

# 博士論文

論文題目      びまん性胃癌における網羅的ゲノム解析

氏      名      垣内（山本）      美和子

目次	頁
1. 要旨	3
2. 序文	4
3. 方法	7
1) インフォームドコンセントとサンプル採取	
2) 免疫組織化学	
3) 全エクソームシーケンス	
4) ターゲットリシーケンス	
5) サンガーシーケンス	
4. 結果	16
1) びまん性胃癌の全エクソームシーケンス(WES)	
2) びまん性胃癌における遺伝子変異	
3) 腸型胃癌(IGC)とびまん性胃癌(DGC)の遺伝子変異比較	
5. 考察	33
6. 結語	37
7. 参考文献	38
8. 謝辞	41

## 1. 要旨

びまん性胃癌は、豊富な間質を伴って浸潤する性質を持ち、胃癌のなかでも予後の悪いサブタイプである。難治癌の一つであるびまん性胃癌に特徴的な遺伝子変異を解明し治療標的を探索する目的で、30 例のびまん性胃癌で全エクソームシーケンスを行ったところ、新規癌遺伝子として *RHOA* の変異を認めた。さらに 57 例のびまん性胃癌と 51 例の腸型胃癌を加えて、*RHOA* を含めて 46 遺伝子を標的としたターゲットリシーケンスを行った。その結果びまん性胃癌でのみ、25.3%(22/87)の症例で *RHOA* 遺伝子変異を認め、特に Y42、R5、G17 のアミノ酸置換に集中しており、びまん性胃癌にとって機能獲得性変異である可能性が示唆された。びまん性胃癌の新規治療標的分子として期待される。

## 2. 序文

胃癌は、日本をはじめとして世界的に年々減少傾向ではあるものの、2012 年の GLOBOCAN (WHO)の報告では依然として世界で癌による死因の第 3 位である[1]。胃癌の死亡率が減少傾向である理由としては、胃癌検診の普及や、内視鏡の開発と発展による早期での発見、治療が可能になったことが挙げられるが、さらに発癌リスクとされるヘリコバクターピロリの発見・除菌治療により、今後も減少傾向になると考えられる。

しかし、胃癌には全体の 30-50%[2-4]を占めるびまん性胃癌(Diffuse-type gastric cancer, DGC)という組織型のサブグループ(Laurens 分類) [5]があり、その他通常型(腸型: Intestinal-type, IGC)胃癌と比較して非常に進行が早く、手術可能な病期で発見されたとしても手術後の 5 年生存率が 10-20%と予後不良である[6]。びまん性胃癌の病理組織学的特徴として、低分化腺癌もしくは印環細胞癌が小塊・個細胞性に進展し、粘膜下層へ豊富な間質を伴って浸潤していくことで、胃壁の肥厚および硬化を呈することから「スキルス(=硬い)胃癌」と呼ばれることも多い。臨床的な特徴から DGC 高リスク群の解明が進められているが、比較的若年での割合が高いこと、IGC と比較して女性の罹患率が高いこと[4]、従来ピロリ感染率の低い米国では IGC が年々減少傾向である一方で DGC は徐々に増加している[2]と言われ、その発癌メカニズムは IGC とは異なることが予想される。

発癌に関与する分子生物学的研究としては、家族性 DGC の研究から接着因子の一

つである E-Cadherin (*CDH1* 遺伝子) の変異を認め[7]、孤発性 DGC でも *CDH1* の変異や loss of heterozygosity (LOH) [8]、プロモーター領域の高メチル化[9]が認められるとされる。これらの報告をもとに、胃壁細胞において E-Cadherin と p53 のノックアウトマウスが、DGC の発癌モデルとして提唱されている[10]。しかし、DGC 症例全例でこの 2 遺伝子の変異があるわけではなく、その発癌機構は未解明な点も多い。また、胃癌の一部に HER2 遺伝子の増幅/高発現があり分子標的治療が可能になっているが、IGC では約 30%だが、DGC では 10%程度しか陽性にならない[11, 12]。このような臨床的、病理組織学的な特徴を持つ DGC について、その分子生物学的プロフィールを確立することは DGC に対する新たな戦略を見出すのに不可欠であると考えられる。

近年、新たな癌遺伝子・癌抑制遺伝子の探索や、発癌メカニズムの全貌を明らかにする目的で、網羅的なゲノム解析が世界的に進行している。次世代シーケンサーの登場により、膨大なゲノム情報を比較的容易に得られるようになり、癌の全ゲノムシーケンス (whole genome sequencing :WGS) ・全エクソームシーケンス (whole-exome sequencing :WES) が数多く報告されてきた。胃癌についても、2011～2012 年にそれぞれ 22 例[13]と 15 例[14]の WES の結果が報告されたが、その組織学的内訳は DGC が 2 例および 3 例と非常に少なかった。DGC が少ない理由として、間質を多く伴った DGC は標本中の癌細胞含有率が低く、変異解析の検出力が劣るため適切なサンプル採取が難しいことが挙げられる。

今回の研究では、DGC の腫瘍率の問題をカバーしつつ、網羅的なゲノムプロファイルを明らかにすることによって、DGC を特徴づける新たな癌遺伝子や発癌メカニズムを見いだすことが目的である。

### 3. 方法

#### 1) インフォームドコンセントとサンプル採取

サンプルは、2003 年～2013 年 6 月に東京大学医学部附属病院においてインフォームドコンセントを得られた症例で、胃癌の診断で外科的に切除された組織の一部を Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) コンパウンドにて包埋し、-80℃で保存されている凍結標本を用いた。Whole-exome sequencing を用いた研究計画「胃腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」は 2011 年 11 月ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて承認された（審査番号 G3521）。

保存されているサンプルを、病理組織学的診断(Laurens 分類)としてびまん性胃癌 (Diffuse-type gastric cancer)と腸型胃癌(Intestinal-type gastric cancer)とに大別し、まずは DGC 30 例を WES とターゲットリシーケンスに用い、さらに 57 例の DGC と 51 例の IGC をターゲットリシーケンスに用いた。

DGC 計 87 例および IGC 51 例の症例背景は、表 1 の通りである。

		DGC N=87		IGC N=51		p-value
		N	(%)	N	(%)	
Gender	Male	50	57	41	80	0.006 <sup>*1</sup>
	Female	37	43	10	20	
Age	Mean	63.72		70.76		0.0002 <sup>*2</sup>
	Median	63		70		0.0011 <sup>*3</sup>
stage T	T1	11	17	6	27	0.198 <sup>*1</sup>
	T2	1	2	2	9	
	T3	16	25	3	14	
	T4	37	57	11	50	
stage N	N0	27	42	7	32	0.861 <sup>*1</sup>
	N1	7	11	3	14	
	N2	9	14	4	18	
	N3	22	34	8	36	
stage M	M0	54	83	19	86	0.717 <sup>*1</sup>
	M1	11	17	3	14	
UICC stage	I	10	15	6	27	0.597 <sup>*1</sup>
	II	21	32	5	23	
	III	23	35	8	36	
	IV	11	17	3	14	

表 1. DGC と IGC 解析症例

\*1  $\chi^2$  test

\*2 t-test

\*3 Mann-Whitney's U test

O.C.T.包埋された凍結標本（癌部および同時採取された正常部）を、クライオスタット(Leica)を用いて 10-20um の厚さに薄切し、サンプルのサイズによって 15-60 枚の連続切片を回収した。癌部組織内の腫瘍率を推定するため、凍結切片の迅速 Giemsa 染色を行い、明らかな正常部が含まれるものに関しては腫瘍含有率を高めるために、正常部を可及的に除去した。また、サンプリング時の腫瘍不均一性を考慮し、サンプル内に組織型としてびまん性胃癌の成分が含まれていることを確認した。回収した切片より QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen)を用いて DNA 抽出を行った。

## 2) 免疫組織化学

薄切した癌部の組織について、切片内に癌細胞がどの程度含まれているかを肉眼的に明らかにするため、背景の炎症細胞や間質細胞と上皮細胞由来の癌細胞を免疫組織化学にて区別することとした。スライドグラス上に 5um 厚の切片を置き、アセトンで固定、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った後、Protein Block Serum-Free (X0909, Dako)を用いてブロッキングした。その後上皮細胞に特異的なマウスモノクローナル pan-cytokeratin 抗体である AE1/AE3 抗体(M3515, Dako)を 100 倍希釈し 1 次抗体に用いた。2 次抗体としてポリマー試薬（ペルオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体および ペルオキシダーゼ標識デキストラン結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体、K5027, Dako）にて反応後、DAB (3,3'-Diaminobenzidine)基質

試薬 (K3468, Dako) で発色した。核の対比染色のため、ヘマトキシリン染色を行ったのち、エタノールにて脱水、キシレンの透徹、封入を行った。

### 3) 全エクソームシーケンス

#### 3-1) ライブラリー作成、シーケンス

1 サンプルあたり 1ug の DNA を、Covaris SS Ultrasonicator を用いて断片化したのち、Agilent SureSelect Human All Exon Kit v4 (Agilent Technologies) を使用しシーケンスのためのライブラリー作成、exon 領域のキャプチャを行った。その流れとしては、ピークが 150-200bp 程度になるように断片化された DNA の両端を修復、3'末端に A 塩基を付加、両端にアダプター付加して PCR にて増幅したのち、exon 領域にハイブリダイズするように設計されたビオチン化 RNA ライブラリーでキャプチャした。キャプチャされたライブラリーにマルチプレックスシーケンスを可能にするため index を付加、PCR にて増幅し、300-400bp 長のシーケンスライブラリーが完成した (図 1)。その後、HiSeq2000 (Illumina) を用いて 100bp ペアエンドシーケンスを行った。

