

令和2年度シニア・リサーチフェロー  
**研究成果報告書**

2021年 6月20日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名： 田中 康介



研究課題： 腹水を有する難治性消化器がんの統合的ゲノム解析

研究期間： 自 2020 年 4 月 1 日

至 2021 年 3 月 30 日

研究指導者： 氏名 間野 博行



公益財団法人 がん研究振興財団

## (1) シニア・リサーチフェロ一期間中の研究について

### 1) 要旨

腹膜転移およびそれに伴う腹水貯留は難治消化器癌の象徴であり、有効な治療法は現状存在しない。特にびまん性胃がん（スキルス胃がん）において腹膜転移の頻度が高いことが知られており、治療標的の探索が必要とされている。我々はびまん性胃がん患者由来の腹水サンプルおよびそこから樹立した細胞株を用いて、全ゲノムシーケンス（WGS）、トランスクリプトーム解析（RNA-seq）、ChIP シーケンス（ChIP-seq）、メチル化解析を組み合わせた統合的解析を行った。結果、びまん性胃がん腹膜転移において高頻度のチロシンキナーゼ受容体（RTK）の遺伝子増幅を認め、それらに対する分子標的薬投与の有効性を実験的に示した。また、胃がんの中でも上皮間葉転換（EMT）の強いグループが存在することを RNA-seq および ChIP-seq によって示した。EMT は治療抵抗性の原因とされており、EMT と協調して発現上昇が認められる HIPPO 経路を阻害することで治療抵抗性が解除されることを示した。本研究により、胃がん腹膜転移特有のゲノムプロファイルが解明され、それらに対する治療標的を同定することにより、腹膜転移症例における将来的なゲノム医療適応拡大の可能性が示唆された。

### 2) 序

がんのゲノム異常に基づいた層別化治療の標準治療への組み入れが進んでいく中、標的異常を持つ胃がんは全体の 20%程度であり、ゲノム医療の恩恵の拡大が切望されている。特に胃がん全体の 3 割を占めるびまん性胃がん（スキルス胃がん）は、腹膜転移を始めとする遠隔転移をきたしやすい点や化学療法に対して治療抵抗性である点から、予後不良のサブタイプとして知られている。びまん性胃がんの 3 割においては *RHOA* 遺伝子や *ARHGAP* 融合遺伝子などのドライバー遺伝子の異常が同定されてきたが、薬剤治療ターゲットとしての性質に乏しい。また、ゲノム解析の技術的な問題点として、びまん性胃がんの原発巣サンプルは間質成分が豊富でがん細胞自体の成分が数十%以下と純度が低いため、ゲノムのコピー数解析、発現解析、エピゲノム解析などを正確に行うのが困難であり、既存の研究における評価が十分でない可能性が懸念される。びまん性胃がんの腹膜転移を有する患者は臨床経過中に大量の悪性腹水に苦しむ。腹水サンプルの希少性から国内外でも十分な網羅的解析の報告は稀であるが、腹水サンプルは単離された腫瘍細胞の純度の高さから、ゲノム解析に適している。我々はびまん性胃がんの腹膜転移患者から得られた悪性腹水サンプルおよびそこから樹立した細胞株を用いて、多層的なゲノム解析を用いた治療標的探索を行った。

### 3) 実験方法

#### 3-1 検体

国立がんセンター研究所 FIOC にて収集された悪性腹水および腹水から樹立された患者由来細胞株を用いた。コホートは国立がんセンター中央病院および要町病院において腹水を回収された 98 例の患者からなる。

#### 3-2 全ゲノム解析

腹水サンプルおよび細胞株の DNA は QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) によって抽出し、TruSeq DNA PCR-free Library Preparation Kit (Illumina) および TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いてライブラリー調整を行った。全ゲノムシーケンスは NovaSeq 6000 で行った。変異解析および構造異常解析は Genomon2 pipeline を用いた。コピー数解析はインハウスパイプラインで行った。

