

令和元年5月16日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08687

研究課題名(和文)全ゲノムの遺伝子増幅解析による胃癌分子標的治療適応の最適化に関する検討

研究課題名(英文) Optimization of molecular-targeted therapy against gastric carcinoma by genome-wide analyses of DNA copy number alterations

研究代表者

尾山 武 (OYAMA, Takeru)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00515314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胃癌検体から抽出されたDNAを用いて、アレイCGH法による包括的な遺伝子コピー数解析を施行した。その結果から、血管内皮増殖因子A (Vascular endothelial growth factor A: VEGFA) を含む染色体領域の増幅が示唆された。VEGFA遺伝子の増幅はFISH法により追認された。続いて胃癌におけるVEGFA遺伝子増幅の頻度を算出したところ約4%であった。免疫組織学的検討により、遺伝子増幅の程度とタンパク発現の強度には有意な正の相関が確認された。VEGFA遺伝子の増幅が確認された胃癌検体においては、腫瘍微小環境に含まれるM2型マクロファージの減少が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌においては、現在、HER2に対する分子標的治療薬であるTrastuzumabおよびVEGFR2に対する治療薬であるRamucirumabが使用されている。

今後は臓器横断的な薬剤開発により、分子標的治療薬の急増が予想される。そしてこれらの治療薬の対象となる患者選定のための効果的なマーカーも必要とされることとなる。

本研究における胃癌検体に対する包括的な遺伝子コピー数の解析の結果から、VEGFA遺伝子を含む染色体領域の増幅が示唆された。VEGFAは分子標的治療であるBevacizumabの標的遺伝子であり、その遺伝子増幅は投薬の適応となる患者選定のためのマーカーとして使用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide copy number analysis in human gastric carcinoma identified an amplified gene locus including vascular endothelial growth factor A (VEGFA). VEGFA gene amplification was validated by fluorescence in situ hybridization assay. The levels of VEGFA gene amplifications were positively associated with the levels of VEGFA protein expressions. VEGFA gene amplification with VEGFA overexpression suggested to be associated with decreased M2 macrophages at the tumor front in gastric cancer.

研究分野：病理学

キーワード：array CGH gastric cancer FISH VEGFA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 切除不能な胃癌や再発した胃癌に対しては、薬物療法が主体となる。特に近年は、従来の化学療法に加えて、分子標的治療薬としてHER2に対する治療薬であるTrastuzumabおよびVEGFR2に対する治療薬であるRamucirumab、免疫チェックポイント阻害剤であるNivolumabが承認および使用されている。

HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) 陽性乳癌に対して有効であるTrastuzumabが、同じようにHER2陽性胃癌にも有効であるとして治験が行われた経緯などから、今後は特定の臓器を対象とするのではなく、臓器横断的にバイオマーカーを標的 (biomarker oriented) として薬剤開発が進められる可能性が示されたことになり、他の癌で既に承認されている多くの分子標的治療薬が、その遺伝子の変異を有する胃癌に対しても適応される可能性が高いと予想され、実際に行われようとしている。

Trastuzumabによる分子標的治療薬の対象となる患者の選定は、病理医による免疫組織学的方法を用いたHER2タンパクの過剰発現の判定あるいは、Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)/Dual Color *in situ* Hybridization (DISH)によるHER2遺伝子増幅の判定に基づく。そしてその判定は、副作用や高額な医療費による患者の心理や医療経済への負担を考えると、より厳密に行われるべきである。

(2) 分子標的治療薬には、「薬剤抵抗性」の問題もある。例えば、PIK3CA遺伝子の変異や、PTEN遺伝子の欠損を有する患者は、Trastuzumabによる治療に抵抗性を示すことが示唆されているため、その治療の対象からは除外される。分子標的治療薬が増加すると、多数の治療薬に対して「薬剤抵抗性」を示す症例を除外する必要がある。

(3) 分子標的治療薬の投与により一度腫瘍は縮小するが、そのほとんどは比較的短期間に再発する。そのメカニズムとしては、①分子標的治療薬の対象となる遺伝子あるいはシグナル伝達経路上の遺伝子変異が新たに起こる、あるいは②別の独立した遺伝子あるいはシグナル伝達経路によることが想定される。