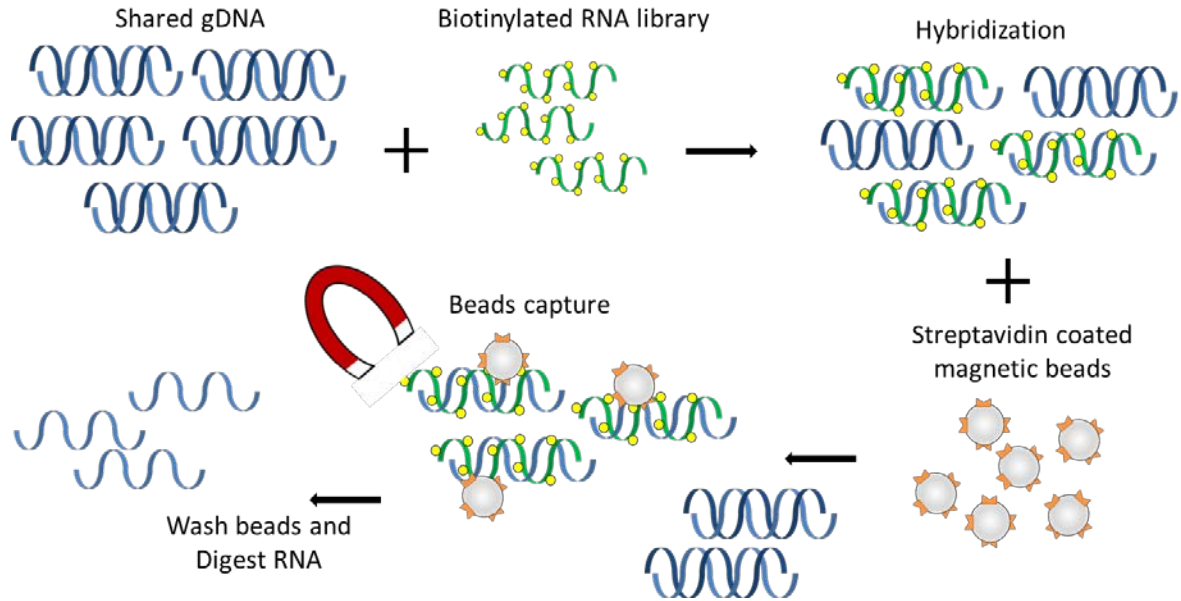
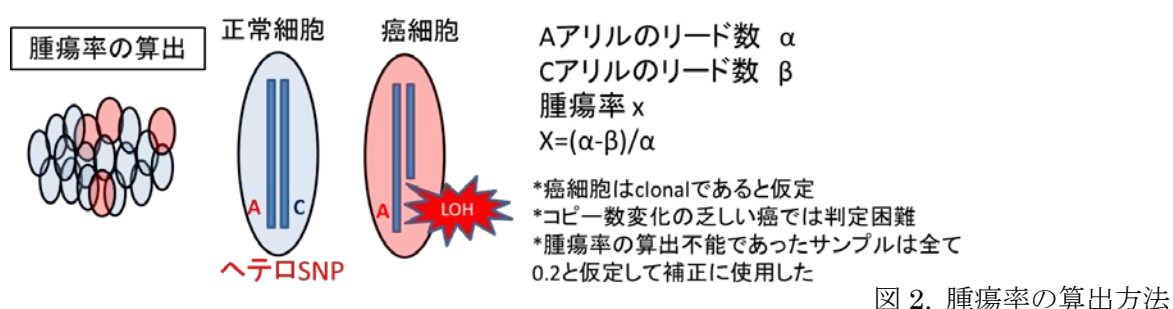


図 1. 全エクソームシーケンス ライブラリー作成（エクソンキャプチャー）

### 3-2) シーケンスデータ解析

得られたシーケンス情報は、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [15]と Novoalign ソフトウェアを用いてヒトのリファレンス配列 GRCh37/hg19 にマッピングした。ライブラリー作成時の PCR バイアスを考慮して duplicate (まったく同じ配列のリード) を除いたのち、変異同定をより正確にするために Short Read Micro re-Aligner (SRMA) [16]を用いた。さらに腫瘍率の低い癌腫における体細胞変異の同定のため、シーケンスデータから癌部の腫瘍率を推定し（図 2）それによって変異アレル頻度を補正する手法を組み込んだ、先端研ゲノムサイエンス分野オリジナルの解析パイプライン”karkinos”を開発している（URL: <http://sourceforge.net/projects/karkinos/>）。多数検体での網羅的ゲノム解析をすすめる中心的プロジェクトの TCGA(The Cancer Genome Atlas)では、腫瘍率が 60-70%以上のサンプルのみを使用しており、腫瘍率を勘案した解析方法は用いられていない。本研究ではそのように腫瘍率が高いサンプ

ルのみを選別することは、サンプリングバイアスとなる恐れがあり、間質が豊富であるびまん性胃癌の特性を反映できないと考えた。そこで、腫瘍率を算出したのち、補正後の変異アリル頻度が15%以上の変異を同定した。また、germline variant を除外するため、癌部とペアとなる正常部とを比較し、正常部で認められた変化は癌部の変異リストから除いた。



#### 4) ターゲット リシークエンス

##### 4-1) 標的遺伝子の選別

WES で認められた体細胞変異に関して、変異の確認を行うと共に、より正確に症例における頻度や分布を明らかにするために、複数症例において変異が認められた遺伝子及びその関連遺伝子を選別しリシークエンスを行った。特に、WES で明らかになった *RHOA* の変異に関して、より系統的に調べるため、*RHOA* の活性を調節するタンパクである RhoGEF, RhoGAP, RhoGDI (図 3 や、*RHOA* のエフェクター分子等を、*RHOA* を合わせて 27 遺伝子選択した。選択にあたっては、*RHOA* との相互作用の有無について、データベース(BioGRID, Human Protein Reference Database)を参考とした。さらに、*RHOA* 以外の変異頻度の高い遺伝子を 19 遺伝子選択し、合計で 46 遺伝子を解析対象とすることとした。(表 2)

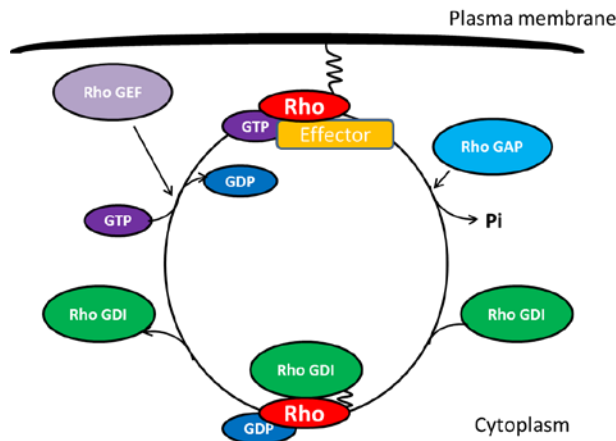


図 3. RHO の活性化と不活化

#### 4-2) アンプリコンシーケンス

DGC は腫瘍率が低く変異アリの検出力が問題となることから、WES よりもさらに deep にシーケンスする必要があると考え、アンプリコンシーケンスで標的遺伝子の変異を検出することとした。「アンプリコン(amplicon)」とは、PCR 反応で得られた 1 対の primer で両端が定義された DNA 鎖のことであり、同時に複数の primer 対を用いて PCR 反応を行う(multiplex PCR)ことで複数の amplicon を増幅し、それらを同時にシーケンスする方法がアンプリコンシーケンスである。

Illumina 社の DesignStudio を用いて、標的遺伝子の exon 領域に対する amplicon (平均 175bp 長)のセットを 2 つデザインし(それぞれ 1504、1525 amplicon を含む)、TruSeq Custom Amplicon(TSCA) kit を合成した(表 2)。解析対象領域に対して、デザインされた amplicons によってカバーされる領域の割合(表 2 における coverage)は、それぞれ 98.9%、93.5%となった。癌部およびペアの正常部 DNA 250ng を用いてプロトコル通りにライブラリー作成を行った(図 4)。シーケンスは HiSeq2500 Rapid run mode で 150bp ペアエンドシーケンスを行った。

しかし、一部のサンプルにおいて、*RHOA* 遺伝子第 2 exon 領域の amplicon 増幅が認められない問題が発生したため、ターゲット領域を含んだ 1kb 長の PCR 産物 (primer 配列は表 3) をもとに、NexteraXT kit (Illumina) を用いてプロトコル通りにライブラリー作成を行った。シーケンスは MiSeq system (Illumina) を使用し、200bp ペアエンドシーケンスを行った。

得られたリードの両端にはライブラリー作成やシーケンスに伴うエラーが多発することから、両端 5 塩基を除外した配列を BWA を用いてリファレンス配列 (hg19) にマッピングした。塩基置換、indel の同定には、20 リード以上がある領域で Genome Analysis Toolkit (GATK) Unified Genotyper を用いた。さらに 1 回のシーケンスで用いた各正常部で認められた variants をすべてまとめ、癌部のデータから除外することで Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) などの germline variants や PCR エラーを除去し体細胞変異を同定した。最終的には、マッピングされたリードを Integrative Genomics Viewer (IGV) にて確認して検証した。

chr	gene	# of amplicons	coverage(%)
1	CDC42	22	100
1	ARID1A	84	100
1	VAV3	48	100
2	ROCK2	73	97.8
3	RHOA	16	100
3	ECT2	50	100
4	RAP1GDS1	30	100
5	RGNEF	88	100
5	ARHGAP26	38	100
7	RAC1	11	100
8	DLC1	70	99.3
8	FGFR1	47	100
9	VAV2	41	92.4
10	NET1	32	100
10	ARHGAP21	84	99
10	PTEN	19	100
11	CFL1	9	100
11	ARHGAP20	49	100
12	ARHGDIB	14	100
13	STARD13	55	100
14	ARHGAP5	44	96.7
14	DAAM1	54	100
15	RASGRF1	71	97.8
15	AKAP13	125	100
16	CDH1	47	100
17	TP53	15	56.7
17	ARHGAP44	37	98.4
17	CDC27	38	100
17	RAC3	13	95.4
18	ROCK1	68	96.3
19	VAV1	45	95.7
19	GRLF1	46	96.7
22	RAC2	21	98.8
Panel 1 Total		1504	98.9

chr	gene	# of amplicons	coverage(%)
1	MACF1	338	95.8
2	DNAH7	177	95.6
3	CTNNB1	25	75.3
3	PBRM1	74	97
3	PIK3CA	51	93.8
4	FAT4	172	94.5
5	APC	97	87.7
6	PKHD1	196	90.1
6	ARID1B	85	92.9
7	MLL3	202	92.4
12	KRAS	11	100
12	ARID2	73	95.9
17	KIF2B	24	100
Panel 2 Total		1525	93.5