#### 3-3 転写産物解析

腹水サンプルおよび細胞株の RNA は ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて抽出し、NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) にてライブラリー調整を行った。シーケンスは HiSeq2500 (Illumina) で行った。TopHat2 および Cufflinks を用いて発現量を定量した。融合遺伝子解析は deFuse を用いた。遺伝子パスウェイ解析は GSEA を用いた。

#### 3-4 ChIP-seq

細胞株を用いて SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling Technology) および 抗 H3K27ac 抗体 (D5E4, Cell Signaling Technology) により行った。ライブラリー調整ののち、シーケンスは HiSeq2500 (Illumina) で行った。2% インプットをコントロールとして MACS2 によるピークコール、ROSE によるエンハンサー コールを行った。CRC mapper によりモチーフ解析を行った。

#### 3-5 メチル化解析

細胞株を用いて Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit (Illumina) を用いて解析を行った。 $\beta$  value が少なくとも 1 症例は 0.2 以上のプローブを用いて解析した。

#### 3-6 *in vitro* 薬剤スクリーニング

細胞株に固定濃度で下記の薬剤を加え、96 時間後に測定を行った。alectinib (Selleck, 70 nM), capmatinib (Selleck, 10 nM), infigratinib (Selleck, 5nM), osimertinib (Selleck, 10 nM), neratinib (Selleck, 120 nM), binimetinib (Selleck, 50 nM), K-975 (Kyowa Kirin Co. Ltd., 200 nM). CellTiter-Glo 2.0 reagent (Promega) を用いて定量評価を行った。

### 3-7 *in vivo*評価

細胞株にルシフェラーゼ 発光のレンチウイルスベクターを導入し、C.B-17 SCID mice (Charles River) に腹腔内投与による細胞移植を行った。IVIS-200 *in vivo* imaging system (PerkinElmer) の測定による生物発光シグナルを用いて腫瘍量を評価した。治療群には infigratinib (Selleck, 15 mg/kg/day, once daily), capmatinib (Selleck, 10 mg/kg/day, twice daily), alectinib (Selleck, 15 mg/kg/day, once daily), K-975 (Kyowa Kirin Co. Ltd., 30 0 mg/kg/day, twice daily) を経口投与した。

## 4) 結果

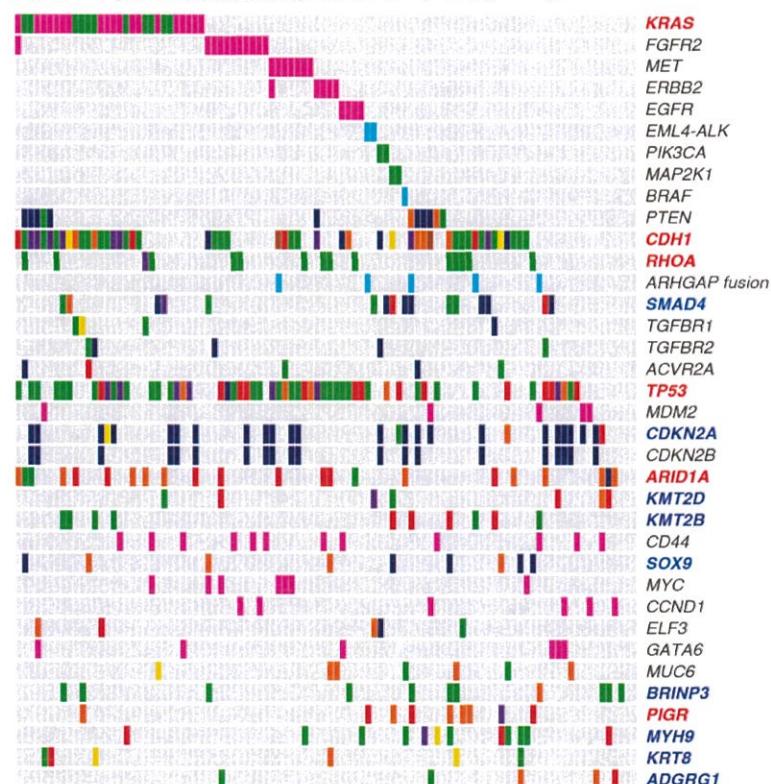
### 4-1 研究進行状況

98 症例から 76 の腹水検体および 59 の樹立細胞株、各々の末梢血検体が得られ、WGS、RNA-seq、ChIP-seq、メチル化解析を行った。また、同定した標的に対する *in vitro*, *in vivo* 実験を行い、治療効果を確認した。以上により前年度予定されていた計画を終了し、成果は英文誌に受理された。

