

# 博士論文

胃粘液癌の網羅的ゲノム解析および病理組織学的研究

六反啓文

## <目次>

要旨	1
第一章 序文	
1. 世界および本邦における胃がんの現状	2
2. 胃がんの一亜型としての粘液癌	2
3. 次世代シーケンスによるがんゲノム異常の解明	4
第二章 背景と目的	
1. 胃がん次世代シーケンス研究の現状	6
2. 胃粘液癌における未解明事項	6
3. 目的	7
第三章 材料と方法	
第一節 材料	
1. 胃粘液癌の手術検体	8
2. 倫理委員会の承認に関する事項	8
3. 胃がん細胞株	8
第二節 方法	
1. DNA 抽出および定量	9
2. 全エクソンシーケンスライブラリの作製	9
3. 全エクソンシーケンスおよびデータ解析	9
4. サンガーシーケンスによる検証	10
5. ターゲットシーケンス	11
6. 細胞培養	13

7. <i>MYH9</i> 遺伝子の機能解析	13
8. 免疫組織化学	15
9. 統計学的評価	15
第四章 結果	
1. 対象症例の分布	17
2. 体細胞変異の全体像	16
3. 高頻度にみられるクロマチン関連遺伝子の変異	23
4. 着目すべき体細胞変異	25
5. 分化度分類と体細胞変異の関連	29
6. 胃粘液癌の予後因子	29
7. MLH1 陰性例の特徴	31
8. 粘液癌において <i>RHOA</i> 変異はまれである	34
9. 変異プロファイルに基いた、胃粘液癌の位置づけの検討	35
10. 治療標的分子の遺伝子変異	38
第五章 考察	39
謝辞	44
引用文献	45

## 略語一覧

略語	スペルアウト
ACTB	beta-actin
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	adenomatous polyposis coli
ARID1A	AT rich interactive domain 1A
ASXL1	additional sex combs like 1
BCL11B	B cell leukemia/lymphoma 11B
BCOR	BCL6 corepressor
BRCA1	breast cancer 1, early onset
BRCA2	breast cancer 2, early onset
BWA	Burrows-Wheeler Aligner
CDH1	cadherin 1
cDNA	complementary deoxyribo nucleic acid
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
DAB	3,3'-diaminobenzidine
D-MGC	differentiated mucinous gastric carcinoma
DNA	deoxyribo nucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EBV	Epstein-Barr virus
EGFR	epidermal growth factor receptor
EP400	E1A binding protein p400
ER	estrogen receptor
ERBB3	erb-b2 receptor tyrosine kinase 3
FA	Fanconi anemia
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
FFPE	formalin-fiexd paraffin-embedded
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
JmjC domain	Jumonji C domain
KDM6A	lysine (K)-specific demethylase 6A
LOH	loss of heterozygosity
MGC	mucinous gastric carcinoma
MLH1	mutL homolog 1
MLL	mixed lineage leukemia

mRNA	messenger ribonucleic acid
MSI	microsatellite instability
MSS	microsatellite stable
MTOR	mechanistic target of rapamycin
NM IIA	non-muscle myosin IIA
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PIK3CA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RBMXL3	RNA-binding motif, X-linked-like 3
RHOA	ras homolog family member A
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDK1	sidekick homolog 1
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4
SNV	single nucleotide variant
SRC	signet-ring cell
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TP53	tumor protein p53
U-MGC	undifferentiated mucinous gastric carcinoma
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2
WES	whole-exome sequencing
WHO	world health organization

## 要旨

胃がんの一組織型である胃粘液癌は、豊富な細胞外粘液を伴う病理組織像が特徴的であり、それ以外の組織型に比べて予後不良とされている。本研究では全エクソンシーケンスおよびターゲットシーケンスによる包括的な体細胞変異の同定を通して、胃粘液癌における分子機構の異常を研究した。胃粘液癌ではクロマチン関連遺伝子群の体細胞変異が多くみられることを明らかにしたほか、高頻度に変異のみられる *MYH9* が未分化型粘液癌において腫瘍抑制遺伝子として働いていることを示した。また、ドライバー遺伝子の変異頻度の比較から、胃がんにおける胃粘液癌の分子遺伝学的な位置づけを解明した。

## 第一章 序文

### 1. 世界および本邦における胃がんの現状

国際的な統計によれば、単年で新規に 950,000 人の胃がん患者が登録されている (GLOBOCAN 2012, <http://globocan.iarc.fr/>)。胃がんは重大な死因の 1 つであり [1]、がんによる死亡数としては、男性および女性において 3 位である (GLOBOCAN 2012)。胃がんの罹患率は、東アジア、ロシア、南米で高い傾向があり [2]、日本も胃がんの多い地域に含まれる。日本では胃がんの罹患率は減少傾向にあるものの、依然として第 1 位を占め、死亡数についても 2015 年の統計では 49,400 人 (悪性腫瘍の 3 位 ; 男性 2 位, 女性 3 位) となっている (がん情報サービス [http://ganjoho.jp/reg\\_stat/index.html](http://ganjoho.jp/reg_stat/index.html))。胃がんに対して現状よりも有効な診断・治療戦略を立てることは、がん研究者、医療従事者が精力的に進めるべき課題のひとつである。現在の胃がんに対する治療の柱は早期発見に基づく治癒的外科的切除であるが、補助療法としての化学療法や、転移播種・切除不能症例に対する化学療法の有効性を今後さらに高めていくことが死亡率減少に向けて肝要である。化学療法としては、従来の抗がん剤にくわえて、HER2, EGFR, VEGFR2 などの遺伝子異常をターゲットとした治療薬の開発について臨床応用が進められつつあるが ( : 「個別化医療」)、有効な分子標的治療薬をさらに開発する必要がある、そのためにも、病理学的に多様とされる胃がんにおける分子経路異常を解明していくことが重要である。

### 2. 胃がんの一亜型としての粘液癌

胃がん全体の 2.6-8.7% [3-5] を占める亜型として、粘液癌がある。最新の WHO 分類 (2010) において、胃がんの組織型は主要 4 型に分けられており、粘液癌 (mucinous)

はその一角を占める（表1）[6, 7]。組織学的には、細胞外粘液（extracellular mucin）を伴う領域が腫瘍内で50%をこえる症例を粘液癌に分類することが慣習となっている[6]。正常胃粘膜から分泌される粘液はそもそも粘膜保護の役割を果たすと考えられている[8, 9]ものの、胃がんの腫瘍細胞が粘液を分布する場合に、その粘液が果たす役割についてはいまだ不明な点が多い。粘液産生を伴う（細胞内粘液が目立つ）胃がんの組織型としては、粘液癌（本邦規約における muc）と印環細胞癌（本邦規約における sig）が知られているが、本研究で対象とする粘液癌は、細胞外に粘液豊富な領域を形成し（「粘液結節」あるいは「粘液湖」とよばれる）それを背景として腫瘍細胞が浮遊する像を呈する点で印環細胞癌（本邦規約における sig）とは異なっており、特徴的な組織亜型である。

表1. 胃がんの各組織型分類の対応、および粘液癌の位置づけ

本邦の胃癌取り扱い規約		細胞内粘液	細胞外粘液	WHO分類	Lauren分類 (※1)
pap [乳頭腺癌]				Papillary	Intestinal type
tub1 [管状腺癌, 高分化]				Tubular	
tub2 [管状腺癌, 中分化]					
por1 [低分化腺癌, 充実型]					
por2 [低分化腺癌, 非充実型]				Poorly cohesive	Diffuse type
sig [印環細胞癌]		+			
muc [粘液癌]	分化型粘液癌	+	+	Mucinous	
	未分化型粘液癌 (※2)	+	+		
(※1) Lauren分類は、日本での診療ではなじみが薄い、英文学術誌においてしばしば議論の土台となる。					
(※2) 未分化型粘液癌の腫瘍内でも印環細胞が見られるが、細胞外粘液を伴う点でsig症例とは異なる。					

胃粘液癌は、粘液癌以外の組織亜型（以下、「非粘液癌」とする）に比べ、腫瘍深達度や病期が進行している例が多く[5, 10]、予後不良[4, 5, 10]とされている。また、抗がん剤の腹腔内投与治療による恩恵を受けにくいグループに粘液癌が含まれるという報告もある[11]。したがって、胃粘液癌に対する有効な治療法の開発に向け、そ



の基盤となる分子機構の解明は重要である。しかしながら、胃粘液癌はそれほど頻度が高くないため、症例を集積したうえでの分子遺伝学的な先行研究は少ない。これまでの知見としては、①HER2 の過剰発現、HER2 遺伝子の増幅、EGFR の過剰発現の頻度が、非粘液癌と比べて低いという報告[10]と、②免疫組織化学的に  $\beta$ -カテニンの陽性率が非粘液癌と比べて低いという報告[12]、に留まっている。

### 3. 次世代シーケンスによるがんゲノム異常の解明

次世代シーケンサーは、数千万から数億の DNA 断片を大量並列的に処理することができるため、膨大な塩基配列のシーケンスが可能である。その際、サンプルごとに異なるインデックスを付加することで、多数のサンプル由来のシーケンスライブラリを一度のランで扱うこともできる。次世代シーケンスは、対象サンプルから抽出し 100-400 塩基対程度に断片化した DNA（あるいは cDNA）を鋳型とし、再合成時に蛍光標識ヌクレオチドが発する蛍光を検出する原理や、取り込まれた dNTP に対応したルシフェリンの発光量や pH 変化を検出する原理に基いて塩基配列を決定していく。現在、塩基を同定する原理が異なる複数のプラットフォームが利用可能である。このような次世代シーケンサーの開発と進歩、およびシーケンスコストの低下（2014 年時点で、ヒトゲノム約 30 億塩基対の解析コストは 15 万円程度）により、近年、がんがもつ体細胞変異を網羅的に同定することが盛んに行われるようになってきた。DNA や RNA には細胞の増殖や分化の設計情報が格納されているため、それらの網羅的解析を通じて、がんの発生・進展過程に重要な分子機構の解明や、がんの分子遺伝学的分類の再編、さらには新規治療ターゲットの発見につながる。

胃がんを対象とした次世代シーケンス研究が行われる以前から、Lauren 分類[13]における intestinal type 胃がん（管状構造をとるタイプ）と diffuse type 胃がん（低分化であり管状構造を欠くタイプ）では異なる遺伝子異常が確認されることが知られてい

た。Intestinal type 胃がんでは、頻度の高い遺伝子異常として、*TP53* 遺伝子のヘテロ接合性消失 (loss of heterozygosity; LOH) や変異[14, 15]、*APC* 遺伝子の LOH や変異[16]、細胞周期関連遺伝子である p16 や p27 のサイレンシング[17, 18]などが知られていた。一方、diffuse type 胃がんにおいては、E-cadherin の発現低下の頻度が高いことや[19]、*CDHI* のプロモーターの高メチル化が多いこと[20]などから、*CDHI* 遺伝子の重要性が認識されていた。そのほか、特徴的なゲノム異常を持つ疾患単位（マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability; MSI) 陽性胃がん、HER2 陽性胃がん等) も広く認識されるようになっていた。

胃がんを対象とした次世代シーケンス研究は、それまで知られていなかったゲノム異常を同定することとなった。その成果は 2011 年頃から報告されはじめ、従来胃がんにおいて着目されていなかった *ARID1A* 変異が高頻度にみられることが報告されたことを端緒として[21, 22]、その後、*TP53*, *CDHI*, *SMAD4*, *PIK3CA* などのドライバー変異の存在が確認された[23, 24]。胃がんのゲノム異常に関する研究成果は現在も集積されつつあり、将来的には胃がんも、肺腺癌のように、特徴的なゲノム異常や治療標的に立脚した形で分類されていく可能性も高いと考えられる。

## 第二章 背景と目的

### 1. 胃がん次世代シーケンス研究の現状

序文「3」で述べたように、胃がんを対象とした次世代シーケンス研究成果が近年集積しつつあり、従来からの胃がん分類（「intestinal type 胃がん」「diffuse type 胃がん」「MSI 胃がん」「EBV 関連胃がん」等）に立脚した形での大規模なゲノム解析も行われ、組織型特異性の高い *RHOA* 変異などのドライバー遺伝子も同定されたほか[23, 24]、分子遺伝学的な視点からの胃がんのタイピングが行われた[24, 25]。しかし、頻度の低い胃がん亜型については、その発生・進展に関わるゲノム異常の解明はいまだ不十分である。とくに、豊富な細胞外粘液を伴う特殊な亜型である粘液癌のゲノム異常も未解明であり、そのゲノムの網羅的解析を通して新しい治療標的を見出すことは重要と考え研究を開始した。特徴的な組織亜型のゲノム解析を通じて特徴的なゲノム異常の発見につながることはしばしばあり、実際、胃以外の臓器（膵臓[26]、卵巣 [27, 28]、肺 [29]など）における粘液産生腫瘍を対象とした次世代シーケンス研究はユニークかつ重要なゲノム異常を同定している。

### 2. 胃粘液癌における未解明事項

胃粘液癌は非粘液癌よりも悪性度が高いことが示唆されているにも関わらず、その分子機構は未解明な部分が多く（序文「2」参照）、特殊型として分類されてきた胃粘液癌が分子遺伝学的にも特殊か否かはあまり研究されてきていない。

また、胃がんにおける粘液癌の分子遺伝学的な位置づけも未解明である。病理学的には、分化型粘液癌の組織構築は管状構造を形成する点で *intestinal type* に類似しており、未分化型粘液癌は腫瘍細胞どうしの接合性が低い点で *diffuse type* との形態学的類

似性を持つ (図 1)。また、未分化型粘液癌の多くは腫瘍内の一部に diffuse type に相当する組織像を有する。しかし、粘液癌が diffuse type, intestinal type と分子遺伝学的にどのような関係性にあるかは知られていない。粘液癌を含めた亜型ごとの分子遺伝学的関係性を解明することは、胃がんに対する診療を最適化していく際の指標としても重要と考えられる。