表 2. 標的遺伝子と Amplicons

**Panel1** 33 遺伝子、1504 amplicons  
*RHOA* と *RHOA* 関連 26 遺伝子（黄）  
 高頻度変異 6 遺伝子（緑）

**Panel2** 13 遺伝子、1525 amplicons  
 既知の変異 13 遺伝子（緑）

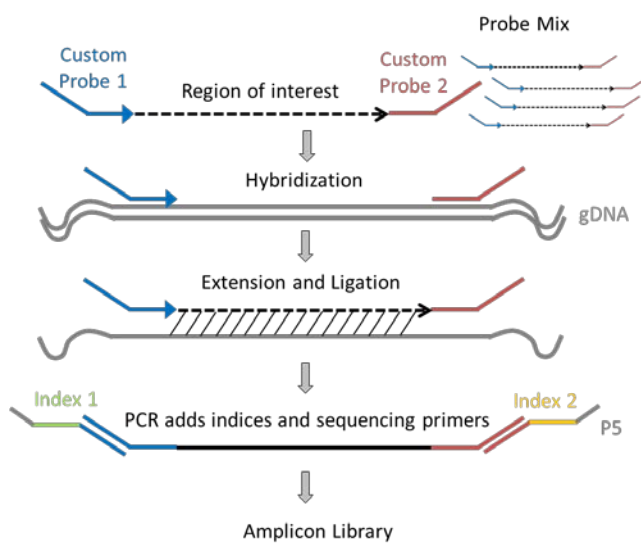


図 4. アンプリコンシーケンス ライブラリー作成

## 5) サンガーシーケンス

*RHOA* 変異の validation として、Sanger 法によるシーケンスを行った。*RHOA* 遺伝子の第 2 exon 領域、第 3 exon 領域をそれぞれ PCR 反応によって増幅し、PCR 産物をテンプレートとして、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)を用いたシーケンス反応を行った。PCR およびシーケンス反応で用いた primer は表 3 の通りである。

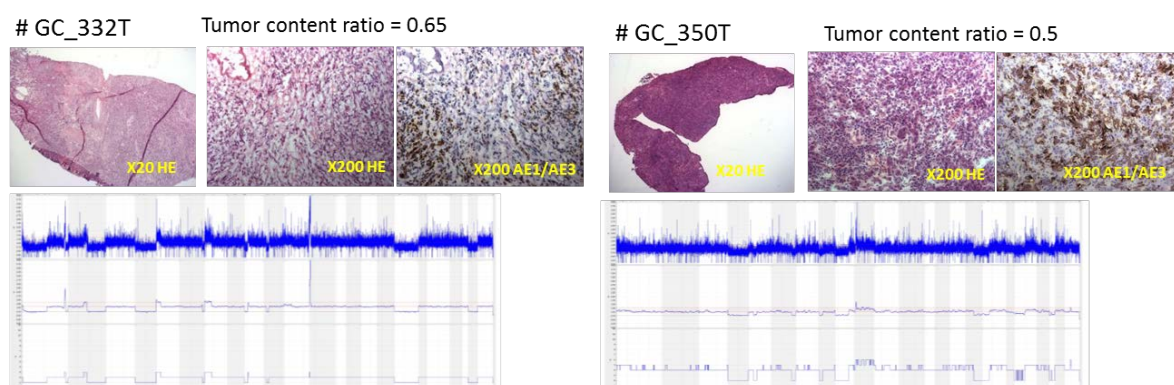
Primer sequences used in amplicon sequencing	
RHOA forward	5'-gacttcttgtgcattgcaggtaa-3'
RHOA reverse	5'-atgctaaggacaccatgtcaaa-3'
Primer sequences used in sanger sequencing	
RHOA exon2 forward	5'-ggatcggcgtactagaagtttg-3'
RHOA exon2 reverse	5'-aacttggaactaagatggcagg-3'
RHOA exon3 forward	5'-ttccattacaggtagagttg-3'
RHOA exon3 reverse	5'-agggccactcacctaaactatc-3'

表 3. 使用した primer 配列

## 4. 結果

### 1) びまん性胃癌の全エクソームシーケンス(WES)

30 例のびまん性胃癌症例の癌部および正常部における WES の結果、癌部で平均 102x、正常部で平均 99x の coverage であり、推定腫瘍率は 20%未満から 65%と算出された。元来、腫瘍率が低いと予想されるサンプルであったため、凍結切片を作成後、HE 染色および pan-cytokeratin 抗体(AE1/AE3)での免疫染色を行い、肉眼的に腫瘍部を可視化した。WES のデータから推定された腫瘍率と、copy number alteration (CNA)、組織写真を比較すると(図 5)、腫瘍率が 0.2 を下回ると CNA の判定は困難となることがわかった。一方、腫瘍率が 0.3 程度以上のサンプルでは、Chr.4 の loss、Chr.8 の gain など、WGS で報告された[17]ような IGC、DGC で共通の変化は捉えられている。DGC では CNA が少ないと言われている[17]が、やはり腫瘍率が低く正常細胞のコンタミネーションによる過小評価は否定できないと考える。



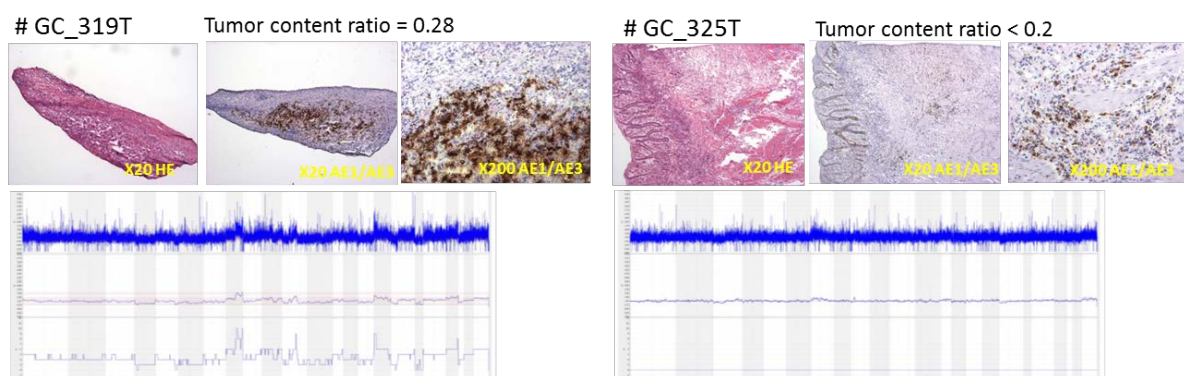


図 5. 算出腫瘍率と組織、CNA の推定

写真は HE 染色および抗 pan-cytokeratin 抗体による免疫組織化学。CNA のグラフは WES データより推定、上段からノイズを除去して再下段を算出している。

全 30 例において合計 6,616 の体細胞変異を認め、その内訳は 5,359 の一塩基置換 (Single nucleotide variations: SNVs) と 1,257 の indels であった。この変異頻度は DNA 1Mb あたり 4.4 体細胞変異となり、既報の腸型胃癌(IGC)を中心とした WES の報告[13]における microsatellite stable (MSS)症例では 1Mb あたり 3.29 体細胞変異、WGS の報告における[17]MSS 症例では 1Mb あたり 5.7 体細胞変異とされている。特に WGS の報告では、IGC に比べると DGC は SNVs が少ない傾向にあるとのことであった。WES の解析では exon 領域のキャプチャ試薬が異なり、WGS では coding 領域以外の変異も集計されることもあり、直接的な比較はできないが我々の結果と大きな相違はないと考えられた。さらに、アミノ酸変化を伴う体細胞変異は、合計 1,838 であり(1,680 SNVs と 158 indels)、1 症例あたりの平均として 56 SNVs と 5 indels であった(図 6)。なお、DGC で腫瘍率の低いサンプルでも極端に検出力が劣ることはなかった。

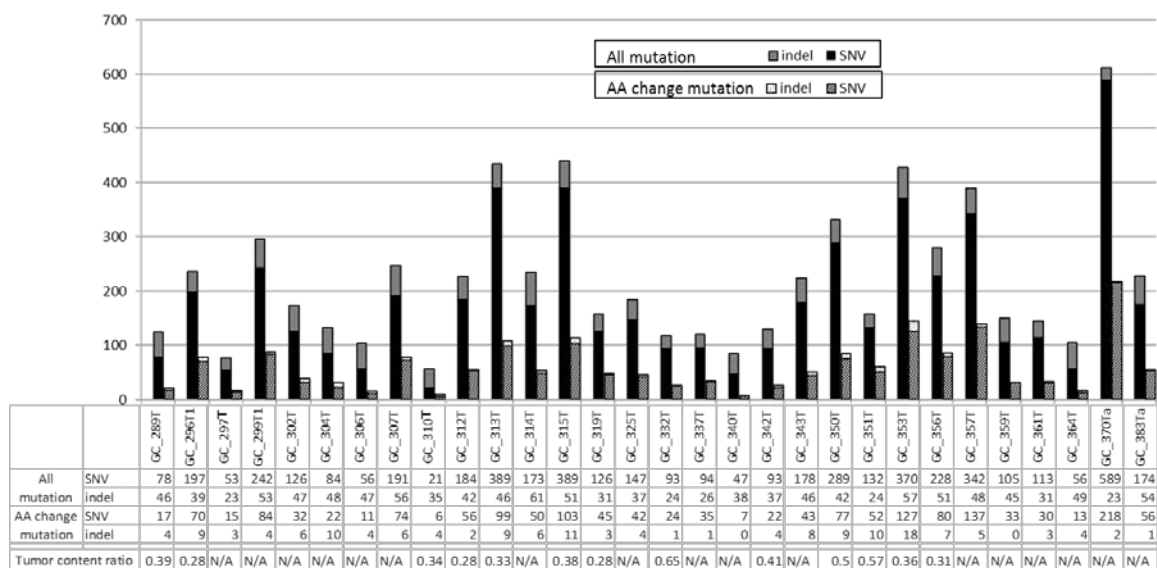


図 6. 変異数と腫瘍率

近年、癌のゲノム解析(WES, WGS)が多種癌・多症例で行われ、その変異プロファイルをまとめることで、発癌の etiology を推測・大別できると示唆されている (mutational signature)[18, 19]。従来塩基置換のパターン(6 パターン)で分類し、癌腫ごとの比較が行われてきたのに加え、最近では置換された塩基の前後の配列も含めた 96 パターンでの分類が行われている。今回の WES 結果から、既報に倣って塩基置換のパターンを分類しグラフにまとめたところ(図 7)、中心的な変異は C>T 置換であるものの、一部症例では特徴的な塩基置換 T>G を認めた(特に、GTG>GGG, CTT>CGT が目立つ)。T>G 置換をもたらす原因は不明だが、少数ながら食道癌、肝癌、B 細胞リンパ腫、および胃癌での報告がなされている[18, 20, 21]。特に CTT>CGT 置換については、ごく最近の胃癌 WGS 解析結果[17]からも注目されており、background mutation としての加齢との関連が示唆されている C>T 置換のパターンと比較して、合計の変異数が多い症例で T>G 変異が蓄積されていることから、何ら