### 4-2 変異解析

WGS データから変異解析を行った。3 つのドライバー探索ツール (MutSigCV2, dNdScv, MutPanning) を用いた解析を用いると *CDH1*, *TP53*, *ARID1A*, *RHOA*, *KRAS*, *PIGR* が統計学的有意に選択された遺伝子変異であった（図 1）。シグネチャー解析では COSMIC における SBS1, SBS17b, SBS18, SBS35, SBS37 が認められた。TMB の検討では TCGA 胃がんにおける GS サブタイプより変異数が多かったが、MSI サブタイプより変異数が少なかった。*PIGR* 変異は既報で胃がんのドライバーとしての報告はないが、本コホートで *PIGR* 変異は *CDH1* 変異, *RHOA* 変異, *ARHGAP* 融合遺伝子と共に存在しており、TCGA コホートでも統計学的有意に *CDH1* 変異と共に存在していたため、びまん性胃がんにおける *PIGR* 変異の役割が示唆された。非コード領域の解析では、変異集積領域の転写因子の結合モチーフ解析を行ったところ、CTCF の結合モチーフが有意に認められた。

図 1. 胃がん腹膜転移のランドスケープ



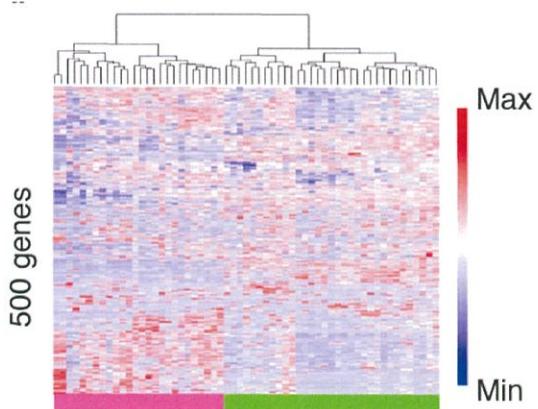
#### 4-3 コピー数解析

WGS データからコピー数解析を行った。*KRAS*, *FGFR2*, *MET*, *ERBB2*, *EGFR*, *MYC*, *CD44*, *CCND1*, *GATA6* の増幅、*CDKN2A/B*, *TP53*, *PTEN*, *SMAD4* の欠失を求めた。特に、RTK/RAS 経路の高度増幅を *KRAS* (19.3%), *FGFR2* (11.2%), *MET* (7.1%), *ERBB2* (5.1%), *EGFR* (4.1%) 含め、45%に認めた(図 1)。TCGA の原発巣コホートでは全体で 37.2% びまん性胃がんで 32.4%, GS サブタイプで 17.5% にしかこれらの増幅を認めなかった。また、腹膜転移以外の遠隔転移の既報のデータと比較すると、*KRAS* と *FGFR2* の増幅が腹膜転移に多く、*ERBB2* の増幅は少なかつた。これらから、高頻度の RTK の増幅は腹膜転移特有の遺伝子変化と考えられた。腹膜転移症例の原発巣の FISH 解析を利用可能な症例で行ったところ、*FGFR2* や *MET* の増幅を原発巣でも認めた。