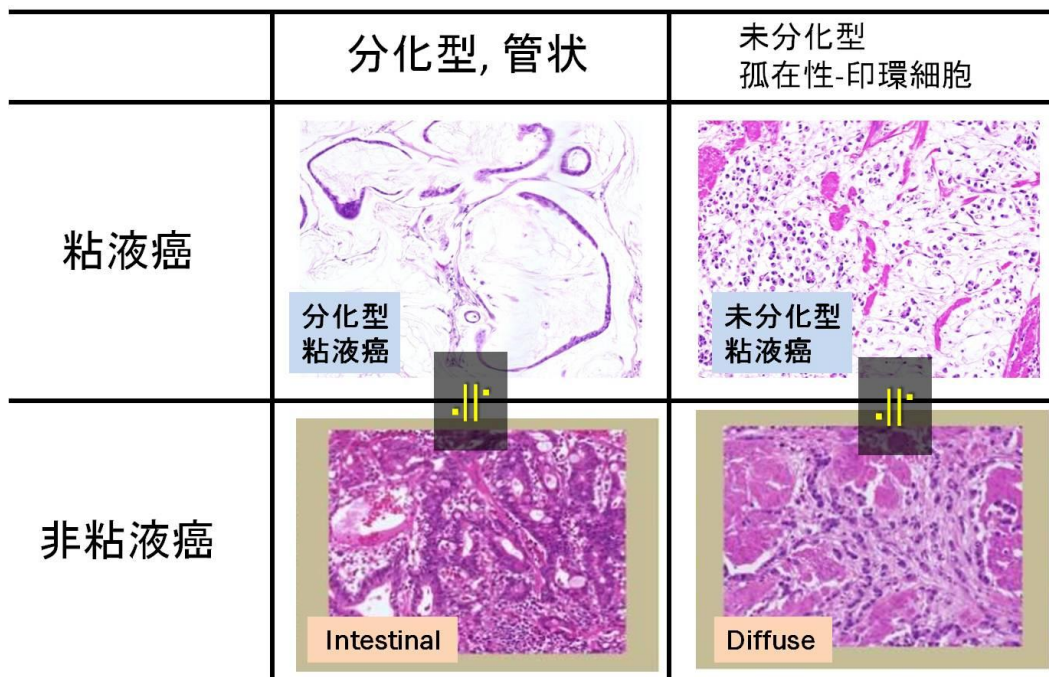


図 1. 分化型粘液癌と未分化型粘液癌の組織像、および非粘液癌 (intestinal, diffuse タイプ) との形態学的類似性

### 3. 目的

本研究の目的は、胃粘液癌の体細胞変異の同定を通じて重要な分子経路を解明し、粘液癌以外の胃がん亜型との分子遺伝学的な関連性も明らかにすること、さらには胃粘液癌の治療や予後予測に役立つ知見を得ることである。

## 第三章 材料と方法

### 第一節 材料

#### 1. 胃粘液癌の手術検体

全エクソンシーケンスには、国立がん研究センターのバイオバンクに保管されている胃粘液癌の凍結検体 16 例分（腫瘍部・非腫瘍部）を使用した。ターゲットシーケンスには、同バイオバンク保管されている胃粘液癌の凍結検体 4 例分（腫瘍部・非腫瘍部）と、国立がん研究センター中央病院にて外科的に切除された胃粘液癌の病理標本（ホルマリン固定パラフィン包埋〔formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE〕サンプル）48 例分（腫瘍部・非腫瘍部）を用いた。いずれの検体も、その研究への利用について、患者の同意は取得済みである。各患者の臨床情報は後ろ向きに検索して取得した。

#### 2. 倫理委員会の承認に関する事項

国立がん研究センターバイオバンクの凍結材料や胃がん病理標本の使用に関しては、国立がん研究センター 倫理審査委員会に申請し、承認を受けた（課題名：ゲノム構造解析に基づく肝がん、膵がん、肺がん、胃がん、大腸がん、胆道がん、乳がん、食道がん、卵巣がん、子宮がん、膀胱がん、頭頸部がん、骨軟部肉腫の発生・進展分子機構の解明上部消化管腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明【番号】17-30）。

#### 3. 胃がん細胞株

胃粘液癌のゲノム解析から得られたドライバー遺伝子候補 *MYH9* (myosin heavy chain 9) の機能解析を行うにあたり、ヒト未分化型胃がんから樹立された HSC44 を

用いた。同株を樹立した Yanagihara らによれば[30]、HSC44 においては免疫組織化学的に E-カドヘリンの発現が保たれている。また、主ながん遺伝子の発現としては EGFR が中等度～強陽性とされている[30]。

## 第二節 方法

### 1. DNA 抽出および定量

腫瘍部および非腫瘍部の凍結保存サンプルから、フェノール・クロロホルム抽出によってゲノム DNA を抽出し、下記「2」および「5」へ進めた。FFPE ブロックを使用する際は厚さ 10  $\mu\text{m}$  の組織切片標本を作製し、フェノール・クロロホルム抽出によってゲノム DNA を抽出した。その際、腫瘍 FFPE サンプルについては、非腫瘍成分をできるだけ排除したうえで（：マクロダイセクション）DNA 抽出を行い、腫瘍含有率を高めた。抽出した DNA は Qubit fluorometer (Life Technologies) で定量した。

### 2. 全エクソンシーケンスライブラリの作製

既報のとおり[31]、SureSelect Human All Exon V5 Plus kit (Agilent Technologies) を用いてエクソン領域を濃縮した(エクソンキャプチャー)。1  $\mu\text{g}$  DNA を Covaris S2 system (Covaris, Inc. Woburn, MA) にて 150-200 bp へ断片化し、末端修復、A 付加、アダプターライゲーションを行い、750 ng 相当の産物を分取したうえでキャプチャーライブラリとのハイブリダイゼーションを 24 時間行った。

### 3. 全エクソンシーケンスおよびデータ解析

イルミナ HiSeq 2000 のペアエンド・モードにてシーケンスを行った。シーケンスリードは既報[31]のとおり、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) ソフト[32]を用いてヒトゲノムのリファレンス配列 (GRCh37) にアラインメントし、マッピング処理をし、

SAMtools[33] と当研究室独自のプログラムを用いてパイプアップした。体細胞変異は、腫瘍部の塩基配列と非腫瘍部の塩基配列を比較することで検出した。この際、胃がん検体における腫瘍含有量の低さが問題となったが、国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野において開発された独自の変異検出アルゴリズム（腫瘍含有率を変数として組み込んでいる）を使用した。一塩基置換（single nucleotide variant, SNV）および挿入/欠失（indel）の検出には、表 2 に示すフィルタリングを用いた。読み取り深度が不足したサンプルについてはディープシーケンスを追加した。変異を同定した遺伝子の重要性は、体細胞変異が遺伝子上のランダムな場所に入るという仮定（バックグラウンド）と比較しポアソン分布をあてはめた検定（体細胞変異が同じ遺伝子に多く入っているほど  $p$  値が小さくなる）をもとに判断した。

表 2. 一塩基置換および挿入/欠失の検出に用いたフィルタリング

	フィルタリング項目	アレル頻度 (AF) が高い場合	アレル頻度 (AF) が低い場合
一塩基置換 (SNV) の検出	読みとり深度	$\geq 8$	$\geq 8$
	Mapping quality	$\geq 20$	$\geq 20$
	Base quality	$\geq 10$	$\geq 10$
	腫瘍におけるアレル頻度	$\geq 0.15$	$0.15 > AF \geq 0.05$
	腫瘍において SNV に対応するリード数	$\geq 4$	$\geq 8$
	非腫瘍におけるアレル頻度	$< 0.03$	$< 0.01$
	(非腫瘍におけるアレル頻度) $\div$ (腫瘍におけるアレル頻度)	$< 0.1$	$< 0.1$
挿入/欠失 (indel) の検出	読みとり深度	$\geq 8$ (腫瘍) かつ $\geq 10$ (非腫瘍)	$\geq 8$ (腫瘍) かつ $\geq 10$ (非腫瘍)
	腫瘍におけるアレル頻度	$\geq 0.20$	$0.20 > AF \geq 0.05$
	腫瘍において indel に対応するリード数	$\geq 6$	$\geq 12$
	非腫瘍におけるアレル頻度	0	0

#### 4. サンガーシーケンスによる検証

上記「3」の全エクソンシーケンス (whole-exome sequencing; WES) によって重要

と推定された遺伝子の SNV については、Primer-BLAST および 遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX を使用してプライマーを設計し、nested PCR 法で DNA を増幅し、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によって各 SNV の有無を検証した。

## 5. ターゲットシーケンス

200~600 ng のゲノム DNA を出発量とし、Covaris S2 system (Covaris, Inc.) にて断片化ののち、Hyper Prep Kit (Kapa Biosystems) および SureSelect XT Library Prep Kit (Agilent Technologies) を組み合わせてライブラリを作製した。キャプチャー試薬としてはカスタム合成した SureSelect bait library (Agilent Technologies) を用い、選択した 114 遺伝子 (表 3) のエクソン領域をキャプチャーした。ターゲットとした DNA は合計 418 kbp となった。WES と同様、イルミナ HiSeq 2000 にてシーケンスを行った。

FFPE 由来のゲノム DNA は、DNA 断片化の影響で PCR 増幅能が低下し、ライブラリ作製がうまくいかないことがある。今回我々は、定量 PCR を用いた手法 (考案: 国立がん研究センター 先端医療開発センター 市川 仁 部門長ら, 未発表) を用いて、FFPE 由来ゲノム DNA サンプルの断片化の程度を測定し、その値を参考にしながら Covaris system を用いた断片化のサイクル数を 0-3 サイクルの間で調整した。凍結検体については 6 サイクルで DNA 断片化を行った。同手法に基づいてライブラリ作製前に測定した断片化指標は、ライブラリ作製過程におけるピークサイズ (単位: 塩基対) と相関しており、断片化の程度を予測できることが確認されている (未発表手法に関連するデータのため、詳細は公表せず)。

ターゲットシーケンスを行う 114 遺伝子 (表 3) は、我々の WES の結果および先行研究による遺伝子リスト [23, 24, 34] から選定した。



表3. ターゲットシーケンスにおいて対象とした 114 遺伝子のリスト

<i>ABCA13</i>	<i>CDH9</i>	<i>HVCN1</i>	<i>MSR1</i>	<i>RHOA</i>	<i>TMEM179</i>
<i>ABR</i>	<i>CDK20</i>	<i>IFI35</i>	<i>MTOR</i>	<i>RND3</i>	<i>TMEM72</i>
<i>ADAMTS1</i>	<i>CEACAM6</i>	<i>ILK</i>	<i>MX11</i>	<i>RNF43</i>	<i>TP53</i>
<i>AHNAK2</i>	<i>CSRP1</i>	<i>INHA</i>	<i>MYH9</i>	<i>SCNN1B</i>	<i>TRAM1L1</i>
<i>ANO10</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>IRF3</i>	<i>NCOA6</i>	<i>SDK1</i>	<i>TRIM48</i>
<i>AP1S1</i>	<i>CXCR2</i>	<i>KAT6A</i>	<i>NEUROD4</i>	<i>SDK2</i>	<i>TRPS1</i>
<i>ARID1A</i>	<i>CYP1B1</i>	<i>KCNA4</i>	<i>NOTCH3</i>	<i>SEC13</i>	<i>USP13</i>
<i>ARID1B</i>	<i>CYP4F22</i>	<i>KDM6A</i>	<i>NPY2R</i>	<i>SETBP1</i>	<i>WBP1</i>
<i>ASXL1</i>	<i>DNAJB3</i>	<i>KIF2B</i>	<i>NUPL2</i>	<i>SFXN3</i>	<i>ZBTB7C</i>
<i>BAX</i>	<i>EP400</i>	<i>KRTAP22-2</i>	<i>OR5A1</i>	<i>SIGLEC7</i>	<i>ZNF205</i>
<i>BCL11B</i>	<i>ERBB3</i>	<i>LCN2</i>	<i>PAMR1</i>	<i>SLC3A2</i>	<i>ZNF24</i>
<i>BCOR</i>	<i>FAT1</i>	<i>LDHB</i>	<i>PARP4</i>	<i>SLFN5</i>	<i>ZNF330</i>
<i>BRAF</i>	<i>FLG2</i>	<i>LDOC1L</i>	<i>PDE3A</i>	<i>SMAD4</i>	<i>ZNF365</i>
<i>BRCA1</i>	<i>GIMAP6</i>	<i>LYZL2</i>	<i>PIEZO2</i>	<i>SNTG1</i>	<i>ZNF506</i>
<i>BRCA2</i>	<i>GJB7</i>	<i>MAGI2</i>	<i>PROCA1</i>	<i>SOGA1</i>	
<i>CACNA1C</i>	<i>GNAS</i>	<i>MED25</i>	<i>PRRT2</i>	<i>SPECC1</i>	
<i>CCDC57</i>	<i>GORAB</i>	<i>METTL8</i>	<i>QKI</i>	<i>SUPT5H</i>	
<i>CCDC160</i>	<i>GPR65</i>	<i>MLL</i>	<i>QRFP</i>	<i>TCHH</i>	
<i>CD300LG</i>	<i>GRAP2</i>	<i>MLL2</i>	<i>RBMXL3</i>	<i>TEX15</i>	
<i>CDH1</i>	<i>HHIPL2</i>	<i>MLL3</i>	<i>RFX5</i>	<i>TMED7-TICAM2</i>	

## 6. 細胞培養

未分化型の胃癌細胞株 HSC44 は、RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) に 10%FBS (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA)、2mM L-glutamine (Wako Pure Chemicals Ltd., Osaka, Japan)、50 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin を添加して使用した。細胞の培養は 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で行った。

## 7. MYH9 遺伝子の機能解析

### (7A) siRNA 導入

HSC44 細胞を 6-well プレートにまき、siGENOME SMARTpool (Dharmacon, GE Healthcare) を用いて (最終濃度 100nM) MYH9 をノックダウンした。導入試薬は Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用いた。陰性コントロールとしては siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #2 (Dharmacon, GE Healthcare) を用いた。

### (7B) RT-PCR

トランスフェクション後の培養細胞から RNA spin Mini Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) にて RNA を抽出し、それを元に First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) を用いて cDNA を作製した。MYH9 および ACTB 遺伝子に対する特異的プライマーを用いて、LightCycler LC480 (Roche) にて定量 PCR を行った。MYH9 に対するプライマーは、F (5' TGGAGGACCAGAACTGCAA 3') および R (5' GGTTGGTGGTGA ACTCAGCTA 3') を用いた。ACTB に対するプライマーは、F (5' CGCCAGCTCACCATGGATGA 3') および R (5' AAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCATTT 3') を用いた。