このような「薬剤耐性」を獲得した腫瘍を有する症例に関しても、治療対象から除外することが必要となる。

2. 研究の目的

胃癌に対する分子標的治療薬およびその標的遺伝子が急増しつつあるため、またその治療薬に対する「薬剤抵抗性」を示す症例を除外するため、さらに治療後の「薬剤耐性」を示す症例を除外するために、胃癌の全ゲノムに対する遺伝子増幅の情報を包括的に得ることにより、それらに対する効果的なマーカーを検索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胃癌のホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin fixed paraffin embedded: FFPE) 検体を、年齢、性別、壁深達度、リンパ節転移、遠隔転移、全生存期間 (Overall survival: OS)、無増悪生存期間 (progression-free survival: PFS) および、無病生存期間 (disease-free survival: DFS) などの臨床病理学的な情報とともに収集した。

(2) 選出された胃癌のFFPE検体からゲノムDNAを抽出した後、そのゲノムDNAに対しアレイCGH法を施行することにより、全ゲノムにわたるコピー数変化に関するデータを得た。得られたデータからは、専用のソフトウェアを用いることにより、ゲノム上の各々の遺伝子に対して対照となる非癌部のDNAと比較することにより相対的なコピー数増加の程度を知ることができた。同様なアレイCGH法による解析を胃癌検体5検体に対して行った。

(3) アレイCGH法の結果、非癌部と比較して4倍以上のコピー数の増加が示唆された染色体領域に含まれる遺伝子から、Trastuzumab、Ramucirumabがそれぞれにおいて関与する上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF)、血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) およびその受容体などのシグナル伝達経路からまず第一に、分子標的治療薬の対象となる患者選別のためのマーカー遺伝子の候補としてVEGFA遺伝子を選出した。

(4) おおよそ100例の胃癌検体におけるVEGFA遺伝子増幅の頻度をMultiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法を用いることにより測定し、胃癌総数に対する頻度を算出した。

(5) VEGFA遺伝子増幅は、それぞれFISH法により確認された。

(6) FISH法において、遺伝子増幅が確認された検体および遺伝子増幅が認められない検体に対して、それぞれVEGFAタンパクに対する免疫染色を行い、その染色の強度を3段階に分けて評価した。

4. 研究成果

(1) 胃癌のFFPE検体に対するアレイCGHのプロファイルを示す(図1)。ゲノムの広い領域においてコピー数の増加が見られ

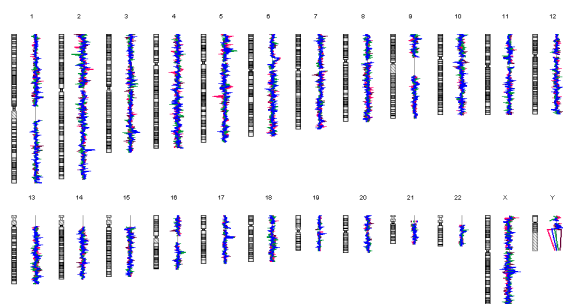


図1 胃癌における遺伝子コピー数増減のプロファイル

たが、高度な増幅（4倍以上）を示した領域に限るとそこに含まれる遺伝子はせいぜい20程度と意外に少ないことが推測された。

それらの遺伝子のうち、胃癌においてすでに治療に使用されている Ramucirumab は、VEGFR2 を標的としているため、VEGFR2 のリガンドとして知られている VEGFA が治療適応の判定のマーカーとなりうるか検討することとした。

(2) VEGFA 遺伝子増幅を確認するために、その遺伝子を含む染色体領域に対して FISH probe を作成し、胃癌 FFPE 検体約 100 例に対して FISH 法を施行した (図 2)。胃癌検体全体に対する VEGFA 遺伝子増幅の頻度は約 4% であった。