#### 4-4 発現解析

59 の患者由来細胞株の発現データをもとにクラスタリング解析を行った。細胞株は 2 グループに大別され(図 2)、2 グループ間で発現に差があった遺伝子群は GSEA 解析によれば上皮間葉転換(EMT) の遺伝子セットに有意に含まれていた。以下 EMT 発現が高いグループを EMT グループ、他方を non-EMT グループと称する。EMT グループでは TGF-β 経路の遺伝子発現が上昇しており、中でも *SMAD3* の高発現が認められた。ノンコーディング RNA の発現クラスタリング解析でも EMT 群と non-EMT 群はクラスターが分離しており、*LINC00842* などの上昇が EMT 群で認められた。GSEA 解析による EMT グループで高発現しているグループは HIPPO 経路の遺伝子発現上昇を伴っていた。HIPPO 経路の遺伝子発現上昇は *SMAD3* の発現上昇と相関関係にあった。

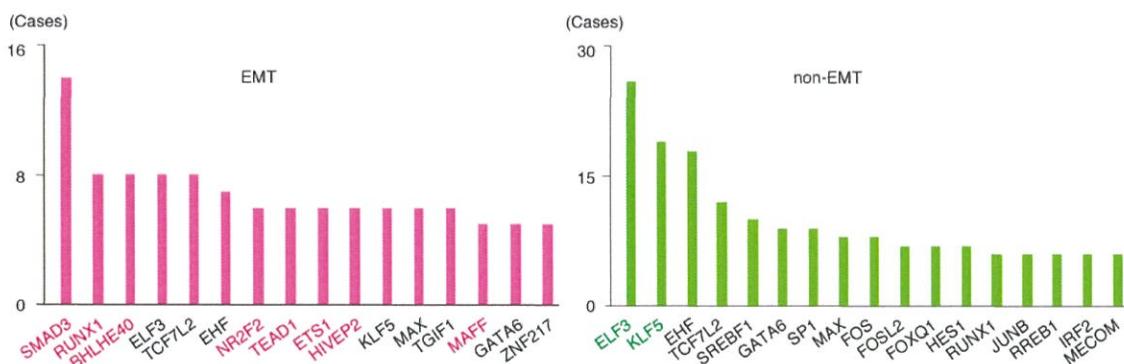
図 2. クラスタリング解析による EMT 群および non-EMT 群



#### 4-5 エンハンサー解析

44の患者由来細胞株において H3K27ac に対する ChIP-seq を行い、スーパーエンハンサーを同定した。細胞株においてリカレントなスーパーエンハンサーを同定し、さらに EMT グループおよび non-EMT グループに特有のスーパーエンハンサーについて解析した。*SMAD3* のスーパーエンハンサーは EMT グループに特有であった。また、各細胞株においてスーパーエンハンサーをコントロールしている転写サーキットについて解析を行った。*SMAD3* は EMT グループをコントロールする主たる転写因子であり、*ELF3* および *KLF5* は non-EMT グループをコントロールしている転写因子であった（図 3）。

図 3. EMT 群および non-EMT 群におけるコントロール転写因子の比較



#### 4-6 メチル化解析

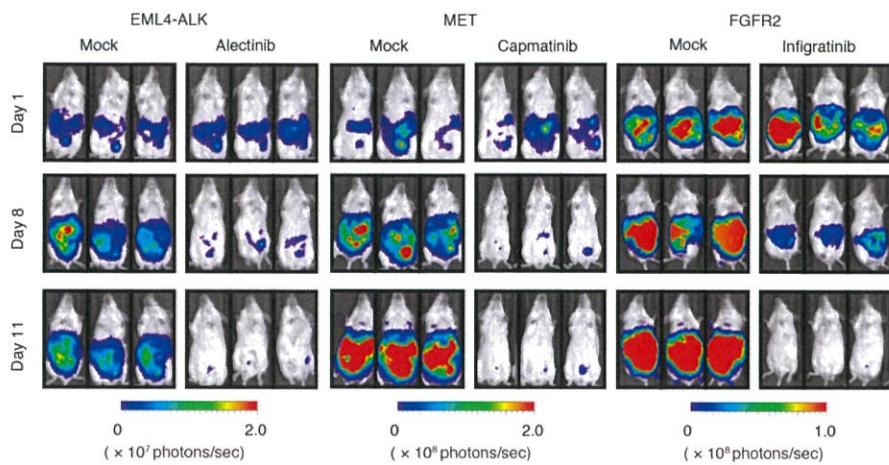
44の患者由来細胞株におけるプロモーターCpG アイランドのメチル化解析によると EMT グループおよび non-EMT グループで有意にメチル化が亢進しているプローブが各々 216 プローブ、359 プローブ認められた。メチル化の低下と発現上昇が相關していたのは non-EMT グループでメチル化が亢進しているプローブのみで、それらには *WWTR1*, *VIM*, *ZEB1*, *TGFB2* などの EMT 経路や HIPPO 経路特有の遺伝子が含まれていた。

