HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低分化胃癌の個別化病理診断のための遺伝子プロファイリング
Author(s)	加藤, 麻倫
Description	配架番号：2291
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12550号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12550
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65899
Type	doctoral thesis
File Information	Marin_Kato.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

低分化胃癌の個別化病理診断のための遺伝子プロファイリング

(Gene Profiling for the Personalized Pathological Diagnosis of Diffuse-type Gastric Adenocarcinoma)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

加 藤　麻 倫

学 位 論 文

低分化胃癌の個別化病理診断のための遺伝子プロファイリング

(Gene Profiling for the Personalized Pathological Diagnosis of Diffuse-type Gastric Adenocarcinoma)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

加 藤　麻 倫

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・　1頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　7頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　9頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・68頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・69頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・70頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に掲載された。

1. Marin Kato, Hiroshi Nishihara, Hideyuki Hayashi, Taichi Kimura, Yusuke Ishida, Lei Wang, Masumi Tsuda, Mishie Ann Tanino and Shinya Tanaka
   Clinicopathological evaluation of Sox10 expression in diffuse-type gastric adenocarcinoma.
   Medical Oncology 34, 8, (2017).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 石川　麻倫、毛利　普美、王　磊、木村　太一、谷野　美智枝、西原　広史、田中　伸哉
   若年発症胃癌における分子プロファイリングによる臨床病理学的検討
   第 60 回日本病理学会秋季特別総会、2014 年 11 月 20 - 21 日、沖縄

2. 石川　麻倫、西原　広史、毛利　普美、加藤　容崇、王　磊、木村　太一、津田　真寿美、谷野　美智枝、田中　伸哉
   胃低分化腺癌及び印環細胞癌における actionable mutation の網羅的検討
   第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日 - 5 月 2 日、愛知

緒　言

胃癌とは主要な固形癌のひとつで、その死亡数は世界において第 3 位であり [1]、日本においても胃癌は死亡数および罹患数において上位である。2012 年における日本国内での悪性腫瘍の罹患数は 865,238 人であり、そのうち胃癌の罹患数は 132,159 人で第 2 位である。また、育児や就労などで社会を支える中心である 50 歳未満の世代においてもその罹患数は 4,460 人と第 2 位である（図 1）[2]。悪性腫瘍による死亡数は 360,963 人であり、そのうち胃癌による死亡数は 47,903 人と第 3 位で、50 歳未満では 1,152 人で第 2 位である（図 2）[3]。