かの additional な mutagenesis が起きていると議論されている。我々のデータでも、CTT>CGT 置換のあるサンプルでは、平均 SNVs は 303 であり、それ以外（平均 154 SNVs/サンプル）と比較して変異数が多いことがわかった。さらに、既報の IGC のデータ[13]と比較すると、T>G 置換は DGC に特徴的であり DGC の発癌・進展過程が IGC とは異なることを示唆しうる。また各サンプルで中心となる C>T 置換は、前述のように加齢との関連が示唆されているが、発癌リスクとしてのピロリ菌感染との関連として AID(activation-induced cytidine deaminase)の発現誘導による変異の関与も示唆されている[22]。すなわち、ピロリ陽性例がほとんどである日本人では、びまん性胃癌の発癌においても炎症による要素も含まれていると考えられる。なお、変異数が唯一 500 を超えていたサンプル(GC\_370Ta)について、mutational signature も他とはまったく異なるパターンを示し C>A 変異が中心を占めていた。C:G>A:T 変異は、発癌物質として肺癌におけるタバコ（ベンツピレン）[23]や肝癌におけるアフラトキシンによる変異が知られている[24]が、本症例での関連は不明である。

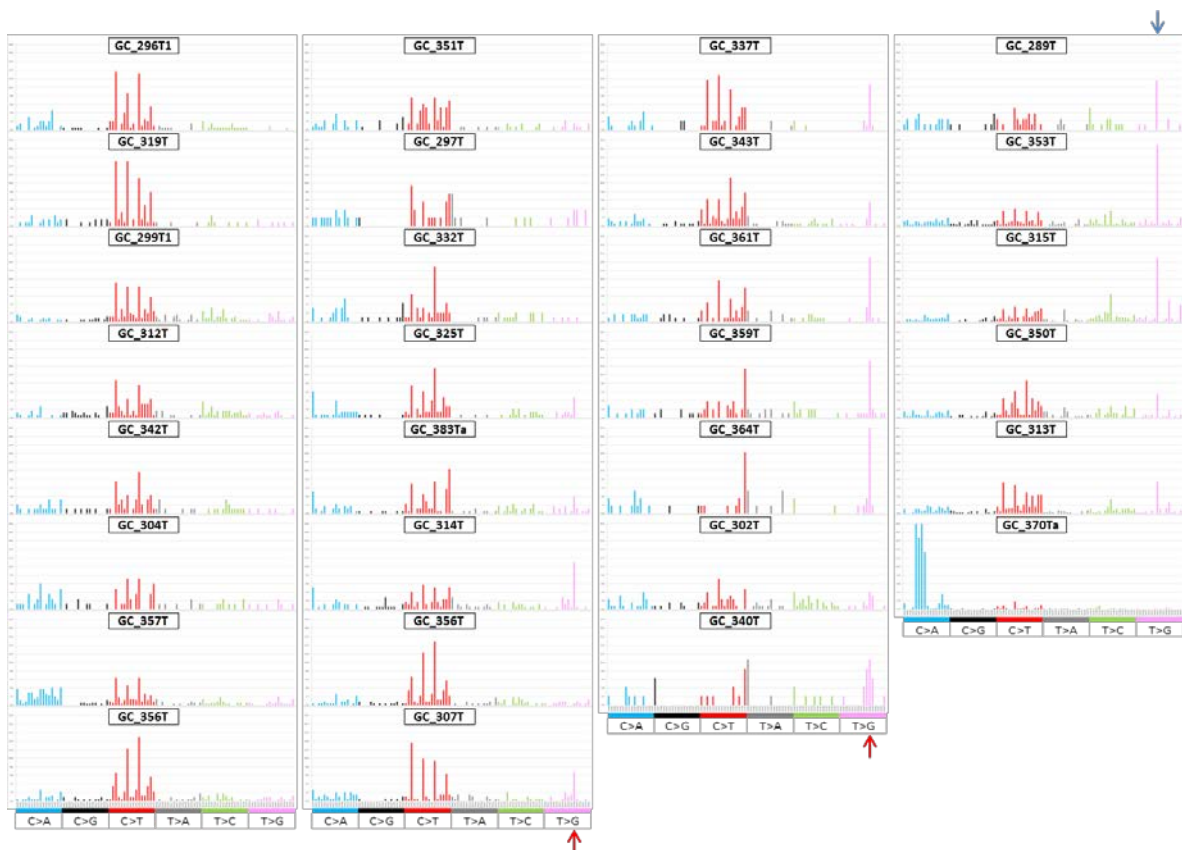


図 7. Mutational Signature

縦軸は全塩基置換中の割合を示す。赤矢印：GTG>GGG、青矢印：CTT>CGT。

次に、アミノ酸変化を伴う体細胞変異の頻度順リストは表 4 の通りであった。胃癌における変異が知られている遺伝子として、*TTN*、*TP53*、*ARID1A* の変異を認め、家族性 DGC で指摘されている *CDH1* 遺伝子の変異[7]も高頻度で認めた。*TTN*は遺伝子が非常に大きく、多種の癌で passenger mutation が多い遺伝子として知られている。そして高頻度に、新たに *RHOA* 遺伝子の変異を 23% (7/30)で認めた。さらに変異のある 7 例中 4 例において、Y42C のアミノ酸置換を引き起こす変異に集中しており、癌にとって機能獲得性の変異である可能性が示唆された。

Gene symbol	Full name	Size	# of samples bearing mut	# of distinct position	# of indel
TTN	titin	100272	11	15	0
TP53	tumor protein p53	1182	11	11	1
RHOA	ras homolog gene family, member A	582	7	4	0
ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	6858	5	5	2
CDC27	cell division cycle 27 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	2493	4	5	1
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	2649	5	5	1
KIF2B	kinesin family member 2B	2022	4	4	0
SPTA1	spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2)	7260	4	5	0
CACNA1H	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	7062	4	4	0
MUC16	mucin 16, cell surface associated	43524	4	5	1
DHFR;MSH3	dihydrofolate reductase	864	3	3	0
TLL1	tolloid-like 1	3111	3	5	1
TPRXL	tetra-peptide repeat homeobox-like, non-coding RNA	759	3	2	0
SRRM4	serine/arginine repetitive matrix 4	1836	3	3	0
GRM5	glutamate receptor, metabotropic 5	3639	3	3	1
ZNF804B	zinc finger protein 804B	4050	3	3	0
MYT1L	myelin transcription factor 1-like	3561	3	3	0
CRB1	crumbs homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	4221	3	3	0
HEATR5B	HEAT repeat containing 5B	6216	3	2	0
NCKAP5	NCK-associated protein 5	5730	3	3	0
STAB1	stabilin 1	7713	3	3	0
DMD	dystrophin, Dp71	11058	3	3	0
RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)	14904	3	4	0
DYNC2H1	dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1	12945	3	3	2
SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	26394	3	3	0

表 4. Recurrently mutated genes

3 症例以上で同定された変異遺伝子。

## 2) びまん性胃癌における遺伝子変異

*RHOA*およびその関連遺伝子を標的としたターゲットリシーケンスと WES の結果を統合した変異遺伝子一覧を示す(表 5)。この中には、当初の WES では検出できなかった変異が、deep sequencing を行ったことで判明する例もあった。逆に、遺伝子によっては amplicon の設計上、ターゲットリシーケンスでは設計され得なかった領域は同定できないこともあった(表 6、図 8)。また、WES で比較的高頻度に変異を認めた *CDC27* は、ターゲットリシーケンスでは変異として同定されなかった。その理由としては、実際は germline variants であったが、WES では対照の正常サ

ンプルで変異アリルが検出限界以下であったことで、体細胞変異としてカウントされていたことが判明した。WES とターゲット解析両方を行った 30 例に対し、両方で同定された遺伝子変異のアリル頻度について比較すると、ややばらつきはあるものの、近似式は  $Y \div X$  となりほぼ一致していた(図 9)。

Gene	samples	(percentage)
TP53	30	(34%)
CDH1	29	(33%)
RHOA	22	(25%)
ARID1A	13	(15%)
PIK3CA	4	(5%)
MACF1	4	(5%)
FAT4	4	(5%)
KIF2B	4	(5%)
ARHGEF13(AKAP13)	3	(3%)
PTEN	3	(3%)
VAV1	2	(2%)
ARHGEF28(RGNEF)	2	(2%)
ARHGAP7(DLC1)	2	(2%)
APC	2	(2%)
PKHD1	2	(2%)
VAV3	1	(1%)
RASGRF1	1	(1%)
ARHGAP5	1	(1%)
ARHGAP35(GRLF1)	1	(1%)
ARHGAP44	1	(1%)
DAAM1	1	(1%)
ARID1B	1	(1%)
ARID2	1	(1%)
PBRM1	1	(1%)
MLL3	1	(1%)
KRAS	1	(1%)
CTNNB1	1	(1%)
FGFR1	1	(1%)
DNAH7	1	(1%)

表 5. DGC におけるターゲット解析および、WES の結果  
遺伝子変異の頻度順にソートした。

	Whole exome sequencing	Targeted resequencing	Common
TP53	10	8	6
RHOA	7	10	7
ARID1A	3	4	3
CDH1	4	8	3