### (7C) 三次元懸垂培養 (hanging drop culture)

細胞-細胞接着を観察する目的で、三次元懸垂培養 (hanging drop culture) アッセイ

[35, 36]を行った。24-well プレートを用意し、使用予定部分のウェルに PBS を予め入れておいた（天井培養中の乾燥防止のため）。トランスフェクション後の HSC44 細胞を分取し（ $1 \times 10^4$  個/200  $\mu\text{L}$ ）、その懸濁液を 200  $\mu\text{L}$  ピペットチップで厳密に 10 回ピペッティングし、細胞塊を個々の細胞へと分離させたのち、滴状培養液 30  $\mu\text{L}$  ずつを 24-well プレートの蓋から吊り下げ、懸垂培養を 2 時間行った。位相差顕微鏡で観察を行い、細胞集塊（構成細胞数  $\geq 10$  個）の数（A）と、孤在性細胞の数（B）をそれぞれカウントした。集計は、A の値が 5 以上となるまで対象視野（ $\times 200$ ）を増やし続けて行い、毎回 100 個以上の細胞をカウントした。最終的に、 $A \div B$  を算出することで、細胞-細胞接着を評価・比較した。

#### (7D) 印環細胞の割合の評価

トランスフェクション後の HSC44 細胞を 6-well プレートに播き（ $2.5 \times 10^4$  個/well）、7 日間培養したのち、カルノア液（メタノール：酢酸 = 3:1）にて固定し、crystal violet で 15 分間染色した。顕微鏡にて 1000 個以上の細胞を観察し、印環細胞の出現頻度を測定した。

#### (7E) 創傷癒合アッセイ（wound healing assay）

トランスフェクション後の HSC44 細胞を 6-well プレートに播き（ $7 \times 10^4$  個/well）、コンフルエントとなるまで培養したのち、ピペットチップを用いて直線状の傷をつけ、PBS にて洗浄した。傷によってできた細胞非存在部分に細胞が遊走していく様子を、顕微鏡で 0, 1, 2 日後に撮影した。

#### (7F) 増殖アッセイ

トランスフェクション後の HSC44 細胞を 6-well プレートに播き（ $1 \times 10^4$  個/well）、1, 3, 5 日後の生細胞数を Countess II Automated Cell Counter (Life Technologies)を用いて

測定した。

#### (7G) 免疫蛍光染色

トランスフェクション後の HSC44 細胞を Lab-Tek chamber slide (Sigma-Aldrich) に播いて接着させ、4%パラホルムアルデヒドにより固定し、室温にて 30 分間のブロッキングを行い (Perkin Elmer 社の Blocking Reagent を使用)、一次抗体と 4°C で一晩反応させた。一次抗体は、ラビット・モノクローナル 抗 E-cadherin 抗体 (clone EP700Y, Merck Millipore, Schwalbach, Germany, 500 倍希釈) を用いた。翌日、PBS にて洗浄したのち、蛍光標識二次抗体 (Alexa-488, anti-rabbit, 500 倍希釈) と 60 分間反応させ、PBS にて洗浄し、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (キーエンス, Osaka, Japan) にて観察し、撮影した。

### 8. 免疫組織化学

*MLH1* 遺伝子のプロモーター領域の高メチル化は、胃がんにおけるマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability; MSI) の原因として最多であり [37, 38]、MSI 陽性胃がんの検出に *MLH1* の免疫組織化学が有用であることが知られている [37-40]。我々は、MSI 陽性粘液癌を検出する目的で *MLH1* タンパクの免疫組織化学を行った。*MLH1* の免疫組織化学は、*MLH1* に対するマウス・モノクローナル抗体 (clone ES05, 1:200 dilution, Novocastra, UK) を用いて行った。組織切片をクエン酸 buffer に浸しオートクレーブ法にて賦活化したのち、3%  $H_2O_2$  に 10 分間浸し、一次抗体で一晩反応させた。翌日、VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) および DAB にて発色させた。

### 9. 統計学的評価

連続変数は、t 検定またはマン・ホイットニーの U 検定にて比較した。カテゴリー

変数（臨床病理学的因子や遺伝子変異の有無）の比較は、カイ 2 乗検定ないしフィッシャーの正確確率検定を用いて行った。生存解析は Kaplan-Meier 法を用いて行い、ログランク検定により差異の有無を検定した。いずれの検定においても  $P$  値  $< 0.05$  の場合に統計学的に有意とした。以上の統計解析は StatView（version 5.0; SAS institute, Cary, NC）を用いて行った。

## 第四章 結果

### 1. 対象症例の分布

シーケンス対象症例は 68 例となった(WES 16 例 + ターゲットシーケンス 52 例)。対象症例の臨床病理学的特徴を表 4 に示す。年齢の中央値は 63 歳 (34-89 歳) であり、48 例 (70.6%) は男性であった。最新の TNM 分類 (7th) と AJCC に基づいたステージ評価により、ステージ 1, 2, 3, 4 に相当する症例はそれぞれ、3 例、16 例、38 例、11 例、となった。フォローアップ期間の中央値は 34.7 ヶ月であり、28 例がフォローアップ期間内に死亡した。

粘液癌はしばしば、優勢である組織像に基づいて、円柱状細胞が管状に増殖する分化型と、印環細胞が孤在性に増殖する未分化型に亜分類される (図 1) [5, 10, 41]。我々の症例は、分化型 22 例と未分化型 46 例に分類された。

表 4. シーケンス対象症例の特徴および分化度の内訳

	症例数 (n = 68)	分化型 (n = 22)		未分化型 (n = 46)		P
		症例数	%	症例数	%	
<b>年齢</b>						
中央値	63	73		63		
標準偏差	11.9	14.1		10.5		
<b>性別</b>						
男性	48	16	72.7	32	69.6	1.0
女性	20	6	27.3	14	30.4	
<b>部位</b>						
U (胃の上部 1/3)	17	9	40.9	8	17.4	0.086
M (胃の中部 1/3)	22	7	31.8	15	32.6	
L (胃の下部 1/3)	29	6	27.3	23	50.0	
<b>深達度</b>						
pT1b	4	3	13.6	1	2.2	0.068
pT2	5	0	0.0	5	10.9	

pT3-4	59	19	86.4	40	87.0	
リンパ節転移						0.004
なし	9	7	31.8	2	4.3	
あり	59	15	68.2	44	95.7	
ステージ						0.013
I	3	3	13.6	0	0.0	
II	16	8	36.4	8	17.4	
III	38	9	40.9	29	63.0	
IV	11	2	9.1	9	19.6	

## 2. 体細胞変異の全体像

16症例を対象としたWESにおけるシーケンスカバレッジの中央値は254×となった。非同義置換は合計6,207個検出され、1例あたりの中央値は62.5個(四分位範囲13-333)であり、これは1.9個/Mbに相当した。ミスセンス変異の中央値は55.5個、挿入/欠失の中央値は4個であった。非同義置換が1,000個をこえる(hypermuation)症例が3例みられ、いずれも免疫組織学的にMLH1陰性であった。WESにおいて、体細胞変異が遺伝子上のランダムな場所に入るという仮定にポアソン分布をあてはめた検定におけるp値が0.05未満となる(すなわち、ある遺伝子に体細胞変異が多く入っている)遺伝子が189個検出された。p値が低い順に並べるとTP53が1位( $p = 1.27 \times 10^{-07}$ )であり、E-cadherinをコードするCDH1は84位( $p = 0.024$ )であった。WESのデータおよび先行研究のデータ[23, 24, 34]から重要性が高いと考えられた114遺伝子(表3)を選び、胃粘液癌52症例(168症例)を対象としてターゲットシーケンスを行った。ターゲットシーケンスにおけるシーケンスカバレッジの平均値は684×となった。非同義置換は、63個の遺伝子にわたって計264個検出された。ミスセンス変異が215個、挿入/欠失は17個であった。

胃粘液癌全体で集計された点突然変異の塩基置換パターンとしては C>T/G>A 置換が最も多く、これは胃がんに関する既報と一致した[21, 22]。分化型粘液癌と未分化型粘液癌のあいだで、塩基置換パターンに目立った違いは見られなかった (図 2A)。

凍結検体を材料とした WES と、FFPE 検体を材料としたターゲットシーケンスにおいて、点突然変異の塩基置換パターンは極めて類似しており、明瞭な差は見られなかった (図 2B)。最も多かった置換は、両シーケンスにおいて C>T/G>A 置換であり、その頻度は 62.1%, 60.7%と極めて近い値となった。FFPE 検体では C の脱アミノ化 (U への塩基置換) に起因するアーチファクトとして C>T 変異が増えるとされているが [42, 43]、そういったエラーは本研究では排除されていることが、この結果から裏付けられた。

WES (n = 16) とターゲットシーケンス (n = 52) のデータを統合し、それぞれの遺伝子変異の頻度を算出した (図 3)。頻度の高かった順に、*TP53* (38 例, 55.9%)、*ARID1A* (14 例, 20.6%)、*CDHI* (14 例, 20.6%)、*MLL2* (13 例, 19.1%)、*RBMXL3* (13 例, 19.1%)、*MLL3* (10 例, 14.7%)、*MYH9* (9 例, 13.2%)、*SDK1* (9 例, 13.2%)、となった。重要と考えられた遺伝子の変異については、サンガーシーケンスによりその存在を確認した (図 4)。



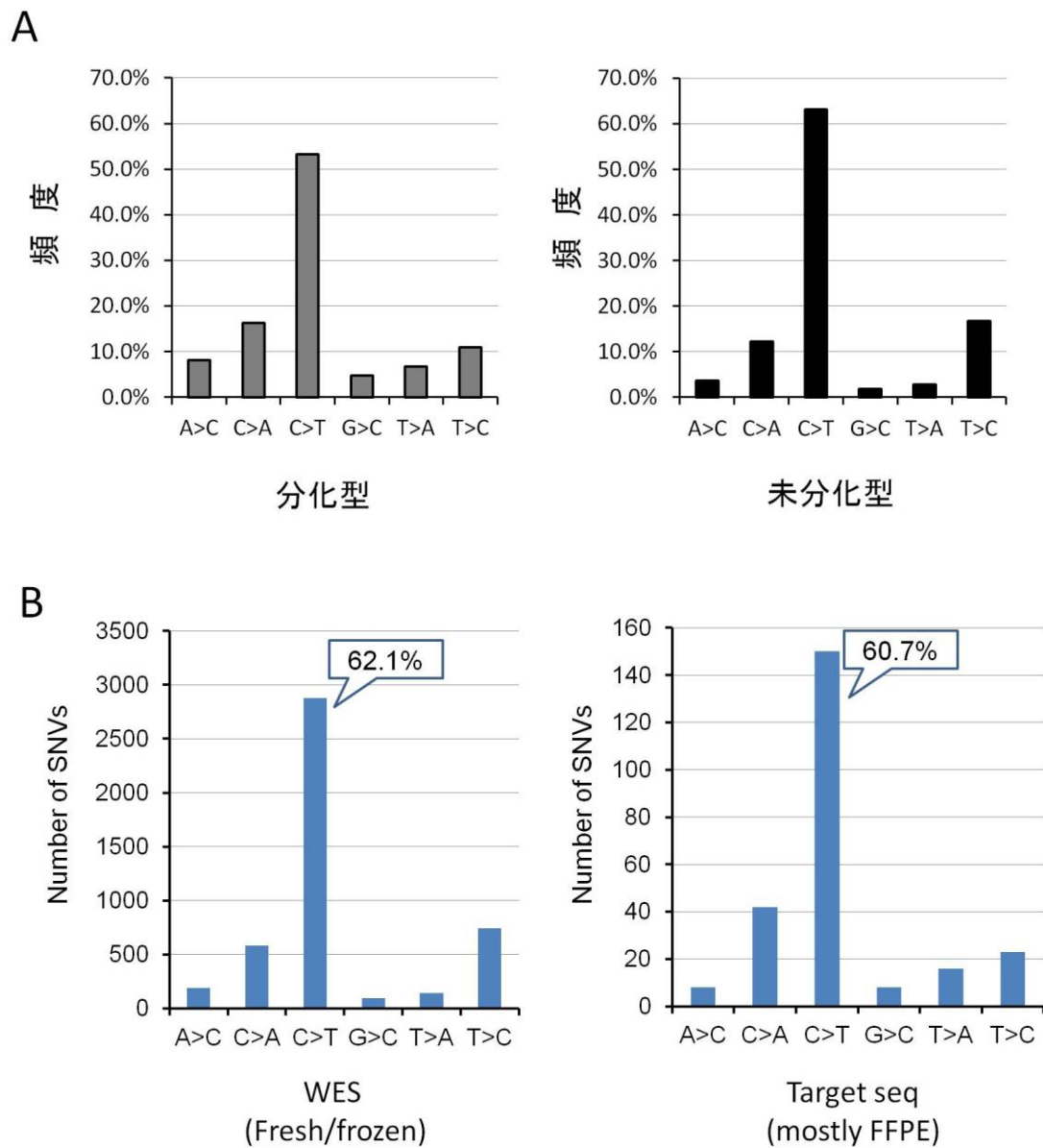


図2. 塩基置換頻度の比較

(A) 分化型粘液癌と未分化型粘液癌の比較。両者の塩基置換パターンは全体的に類似する。(B) 凍結検体と FFPE 検体の比較。両者のパターンが類似していることから、アーチファクトが排除されていることが示唆される。