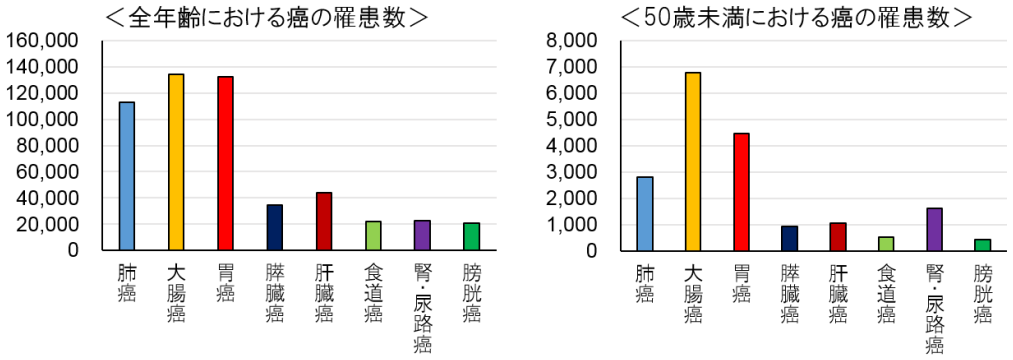


図 1　癌の罹患数

2012 年の日本国内における癌の罹患数。全年齢では胃癌は第 2 位であり、50 歳未満においても第 2 位である。

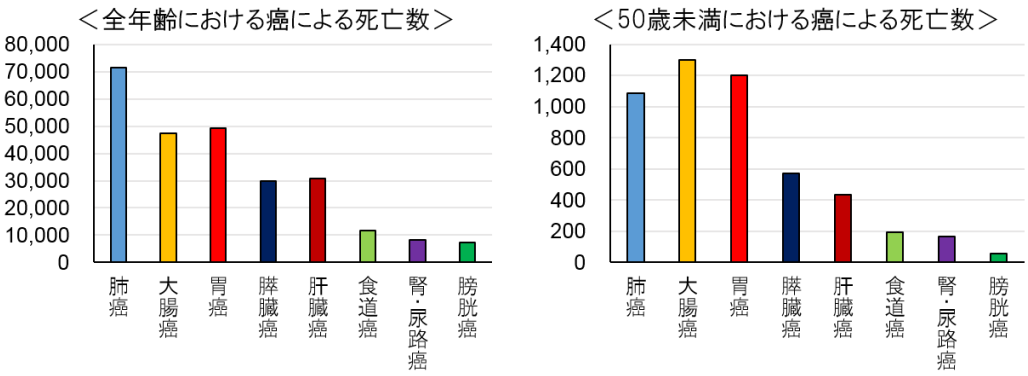


図 2　癌による死亡数

2012 年の日本国内における癌による死亡数。全年齢では胃癌は第 3 位であり、50 歳未満においては第 2 位である。

胃癌の発生リスクは環境要因や遺伝要因など多岐にわたっており、多量の塩分摂取、喫煙、飲酒、epstein-barr ウイルス（EBV）や *Helicobacter pylori* の微生物感染などが報告されている。EBV 感染では DNA のメチル化が亢進することで癌化する[4]と言われており、*H. pylori* 感染では慢性炎症により生じる DNA メチル化や CagA による Ras/Erk 経路の活性化、ペプチドグリカンによる NF-κB 経路・STAT3 経路・PI3K 経路の活性化、活性化誘導シチジンデアミナーゼによる *TP53* 変異などで癌化する[5-10]と言われている。また近年では、次世代シーケンサー（next generation sequencers, NGS）による遺伝子解析の研究報告が相次いでおり、低分化胃癌におけるドライバー遺伝子として *RHOA* が報告された[11,12]。しかし肺癌ではドライバー遺伝子異常として、*EGFR* 変異、*KRAS* 変異、*ALK* 融合、*ROS1* 融合、*RET* 融合、*ERBB2* 変異、*BRAF* 変異と、併せて 70%同定されており[13]、それと比べると胃癌のドライバー遺伝子の数は圧倒的に少ない。また、胃癌において網羅的がん遺伝子検査によって治療対象となる遺伝子変異が見つかる確率は 15.8%であり、膵癌（78.9%）や悪性黒色腫(77.2%)、大腸癌（66.9%）と比較すると低い[14]。NGS を用いた胃癌の新しい分子学的分類の報告も複数されている[15-18]が、いずれも日常診療レベルで実用可能とは言い難い。さらに、発症年齢が若いと予後が悪い[19-22]、若年発症胃癌は組織型が低分化であることが多い[23-25]、低分化胃癌は予後が悪い[19,22,26-28]、との報告があるが、若年発症胃癌の発生機序や低分化胃癌に限らず胃癌における予後予測因子などは明らかとなっていない。

現在の胃癌における治療方法は、内視鏡的切除・手術・化学療法・放射線療法があり、これらの選択、組み合わせにより行われている。UICC TNM 分類[29]または胃癌取扱い規約[30]に基づいて判定された臨床病期（表 1）により治療方針（図 3）が決定される。胃癌取扱い規約は TNM 分類を取り入れており、両者の病期診断は一致している。

	N0	N1	N2	N3	M1
T1a (M)	IA	IB	IIA	IIB	IV
T1b (SM)					
T2 (MP)	IB	IIA	IIB	IIIA	
T3 (SS)	IIA	IIB	IIIA	IIIB	
T4a (SE)	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	
T4b (SI)	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	