表 6. DGC におけるターゲット解析および、WES の結果比較 1

変異頻度の高い 4 遺伝子において、WES を行った 30 例に関して比較。TP53 はターゲット解析で amplicon がカバーできない領域が多かった(表 2, 図 x 参照)

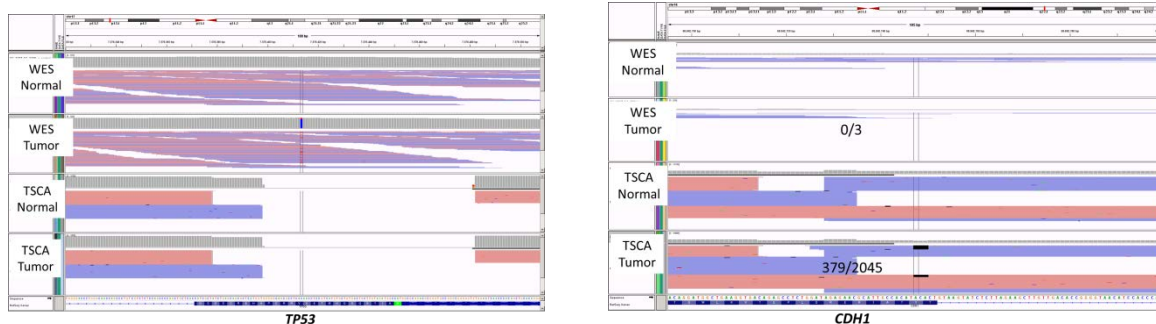


図 8. DGC におけるターゲット解析および、WES の結果比較 2

(A) *TP53* はターゲット解析で amplicon がカバーできない領域あり。(B) 一方、WES では depth がなく同定できなかった変異がターゲット解析で判明する例もあった。

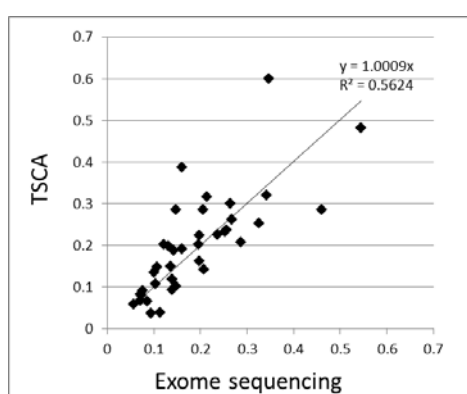


図 9. DGC におけるターゲット解析および、WES の結果比較 2

両方で同定された変異のアリル頻度分布について、線形近似を行った。

87 例のびまん性胃癌において、22 例(25%)で *RHOA* 遺伝子の変異を認めた(表 5)。

*RHOA* 遺伝子の変異をさらに確認するため、Sanger 法でのシーケンスも行った。

その結果、WES あるいはターゲットリシーケンスで 6%以上のアリル頻度で同定された塩基置換に関しては、Sanger 法でも検出可能であったが、アリル頻度が低いも

のに関しては、Sanger 法では検出限界となった(表 7)。DGC のような腫瘍率が低い

と予想されるサンプルにおける変異の検出には、次世代シーケンサーを用い、さら

にできる限り deep にシーケンスすることが必須であると考えられた。なお、アリ

ル頻度が低いサンプルでは、場合によっては background mutation として背景粘膜

に変異が存在する可能性も否定はできない[25]。これを明らかにするためには、single

cell レベルでの解析や、laser capture microdissection による腫瘍細胞の抽出が必要となる。

Sample	Mutatic	Estimated TC	Sanger	RHOA(TSCA)			RHOA(Nextera)			RHOA(exome)			ITC adjusted
				mut read	depth	ratio	mut read	depth	ratio	mut read	depth	ratio	
GC15T	R5W			57	5664	0.01	747	70744	0.01				
GC383Ta	Y42C	N/A	0	61	3718	0.02				8	265	0.03	0.15
GC22T	L69R		0	161	8730	0.02							
GC16T	R5W		0	114	5201	0.02	1309	81288	0.02				
GC164T	W58S		1	259	7744	0.03							
GC267T	E54K		0	212	4210	0.05							
GC16T	R68P		0	535	9188	0.06							
GC302T	L22R	N/A	1	520	8008	0.06				7	82	0.09	0.43
GC359T	R5Q	N/A	1	372	4119	0.09				2	54	0.04	0.19
GC224T	V38G		1	373	3934	0.09							
GC307T	R5W	N/A	1	352	3283	0.11				5	48	0.10	0.52
GC286T	Y42C		1				12072	87899	0.14				
GC342T	R5W	0.41	1	555	3542	0.16				3	20	0.15	0.37
GC315T	Y42C	0.38	1	1146	5690	0.20				11	90	0.12	0.32
GC313T	Y42C	0.33	1	1200	5161	0.23				25	99	0.25	0.77
GC140T	G17E		1	1648	7044	0.23	12041	52426	0.23				
GC136T	G17E		1	1552	5980	0.26	12258	47050	0.26				
GC299T1	Y42C	N/A	1	1407	4947	0.28				30	146	0.21	1.03
GC241T	G17E		1	1721	5965	0.29							
GC332T	Y42C	0.65	1	1081	3613	0.30				29	110	0.26	0.41
GC356T	Y74D	0.31	1	879	2790	0.32				13	61	0.21	0.69
GC73T	R5W		1	2226	5378	0.41	25861	65339	0.40				
GC172T	L69R		1	2260	5092	0.44							

表 7. *RHOA* 変異についてターゲット解析(TSCA)、サンガーシーケンス、WES の結果比較  
変異アリル頻度は 0.01 から 0.44 までと幅広く、腫瘍率の差を反映していると考えられる。赤字のものはアリル頻度 0.05 未満を示す。アリル頻度 0.05 以下は Sanger 法では検出困難であった。青字は WES で depth が少ないために統計的に変異が同定できなかったもの。アリル頻度は、ターゲット解析と同等であり、正しい結果であった。

腫瘍率を勘案すると、変異アリル頻度は 0.5 前後が多いと推定されるが、一部サンプルでは 1 に近く、LOH も併存している可能性が示唆される。

*RHOA* タンパクにおけるアミノ酸置換部位は、上述した Y42C (6/22)、R5W/Q (6/22)、次いで G17E (3/22)に集中していた(図 10)。これらアミノ酸は、ヒト以外の *RHOA* や、ヒトの *RHO* family において保存されており、構造・機能上重要であると考えられる。特に Y42 は core effector region と呼ばれ、エフェクター分子や RhoGEFs、RhoGAPs との相互作用に重要な部分に含まれている。また、RhoGEFs, RhoGAPs, エフェクター分子らを含めると、36% (31/87)の症例で *RHOA* 関連遺伝子に変異を認めた。



図 10. RHOA 構造とアミノ酸置換部位

なお、*RHOA* および関連遺伝子の変異と、その他の高頻度に変異を認める遺伝子 (*TP53*, *CDH1*, *ARID1A*) との症例の偏りは、明らかではなかった。また、*RHOA* 変異を持つ症例の臨床病理学的なプロファイル(表 8、図 11(1))は、早期癌から進行癌まで網羅されており、また組織学的にびまん性胃癌として一般的な像であることが確認された。さらに予後に関して、*RHOA* 変異の有無では、全生存期間に有意差は認められなかった(図 11(2))。すなわち、粘膜内癌である早期病変でも変異が存在し、病期の進行に従って変異症例の割合が増えるわけではないことから、*RHOA* 変異は癌の *evolution* において早期のイベントであり、組織型としては区別つかないがびまん性胃癌の一つの分子生物学的なサブグループであることが示唆される。ただし、本解析症例の対象は手術症例であり、診断時に明らかに **stageIV** である症例は治療上除外されていることから、びまん性胃癌の自然史において症例の偏りが存在する可能性は否定できない。この点に関しては、**stageIV** 症例も含めた更なる検証が必要である。

ID	Mutation detection	Age(y)	Gender	Site of tumor	Borrmann	UICC stage	Stage T	Stage N	Stage M	Histological grade	Lauren's classification	<i>RHOA</i>	
GC299	exome	70-80	M	U		0(IIa+IIc)	IB	T1b	N1	M0	poor	diffuse	Y42C
GC302	exome	60-70	M	L		3 IIA	T2	N1	M0	poor	diffuse	L22R	
GC307	exome	70-80	M	L		5 IB	T2	N0	M0	poor	diffuse	R5W	
GC313	exome	80-90	M	L		3 IV	T4a	N3a	M1	poor	diffuse	Y42C	
GC315	exome	60-70	F	M		3 IIIB	T4a	N2	M0	poor	diffuse	Y42C	
GC332	exome	70-80	F	M		3 IIIB	T4a	N2	M0	poor	diffuse	Y42C	
GC356	exome	60-70	F	U		0(IIc+IIa)	IIIB	T1b	N3b	M0	poor (signet)	diffuse	Y74D
GC342	TSCA	60-70	M	M		3 IIIA	T3	N2	M0	poor	diffuse	R5W	
GC359	TSCA	40-80	M	L		3 IIIB	T3	N1	M0	poor	diffuse	R5Q	
GC383	TSCA	70-80	M	U		5 IIIC	T4a	N3a	M0	poor	diffuse	Y42C	
GC15	TSCA	50-60	M	M		0(IIc)	IA	T1a	N0	M0	poor(signet)	diffuse	R5W/R68P
GC16	TSCA	80-90	F	U		0(IIc)	IA	T1a	N0	M0	poor	diffuse	R5W
GC22	TSCA	50-60	M	M		3 IV	T4a	N2	M1	poor	diffuse	L69R	
GC73	TSCA	60-70	M	L		0(IIc+IIa)	IA	T1a	N0	M0	poor	diffuse	R5W
GC136	TSCA	60-70	F	M		3 IIIC	T4a	N3b	M0	poor	diffuse	G17E	
GC140	TSCA	40-50	M	L		3 IIA	T3	N0	M0	poor	diffuse	G17E	
GC164	TSCA	70-80	F	M		4 IIIC	T4a	N3b	M0	poor(signet)	diffuse	W58S	
GC172	TSCA	50-60	M	M		4 IIIC	T4a	N3a	M0	poor(signet)	diffuse	L69R	
GC224	TSCA	60-70	M	L		3 IIIB	T4a	N0	M0	poor	diffuse	V38G	
GC241	TSCA	40-50	F	M		3 IIIC	T4a	N3a	M0	poor (signet)	diffuse	G17E	
GC267	TSCA	60-70	F	M		3 IV	T4a	N3a	M1	poor	diffuse	E54K	
GC286	TSCA	70-80	M	M		0(IIc)	IA	T1b	N0	M0	poor(signet)	diffuse	Y42C