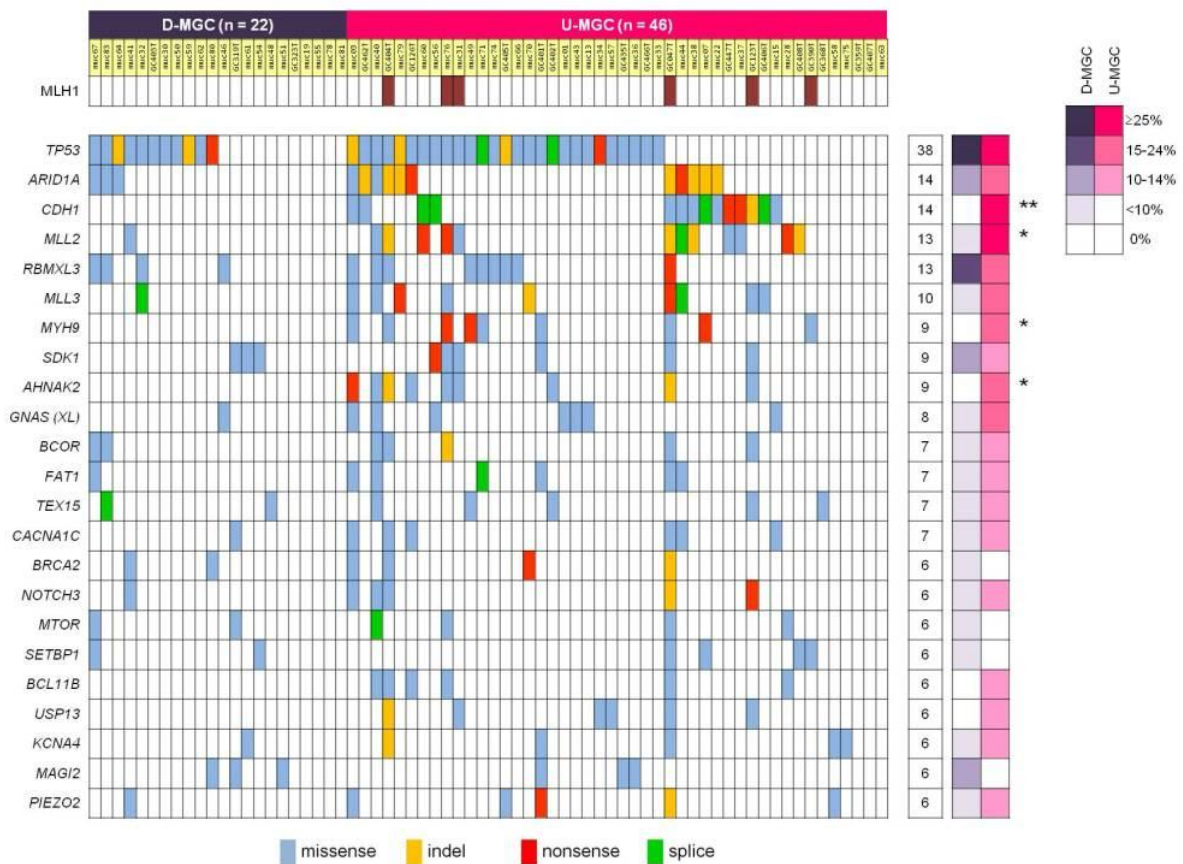
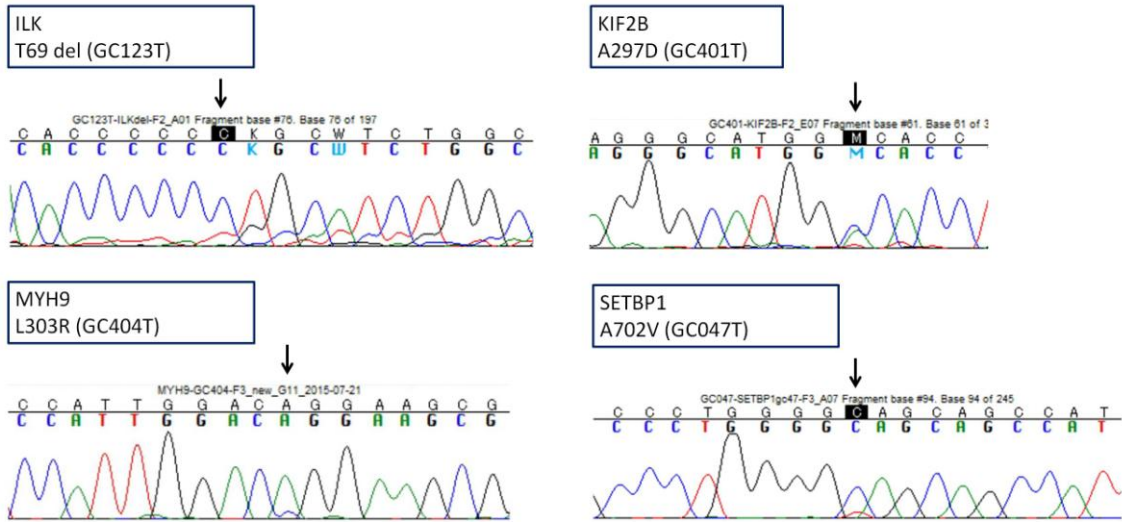


図3. 胃粘液癌 68 例における体細胞変異の分布

WES およびターゲットシーケンスのデータを統合して示す。個々のカラムは症例を表し、各行は遺伝子における変異の有無を表す。6 例以上で変異が検出された遺伝子を、頻度の高い順に上から示す。右側のヒートマップ（紫・ピンク）は分化型 22 例と未分化型 46 例における変異例の頻度をそれぞれ表し（亜型と有意な相関があった場合は \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  で示す）、そのやや中央寄りの数字は変異を有する合計症例数を表す。上方の茶色のカラムは、免疫組織化学的に MLH1 陰性であった症例を示す。WES, whole exome sequencing; D-MGC, differentiated mucinous gastric carcinoma; U-MGC, undifferentiated mucinous gastric carcinoma.

## Fresh/frozen



## FFPE

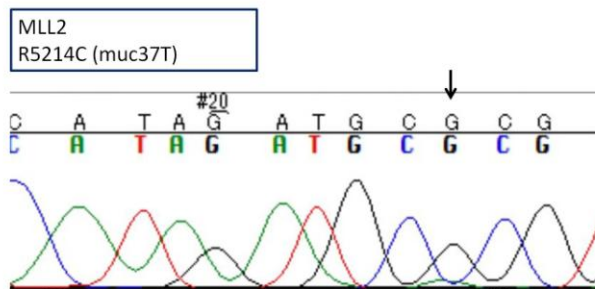


図4. サンガーシーケンスによる変異の確認

重要と思われた遺伝子変異の一部については、凍結サンプル或いは FFPE サンプルを用いてサンガーシーケンスにより確認を行った。矢印は変異の位置を示す。

### 3. 高頻度にみられるクロマチン関連遺伝子の変異

胃粘液癌において、重要なヒストンメチル化酵素である *MLL2* や *MLL3* をコードする遺伝子に変異が多くみられた (図 3 のとおり、*MLL2* が頻度 4 位、*MLL3* が頻度 6 位)。*MLL2* においてはフレームシフト変異 4 個、ナンセンス変異 3 個、*MLL3* においてはフレームシフト変異 2 個、ナンセンス変異 2 個が検出されており、それらはヒストンメチルトランスフェラーゼドメイン (SET ドメイン) を欠くタンパクをもたらす機能欠失型変異であった (図 5)。さらに *MLL* 変異は 4 例で見られ (うち 1 例がフレームシフト変異)、*MLL4* 変異は 2 例で見られた (2 例ともフレームシフト変異)。このように *MLL* ファミリーに高頻度に変異が見られ、かつクロマチンリモデリングに重要である *ARID1A* にも変異が多く見られていたことから、クロマチン制御遺伝子の変異が胃粘液癌において重要であることが示唆された。クロマチン制御に関連する *ARID1A*, *ARID1B*, *MLL*, *MLL2*, *MLL3*, *MLL4*, *KDM6A*, *EP400*, *ASXL1* の 9 遺伝子いずれかの変異は、粘液癌の 47% (32/68 例) に見られていた (図 5)。この頻度は、胃がんを対象としたいずれの先行シーケンス研究における頻度よりも高い値となった。ヒストン脱メチル化酵素をコードする *KDM6A* (*UTX*) については、検出された 5 個の変異のうち 3 個が、酵素活性に重要な JmjC ドメインを欠くタンパクをもたらす機能欠失型変異であった (図 5B)。また、クロマチン制御遺伝子のなかで *MLL2* 変異と *KDM6A* 変異は相互排他的であった。このデータは、両遺伝子が、特異な顔貌・骨格異常・心血管系奇形・易感染性などを特徴とする先天性発達異常「Kabuki syndrome」の重要な原因遺伝子である [44-46] 点からも興味深い。ただし、胃がんの既報データセットを用いた解析では、両遺伝子の変異はむしろ共存する傾向にあった ( $p = 0.072$  [24] および  $p = 0.004$  [47])。クロマチン関連遺伝子の変異を持つ割合は、分化型において 32% (7/22 例)、未分化型において 54% (25/46 例) であり、後者において高かったものの、統計学的有意差はなかった ( $p = 0.119$ )。同遺伝子群の変異の有無は、そのほかの臨床病理学的因子や予後と相関を示さなかった。

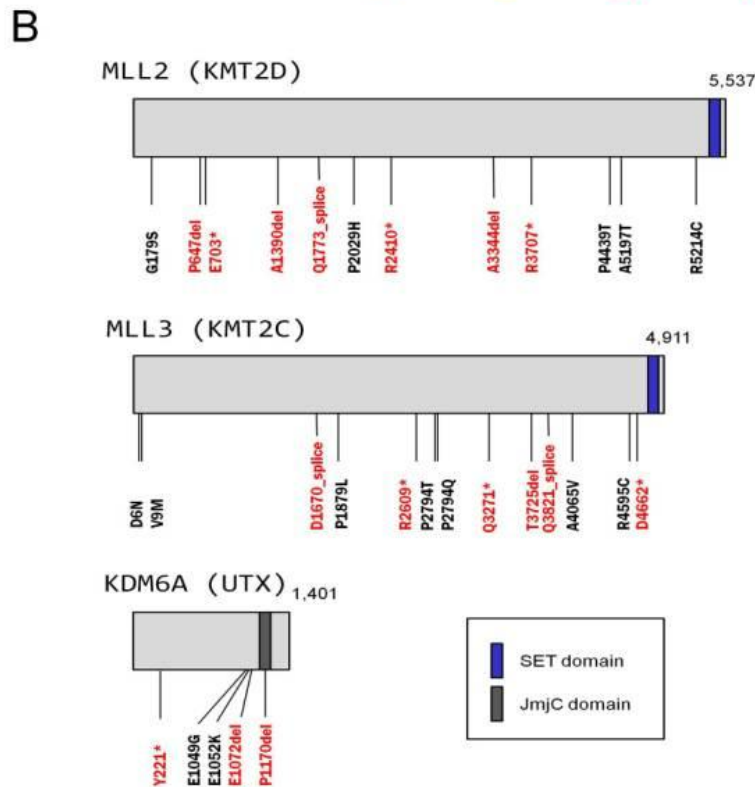
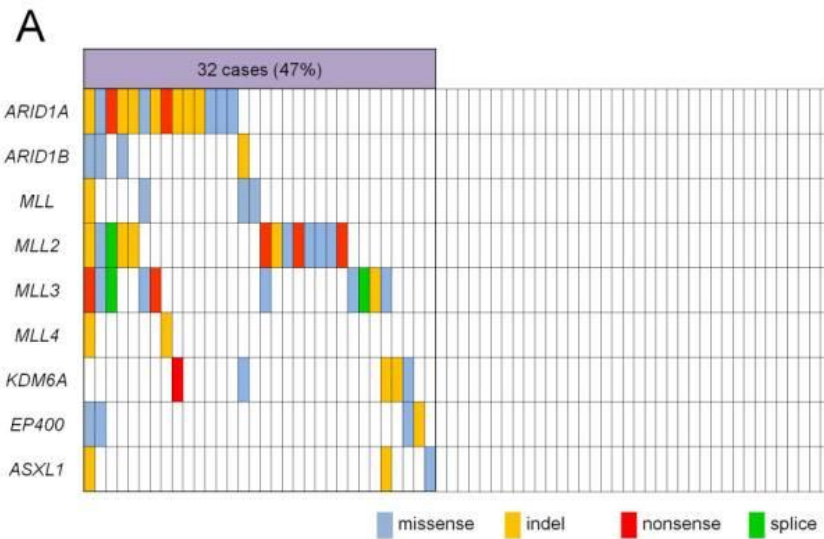


図5. 胃粘液癌に多く見られるクロマチン制御遺伝子群の変異

(A) WES およびターゲットシーケンスで同定されたクロマチン制御遺伝子の変異を示す。各症例をカラムで表し、mutual exclusivity を強調すべく並べている。胃粘液癌の47%がクロマチン制御遺伝子の変異を持つ。挿入/欠失（オレンジ）が多い。

(B) MLL2, MLL3, KDM6A の各タンパクをシェーマで示し、同定された遺伝子変異から予想されるアミノ酸置換を示す。多くの変異は短縮型(truncating)変異であり(赤)、SETドメインあるいはJmjCドメインを欠くタンパクが予想される。

#### 4. 着目すべき体細胞変異

今回のシーケンスにより、*MYH9* 変異 (9 例/68 例)、*SDK1* 変異 (9 例/68 例)、*RBMXL3* (13/68 例) など、胃がんにおける先行研究ではあまり報告されていない遺伝子変異が幾つか同定された。いずれの遺伝子も、腫瘍率による補正を加えた変異アレル頻度は比較的高かった ( $\geq 0.40$ ; 図 6)。

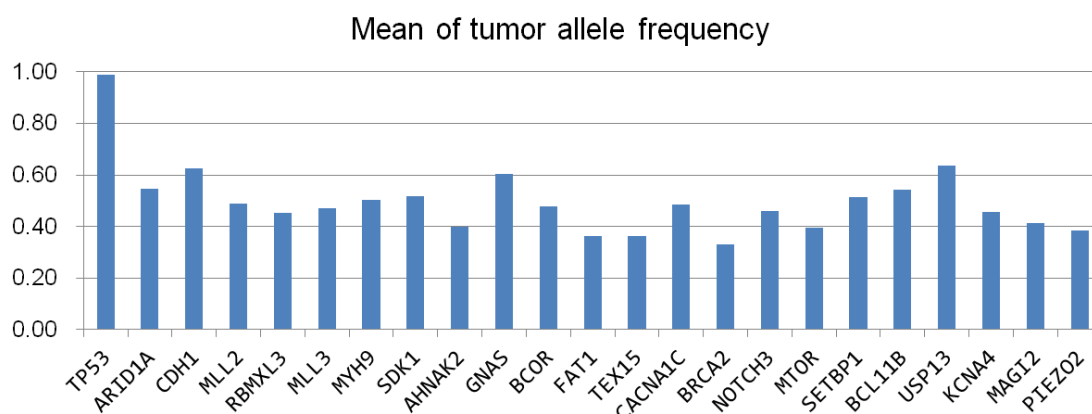


図 6. 胃粘液癌において高頻度で変異が見られる遺伝子の、変異アレル頻度の平均値棒グラフの高さは、各遺伝子における変異アレル頻度の平均値をあらわす。高頻度で変異が見られた遺伝子 (図 3 参照,  $n \geq 6$ ) について、変異アレル頻度が極端に低いものがないことが確認された。

*MYH9* (myosin heavy chain 9) は細胞骨格分子である non-muscle myosin IIA (NM IIA) をコードする遺伝子であり、NM IIA は細胞の形態や運動性、細胞-細胞接着に関与するとされている [48-50]。また、頭頸部の扁平上皮癌においてがん抑制遺伝子として働くという報告もある [51]。今回のシーケンスにより、胃粘液癌において 9 例/68 例に変異が見られ、そのうち 3 例はナンセンス変異であった。*MYH9* 変異例 9 例のうち RNA シーケンスを施行していた 2 例中 2 例で対応する塩基置換を確認した (未発表データ) ほか、腫瘍のアレル頻度が 0.1 を越えているもの (4 例あるうち 2 例を選び) からサンガーシーケンスを施行し、2 例で変異を確認した (1 例分の結果を図 4 に掲載)。