(3) VEGFA 遺伝子増幅を示す胃癌検体および遺伝子増幅の見られない検体に対して、免疫組織学的検討を行った。

免疫染色は、その発現の強さにより評価し 3 段階に分類した (図 3)。

VEGFA 遺伝子増幅の程度と VEGFA の発現強度の相関を検討したところ、有意な正の相関が確認された。

(4) タンパクの過剰発現を伴う VEGFA 遺伝子増幅と、年齢、性別、進行度、リンパ節転移、脈管侵襲などの臨床病理学的な因子との相関を検討したが、有意な相関を示すものは得られなかった。その原因としては、VEGFA 遺伝子増幅を示す胃癌の頻度が 4% と低いいため、統計学的に十分な評価ができなかったことも関係している可能性がある。

(5) VEGFA 遺伝子増幅と臨床病理学的因子との関連が明らかではなかったため、腫瘍微小環境に着目し、その遺伝子増幅が腫瘍内血管密度 (Micro vessel density: MVD) に対する影響を検索する目的で、VEGFA 遺伝子増幅を示す胃癌検体および遺伝子増幅の見られない検体に対して、CD34 および CD31 の免疫染色を行い、MVD を評価したが、統計学的に有意な差は認められなかった。

(6) 続いて、腫瘍微小環境に含まれる炎症細胞の分布に着目した。腫瘍微小環境に存在する炎症細胞のうち腫瘍細胞の近傍に見られるものは、腫瘍随伴マクロファージ (Tumor associated macrophage: TAM) と呼ばれ、腫瘍形成に関与していることが示唆されている。腫瘍随伴マクロファージは M1 型と M2 型に分類されており、特に M2 型マクロファージは腫瘍形成に対して促進的に働くことが示唆されている。胃癌の腫瘍微小環境における M2 マクロファージの数や分布と、VEGFA 遺伝子増幅との関連を検索するため、M2 型マクロファージで発現することが示唆されている CD163 に対する抗体を用いて免疫染色を行うことにより、腫瘍周囲における CD163 陽性細胞の数および分布を検索した。VEGFA 遺伝子増幅が認められた胃癌検体においては、増幅を認めない腫瘍と比較して腫瘍周囲における CD163 陽性細胞数の減少が認められた (図 4)。

以上の結果から、約 4% のヒト進行胃癌においては、VEGF タンパクの過剰発現を伴う VEGFA 遺伝子増幅がその形成に関与していることが示唆され、そのメカニズムとして CD163 陽性の M2 型マクロファージの減少が関与する可能性があることが示唆された。

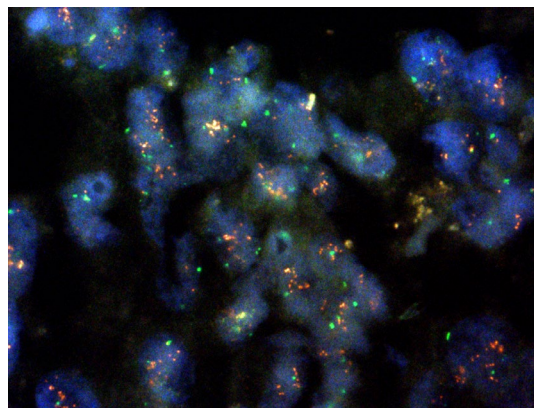


図 2 VEGFA 遺伝子に対する FISH (橙色蛍光シグナル)

