

研究報告書

一般課題：B
(平成28年度)

令和元年6月28日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部

住所 三重県鈴鹿市岸岡町1001番地1

研究者氏名 金山 和樹



(研究課題)

早期胃癌における腫瘍進展と HER2 遺伝子異常の関連性の解明 継続申請

平成29年2月13日付助成金交付のあった標記一般課題：Bについて研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【目的】

申請者らは前年度の研究において、胃癌における HER2 遺伝子増幅は癌の初期段階(粘膜内癌)から生じ、その多くが HER2 発現の不均一性(HER2 heterogeneity)を伴って腫瘍進展することを明らかにした。また、進行胃癌と早期胃癌の HER2 発現パターンの頻度を比較すると、進行胃癌では早期胃癌に比べ HER2 heterogeneity を示す割合が低いことを報告した(Kanayama et al. Virchows Archiv. 2018)。このことから、HER2 heterogeneity を示す症例の一部においては、HER2-positive cell subpopulations が直接腫瘍進展に関与していない可能性が推察されたため、今年度の研究では HER2 heterogeneity を示す早期胃癌の腫瘍生物学的な特性を明らかにすることを目的に、腫瘍内の分子生物学的解析を行った。

【方法】

前回検出した HER2 heterogeneity を示す早期胃癌35例の中から HER2 陽性腫瘍部位と陰性腫瘍部位が十分量採取できる症例を選択しパラフィンブロックを再薄切後、免疫組織化学染色で HER2 陽性腫瘍部位と陰性腫瘍部位を確認した。確認後、レーザーマイクロダイセクション(Arcturus^{XT})で HER2 陽性腫瘍部位、陰性腫瘍部位を回収した。DNA抽出キット(PicoPure DNA Extraction Kit)を用いて DNA を抽出し AMPure XP で精製後、DNA 濃度、A260/A280、リアルタイム PCR による DNA 断片化評価を行った。

次に、Ion AmpliSeq の Comprehensive Cancer Panel 409 遺伝子を用いて次世代シーケンサーで HER2 陽性腫瘍部位と陰性腫瘍部位の癌関連遺伝子変異を網羅的に解析し、エクソン領域の遺伝子変異を検出した。変異検出後、Ion Reporter 上で PolyPhen-2 と SIFT score によるタンパク機能異常予測や統計値から意義の高い変異の抽出を行った。また、COSMIC、Clin Var、OncoKB のデータベースを用いて検出された変異の腫瘍生物学的意義について検討を行った。コピー数変異解析については、ターゲットシーケンスで得られた各遺伝子領域のリード数を用いて遺伝子増幅および欠失を推定した。比較対象として HER2 均一性発現 (HER2 homogeneity) を示す早期胃癌の解析も行った。

【結果】

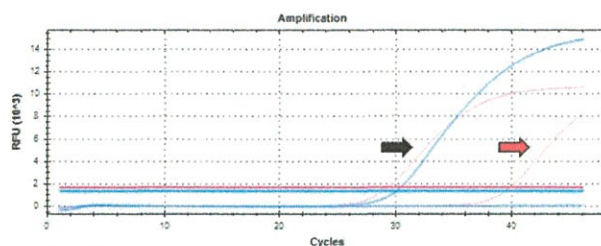
選定した症例の DNA 抽出、リアルタイム PCR による DNA 断片化評価の結果、DNA の断片化が高度であり次世代シーケンサーによる網羅解析が困難であったため(右上図)、代替法として HER2 heterogeneity を示す進行胃癌の粘膜部位を採取し、HER2 heterogeneity 症例 2 例 (HER2 陽性腫瘍部位: 2 サンプル、陰性部位: 2 サンプル) の解析を行った(右下図)。比較対象の HER2 homogeneity の症例については早期胃癌から良質な DNA の採取が可能であったため 2 症例 (2 サンプル) の解析を行った。

Case no. 1 の HER2 陽性部位と陰性部位に共通な遺伝子変異として TP53、TRRAP が検出された。HER2 陽性部位のみに検出された変異は NUMA1、RARA が検出され、陰性部位では ALK、ARID1A、CSMD3 など陽性部位に比べて多くの変異が検出された。Case no. 2 では、HER2 陽性部位と陰性部位に共通な遺伝子変異として TP53、ERCC3、KAT6B が検出された。HER2 陽性部位では BCL11A、CBL、HOOK3 など多くの変異が検出され、陰性部位では AFF1、PAX5、RARA が検出された。リード数からのコピー数変異解析では、明らかな増幅及び欠失部位は認められなかった。

【考察】

今回の検討では、ホルマリン固定されたパラフィンブロックを使用しているため DNA のクオリティーチェックを行ったが、高度の断片化が確認された。ホルマリン固定をすると DNA が切断されるため、網羅解析には短いアンプリコン数で解析可能な Comprehensive Cancer Panel を使用したが、早期胃癌検体ではパラフィンブロック作製から 5 年以上経過していたためさらにブロック内で分解が進み解析困難となったと考えられる。

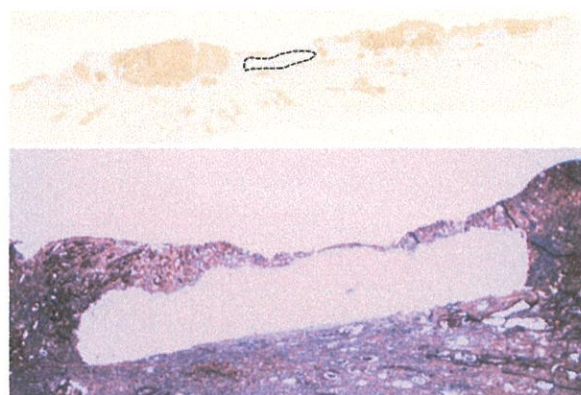
網羅解析の結果、Case no. 1 と Case no. 2 では HER2 陽性部位と陰性部位の遺伝子変異数の傾向が異なっており、Case no. 2 では Case no. 1 に比べ HER2 陽性部位に pathogenic の遺伝子変異が多く検出された。比較対象の HER2 homogeneity 症例では pathogenic の変異数は少なく、HER2 遺伝子増幅に依存した腫瘍進展が示唆された。一方で、Heterogeneity を示す症例では HER2 遺伝子増幅に加えた pathogenic の遺伝子変異が腫瘍進展の鍵となる可能性があるため、今後、症例数を加えて解析を行い上記の可能性を明らかにしていきたい。



黒矢印：コントロール DNA

赤矢印：サンプル DNA

ピンクの曲線は 87bp、青の曲線は 256bp を示す。サンプルでは 256bp の曲線が認められず、DNA の高度断片化が認められた。



上図：HER2 免疫染色

下図：レーザーマイクロダイセクションによる採取

点線：HER2 陰性腫瘍部位(粘膜部分)

免疫染色で HER2 陽性部位(茶色)を可視化し、粘膜部分の陽性部位と陰性部位を採取した。