*MYH9* 変異例は組織学的にいずれも未分化型であり（分化型には変異なし）、その偏りは統計学的に有意であった（ $p = 0.023$ , フィッシャーの正確確率検定）。以上のデータ（とくに、変異例が未分化型に偏って見られることと、しばしばナンセンス変異が見られること）から、未分化型粘液癌において *MYH9* は重要な腫瘍抑制遺伝子であるという仮説を立て、未分化型胃がんの細胞株である HSC44 を用いて機能解析を行った。

siRNA を用いた *MYH9* のノックダウン実験の結果を図 7 に示す。*MYH9* ノックダウンにより、細胞-細胞接着が低下し、細胞遊走が亢進したほか、7 日後の測定において印環細胞の割合が増加していた。細胞増殖に有意な変化はみられなかった。また、先行研究によれば NM IIA を阻害すると細胞-細胞境界における E-カドヘリンの発現が低下するとされている [48-50] ため、我々も HSC44 細胞において *MYH9* ノックダウン下での E-カドヘリンの発現を調べた。その結果、E-カドヘリンの細胞膜への集積が *MYH9* ノックダウンにより低下することが確認された。これらの結果は、胃がんにおいて *MYH9* が腫瘍抑制遺伝子であり、その機能欠失によって浸潤能が亢進することを示唆する。

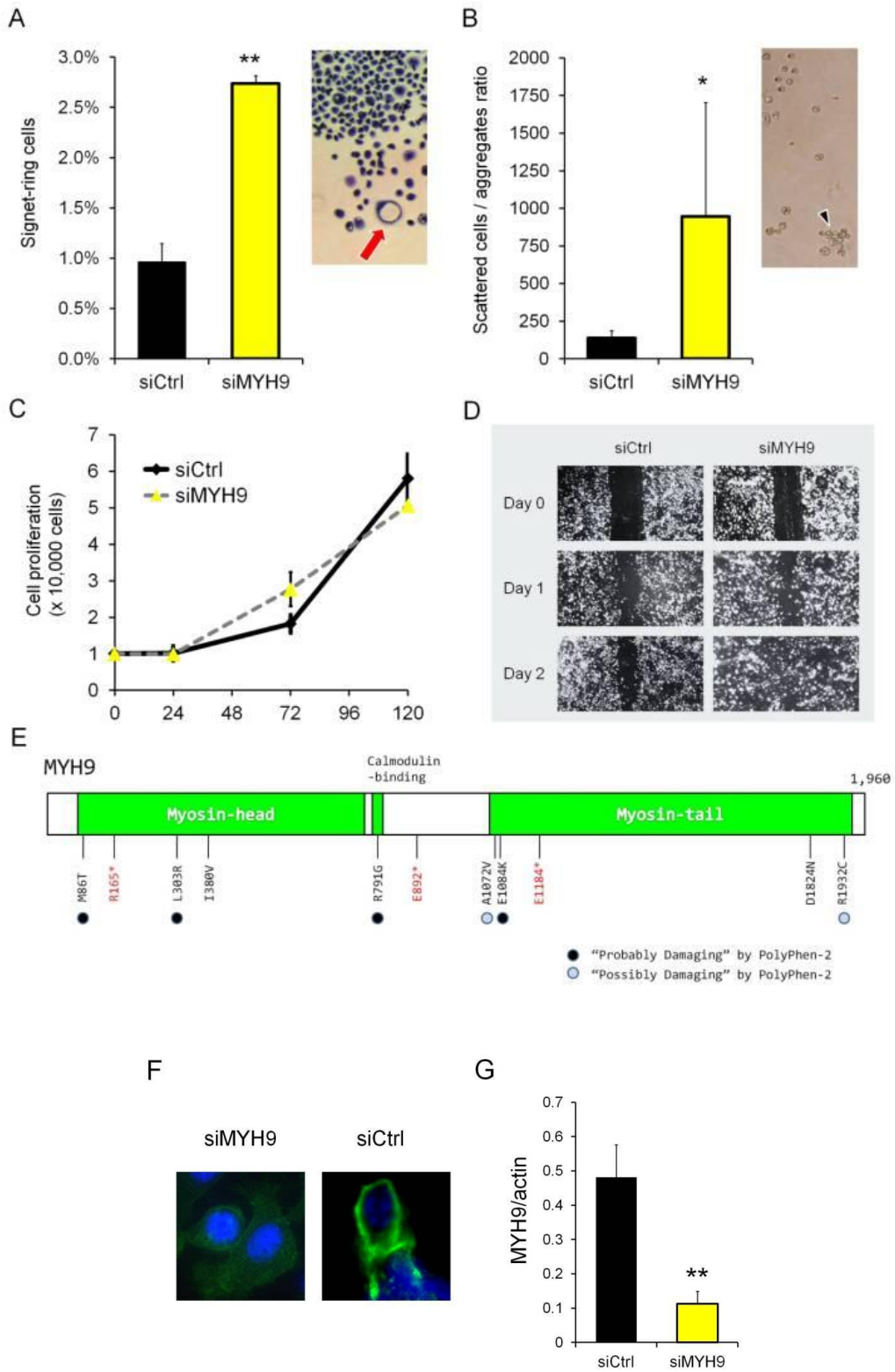




図7. siRNA 導入による MYH9 ノックダウン実験 (前頁に掲載)

- (A) トランスフェクションの7日後の測定において、MYH9 ノックダウン群で印環細胞 (赤い矢印) の割合が増加していた
- (B) MYH9 ノックダウンにより、孤在性細胞数を集塊 (矢頭) の数で割った値が増加した
- (C) MYH9 ノックダウンは細胞増殖には影響を与えなかった
- (D) MYH9 ノックダウンにより細胞遊走が亢進した
- (F) E-カドヘリンの蛍光免疫染色法。コントロール条件下では E-カドヘリンはほぼ細胞膜に限定的に局在するが、MYH9 をノックダウンした細胞ではその限定的局在が崩れ、細胞質内にも E-カドヘリンが分布した。
- (G) リアルタイム RT-PCR による mRNA の定量。MYH9 および ACTB 特異的なプライマーを用いた測定により、MYH9 の mRNA レベル (ACTB に対する比) が siRNA 導入により低下していることを確認した。 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$

接着分子の1つである SDK1 (sidekick homolog 1) [52]の遺伝子変異は胃粘液癌 9 例 (分化型 3 例+未分化型 6 例)に見られ、うち 8 例はミスセンス変異で、1 例はナンセンス変異 (未分化型)であった。SDK1 変異は特定のドメインへ集積せず、散在性に分布していた。SDK1 は、MSS (microsatellite stable) 胃がんのドライバー遺伝子の1つであり[24]、また、前立腺癌の細胞株において細胞遊走を亢進させることが報告されている[53]。

RBMXL3 (RNA-binding motif, X-linked-like 3)の変異は 19.1% (13/68 例)に見られ、変異例 13 例中 12 例はミスセンス変異であった。同遺伝子の RNA 認識モチーフドメインへの変異集積性は見られなかった。The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースによると、大腸癌の 6.9%、子宮の類内膜腺癌の 6.0%に RBMXL3 変異が検出されている。しかし、胃がんにおける RBMXL3 変異の頻度は 0.9%である (COSMIC データベース <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)。

## 5. 分化度分類と体細胞変異の関連

未分化型は分化型に比べて、リンパ節転移の頻度が高く ( $p = 0.004$ )、ステージの進行した症例が多かった ( $p = 0.013$ ) (表 4)。未分化型の予後は分化型に比べて有意に不良であった ( $p = 0.019$ , 図 8 AB)。

分化型による分類 (分化型/未分化型) と相関のあった遺伝子変異として、*CDH1*, *MLL2*, *MYH9*, *AHNAK2* が検出された (図 3, 右側のヒートマップ)。とくに *CDH1* 変異は未分化型の 30.4% (10/46 例) で見られたが分化型では検出されなかった (0/22 例) ( $p = 0.003$ )。また、細胞-細胞接着に重要な役割を果たすとされる *MYH9*[48-50] の変異は未分化型の 19.6% (9/46 例) に見られたが分化型では検出されず、有意な偏りを示した ( $p = 0.026$ )。

## 6. 胃粘液癌の予後因子

胃粘液癌全例 ( $n = 68$ ) の解析では、*BCOR* 変異が良好な予後と有意に相関した ( $p = 0.034$ )。未分化型 ( $n = 46$ ) を対象としたサブグループ解析では、*MLH1* 陰性 (免疫組織化学) 群の予後が良好であり ( $p = 0.020$ , 図 8 C)、*BCOR* 変異も良好な予後と相関した ( $p = 0.038$ , 図 8 D)。2 遺伝子の組み合わせとしては、未分化型において、「*TP53* 変異がない かつ/または *BCL11B* 変異がある」群は良好な予後と相関する傾向にあった ( $p = 0.073$ , 図 8 E)。*BCL11B* 変異は、成人 T 細胞白血病リンパ腫において良好な予後と相関する因子として報告されている変異である [54]。

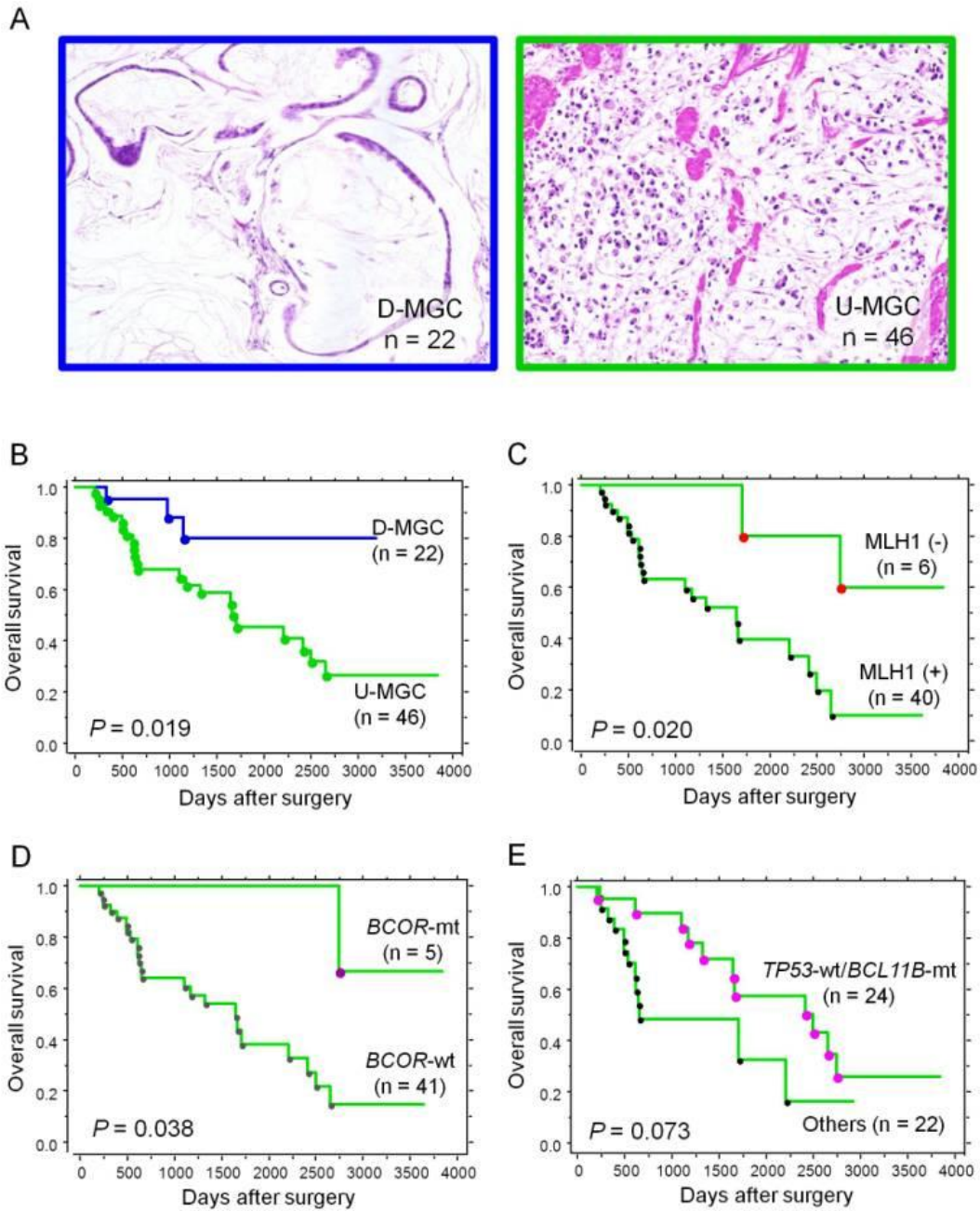


図8. 生存解析の結果

分化型粘液癌 (differentiated mucinous gastric carcinoma; D-MGC) の生存曲線を青で示し、未分化型粘液癌 (undifferentiated mucinous gastric carcinoma; U-MGC) の生存曲線を緑で示している。

A. D-MGC と U-MGC の組織像 [再掲]

B. D-MGC と U-MGC の全生存の比較

C. U-MGC において、MLH1 陰性群は予後良好となった

D. U-MGC において、*BCOR* 変異陽性群は予後良好であった

E. 「*TP53* 変異が無い」または「*BCL11B* 変異がある」U-MGC は予後良好であった

## 7. MLH1 陰性例の特徴

予後良好群であることが示された MLH1 陰性の胃粘液癌について、それらの遺伝子変異および臨床病理学的因子を検討した。MLH1 陰性群の非同義置換の数は、MLH1 陽性群よりも有意に多く (WES において  $p = 0.034$ , ターゲットシーケンスにおいて  $p = 0.049$ ) (図 9)、挿入/欠失の数は WES において MLH1 陰性群で有意に多かった ( $p = 0.016$ )。以上より、胃粘液癌における MLH1 発現検索 (免疫組織化学) が、変異が多いこと (hypermutation) で特徴づけられる胃粘液癌の検出に有用であることが確かめられた。