表 1　胃癌の臨床病期分類

M；粘膜、SM；粘膜下層、MP；固有筋層、SS；漿膜下層、SE；漿膜、SI；他臓器浸潤。

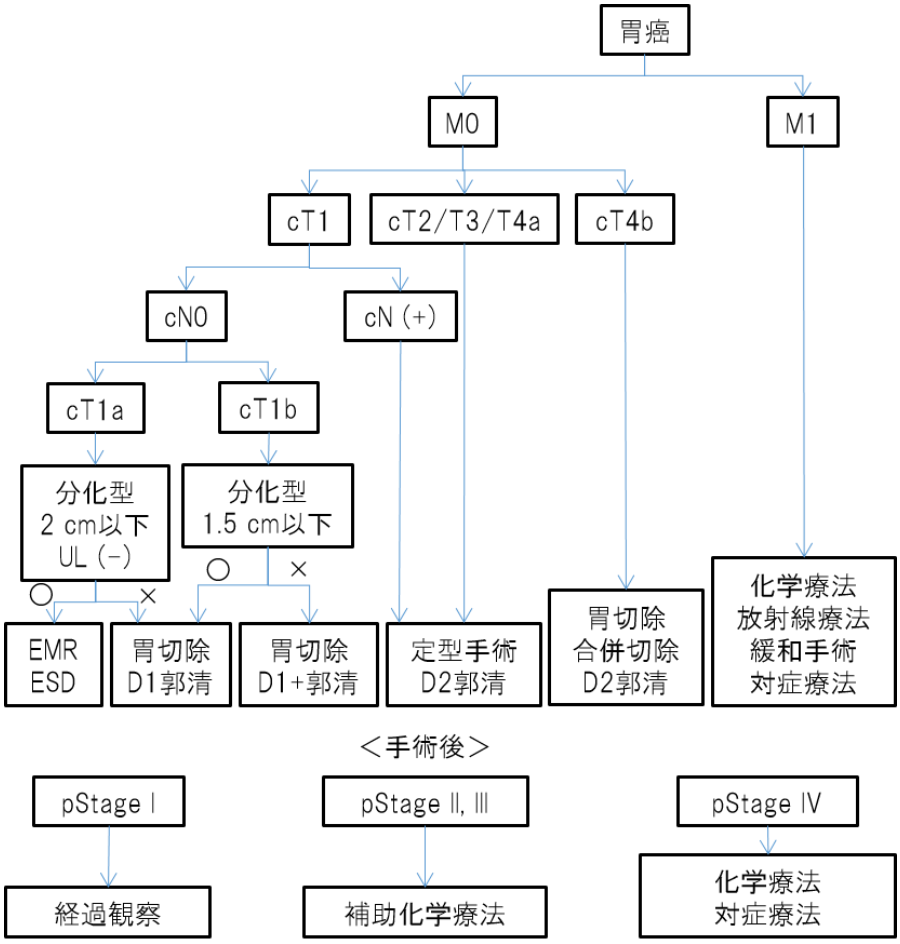


図 3　臨床病期による治療法選択のアルゴリズム

T（深達度）、N（リンパ節転移）、M（遠隔転移）で規定される臨床病期により治療方針を決定する。また、手術後は、病理学的に診断した病期により治療方針を決定する。

化学療法が選択される場合は標準治療とされる抗癌剤の投与を行うが、抗癌剤の治療効果や副作用などの反応は患者個々人で顕著に異なる。そこで近年より、患者個々人の状況に合わせて治療方針を決定する「個別化医療」が求められており、その治療法のひとつとして分子標的療法がある。分子標的療法とは、ある特定の分子を標的として効率よく作用するよう作られた薬（＝分子標的薬）を用いて行われる治療のことであり、副作用の軽減も期待されている。現在、胃癌に対して保険医療の範囲内で使用可能な分子標的薬は 2 種類あり、いずれも治癒切除不能な進行・再発の胃癌が対象となっている。1 つ目は抗ヒト上皮増殖因子受容体 2 型（HER2）の細胞外領域ドメイン IV に特異的に結合する抗体の Trastuzumab である。2010 年に ToGA 試験により「HER2 陽性の切除不能な進行・再発の胃癌に対する初回治療として、Trastuzumab を含む化学療法が新たな標準治療として位置づけられる」と報告され[31]、それを受けて日本では 2011 年 3 月に承認された。しかし、Trastuzumab は免疫組織化学染色または in situ hybridization（ISH）法で HER2 過剰発現を認めた症例のみが適応となる。2 つ目は、血管内皮細胞増殖因子受容体 2（VEGFR-2）に対する遺伝子組換えヒト免疫グロブリン G1 モノクローナル抗体の Ramucirumab である。2014 年に RAINBOW 試験で「パクリタキセル＋Ramucirumab 併用療法は有意な全生存期間の延長を示し、胃癌の二次化学療法における新たな標準治療となり得る」と報告され[32]、また、同年に REGARD 試験で「Ramucirumab 単剤投与は進行胃癌に対する二次化学療法として延命効果を示した」と報告された[33]ことを受けて、日本では 2015 年 3 月に承認された。こちらは Trastuzumab と違い、切除不能な進行・再発の胃癌であれば投与が可能である。