表 8. *RHOA* 変異症例

Stage 分類は UICC TNM 分類第 7 版(2010)による。

(1)

		RHOA wild N=65		RHOA mutant N=22		
		N	(%)	N	(%)	p-value
Gender	Male	37	57	14	64	0.581 <sup>*1</sup>
	Female	28	43	8	36	
Age	Mean	62.8		65.1		0.4519 <sup>*2</sup>
	Median	62		66		0.3608 <sup>*3</sup>
stage T	T1	11	17	6	27	0.198 <sup>*1</sup>
	T2	1	2	2	9	
	T3	16	25	3	14	
	T4	37	57	11	50	
stage N	N0	27	42	7	32	0.861 <sup>*1</sup>
	N1	7	11	3	14	
	N2	9	14	4	18	
	N3	22	34	8	36	
stage M	M0	54	83	19	86	0.717 <sup>*1</sup>
	M1	11	17	3	14	
UICC stage	I	10	15	6	27	0.597 <sup>*1</sup>
	II	21	32	5	23	
	III	23	35	8	36	
	IV	11	17	3	14	

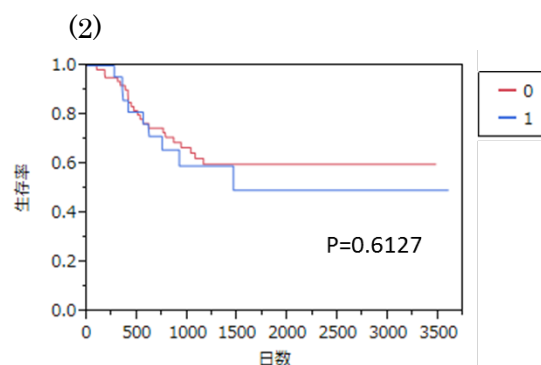


図 11. *RHOA* 野生型と変異型の比較

(1) 患者背景 \*1  $\chi^2$  test, \*2 t-test, \*3 Mann-Whitney's U test

(2) 生存曲線 *RHOA* 野生型 = 0, *RHOA* 変異型 = 1

今回新規変異遺伝子として同定された *RHOA* のほか、最も多かった変異遺伝子は *TP53* 遺伝子であった。*TP53* は癌抑制遺伝子として多くの癌種で重要な遺伝子であり、その機能を失うことで遺伝子変異の蓄積、細胞の異常増殖など発癌への関与が明らかになっている。ただしその変異は腫瘍の増大に伴って増える晩期イベントでもあり、実際に臨床病期との関連でもステージの進行とともに変異頻度が増加している

(表 9)。この点が先述した *RHOA* 変異との相違でもある。また、その機能喪失の機序として多くの癌で、2 コピーのうち的一方を欠失し(LOH)、もう一方に突然変異があることが示されている。本解析において *TP53* の変異アリル頻度を検討すると(図 12)、0.5 を超えるサンプルが認められるものは LOH があることが示唆される。さらにその他の遺伝子変異のアリル頻度から推定するとアリル頻度 0.3 未満の症例がほとんどであることから、腫瘍率は 60%未満であることが推察される。その中でも *TP53* 遺伝子はアリル頻度 0.3 以上のサンプルが散見されている。

*CDH1* 遺伝子については遺伝性 DGC の原因遺伝子として知られ、病原性のある germline variant が報告されている[7, 26-30]。今回解析症例について、germline variant (dbSNP 含む)も含めて検討してみると、表 10 の通りとなった。*CDH1* の機能喪失に関して今回の解析においては、1 症例において体細胞変異が 2 つある症例が 3 例、病原性のある SNP(rs35572355)と体細胞変異を 1 つもつ症例が 2 例あり、癌原性に大きな役割を担っていると考えられる。LOH については、*TP53* と同様にアリル頻度からの推定で高アリル頻度(>0.3)のサンプルも存在する(図 12)。ただし、*TP53*、*CDH1* いずれにおいても、ターゲット解析症例では腫瘍率の推定が困難であることから判断が難しく、検討不十分である。また、ゲノムの変化のみならず、エピゲノム(プロモーター領域のメチル化)についても今後検討する必要がある。

		TP53 wild N=57		TP53 mutant N=30		p-value
		N	(%)	N	(%)	
UICC stage	I	14	25	2	7	0.019 <sup>*1</sup>
	II	19	33	7	23	
	III	14	25	17	57	
	IV	10	18	4	13	

表 9. TP53 変異症例の UICC 病期

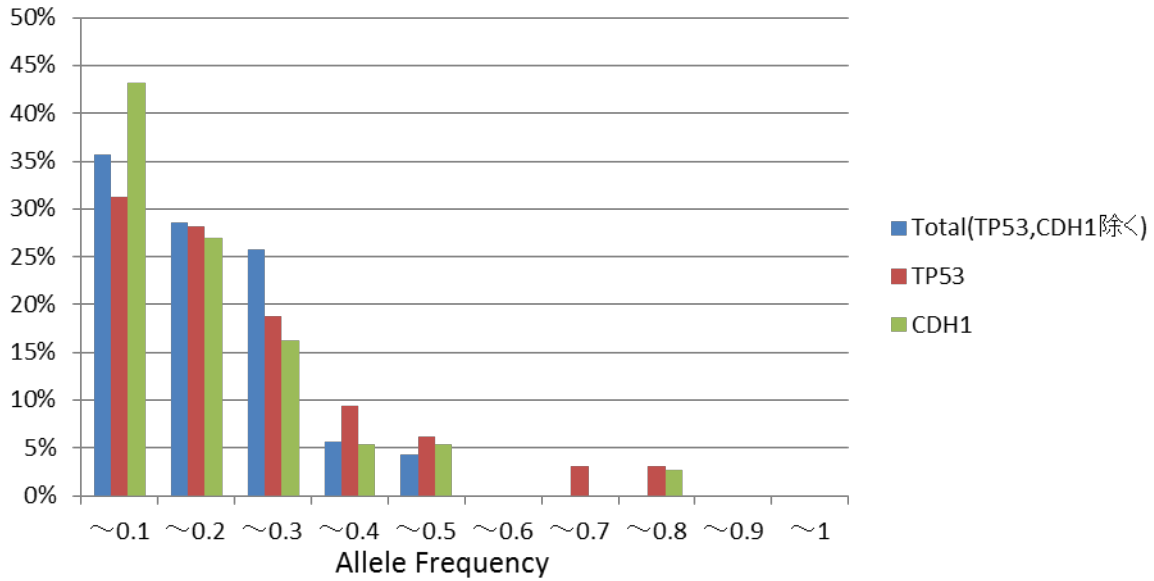


図 12.変異遺伝子のアリル頻度分布

*TP53*、*CDH1* を除いた遺伝子変異のアリル頻度は、0.3 未満のものが 90%を占める。一方、*TP53*は 0.3 未満は 78%、*CDH1* は 86%である。

(次ページ)

表 10.*CDH1* 遺伝子の体細胞変異と SNPs

A: rs3743674 C>T (intronic)

B: rs1801552 T>C A692A

C: rs35686369 insA (intronic)

D: rs33964119 C>T N751N

\*: Tolerated (0.41) in SIFT database、 \*\*: Damaging (0.02) in SIFT database

Sample ID	Somatic Mutation		GermLine Variation						Known pathogenic Variant
	1	2	Common Variant				Rare Variant		
			A	B	C	D			
G023T	splicing(c.687+1G>T)	G238R	1	1					
G059T	R74X	D254V	1	1					
G0231T	W155G	F516C	1						
G0224T	L214P		1					rs35572355 (V832M)	
G0297T	F205S		1					rs35572355 (V832M)	
G04T	T229fs		1	1					
G06T	splicing(c.687+1G>C)		1	1			chr3:68847421 T>C (intronic)		
G016T	splicing(c.531+2T>C)		1	1			chr3:68835786 P126Q *		
G026T	R154G		1	1			chr3:68842784 G>A (intronic)		
G052T	C163X		1						
G054T	V473fs		1	1	1				
G072T	L230R		1						
G087T	splicing(c.1320+1G>T)		1	1					
G094T	splicing(c.531+1G>A)		1	1					
G0128T	V119fs		1	1	1	1			
G0146T	K440N		1	1	1	1			
G0208T	L214P		1	1	1		rs2276330 T>Q (intronic)		
G0213T	E165Q		1						
G0248T	L175fs		1	1					
G0252T	splicing(c.1320+1G>T)		1	1					
G0302T	Y229fs		1	1					
G0307T	D254N		1	1					
G0314T	D288V		1	1	1	1	chr3:68772153 G>A (intronic)		
G0332T	V473D		1	1					
G0337T	P593S		1						
G0342T	splicing(c.1008-2A>C)		1	1					
G0350T	splicing(c.1320+1G>A)		1						
G0356T	splicing(c.523,531delp.175,177del)		1						
G0370T	D254Y			1					
G0319T			1	1			rs34507583 E880K **		
G013T			1	1					
G015T			1	1					
G022T			1	1			rs35667437 G>A (intronic)		
G038T			1	1	1	1			
G039T			1	1					
G049T			1						
G061T			1						
G065T			1	1					
G073T			1	1	1	1			
G074T			1	1					
G077T			1	1					
G097T			1	1	1	1			
G099T			1	1					
G0121T			1	1					
G0129T			1	1					
G0135T			1	1					
G0136T			1	1	1	1			
G0140T			1	1					
G0142T			1	1					
G0158T			1	1					
G0164T			1	1					
G0166T			1	1	1				
G0171T			1	1	1	1			
G0172T			1	1					
G0183T			1						
G0211T			1	1					
G0221T			1						
G0226T			1	1					
G0241T			1	1					
G0244T			1	1			rs2276330 T>Q (intronic)		
G0245T			1	1					
G0261T			1	1					
G0267T			1	1					
G0270T			1	1					
G0278T			1	1			rs2276330 T>Q (intronic)		
G0286T			1	1					
G0289T			1	1					
G0296T			1	1					
G0299T			1	1					
G0304T			1	1					
G0306T			1	1					
G0310T			1						
G0312T			1	1					
G0313T			1	1			chr3:68852008 A>G (intronic)		
G0315T			1	1					
G0325T				1					
G0328T			1	1					
G0340T			1	1	1	1			
G0343T			1	1					
G0344T			1						
G0351T				1	1				
G0353T			1	1			rs2276330 T>Q (intronic)		
G0357T			1	1					
G0359T			1	1	1	1	chr3:68835873 G>A (intronic)		
G0361T			1	1			chr3:68855849,68855850 insT (intronic)		
G0364T			1	1					
G0383T			1	1					