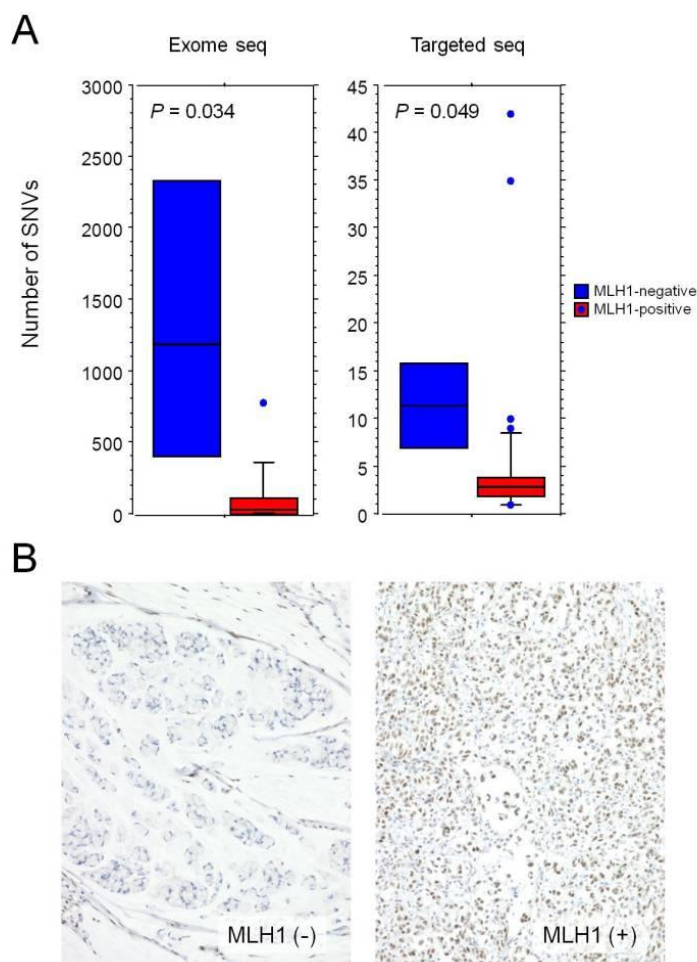


図 9. 胃粘液癌において MLH1 発現検索 (免疫組織化学) により変異の多い

(hypermutated) 症例を検出できる。

(A) MLH1 陽性群と MLH1 陰性群との間で SNV の総数を比較した。WES とターゲットシーケンスでは SNV の数が大幅に異なるため、シーケンスの種類ごとに分けて比較・検定を行った。そのため MLH1 陰性症例数が少なくなり検定がやや困難となるが、統計学的有意差が確認された。

(B) MLH1 の免疫組織化学。MLH1 陰性例では大部分の腫瘍細胞 (写真では印環細胞) で核が陰性となる。一方、MLH1 陽性例では大部分の腫瘍細胞で核に陽性となる。

つづいて、予後良好であることが既に知られている MSI 陽性非粘液癌[25, 39]と、予後良好であることが今回示唆された MLH1 陰性粘液癌とが、分子遺伝学的に近い関係にあるという仮説のもと、両者の遺伝子変異の特徴を比較した。MLH1 陰性胃粘液癌において変異が多く見られた（6例中3例以上）遺伝子のリストを表5に示す。同リストの22遺伝子のうち5個は、既報[24]で MSI 陽性非粘液癌に変異が多いとされる遺伝子リストに含まれていた（表5）。その中には、MSI 陽性の非粘液癌において重要性が報告されている *RNF43*[55]も含まれており、同遺伝子が MSI 陽性非粘液癌のみならず MLH1 陰性粘液癌においても重要であることが示唆された。胃癌を対象とした近年のシーケンス研究から、*ARID1A* 変異は MSI 陽性胃癌の主な特徴として報告されている[21, 22, 25]。今回の粘液癌において *ARID1A* 変異は、MLH1 陰性例で 2/6 例（33.3%）、MLH1 陽性例で 9/62（14.5%）例、と MLH1 陰性群で頻度が高かったが、有意差は見られなかった。以上のとおり、MLH1 陰性粘液癌と MSI 陽性非粘液癌の変異プロファイルはある程度共通していた。MLH1 陰性粘液癌に偏って多い変異として、*SDK1*, *BCOR*, *RNF43* などがあった一方で、同表に示すように *TP53*, *MLL2*, *MLL3* などの変異は MLH1 陰性群・陽性群の両者において高頻度に見られており、そういった遺伝子が変異遺伝子リスト（図3）の上位となっている傾向も確認された。

MSI 陽性胃がんは臨床病理学的因子に特徴的であるとされている（高齢、女性、胃の上部 1/3 に多い、リンパ節転移が少ない、予後良好、など）[39, 56, 57]。しかし、MLH1 陰性粘液癌と MSI 陽性非粘液癌に共通する臨床病理学的特徴は（良好な予後以外には）見られなかった。

表5. MLH1 陰性胃粘液癌において変異が多く見られた遺伝子のリスト

文献 [24]	文献 [47]	Symbol	MLH1 陰性 粘液癌にお ける変異症 例数	MLH1 陽性 粘液癌にお ける変異症 例数	MLH1 陰性 粘液癌中の 変異例% (n = 6)	MLH1 陽性 粘液癌中の 変異例% (n = 62)	P 値
		AHNAK2	5	3	83.3%	4.8%	0.000031
		CYP1B1	4	1	66.7%	1.6%	0.000090
		CYP1B1	4	1	66.7%	1.6%	0.000090
		PAMR1	4	1	66.7%	1.6%	0.000090
Yes		ANO10	3	0	50.0%	0.0%	0.000399
		TRAM1L1	3	0	50.0%	0.0%	0.000399
		BCOR	4	3	66.7%	4.8%	0.000597
		ABR	3	1	50.0%	1.6%	0.001541
		KAT6A	3	1	50.0%	1.6%	0.001541
		NCOA6	3	1	50.0%	1.6%	0.001541
Yes	Yes	RNF43	3	1	50.0%	1.6%	0.001541
		SLC3A2	3	1	50.0%	1.6%	0.001541
Yes		MYH9	4	5	66.7%	8.1%	0.002038
		SDK1	4	5	66.7%	8.1%	0.002038
		MED25	3	2	50.0%	3.2%	0.003718
		SPECC1	3	2	50.0%	3.2%	0.003718
		SUPT5H	3	2	50.0%	3.2%	0.003718
		BCL11B	3	3	50.0%	4.8%	0.007173
		NOTCH3	3	3	50.0%	4.8%	0.007173
		USP13	3	3	50.0%	4.8%	0.007173
Yes		MLL2	4	9	66.7%	14.5%	0.010363
Yes		MLL3	3	8	50.0%	12.9%	0.049166
	Yes	TP53	3	35	50.0%	56.5%	NS

MLH1 陰性症例 6 例のうち 3 例以上で変異が見られた遺伝子を、MLH1 陰性群に偏って(陽性群と比べて)多く見られる  $p$  値が低い順に並べて示す。Wang らによる既報 [24] と The Cancer Genome Atlas による既報 [47] で MSI 陽性例の “significantly mutated genes” とされている場合は、左 2 列分においてそれぞれ「Yes」(網かけ) と記す。MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stable; MGC, mucinous gastric carcinoma.

## 8. 粘液癌において *RHOA* 変異はまれである

2014年以降、diffuse type 胃癌において *RHOA* 変異が 14-25%の頻度で検出されることが報告された[23, 24, 47]。我々の粘液癌 68 例のうち *RHOA* 変異例は 2 例 (2.9%) に留まった。2 例はいずれもミスセンス変異を持ち、うち 1 例は近年報告された diffuse type 胃癌で集積性に見られる機能獲得型変異「Y42C」と一致した。*RHOA* の Tyr42 は、シグナリングにおける物理的相互作用に重要な core effector ドメインに位置しており、Y42C は細胞増殖に関連すると報告されている[23, 24, 47]。*RHOA* 変異陽性の胃粘液癌 2 例の組織像を 図 10 に示す。組織学的にいずれも U-MGC であり、印環細胞が粘液湖に浮遊する像が主体であった。粘液を伴わない (non-mucinous) 成分に着目すると、diffuse type に相当する poorly cohesive 型の像も一部に見られた。また、粘膜内では少量ながら粘液を伴わない分化型成分が見られた。これは牛久らが報告した「*RHOA* 変異のある diffuse type 胃癌の病理像」[58]と一致しており、病理学的に興味深い。

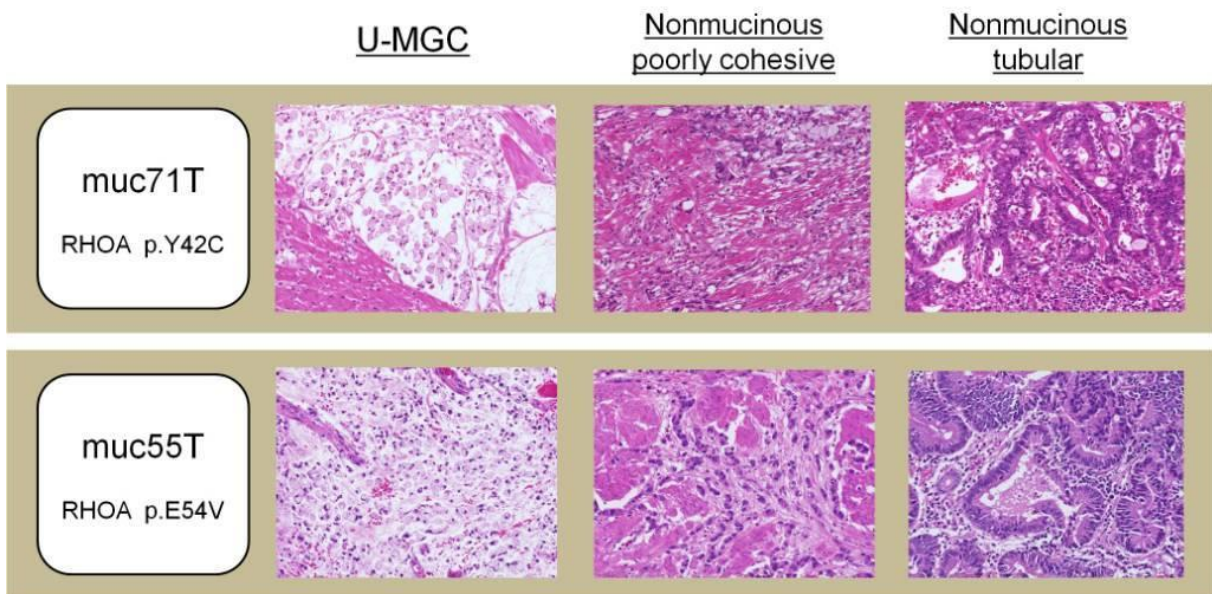


図 10. *RHOA* 変異陽性の胃粘液癌 2 例の病理組織像

## 9. 変異プロファイルに基いた、胃粘液癌の位置づけの検討

本研究から得られた胃粘液癌の変異プロファイルについて、シーケンス結果からとくに重要と考えられた3要素（①クロマチン/ヒストン関連遺伝子群の変異、②*CDHI* 変異、③*RHOA* 変異）を切り口として、非粘液癌の Lauren 分類（intestinal type、diffuse type）と比較し、胃粘液癌の分子遺伝学的な位置付けを評価した。非粘液癌の体細胞変異プロファイルは、TCGA（The Cancer Genome Atlas）データセットのうち、胃がん 30 症例以上を対象とした先行 3 研究[23, 24, 47]のデータを用いた（cBioPortal <http://www.cbioportal.org/> からアクセスした）。それらの先行 3 研究において組織型の情報が入手できた症例数（intestinal : diffuse）は、244 例（177 : 67）、86 例（57 : 29）、138 例（51 : 87）であり、合計 468 例（285 : 183）となった。粘液癌（本研究）と非粘液癌の比較結果を図 11 に示す。

まず、intestinal type（TCGA）と diffuse type（TCGA）の比較では、*CDHI* 変異の頻度および *RHOA* 変異の頻度に大きな差が見られた（*CDHI* 変異も *RHOA* 変異もともに  $p < 0.001$ ）。さらに、クロマチン関連遺伝子（今回我々が選んだ 9 遺伝子群）に変異を持つ頻度が、intestinal type では diffuse type に比べて有意に高かった（43.7% vs. 29.2%,  $p = 0.017$ ）。よって、クロマチン関連遺伝子の変異頻度が高いことは intestinal type 胃がんの特徴の 1 つと考えられる（図 11）。

分化型粘液癌（D-MGC）における変異プロファイルは、図 11 に示すように、intestinal type の変異プロファイルに類似していた。両者の共通点は、クロマチン関連遺伝子の変異が多く、*CDHI* や *RHOA* の変異はまれであることである。

未分化型粘液癌（U-MGC）の変異プロファイルは、*CDHI* 変異が多い点（頻度 30% 以上）では diffuse type の変異プロファイルに類似する。しかし、U-MGC と diffuse type は次の 2 点において異なる。すなわち、U-MGC では、①クロマチン関連遺伝子の変異が多く（53.3%, diffuse type と有意差あり  $p = 0.005$ , intestinal type よりも多く、これまでの研究において最高値）、②*RHOA* 変異が少ない（4.4%, diffuse type と有意差あり  $p$



= 0.021)、という特徴である。

Intestinal type と U-MGC も、①クロマチン関連遺伝子変異が多く、②*RHOA* 変異が少ない、という 2 点において類似している。このうち①に関連して、我々の粘液癌において U-MGC に偏って見られた *MLL2* 変異は、TCGA データセットにおいては intestinal type に偏って見られた (vs. diffuse;  $p = 0.004$ )。これらの結果から我々は、「U-MGC と intestinal type は分子遺伝学的に近い関係にある」という仮説を立て、U-MGC における *CDHI* およびクロマチン関連遺伝子群の変異アレル頻度を比較した。その結果、*CDHI* の変異アレル頻度は、クロマチン関連遺伝子群 (図 5A に示す 9 遺伝子) の変異アレル頻度よりも有意に高かった ( $p = 0.012$ , 図 11C)。一部症例では *CDHI* の LOH も予想されるため、変異アレル頻度を単純に比較することはできないものの、U-MGC において *CDHI* 変異アレル頻度は比較的高いため、*CDHI* 変異は U-MGC において重要なイベントであると考えられた。したがって、U-MGC と、*CDHI* 変異がまれである intestinal type は異なる疾患単位と考えられた。よって、ドライバー遺伝子の観点からは、U-MGC はいずれの胃がん亜型とも異なる独自の分類単位であることが示唆された。