Ramucirumab の承認により治療の選択肢は広がったものの、依然として胃癌における使用可能な分子標的薬は少ない。これは胃癌の発生機序が多岐にわたり、ドライバー遺伝子の検索が困難であることが理由に上げられる。また、死亡率が高いこと、および 50 歳未満の世代でも罹患数や死亡数が多いことから、予後予測因子や若年発症胃癌の特徴などの検討も重要と考えられる。そこで本研究は、次世代のがん治療として求められている個別化医療の実現のための個別化病理診断システムの確立を目指し、分子発現や遺伝子変異の網羅的な検討を行い、臨床病理学的解析や予後解析を行った。

まず、免疫組織化学染色によるパイロット実験の結果、胃癌ではリンパ管侵襲に関与する因子として EGFR 発現が、静脈侵襲およびリンパ節転移

に関与する因子として p53 発現が候補に上がった。また、若年発症胃癌では低分化胃癌の割合が高いことを認めた。そこで若年発症胃癌の特徴を検討するため対象を低分化胃癌として解析したところ、低分化胃癌の発生に関与する因子として *H. pylori* 感染、*RHOA* 変異、*ARID1A* 変異が候補として上がった。また、低分化胃癌のリンパ管侵襲および静脈侵襲に関する因子として β-catenin の細胞膜での発現、Sox10 発現が候補として上がった。さらに、リンパ管侵襲および静脈侵襲が予後に関与する因子であることを確認し、EGFR 発現や β-catenin の細胞膜での発現も予後予測因子として候補に上がった。これらをもとに、現在の臨床現場でも実用可能な低分化胃癌のための診断スキームを作成した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

COSMIC	the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
C_T	threshold cycle
DAB	diaminobenzidine
dbSNP	the Single Nucleotide Polymorphism database
EBV	epstein-barr virus
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
HE	hematoxylin and eosin
HGVD	Human Genetic Variation Database
Indel	insertion/deletion
int	intermediate type
IntOGen	Integrative Onco Genomics
IS	intensity score
ISH	in situ hybridization
LNW1	Library Normalization Wash 1
med	medullary type
NBT	nitro blue tetrazolium
NGS	next generation sequencers
PARP	poly ADP-ribose polymerase
por	poorly differentiated adenocarcinoma
PS	percentage score
QCT	QC Template Reagent
RT-PCR	real-time PCR
sci	scirrhous type
sig	signet-ring cell carcinoma
SNV	single nucleotide variants
SW1	Stringent Wash 1
TBS	tris-buffered saline
TMA	tissue microarray

TS	total score
tub	tubular adenocarcinoma
VF	variant frequency

実験方法

本研究は、北海道大学医学部医学科 医の倫理委員会の承認の下に行われた（医 15-022)。

対象症例

北海道大学大学院医学研究科病理学講座腫瘍病理学分野において、2003 年 1 月から 2015 年 12 月までに病理組織診断をされた胃癌手術検体 784 例中、臨床情報が十分揃っており、かつ組織量も十分ある症例のうち 102 例（表 2）のホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE）組織を対象とした。

年齢	中央値		［年齢幅］	
	70		[30-91]	
	50 歳未満		50 歳以上	
	27		75	
性別	男性		女性	
	64		38	
組織型	tub	por/sig	AFP 産生	
	28	72	2	
深達度	T1	T2	T3	T4
	13	11	34	44
リンパ管侵襲	ly0	ly1	ly2	ly3
	36	12	6	48
静脈侵襲	v0	v1	v2	v3
	42	37	8	15
リンパ節転移	N0	N1	N2	N3
	30	26	26	20
Stage	I	II	III	IV
	25	23	35	19

表 2　胃癌 102 症例の臨床病理学的因子の要約

病理組織学的検討

病理組織診断に用いられた Hematoxylin and eosin (HE) 標本、Elastica-Masson 染色を施行した標本、D2-40 の免疫組織化学染色を施行した標本を、胃癌取り扱い規約（第 14 版）に則り組織型、深達度、リンパ管侵襲および静脈侵襲について再検討した。D2-40 の免疫組織化学染色を施行されていない症例については、後述する免疫組織化学染色のプロトコールに従って免疫組織化学染色を施行した。