### 3) 腸型胃癌(IGC)とびまん性胃癌(DGC)の遺伝子変異比較

既報の IGC を中心とした WES 結果では *RHOA* 変異は指摘されていない[13] [14] が、我々のコホートは日本人に限定されており人種、生活習慣などによる相違も懸念される。*RHOA* 変異が DGC に特異的であるか確認するため、びまん性胃癌と同期間に採取された腸型胃癌 51 例のサンプルを用いて、びまん性胃癌と同じターゲットリシーケンスを行った。

その結果(表 11)、*RHOA* の変異は IGC では 1 例もなく、DGC に特異的であると考えられた。RhoGEFs, RhoGAP, エフェクター分子の変異は、IGC でも認められ、一概に DGC との相違は指摘できなかった。その他の特徴としては、*CDH1* の変異が 1 例しかない( $p<0.001$ )、*TP53*, *PIK3CA*, *KRAS*, Wnt pathway 関連遺伝子は IGC でより多く認められた(表 12)。なお *TP53* に関しては、DGC での WES との比較で明らかになったように、ターゲット解析で評価できない領域があるため、実際の変異数はより多くなる可能性がある。

最後に、DGC と IGC の結果をまとめると、図 13 のようになった。

Gene	samples	(percentage)
TP53	22	(43%)
PIK3CA	7	(14%)
ARID1A	6	(12%)
KRAS	6	(12%)
APC	5	(10%)
MACF1	4	(8%)
ARHGAP7(DLC1)	4	(8%)
FAT4	3	(6%)
ARHGEF28(RGNEF)	3	(6%)
PKHD1	3	(6%)
ARHGAP5	3	(6%)
MLL3	3	(6%)
ARHGEF13(AKAP13)	2	(4%)
FGFR1	2	(4%)
DNAH7	2	(4%)
ARHGAP26	2	(4%)
ARHGAP20	2	(4%)
ARHGAP21	2	(4%)
CDH1	1	(2%)
KIF2B	1	(2%)
PTEN	1	(2%)
RASGRF1	1	(2%)
ARID1B	1	(2%)
CTNNB1	1	(2%)
ARHGEF31(ECT2)	1	(2%)
ARHGEF8(NET1)	1	(2%)
ARHGAP37(STARD13)	1	(2%)
CDC42	1	(2%)
ROCK1	1	(2%)
ROCK2	1	(2%)
RHOA	0	(0%)

表 11. IGC におけるターゲット解析結果  
遺伝子変異の頻度順にソートした。

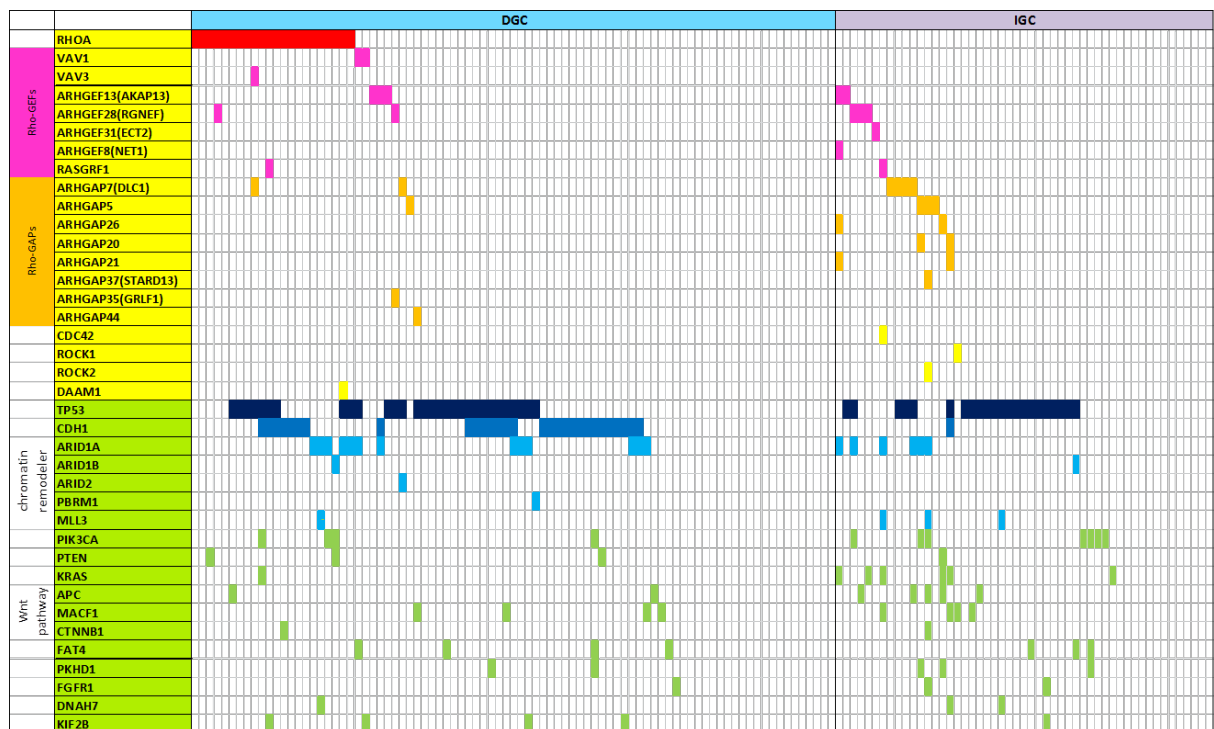
	DGC N=87	IGC N=51	P-value
RHOA	22 (25%)	0 (0%)	0.000
RHOA related genes	13 (15%)	17 (33%)	0.011
RHOA + related genes	31 (37%)	17 (33%)	0.784
TP53	30 (34%)	22 (43%)	0.311
CDH1	29 (33%)	1 (2%)	0.000
ARID1A	13 (15%)	6 (12%)	0.601
Chromatin remodelers	16 (18%)	8 (16%)	0.686
PIK3CA	4 (5%)	7 (14%)	0.056
PTEN	3 (3%)	1 (2%)	0.615
KRAS	1 (1%)	6 (12%)	0.006
APC	2 (2%)	5 (10%)	0.052
Wnt pathway	7 (8%)	9 (18%)	0.089

表 12. DGC と IGC の変異遺伝子比較

Chromatin remodelers : *ARID1A*, *ARID1B*, *ARID2*, *PBRM1*, *MLL3*

Wnt pathway : *APC*, *MACF1*, *CTNNB1*

遺伝子群の変異数は、変異サンプル数である。1 サンプルが重複して変異を持つ場合は 1 変異としてカウントした。



☒ 13. Mutation overview

## 5. 考察

びまん性胃癌は、組織学的に腺管構造をほとんど作らない低分化腺癌もしくは印環細胞癌であり、胃粘膜上皮の形態学的な性質を失っていると考えられる。その背景の1つとして、既知の癌抑制遺伝子である *CDH1* の変異が DGC にほぼ特異的であることが確認され、上皮細胞における接着因子の重要性が再確認された。さらに今回、DGC 特異的に *RHOA* 遺伝子の変異が新たに同定された。

*RHOA* タンパクは、細胞の遊走能、浸潤能や代謝に関与することが知られており、今まで多癌種において高発現の報告は数多くあった[31]。しかし *RHOA* 遺伝子の変異に関してはごく最近、リンパ腫のサブタイプである血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫において、G17V の変異が 53-68%で認められるという報告がなされた[32, 33]。その *RHOA* 変異体の機能は本来の活性を失い GDP 結合型で安定化し、wild-type *RHOA* を阻害し dominant-negative 作用があると想定されている。しかし DGC では同部位のアミノ酸でも G17E と変異アミノ酸は異なっていること、Y42 や R5 も hot spot であることなどいくつかの相違点があり、組織別に *RHOA* 変異体の役割が異なる可能性がある。また、Wang らの報告[17]や TCGA の報告[34]でも DGC における *RHOA* 変異が指摘されており、我々の結果と合わせると図 10 のように Y42C への集積が顕著となる。また、domain としても、G Box もしくは Core effector region に変異が集中していることが明らかであり、びまん性胃癌にとってはなんらかの機能獲得性変異であると考えるのが妥当であろう。