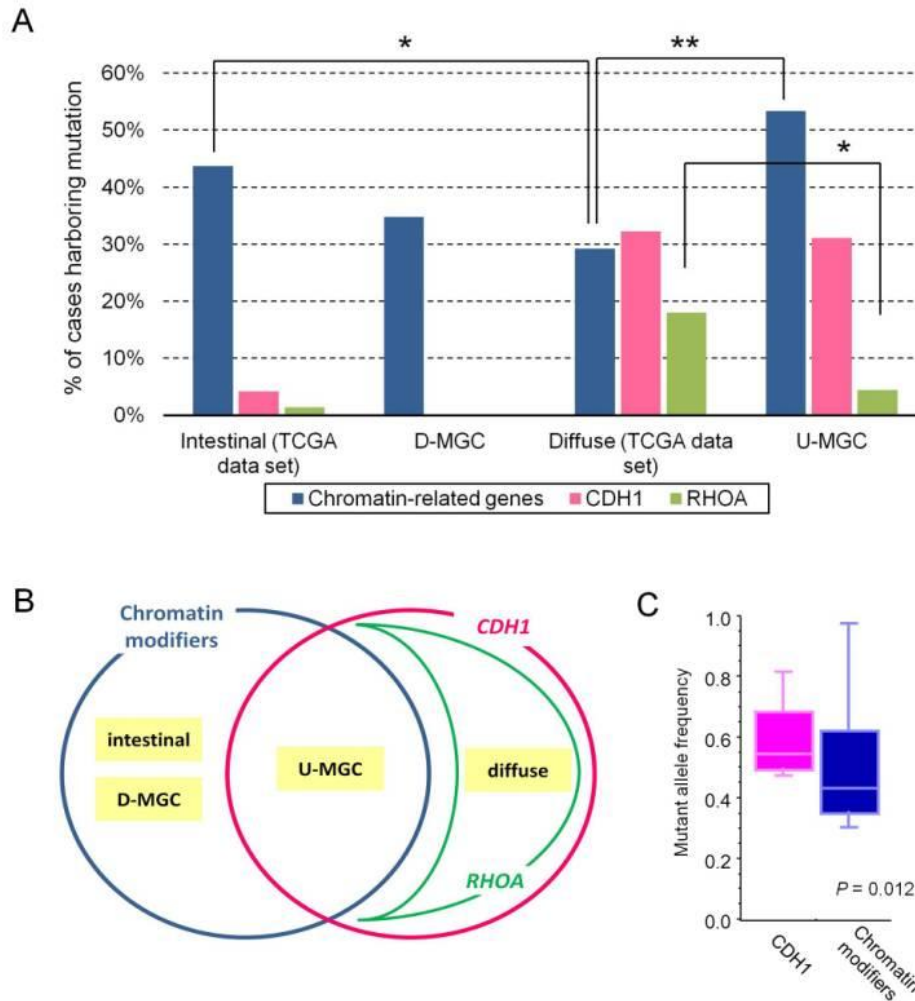


図 11. 変異プロファイルに基づいた胃がん亜型間の比較（粘液癌および非粘液癌）

A. クロマチン制御遺伝子群の変異、*CDH1* 変異、*RHOA* 変異の 3 要素に着目し、それぞれの頻度から胃がん亜型ごとの変異プロファイルと比較した。

B. 上記 A をもとに各亜型をグルーピングした図を示す。分化型粘液癌（D-MGC）の変異プロファイルは intestinal type 胃がんに類似する。未分化型粘液癌（U-MGC）の変異プロファイルは、*CDH1* 変異が多い点で diffuse type に類似するものの、クロマチン制御遺伝子に変異が多く（diffuse type ではクロマチン制御遺伝子変異が少ないことが特徴）、*RHOA* 変異が少ない点で diffuse type 胃がんとは異なる。

C. U-MGC における、*CDH1* とクロマチン関連遺伝子（図 5A に示す 9 遺伝子）の変異アレル頻度の比較。縦軸は、腫瘍率で補正した変異アレル頻度を表す。上記 B では「D-MGC が intestinal type とパターンに近い可能性」も示唆されていたものの、*CDH1* の変異アレル頻度は U-MGC において比較的高いことが明らかになった（：U-MGC における *CDH1* 変異の重要性が示唆された）ため、U-MGC は intestinal type と異なる独立した疾患単位と考えやすい。

TCGA, The Cancer Genome Atlas. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 10. 治療標的分子の遺伝子変異

DNAの相同組み換え修復を制御する Fanconi anemia (FA)-BRCA 経路の不活性化は、がんにおいて重要な分子異常のひとつである[59]。この経路をターゲットとし合成致死を利用した治療法の有効性が、近年の臨床試験において報告されている[60]。今回の粘液癌において、*BRCA2* 変異が6例(8.8%)、*BRCA1* 変異が5例(7.4%)に検出された。また、WES対象症例16例においては *FANCG* の変異が2例(12.5%)、*FANCD2* の変異が1例(6.3%)にみられた。

*ERBB3* のミスセンス変異が4例(5.9%)に検出され、うち2つ(p.V104Mとp.G284R)は既報[61]により腫瘍進展に関わることが示されている *ERBB3* 変異と一致した。WES対象症例16例のうち1例(6.3%)に *ERBB4* 変異が見られた。

*MTOR* 変異が6例(8.8%)に検出されたほか、WES対象症例16例中1例で、mTORシグナルを抑制する腫瘍抑制遺伝子である *PTEN* の短縮型変異が検出された。

## 第五章 考察

我々は、胃粘液癌における体細胞変異の全体像を明らかにした。胃粘液癌において変異の頻度が高かった上位 3 遺伝子は *TP53*, *ARID1A*, *CDH1* であり、これらの変異は胃がん全体において頻度が高いことが既に知られている遺伝子と重複した。すなわち、粘液癌の変異プロファイルは非粘液癌の変異プロファイルと大きくは変わらない一面が明らかとなった。一方で我々は、胃粘液癌（とくに未分化型）において、クロマチン関連遺伝子の変異が高頻度に起こっていることを示した。また、先行研究のデータセットを用いた比較をとおして、その頻度が、既報の次世代シーケンス研究が対象としているいずれの胃がん症例群より高いことを示した。また、それらのクロマチン関連遺伝子変異としては、機能喪失変異（ナンセンス、挿入・欠失）が多いことも特徴的であった。

2011 年に Wang らは胃がんにおいて *ARID1A* の変異が高頻度に見られることを報告し、クロマチン制御遺伝子の胃がんにおける重要性を示唆した[21]。2012 年の別グループによる WES 研究においても同様の結果が示された[22])。それ以降、クロマチン制御遺伝子の変異が胃がんにおける重要な分子経路の 1 つであると認識されてきた。我々が今回解析した粘液癌においては *ARID1A* のみならず *MLL* ファミリーの遺伝子変異も高頻度に見られたため、クロマチン制御遺伝子の変異の寄与が最も目立つ結果となった。

クロマチン関連遺伝子のなかで *KDM6A (UTX)* は、胃がんにおいてこれまであまり着目されていなかったが、胃粘液癌の 7.4% (5/68 例) に変異が検出された。この頻度は、これまでの胃がんの次世代シーケンス研究と比べて高かった。*KDM6A* はヒストン脱メチル化酵素の 1 つであり、膀胱がんにおいて約 1/4 の頻度で変異が見られると報告されている[62]。がんにおける *KDM6A (UTX)* 変異の役割は完全には解明されていないが、T 細胞性急性リンパ性白血病においては、*in vivo* および *in vitro* のデータ

として、がん抑制遺伝子としての働きが報告されている [63]。さらに、*UTX* 変異症例に対してエピジェネティック薬が有効である可能性も報告されており [63]、治療ターゲット候補として興味深い分子である。クロマチン制御遺伝子変異陽性症例を特徴づける臨床病理学的因子は、我々のデータからはほぼ見出だされなかったが、唯一 *MLL2* 変異に関しては、未分化型亜型への有意な偏りが見られた。ただ、それを説明しうるような先行研究は見当たらず、今後さらに解明していくべき現象と考えられる。

また、我々は、未分化型粘液癌の腫瘍形成や形態変化に重要と考えられる *MYH9* 変異を同定した。*MYH9* 変異は胃粘液癌において高頻度に（13.2%, 9 例/68 例）見られ、且つ変異が未分化型粘液癌のみに限って（9 例/46 例）見られていたため、胃癌細胞株 HSC44（低分化型腺癌）を用いて *MYH9* の機能解析を行った。その結果、*MYH9* ノックダウンが同細胞の遊走能を亢進させること、印環細胞の割合を増加させること、細胞-細胞接着を低下させること、を示した。先行研究では、*Myh9* ノックアウトマウスにおいて扁平上皮癌が形成される [51, 64] ことが近年報告されており、*MYH9* の腫瘍抑制遺伝子としての側面が徐々に確立されつつある。しかし、これまで胃がんにおける *MYH9* 遺伝子変異の意義を報告した研究はなく、本研究が初めてとなった。ただし我々のデータは 1 種類の細胞株におけるデータであるため、その意義は限定的である。とくに、*MYH9* ノックダウンにより印環細胞の割合が変化する結果については、他施設からの報告もないため、今後の追加検証が必要である。今回着目した *MYH9* について遺伝子変異データベースを参照すると、胃がんにおける変異頻度は、COSMIC データベースにて 7.75%、TCGA データセット（cBioPortal 経由）において 4.5~9.3% であり、頻度としては少なくない。このことから、粘液癌以外の胃がん亜型においても一定の頻度で *MYH9* 変異が役割を果たしている可能性が推測される。胃以外の臓器のがんにおいても *MYH9* 変異の意義はあまり注目されていない。しかし、TCGA データベースを参照すると、肺がんでは 58 変異中の 10 変異（17%）が短縮型変異（truncating mutation）であり、膀胱がんでは 27 変異中の 6 変異（22%）が短縮型変異であること

からも、複数種類のがんにおいて *MYH9* が腫瘍抑制遺伝子として機能している可能性がある。

分化型粘液癌と未分化型粘液癌との関係性については、これまで、臨床病理学的な悪性度が異なることは報告されていたが、両者の分子遺伝学的な相違点はわかっていなかった。今回我々は、未分化型に特徴的な遺伝子変異があること (*CDH1*, *MYH9*) を明らかにした。また、クロマチン関連遺伝子の変異が未分化型にやや多いことがわかった (分化型 32% vs 未分化型 54%;  $p = 0.119$ )。一方で両者には、①一塩基レベルでの塩基置換パターンは類似している (図 2 A)、②*TP53* 変異はともに高頻度で見られる (図 3)、という共通点も見出された。胃粘液癌の予後予測因子としては、組織学的分化度に基いた亜分類(分化型/未分化型)が予後に相関することが知られており、この傾向は本研究においても再確認された。分子遺伝学的な予後指標としては、これまで、2009 年に Choi らが報告した *EGFR* 過剰発現[10]のみが知られていたが、今回我々は、未分化型のサブグループ解析において、*MLH1* 陰性、あるいは *TP53* と *BCL11B* 変異の組み合わせが予後と相関することを示した。分化型と未分化型は予後が大きく異なるため、それぞれの亜型ごとの予後因子はより重要な意義を持つと考えられる。遺伝子変異の有無 (やその組み合わせ) による分類が予後と相関する背景としては、がんの発生・進展に寄与する分子経路が異なるサブグループを反映している事が考えられる。*BCL11B* は T 細胞の分化に関わる転写因子であり、成人 T 細胞白血病リンパ腫においては遺伝子変異の生物学的・臨床的重要性が確立されつつあるが[54] [65]、血液腫瘍以外の腫瘍において *BCL11B* 変異がどのような生物学的意味を持つのかは未解明であり、今後の研究が必要である。また、*MLH1* 陰性群は予後良好であるという結果からは、*MLH1* 陰性粘液癌と *MSI* 陽性非粘液癌の関連性が示唆された。そして両者はともに変異の多い (*hypermuation*) 例が多いという点でも共通していた。*MLH1* の発現検索 (免疫組織化学) が胃粘液癌患者の予後予測に役立つという結果は、同検索法が簡便で実施しやすい点からも意義がある。

未分化型粘液癌と diffuse type 胃がんは、腫瘍内の大部分あるいは局所的に印環細胞癌の増殖を見るという形態学的な類似点を持つ。この 2 亜型の分子遺伝学的な異同に関しては、これまで ER や PTEN の発現頻度が異なるという報告があるのみであり [66]、不明な点が多かった。今回の研究を通して、diffuse type 胃がんと未分化型胃粘液癌の分子遺伝学的な相違点を明らかにすることができた。具体的には、diffuse type 胃がんにおいて約 25% 存在するとされる *RHOA* 変異は胃粘液癌においては（未分化型粘液癌においても）かなり限定的ということが明らかとなり、予後不良である未分化型粘液癌については diffuse type とは異なる治療標的、分子経路を探索していく必要性が示唆された。とくに未分化型粘液癌においては、クロマチン制御分子がその重要な 1 つであることが示唆された。また、我々は、未分化型粘液癌が先行研究でこれまで解析されてきたどの亜分類単位とも異なる一群である可能性が高いことを示した。

上記のように未分化型粘液癌の分子経路、疾患単位としての位置づけを初めて明らかにできた一因として、解析対象症例中に未分化型が十分な症例数含まれていたことが挙げられる。胃粘液癌は頻度がそれ程高くないため、まとまった分子遺伝学的な研究がこれまで行われていなかった。我々は、凍結検体のみならず FFPE 材料も用いて研究を進めたことで、胃粘液癌のような希少亜型についても重要な一連のデータを出すことができた。FFPE 材料を対象としたシーケンスにおいては、C の脱アミノ化（U への塩基置換）に起因するアーチファクトとして C>T 変異が増えるとされているが [42, 43]、そういったエラーはストランドバイアスの大きい SNV となることが予想されたため、本研究ではそうした SNV を除去するフィルターを採用することでエラー率の減少を目指し、実際に凍結検体からのシーケンスデータとの比較によって、本解析パイプラインによる FFPE 検体由来の変異データの信頼性が確認された。凍結検体と FFPE 検体を組み合わせた研究は、今後がんの希少亜型の分子経路の解明において重要なアプローチと考えられ、FFPE 標本を利用する場面は今後増加すると予想される。FFPE 検体の利用手法に関する検討も、今後の重要な研究課題のひとつであり、