#### 4-7 投薬実験

ゲノム解析によって同定した RTK を中心とする遺伝子異常に対する *in vitro* 投薬実験を、細胞株を用いて行った。FGFR 阻害剤、MET 阻害剤、ALK 阻害剤、EGFR 阻害剤、ERBB2 阻害剤、MEK1/2 阻害剤を用いた。FGFR 阻害剤、MET 阻害剤、EGFR 阻害剤の細胞増殖抑制効果は遺伝子発現量と比例していた。ALK 阻害剤は *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性の細胞株にのみ効果があった。ERBB2 阻害剤と MEK1/2 阻害剤の増殖抑制効果は遺伝子発現量や変異のパターンと相関していなかった。細胞の腹腔内移植による *in vivo* 実験においては FGFR 阻害剤、MET 阻害剤、

ALK 阻害剤投与により速やかに腫瘍細胞は除去された(図 4)。

図 4. *In vivo*における分子標的薬の有効性



EMT は胃がんにおける予後不良マーカーとして知られているため、EMT グループで発現上昇している HIPPO 経路の TEAD ファミリーをターゲットに阻害剤を検討した。TEAD 阻害剤の増殖抑制効果は *TEAD1* の発現量に比例していた。*in vivo*においても TEAD 阻害剤により生存延長効果を示した。MEK1/2 阻害剤は EMT グループにおいて *in vitro* で non-EMT グループに比して抵抗性を示したため、EMT グループにおける MEK1/2 阻害剤への TEAD 阻害剤の相加効果を確認したところ、*TEAD1* 発現の高い株において増殖抑制効果の増強を認めた。

## 5) 考察

本研究により胃がん腹膜転移症例における特徴的な遺伝子異常についての情報が得られた。特に高頻度の RTK 経路の遺伝子增幅は原発巣の研究では認められないものであり、細胞実験により分子標的薬ターゲットとなりうることが示唆された。また、転写解析およびエンハンサー解析により患者由来細胞株の中でも EMT 遺伝子発現が活性化しているグループを認めた。これらのグループは治療抵抗性であるが、分子標的薬と TEAD 阻害剤を組み合わせることで治療効果を上げることができる。以上のように、本研究により予後不良である胃がん腹膜転移に対してゲノム解析に基づいた治療選択を行える可能性が示唆され、今後の検証および将来的なゲノム医療適応拡大の可能性が期待される。

## 【表紙】

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

本研究により今まで明らかになっていなかった胃がん腹膜転移に特有の遺伝子異常の一端を解明することができ、その成果は *Nature Cancer* 誌に受理された。しかしながら、本研究において見出した標的が実際に有効な治療標的であるかは複数のコホートでのゲノム異常の有無の実証と、それに基づく臨床試験によってのみ確認されると考えられ、さらなる検証が不可欠である。また、転移巣はモノクローナルな増殖が観察されることが多い一方で、腫瘍全体としては genomic に heterogenous な細胞集団であることが多いため、全体の腫瘍の根絶のためには heterogeneity を加味した新しいモデルも必要と考える。

本研究で用いる解析手法は、現状のゲノム解析技術のほとんどを網羅しており、各々の解析について都度習得することができ、各々の長所や短所についても学習した。今後は既存の技術が手をつけることができていない領域についての開発を進め、難治癌を中心とするがんのゲノムの未知の部分への理解、および治療的脆弱性の探索を継続したい。