

論文の内容の要旨

論文題目 びまん型胃癌における *RHOA* 変異と転座の臨床病理学的解析

氏 名 田中 淳

全ゲノムシーケンス、エクソンシーケンスにより胃癌を含む種々の腫瘍性疾患の網羅的ゲノム解析が報告されるようになった。我々は胃癌の二大亜型の一つ、びまん型胃癌に *RHOA* 変異が集積していることを報告した。次いで The Cancer Genome Atlas (TCGA) から、*RHOA* 変異に加え、さらに *CLDN18-ARHGAP* 転座が反復してびまん型胃癌に特徴的に認められることが示された。

RHOA 変異の約半数は我々のデータでは R5Q/W, Y42C に hotspot を形成しており機能獲得性変異と考えられた。*RHOA* は創薬ターゲットとなりうるエフェクタードメインや GTP 結合ドメインなどを複数有しており、創薬・新規治療法開発において重要なターゲット分子である。しかし、*RHOA* 変異の頻度、各変異間の臨床病理学的特徴の違い、腫瘍発生における意義はまだ明らかでない。また、*CLDN18-ARHGAP* 転座の特徴についても同様に臨床的な意義はまだ明らかになっていない。このびまん型胃癌の遺伝子異常の意義を解明するため、二つの研究を行った。

RHOA に関する上記の問題を明らかにするため、胃癌手術検体 205 例(びまん型 123 例、腸型 82 例)の hotspot *RHOA* 変異(R5Q, R5W, Y42C)を digital PCR(Taqman 法)を用いて検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック(FFPE)から DNA を抽出し、*RHOA* 野生型アレル特異的 Taqman probe と変異特異的 Taqman probe を用いて検討した。その結果、びまん型胃癌特異的に *RHOA* 変異(123 例中 7 例)がみられ、腸型胃癌 82 例には認められなかった。

続いて、先行研究で発見された *RHOA* 変異例と合わせ計 20 例の変異症例で、変異型における臨床病理学的特徴の違いを検討した。さらに浸潤パターンとして個細胞浸潤の程度と線維化の程度をスコアリングし検討した。その結果、Y42C 例は R5W 例より進行癌に多く、線維化をほぼ伴わない個細胞性浸潤(アメーバ様浸潤、網状浸潤)、リンパ管侵襲を示す傾向が示された。

次に *RHOA* 変異が腫瘍発生早期から存在し、腫瘍内いずれの部位にも変異がみられることを確認するため、*RHOA* 変異癌 8 例(早期癌 4 例、進行癌 4 例)を用いて、

各々の腫瘍部からレーザーマイクロダイセクションで腫瘍粘膜内、深部浸潤部、リンパ節転移等病変を採取し、DNA抽出、digital PCR解析を行った。また、一変異多型(SNPs)を利用したアレル不均衡解析と *RHOA* に対する fluorescence *in situ* hybridization (FISH)により loss of heterozygosity (LOH)と異数性を評価した。その結果、*RHOA* 変異は粘膜内病変から深部浸潤部、リンパ節転移巣まですべての病変部に認められ、組織学的に minor な成分であった中分化腺癌や粘液癌成分等にも同変異が確認できた。これらの結果は、腫瘍発生において *RHOA* 変異が早期に生じた事象で、腫瘍発生に重要な意義を有することを示唆している。また深部浸潤部、リンパ節転移巣で変異アレル頻度上昇がみられ、変異型 *RHOA* 蛋白質が腫瘍進展・浸潤・転移にも重要と考えられた。

*CLDN18-ARHGAP*転座の臨床病理学的特徴を明らかにするために、*RHOA* 変異を検討した胃癌手術検体 205 例の FFPE 検体から RNA を抽出し、cDNA 合成、*CLDN18-ARHGAP*転座に対する特異的プライマーを用い、転座の有無を解析した。また PCR 陽性例を対象に、*CLDN18*に対する FISH を行い *CLDN18*の split signal の有無を検討した。その結果、205 例中 22 例に *CLDN18-ARHGAP*転座が認められた。胃癌の亜型では、びまん型が 18 例、腸型が 4 例と有意にびまん型が多かった。また、*RHOA* 変異と転座はびまん型胃癌において相互排他的であった。びまん型胃癌において、臨床病理学的には、転座陽性胃癌は陰性胃癌と比較して、腫瘍径が有意に大きく、リンパ節転移、遠隔転移の頻度が高かった。また、転座陽性のびまん型胃癌は陰性胃癌に比べ、全生存期間、無病生存期間が有意に短縮していた。しかし、単変量解析で有意差を示したリンパ節転移、遠隔転移とともに Cox 比例ハザードモデルで多変量解析を行ったところ、転座の有無は独立した予後因子ではなかった。

現在、胃癌に対しては HER2 を対象とした分子標的薬治療が行われているが、びまん型胃癌は増幅が認められず、対象とならない症例がほとんどである。一方、*RHOA* 変異蛋白質と *CLDN18-ARHGAP*転座蛋白質は今後の胃癌治療法開発において鍵となる蛋白質である。このため、本研究で両者の異常症例の臨床病理学的特徴を明らかにした意義は大きい。また、びまん型胃癌に特徴的にみられた *RHOA* 変異と *CLDN18-ARHGAP*転座がいずれも *RHOA*-pathway を制御する蛋白質で、両者が相互排他的にみられたことから、*RHOA*-pathway 異常がびまん型胃癌の成り立ちに重要な位置を占めていることが明らかとなった。今後、びまん型胃癌の新規治療法開発のためには *RHOA*-pathway の制御に注目した研究を集中的に行うことが重要である。