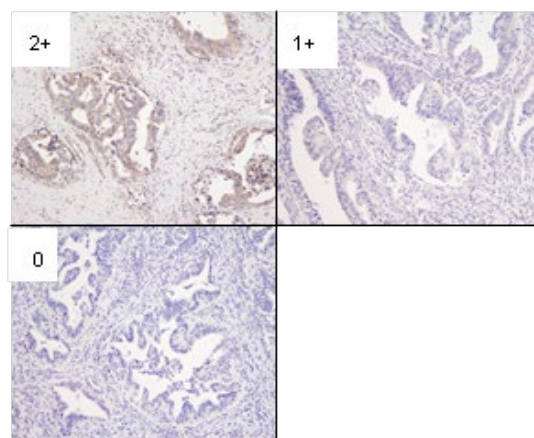


図 3 VEGF タンパクに対する免疫染色

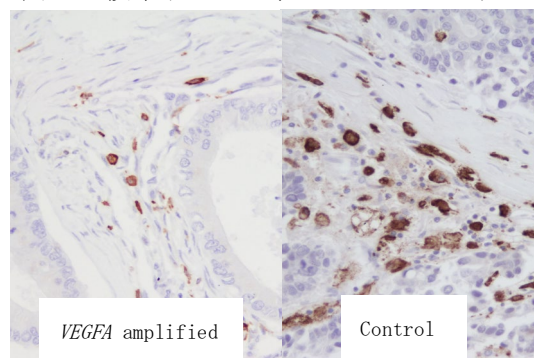


図 4 腫瘍先進部における M2 型マクロファージの分布

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Tsuda T, Tada H, Tanaka Y, Nishida N, Yoshida T, Sawada T, Sakata K, Hayashi K, Kawashiri MA, Oyama T, Sasaki M, Kurose N, Yamagishi M., Amiodarone-induced reversible and irreversible hepatotoxicity: two case reports., Journal of Medical Case Reports, 査読

有, 12(1), 2018, 95
DOI: 10.1186/s13256-018-1629-8.

②Ooi A, Oyama T., Detection of CCND1 Gene Copy Number Variations Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Fluorescence In Situ Hybridization Methods., *Methods in Molecular Biology*, 査読有, 1726, 2018, 101-109
DOI: 10.1007/978-1-4939-7565-5_10.

③Funaki M, Kitabayashi J, Shimakami T, Nagata N, Sakai Y, Takegoshi K, Okada H, Murai K, Shirasaki T, Oyama T., Yamashita T, Ota T, Takuwa Y, Honda M, Kaneko S., Peretinoin, an acyclic retinoid, inhibits hepatocarcinogenesis by suppressing sphingosine kinase 1 expression in vitro and in vivo., *Scientific Reports*, 査読有, 7(1), 2017, 16978
DOI: 10.1038/s41598-017-17285-2.

④Ooi A, Oyama T., Nakamura R., Tajiri R, Ikeda H, Fushida S, Dobashi Y., Gene amplification of CCNE1, CCND1, and CDK6 in gastric cancers detected by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization., *Human Pathology*, 査読有, 61, 2017, 58-67
DOI: 10.1016/j.humpath.2016.10.025.

⑤Tanaka T, Oyama T., Sugie S, Shimizu M., Different Susceptibilities between Apoe- and Ldlr-Deficient Mice to Inflammation-Associated Colorectal Carcinogenesis., *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 17(11), 2016, 1806
DOI: 10.3390/ijms17111806

⑥Ito T, Ozaki S, Chanasong R, Mizutani Y, Oyama T., Sakurai H, Matsumoto I, Takemura H, Kawahara E., Activation of ERK/IER3/PP2A-B56 γ -positive feedback loop in lung adenocarcinoma by allelic deletion of B56 γ gene., *Oncology Reports*, 査読有, 35(5), 2016, 2635-42
DOI: 10.3892/or.2016.4677.

[学会発表] (計 6 件)

①尾山 武., 中村 律子., 大井 章史, Effects of VEGFA amplification on the localization of macrophage and lymphocyte in gastric cancer, 第 7 7 回日本癌学会学術総会, 2018

②尾山 武., 中村 律子., 大井 章史, Effects of VEGFA amplification on the localization of tumor-associated macrophage in gastric cancer, 第 1 0 8 回日本病理学会総会, 2018

③尾山 武., 中村 律子., 大井 章史, Dosage quantification analysis of VEGFA gene in human gastric cancers by multiplex ligation-dependent probe amplification, 第 7 6 回日本癌学会学術総会, 2017

④尾山 武., 中村 律子., 大井 章史, The relationship between VEGF gene amplification and angiogenesis in advanced gastric cancer, 第 1 0 7 回日本病理学会総会, 2017

⑤尾山 武., 中村 律子., 大井 章史, The significance of gene amplification for VEGFA in human gastric cancers, 第 7 5 回日本癌学会学術総会, 2016

⑥尾山 武., 中村 律子., 大井 章史, Investigation of the frequency of VEGFA gene amplification in advanced gastric adenocarcinomas using MLPA assay, 第 1 0 6 回日本病理学会総会, 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中村 律子

ローマ字氏名：(NAKAMURA Ritsuko)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医薬保健研究域医学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：20632657

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。