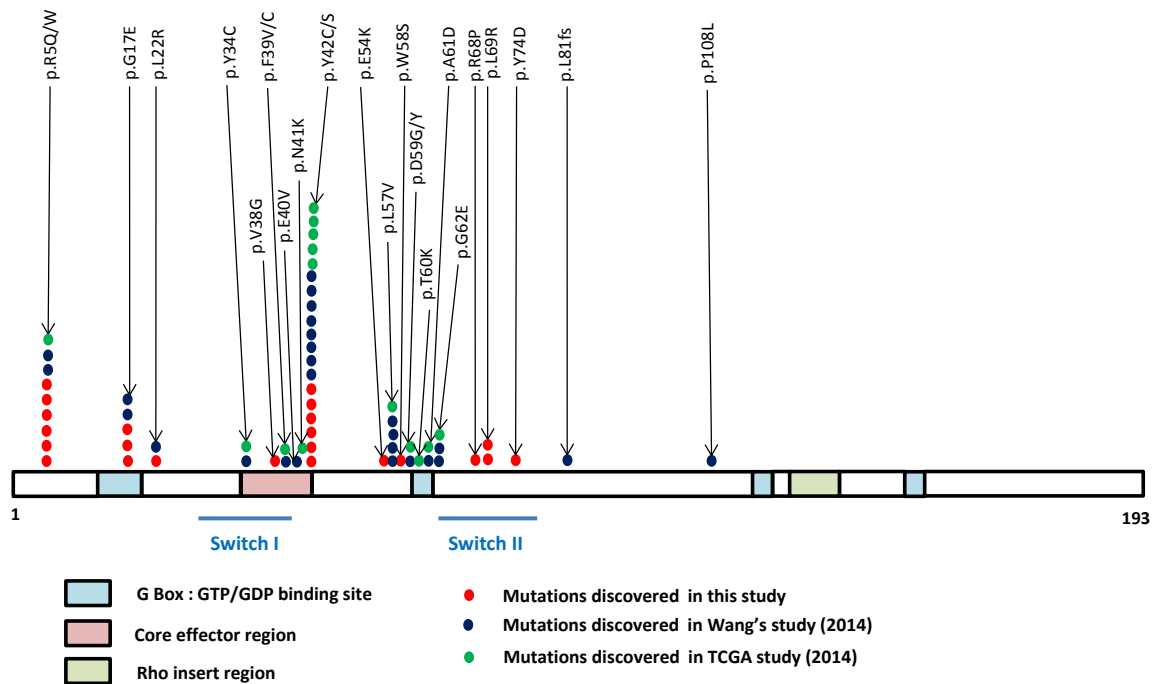


図 14. 胃癌における RHOA 変異

我々の共同研究((株)未来創薬研究所)においては RHOA 変異体の機能解析として、Y42、G17 の変異を有する細胞株を用いた siRNA 実験を行い、コントロール siRNA では細胞増殖に影響はない一方で、RHOA siRNA では抑制されることが判明した。さらに、siRNA で発現抑制されない変異 RHOA(Y42C, G17E)を強制発現させておくと、*RHOA* siRNA での細胞増殖抑制がキャンセルされた。すなわち、これら RHOA 変異体を有する細胞株では、RHOA 依存的に生存していることが示唆され、治療標的となりうるドライバー変異であると考えられた[35]。

また RHOA 変異症例 22 症例中には、HER2 の免疫染色では陽性例は 1 症例のみであった(東京大学病理部との共同研究結果)ことから、既存の分子標的治療の対象とされないサブグループであり、RHOA あるいはそのエフェクター分子が治療標的と

なることが期待される。また、同一症例で粘膜内の病変と、浸潤部の病変それぞれにおいて、*RHOA* の変異を確認したところ、双方の病変において変異が確認された[35]。早期癌でも変異は認められ、進行癌でも腫瘍内で均一に変異があることから、*RHOA* 変異は発癌もしくは癌の進行における早期のイベントであり、治療標的として有力である。

今後、変異型 *RHOA* を有する癌に対する治療を考えるにあたっては、変異型 *RHOA* そのものをターゲットするか、その下流の分子・*pathway* をターゲットにする、という方法が考えうる。*RHOA* は正常細胞での役割[36-38]もあるため、変異体特異的な薬剤が癌以外の正常部の *RHOA* を阻害することのないよう工夫をする必要があるが、変異体も数種あるため、その薬剤の特異性を発揮させるのは困難と考えられる。そこで、変異型 *RHOA* のエフェクターをターゲットにすることを想定するため、発現解析、プロテオミクスといったさらなる探索的研究が必要となる。また、実際の発癌にどのように寄与しているか *in vivo* での解析も重要であり、モデルマウス等の作成も検討される。

なお、*E-cadherin* と *p53* のダブルノックアウトマウスが *DGC* のモデルマウスとして知られているが、今回の変異解析からは 87 症例中 10 例(11.5%)のみが両方の遺伝子変異を持っていることが判明した。*CDH1* 変異はびまん性胃癌の性質を反映しているとは言えるが、機能喪失性変異であると考えられ直接の治療標的としては困難であろう。このように *DGC* と一口に言っても、そのゲノムプロファイルは多様であり、

共通のドライバー遺伝子、pathway のみによって発癌・維持されているとは限らない。

将来的には、症例ごとの癌の性質に合わせた個別化治療が望まれているが、今回、機能獲得性変異と考えられる *RHOA* 遺伝子変異をもつという、DGC のうち 25%を占める新たなサブクラスを同定することができ、診断だけでなく治療においても症例の選別に貢献できると期待される。

次世代シーケンサーの登場により、ゲノム病と言える癌のプロファイルはかなり詳細に解明されてきており、各癌種における変異情報のカタログ化は進んでいる。しかし、癌の全貌を明るみにし、さらに治療への手がかりとするにはまだ必要なデータがそろっているとは言えない。そこではゲノム情報だけでなく、RNA の解析 (expression, transcript variant, fusion gene, RNA editing 等)、エピゲノムの解析、proteomics 等、情報をいかに統合して新たな知見を得られるかどうか、課題は大きい。

## 6. 結語

本研究では、次世代シーケンサーを用いて、網羅的ゲノム解析とより高感度な遺伝子変異解析を行うことで、臨床的、病理組織学的な特徴を有するびまん性胃癌の遺伝子変異プロファイルを明らかにした。特に、びまん性胃癌特異的に *RHOA* 遺伝子の変異を新たに同定し、そのアミノ酸変化の様式から、びまん性胃癌にとって機能獲得性変異であると示唆され、新たな治療標的となる可能性がある。

## 7. 参考文献

1. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]*. International Agency for Research on Cancer, 2013( Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 17/8/2014. ).
2. Henson, D.E., et al., *Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type*. Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(7): p. 765-70.
3. Hayashi, T., et al., *The superiority of the seventh edition of the TNM classification depends on the overall survival of the patient cohort: comparative analysis of the sixth and seventh TNM editions in patients with gastric cancer from Japan and the United Kingdom*. Cancer, 2013. **119**(7): p. 1330-7.
4. Kaneko, S. and T. Yoshimura, *Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989*. Br J Cancer, 2001. **84**(3): p. 400-5.
5. 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 Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
6. Endo, K., et al., *Biological significance of localized Type IV scirrhus gastric cancer*. Oncol Lett, 2012. **3**(1): p. 94-99.
7. Guilford, P., et al., *E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer*. Nature, 1998. **392**(6674): p. 402-5.
8. Sugimoto, S., et al., *Early-onset diffuse gastric cancer associated with a de novo large genomic deletion of CDH1 gene*. Gastric Cancer, 2013.
9. Machado, J.C., et al., *E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma*. Oncogene, 2001. **20**(12): p. 1525-8.
10. Shimada, S., et al., *Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer*. Gut, 2012. **61**(3): p. 344-53.
11. Tanner, M., et al., *Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab*. Ann Oncol, 2005. **16**(2): p. 273-8.
12. Y. Bang, H.C., J. Xu, F. Lordick, A. Sawaki, N. Al-Sakaff, O. Lipatov, C. See, J. Rueschoff and E. Van Cutsem, *Pathological features of advanced gastric cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(15S): p. 4556.
13. Wang, K., et al., *Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer*. Nat Genet, 2011. **43**(12): p. 1219-23.

14. Zang, Z.J., et al., *Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes*. Nat Genet, 2012. **44**(5): p. 570-4.
15. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 2009. **25**(14): p. 1754-60.
16. Homer, N. and S.F. Nelson, *Improved variant discovery through local re-alignment of short-read next-generation sequencing data using SRMA*. Genome Biol, 2010. **11**(10): p. R99.
17. Wang, K., et al., *Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer*. Nat Genet, 2014. **46**(6): p. 573-82.
18. Lawrence, M.S., et al., *Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes*. Nature, 2013. **499**(7457): p. 214-8.
19. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. Nature, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
20. Dulak, A.M., et al., *Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity*. Nat Genet, 2013. **45**(5): p. 478-86.
21. Nagarajan, N., et al., *Whole-genome reconstruction and mutational signatures in gastric cancer*. Genome Biol, 2012. **13**(12): p. R115.
22. Shimizu, T., et al., *Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis*. Cancer Sci, 2012. **103**(7): p. 1201-6.
23. Pleasance, E.D., et al., *A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 184-90.
24. Smela, M.E., et al., *The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2001. **22**(4): p. 535-45.
25. Shimizu, T., et al., *Accumulation of Somatic Mutations in TP53 in Gastric Epithelium With Helicobacter pylori Infection*. Gastroenterology, 2014. **147**(2): p. 407-417 e3.
26. Yabuta, T., et al., *E-cadherin gene variants in gastric cancer families whose probands are diagnosed with diffuse gastric cancer*. Int J Cancer, 2002. **101**(5): p. 434-41.
27. Richards, F.M., et al., *Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(4): p. 607-10.
28. Suriano, G., et al., *Identification of CDH1 germline missense mutations associated with functional inactivation of the E-cadherin protein in young gastric cancer probands*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(5): p. 575-82.
29. Guilford, P.J., et al., *E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer*. Hum Mutat, 1999. **14**(3): p. 249-55.
30. Gayther, S.A., et al., *Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin*. Cancer Res, 1998. **58**(18): p. 4086-9.

31. Karlsson, R., et al., *Rho GTPase function in tumorigenesis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(2): p. 91-8.
32. Sakata-Yanagimoto, M., et al., *Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma*. Nat Genet, 2014. **46**(2): p. 171-5.
33. Yoo, H.Y., et al., *A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma*. Nat Genet, 2014. **46**(4): p. 371-5.
34. The Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014.
35. Kakiuchi, M., et al., *Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma*. Nat Genet, 2014. **46**(6): p. 583-587.
36. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
37. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
38. Olson, M.F., H.F. Paterson, and C.J. Marshall, *Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1*. Nature, 1998. **394**(6690): p. 295-9.

## 8. 謝辞

本研究を遂行する機会および御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科消化器内科教授小池和彦先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、以下の先生方に特に多大なる御協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス部門

油谷浩幸教授、上田宏生氏、後藤健吾氏、山本尚吾氏、辰野健二氏、

椎名香織氏、川辺さおり氏

東京医科歯科大学難治疾患研究所ゲノム病理学分野

石川俊平教授

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、林玲匡先生

東京大学大学院医学系研究科消化器内科

立石敬介先生、山本恵介先生