本研究はその点でも重要な検証となった。

我々は、網羅的なゲノム解析（次世代シーケンス）によって、胃粘液癌に特徴的な分子経路（とくにクロマチン制御分子群の重要性）を解明し、未分化型粘液癌に変異の多い *MYH9* の腫瘍抑制性機能も示した。今後の展望としては、他の胃がん組織亜型や他のがん種における *MYH9* の働きを解明し、診断や治療に役立てていくことが第一に重要と考えられる。また、今回の研究において粘液産生能と直接関連する分子はいまだ同定されておらず、粘液が癌細胞に対してどのように作用しているのかも未解明であるため、粘液産生の分子機序の解明や、さらに粘液産生（あるいはその周辺事象）の制御を介して抗腫瘍効果をあげるようなアプローチの基盤となる研究も必要と考えている。



## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科 人体病理学・病理診断学分野 深山正久教授、ならびに、国立がん研究センター研究所（NCC）がんゲノミクス研究分野 柴田龍弘分野長に深い感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、終始直接のご指導を賜りました、NCC がんゲノミクス研究分野 細田文恵 ユニット長をはじめ、実験操作および解析過程においてご協力いただきました、NCC がんゲノミクス研究分野のスタッフの皆様はこの場を借りて深謝いたします。

標本作製にご協力いただきました、東京大学大学院医学系研究科 人体病理学・病理診断学分野 佐久間慶技官、NCC がんゲノミクス研究分野 五十嵐恵子 研究補助員、に深謝いたします。

## 引用文献

1. Jemal A, Center MM, DeSantis C, and Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 1893-1907, 2010.
2. Wesolowski R, Lee C, and Kim R. Is there a role for second-line chemotherapy in advanced gastric cancer? *The Lancet* 10: 903-912, 2009.
3. Brander WL, Needham PR, and Morgan AD. Indolent mucoid carcinoma of stomach. *Journal of clinical pathology* 27: 536-541, 1974.
4. Kawamura H, Kondo Y, Osawa S, Nisida Y, Okada K, Isizu H, Uebayasi T, Takahasi M, and Hata T. A clinicopathologic study of mucinous adenocarcinoma of the stomach. *Gastric Cancer* 4: 83-86, 2001.
5. Kunisaki C, Akiyama H, Nomura M, Matsuda G, Otsuka Y, Ono HA, and Shimada H. Clinicopathologic characteristics and surgical outcomes of mucinous gastric carcinoma. *Annals of surgical oncology* 13: 836-842, 2006.
6. Bosman FT CF, Hruban RH, Theise ND (eds). *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: IARC Press, 2010.
7. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, and Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of gastrointestinal oncology* 3: 251-261, 2012.
8. Johansson ME, Sjovall H, and Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews* 10: 352-361, 2013.
9. Phillipson M, Johansson ME, Henriksnas J, Petersson J, Gendler SJ, Sandler S, Persson AE, Hansson GC, and Holm L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *American journal of physiology* 295: G806-812, 2008.
10. Choi JS, Kim MA, Lee HE, Lee HS, and Kim WH. Mucinous gastric carcinomas: clinicopathologic and molecular analyses. *Cancer* 115: 3581-3590, 2009.
11. Shi C, Yang B, Chen Q, Yang J, and Fan N. Retrospective analysis of adjuvant intraperitoneal chemotherapy effect prognosis of resectable gastric cancer. *Oncology* 80: 289-295, 2011.
12. Choi MG, Sung CO, Noh JH, Kim KM, Sohn TS, Kim S, and Bae JM. Mucinous gastric cancer presents with more advanced tumor stage and weaker beta-catenin expression than nonmucinous cancer. *Annals of surgical oncology* 17: 3053-3058, 2010.
13. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 64: 31-49, 1965.
14. Joypaul BV, Newman EL, Hopwood D, Grant A, Qureshi S, Lane DP, and Cuschieri A. Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: an immunohistochemical study. *The Journal of pathology* 170: 279-283, 1993.
15. Tohdo H, Yokozaki H, Haruma K, Kajiyama G, and Tahara E. p53 gene mutations in gastric

adenomas. *Virchows Archiv* 63: 191-195, 1993.

16. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Ando H, Yanagisawa A, Tsuchiya E, Kato Y, and Nakamura Y. Frequent somatic mutations of the APC gene in human pancreatic cancer. *Cancer research* 52: 6696-6698, 1992.

17. Han S, Kim HY, Park K, Lee MS, Kim HJ, and Kim YD. Expression of p27Kip1 and cyclin D1 proteins is inversely correlated and is associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *Journal of surgical oncology* 71: 147-154, 1999.

18. Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, and Gabbert HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *International journal of cancer* 111: 224-228, 2004.

19. Xiangming C, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S, Kuroshima K, and Aikou T. Cooccurrence of reduced expression of alpha-catenin and overexpression of p53 is a predictor of lymph node metastasis in early gastric cancer. *Oncology* 57: 131-137, 1999.

20. Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, and Meltzer SJ. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 569-573, 2000.

21. Wang K, Kan J, Yuen ST, Shi ST, Chu KM, Law S, Chan TL, Kan Z, Chan AS, Tsui WY, Lee SP, Ho SL, Chan AK, Cheng GH, Roberts PC, Rejto PA, Gibson NW, Pocalyko DJ, Mao M, Xu J, and Leung SY. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nature genetics* 43: 1219-1223, 2011.

22. Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, Zhang SL, McPherson JR, Tao J, Rajasegaran V, Heng HL, Deng N, Gan A, Lim KH, Ong CK, Huang D, Chin SY, Tan IB, Ng CC, Yu W, Wu Y, Lee M, Wu J, Poh D, Wan WK, Rha SY, So J, Salto-Tellez M, Yeoh KG, Wong WK, Zhu YJ, Futreal PA, Pang B, Ruan Y, Hillmer AM, Bertrand D, Nagarajan N, Rozen S, Teh BT, and Tan P. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. *Nature genetics* 44: 570-574, 2012.

23. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, and Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nature genetics* 46: 583-587, 2014.

24. Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, Siu HC, Deng S, Chu KM, Law S, Chan KH, Chan AS, Tsui WY, Ho SL, Chan AK, Man JL, Foglizzo V, Ng MK, Chan AS, Ching YP, Cheng GH, Xie T, Fernandez J, Li VS, Clevers H, Rejto PA, Mao M, and Leung SY. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nature genetics* 46: 573-582, 2014.

25. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, Liu J, Yue YG, Wang J, Yu K, Ye XS, Do IG, Liu S, Gong L, Fu J, Jin JG, Choi MG, Sohn TS, Lee JH, Bae JM, Kim ST, Park SH, Sohn

- I, Jung SH, Tan P, Chen R, Hardwick J, Kang WK, Ayers M, Hongyue D, Reinhard C, Loboda A, Kim S, and Aggarwal A. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nature medicine* 21: 449-456, 2015.
26. Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E, Yoshida S, Hatori T, Yamamoto M, Shibata N, Shimizu K, Kamatani N, and Shiratori K. Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Scientific reports* 1: 161, 2011.
27. Anglesio MS, Kommoss S, Tolcher MC, Clarke B, Galletta L, Porter H, Damaraju S, Fereday S, Winterhoff BJ, Kalloger SE, Senz J, Yang W, Steed H, Allo G, Ferguson S, Shaw P, Teoman A, Garcia JJ, Schoolmeester JK, Bakkum-Gamez J, Tinker AV, Bowtell DD, Huntsman DG, Gilks CB, and McAlpine JN. Molecular characterization of mucinous ovarian tumours supports a stratified treatment approach with HER2 targeting in 19% of carcinomas. *The Journal of pathology* 229: 111-120, 2013.
28. Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, Rowley SM, Christie M, Allan PE, Bowtell DD, Gorringer KL, and Campbell IG. RNF43 is a tumour suppressor gene mutated in mucinous tumours of the ovary. *The Journal of pathology* 229: 469-476, 2013.
29. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe S, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, and Kohno T. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 20: 3087-3093, 2014.
30. Yanagihara K, Kamada N, Tsumuraya M, and Amano F. Establishment and characterization of a human gastric scirrhous carcinoma cell line in serum-free chemically defined medium. *International journal of cancer* 54: 200-207, 1993.
31. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, and Shibata T. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nature genetics* 47: 1003-1010, 2015.
32. Li H, and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25: 1754-1760, 2009.
33. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, and Durbin R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25: 2078-2079, 2009.
34. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, and Getz G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505: 495-501, 2014.
35. Barnes EA, Kenerson HL, Jiang X, and Yeung RS. Tuberin regulates E-cadherin localization: implications in epithelial-mesenchymal transition. *The American journal of pathology* 177: 1765-1778, 2010.
36. Katsamba P, Carroll K, Ahlsen G, Bahna F, Vendome J, Posy S, Rajebhosale M, Price S, Jessell TM, Ben-Shaul A, Shapiro L, and Honig BH. Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

*of America* 106: 11594-11599, 2009.

37. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, and Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer research* 59: 1090-1095, 1999.
38. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, and Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer research* 59: 159-164, 1999.
39. Falchetti M, Saieva C, Lupi R, Masala G, Rizzolo P, Zanna I, Ceccarelli K, Sera F, Mariani-Costantini R, Nesi G, Palli D, and Ottini L. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. *Human pathology* 39: 925-932, 2008.
40. Sakata K, Tamura G, Endoh Y, Ohmura K, Ogata S, and Motoyama T. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *British journal of cancer* 86: 564-567, 2002.
41. Sung CO, Lee SM, Choi JS, Kim KM, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Bae JM, Kim WH, Park CK, and Kim S. Tumor size predicts survival in mucinous gastric carcinoma. *Journal of surgical oncology* 106: 757-764, 2012.
42. Chen G, Mosier S, Goeke CD, Lin MT, and Eshleman JR. Cytosine deamination is a major cause of baseline noise in next-generation sequencing. *Molecular diagnosis & therapy* 18: 587-593, 2014.
43. Do H, and Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. *Oncotarget* 3: 546-558, 2012.
44. Lederer D, Grisart B, Digilio MC, Benoit V, Crespin M, Ghariani SC, Maystadt I, Dallapiccola B, and Verellen-Dumoulin C. Deletion of KDM6A, a histone demethylase interacting with MLL2, in three patients with Kabuki syndrome. *American journal of human genetics* 90: 119-124, 2012.
45. Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, and Matsumoto N. KDM6A point mutations cause Kabuki syndrome. *Human mutation* 34: 108-110, 2013.
46. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, and Shendure J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nature genetics* 42: 790-793, 2010.
47. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513: 202-209, 2014.
48. Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM, and Adelstein RS. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *The Journal*

*of biological chemistry* 279: 41263-41266, 2004.

49. Ivanov AI, Bachar M, Babbini BA, Adelstein RS, Nusrat A, and Parkos CA. A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions. *PLoS one* 2: e658, 2007.
50. Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, Stehbens SJ, Verma S, Kovacs EM, and Yap AS. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Molecular biology of the cell* 16: 4531-4542, 2005.
51. Schramek D, Sandoel A, Segal JP, Beronja S, Heller E, Oristian D, Reva B, and Fuchs E. Direct in vivo RNAi screen unveils myosin IIa as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas. *Science (New York, NY)* 343: 309-313, 2014.
52. Yamagata M, Weiner JA, and Sanes JR. Sidekicks: synaptic adhesion molecules that promote lamina-specific connectivity in the retina. *Cell* 110: 649-660, 2002.
53. Verone AR, Duncan K, Godoy A, Yadav N, Bakin A, Koochekpour S, Jin JP, and Heemers HV. Androgen-responsive serum response factor target genes regulate prostate cancer cell migration. *Carcinogenesis* 34: 1737-1746, 2013.
54. Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, De Keersmaecker K, Hadler M, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Forne C, Rue M, and Ferrando AA. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 122: 74-82, 2013.
55. Jo YS, Kim MS, Lee JH, Lee SH, An CH, and Yoo NJ. Frequent frameshift mutations in 2 mononucleotide repeats of RNF43 gene and its regional heterogeneity in gastric and colorectal cancers. *Human pathology* 2015.
56. Ottini L, Palli D, Falchetti M, D'Amico C, Amorosi A, Saieva C, Calzolari A, Cimoli F, Tatarelli C, De Marchis L, Masala G, Mariani-Costantini R, and Cama A. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from Tuscany. *Cancer research* 57: 4523-4529, 1997.
57. Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, Sheu JC, and Lin JT. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes, chromosomes & cancer* 27: 403-411, 2000.
58. Ushiku T, Ishikawa S, Kakiuchi M, Tanaka A, Katoh H, Aburatani H, Lauwers GY, and Fukayama M. RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. *Gastric Cancer* DOI 10.1007/s10120-10015-10493-10120, 2015.
59. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, and Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434: 917-921, 2005.
60. Scott CL, Swisher EM, and Kaufmann SH. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development. *J Clin Oncol* 33: 1397-1406, 2015.
61. Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, Chan E, Parikh C, Durinck S, Chaudhuri S, Pujara K, Guillory J, Edgar KA, Janakiraman V, Scholz RP, Bowman KK, Lorenzo M, Li H, Wu J, Yuan W, Peters BA, Kan Z, Stinson J, Mak M, Modrusan Z, Eigenbrot C, Firestein R, Stern HM, Rajalingam K,

- Schaefer G, Merchant MA, Sliwkowski MX, de Sauvage FJ, and Seshagiri S. Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer cell* 23: 603-617, 2013.
62. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 507: 315-322, 2014.
63. Van der Meulen J, Sanghvi V, Mavrakis K, Durinck K, Fang F, Matthijssens F, Rondou P, Rosen M, Pieters T, Vandenberghe P, Delabesse E, Lammens T, De Moerloose B, Menten B, Van Roy N, Verhasselt B, Poppe B, Benoit Y, Taghon T, Melnick AM, Speleman F, Wendel HG, and Van Vlierberghe P. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125: 13-21, 2015.
64. Anne Conti M, Saleh AD, Brinster LR, Cheng H, Chen Z, Cornelius S, Liu C, Ma X, Van Waes C, and Adelstein RS. Conditional deletion of nonmuscle myosin II-A in mouse tongue epithelium results in squamous cell carcinoma. *Scientific reports* 5: 14068, 2015.
65. Bartram I, Gokbuget N, Schlee C, Heesch S, Fransecky L, Schwartz S, Stuhlmann R, Schafer-Eckhart K, Starck M, Reichle A, Hoelzer D, Baldus CD, and Neumann M. Low expression of T-cell transcription factor BCL11b predicts inferior survival in adult standard risk T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. *Journal of hematology & oncology* 7: 51, 2014.
66. Yang XF, Yang L, Mao XY, Wu DY, Zhang SM, and Xin Y. Pathobiological behavior and molecular mechanism of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the stomach: a comparative study. *World journal of gastroenterology* 10: 750-754, 2004.