相同組み換え修復に関する遺伝子(ATM、ATR、BRCA1、BRCA2、BRIP1、RAD51B、RAD51C、RAD51D)の Truncating 変異の有無を調べたが、胎児形質胃癌で上記遺伝子に Truncating 変異は認められなかった。続いて、HRD の指標として「Signature 3 の寄与度」、「平均 indel 長」、「microhomology の 5bps 以上の deletion の占める割合」の 3 項目を用いて検討した。「Signature 3 の寄与度」は deconstructSigs ソフトウェアで得た Signature 3 の寄与割合を示しており、「microhomology の 5bps 以上の deletion の占める割合」は二本鎖切断相同組み換え修復ではなく非相同末端結合による修復が起きた際に、特徴的にみられる修復のエラー(microhomology の 5bp 以上の deletion)が indel 全体に占める割合を示している。上記 3 つの指標は HRD が高度であれば高値を示す指標であり、胎児形質胃癌における指標の強度を

検討した。胎児形質胃癌が含まれる CIN 型胃癌では、その他の胃癌と比較して上記 3 つの指標はいずれも高い傾向にあった。次に胎児形質胃癌とその他の CIN 胃癌とを比較したところ、「Signature 3 の寄与度」は胎児形質胃癌で高い傾向にあったものの、「平均 indel 長」、「microhomology の 5bps 以上の deletion の占める割合」では有意差はみられなかった。また、これらの指標の程度をみると、胎児形質胃癌はいずれの指標も軽度～中等度であった。上記指標が高度であったのは、二本鎖切断相同組み換え修復に関わる遺伝子の病的変異を有する非胎児形質胃癌の CIN 症例であった。HRD の一因となる *BRCA1* のメチル化についても検討したが、胎児形質胃癌を含む多くの CIN 型胃癌は *BRCA1* 低メチル化群に分類され、*BRCA1* メチル化による HRD の要素は否定的であり、胎児形質胃癌の HRD への関与は限定的と考えられた。また上記 3 指標とも早期癌の段階でも異常がみられ、早期癌と進行癌で有意差はみられず、腸上皮化生を有している例では「Signature 3 の寄与度」が高い傾向にあった。

また治療標的分子検索のため受容体型チロシンキナーゼの発現検討を行ったが、胎児形質胃癌では非胎児形質胃癌に比べ *FGFR3/4*、*ERBB3* の RNA 発現が有意に高い結果となった。次に iPS 細胞の初期化因子をコードする *MYC* の胎児形質胃癌における高発現を期待し、*MYC* の発現検討を行ったところ、胎児形質胃癌の多くは高発現を示すものの低発現症例も数例含まれていた。*MYC* 低発現の胎児形質胃癌について、*FBXW7* 変異による c-Myc が安定化の可能性を考えたが、*MYC* 低発現症例に *FBXW7* の体細胞変異は認められなかった。しかし、*MYC* 低発現を示す胎児形質胃癌症例では *MYC* の代わりに *MYCN*、*MYCL* が高発現していることが明らかとなった。

続いて RNAseq のクラスター解析で胎児形質胃癌にて高発現であった 1,257 個(種)の遺伝子群の Gene ontology 解析では、通常肝細胞、生殖細胞でみられる機能(凝固系、生殖など)が上位に来ていた。成人の肝臓、精巣で発現している遺伝子とのオーバーラップをみると、上記の 1,257 個の遺伝子は肝臓の発現遺伝子と 15.6%、精巣の発現遺伝子と 26.0% 重複があり、胎児形質胃癌の肝臓分化、幼若な分化傾向を反映した結果と解釈された。

細胞株を用いた増殖抑制試験では、AFP 産生胃癌の細胞株である FU97 で *FGFR* 阻害薬の TAS120 投与で濃度依存性の増殖抑制効果が確認された。ATRA を用いた分化誘導療法や 5-HT による *SALL4* 阻害および両者の併用、*PARP* 阻害薬である Olaparib 投与も施行したが、AFP 産生胃癌での有効性は認められなかった。

考察として、まず本研究では RNAseq のクラスター解析から複数の胎児性遺伝子の活性化を伴う特徴的症例群(=胎児形質胃癌症例群)を抽出し、胎児性分子の免疫染色を実施し検討したが、そのうち *IGF2BP1* 高発現症例は胎児形質胃癌に非常に高率かつ特異的に認められ、胎児形質胃癌抽出に有用な免疫染色マーカーであると考えられた。*FBXW7* の体細胞変異が胎児形質胃癌で特徴的に認められたことを、本研究ではじめて明らかにしたが、*FBXW7* はユビキチンプロテアソーム系に関わるタンパク質で、cyclin E1 や c-Myc などの腫瘍性タンパク質の分解に寄与する癌抑制因子とされている。先行研究でも AFP 産生胃癌

では *CCNE1* や *MYC* の高増幅が特徴的にみられることが知られており、胎児形質胃癌における *FBXW7* の変異は、*CCNE1* や *MYC* を介した癌形質維持や腫瘍進展に関与している可能性がある。また胎児形質胃癌における *MYC* の高発現も期待したが、全ての胎児形質胃癌で高発現は見られず、むしろ *MYC* 低発現となる胎児形質胃癌症例も認められた。しかし、このような症例では他の *MYC* ファミリー分子の高発現が確認されていた。iPS 細胞作製において、初期化因子として、*MYC* の代わりに他のファミリー分子を用いても初期化されることが知られており、*MYC* ファミリー分子の高発現状態は胎児形質胃癌における幼若な分化誘導要因の一つと考えられた。

また胎児形質胃癌を含む多くの CIN 型胃癌では、二本鎖切断相同組み換え修復に関与する遺伝子に病的変異やメチル化はみられないものの、HRD の存在が示唆された。この現象について、*H.pylori* 感染により HRD が生じた可能性を考えた。*H.pylori* 感染下では、*CagA* が宿主細胞の BRCA1 リン酸化に関わるキナーゼ PAR1b を不活性化させ、BRCA1 の核内移行を妨げられ、HRD が引き起こることが報告されており、*TP53* 変異例ではさらに、二本鎖切断が生じたとしても細胞周期が停止せず、HRD に関連した変異 signature が蓄積することが知られている。このため *TP53* 変異の多い CIN 型胃癌群で低～中等度の signature 3 が生じたメカニズムのひとつとして考慮された。

遺伝子発現では肝臓、精巣の発現遺伝子とのオーバーラップが確認された。実際に病理組織化学的にも肝様、胎児消化管上皮類似の形態のものが多く含まれており、分化方向性という観点では形態学的所見と合致していた。受容体型チロシンキナーゼの発現検討では、胎児形質胃癌で *FGFR3/4* が高値であることが明らかとなったため、FGFR 阻害薬の TAS120 投与を胃癌細胞株で投与し腫瘍細胞の増殖抑制試験を行った。AFP 産生胃癌である FU97 でのみ濃度依存性に増殖抑制効果がみられたが、他の AFP 産生胃癌細胞株では増殖抑制効果は得られなかった。これについて CCLE 登録の胃癌細胞株データから、細胞株によっては臨床検体を十分に反映できておらず、期待していた結果が得られなかった可能性が考えられた。

以上、本研究では極めて予後不良な胃癌亜型である胎児形質胃癌について、病理組織学的特徴や遺伝子異常を詳細に評価するとともに、有用な診断マーカーの発見(*IGF2BP1*)や治療標的分子(*FGFR3*、*FGFR4*)の同定、細胞株での検証を実施した。研究成果を踏まえ、本腫瘍の病態解明および治療戦略の確立に向けた研究を推進していきたい。