Tissue Microarray (TMA) ブロックの作製

組織マイクロアレイヤーJF-4 (パソロジー研究所) を使用して、径 3 mm からなるコアが 24 個載った TMA 標本を作製した。

一つの FFPE ブロックの腫瘍部分から 2 箇所、正常粘膜から 1 箇所を径 3 mm のシリンダーで打ち抜いた。包埋皿に両面テープを貼り、打ち抜いたコアを両面テープに接着させて立たせ、パラフィンで固定した。冷却後に包埋皿と両面テープを外した。

免疫組織化学染色による蛋白発現解析

FFPE 組織を 4 μm に薄切して切片を作製後、キシレンにより脱パラフィンし、エタノール系列で水和した。pH 9.0 のエチレンジアミン四酢酸による抗原賦活化処理を 95℃で 30 分間行い、水洗した。p-mTOR 以外の 25 抗体は以下のプロトコールに従った。内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために 0.3%の過酸化水素水に 5 分間反応させ、tris-buffered saline (TBS) で 2 回洗浄した。一次抗体を反応させ（表 3)、TBS で 2 回洗浄した。二次抗体は、CyclinD1 と EGFR 以外は EnVision (K500711、DAKO JAPAN) を室温で 30 分間反応させ、CyclinD1 と EGFR はヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) (424132、ニチレイバイオサイエンス）を室温で 30 分間反応させた。TBS で 2 回洗浄後、3, 3'-ジアミノベンジジン（diaminobenzidine, DAB）四塩酸塩による発色を室温で 5 分間行い、再び TBS で 2 回洗浄した。カラッチ・ヘマトキシリン（3002-2、武藤化学株式会社）で核を染色し、水洗後に透徹し封入した。p-mTOR は

CSA Ⅱ　Biotin-free Tyramide Signal Amplification System（DAKO JAPAN）を検出試薬として用いた。他抗体と同様に賦活化処理を行い水洗した後に、PEROXIDASE BLOCK （DAKO JAPAN）を室温で 10 分間反応させ、TBS で 2 回洗浄した。PROTEIN BLOCK SERUM FREE（DAKO JAPAN）を室温で 10 分間反応させ、一次抗体を室温で 30 分間反応させた。TBS で 2 回洗浄後、ANTI-RABBIT IMMUNOGLOBULINS-HRP (1:200) を室温で 15 分反応させ、再度 TBS で 2 回洗浄した。AMPLIFICATION REAGENT（DAKO JAPAN）を室温で 15 分間反応させ、TBS で 2 回洗浄した。ANTI-FLUORESCEIN-HRP（DAKO JAPAN）を室温で 15 分間反応させ、TBS で 2 回洗浄した。3, 3'-DAB 四塩酸塩による発色を室温で 5 分間行い、再び TBS で 2 回洗浄した。カラッチ・ヘマトキシリンを 10 秒間反応させて核を染色し、水洗後に透徹し封入した。

一次抗体	クローン	コード	メーカー	希釈濃度	反応時間[+]
ß-catenin	ß-Catenin-1	M3539	Dako	1:1000	60 分
Cyclin D1	SP4	413521	ニチレイバイオサイエンス	希釈済	30 分
CD44	DF1485	NCL-CD44-2	Leica Biosystems	1:100	60 分
c-Kit	polyclonal	A4502	Dako	1:150	30 分
Claudin 5	polyclonal	ab15106	abcam	1:300	60 分
c-Met	EP1454Y	ab51067	abcam	1:200	60 分
COX2	polyclonal	160126	Cayman Chemical	1:200	60 分
CrkII	22/Crk	610036	BD Biosciences	1:1000	30 分
CrkL	C-20	sc-319	Santa Cruz Biotechnology	1:500	30 分
D2-40	D2-40	M3619	Dako	1:100	30 分
Dock180	H-70	sc-5625	Santa Cruz Biotechnology	1:75	30 分
E-cadherin	NCH-38	M3612	Dako	1:100	60 分
EGFR	31G7	423701	ニチレイバイオサイエンス	希釈済	60 分
HER2	Polyclonal	A0485	Dako	1:200	30 分
Integrin α5	1/CD49e	610633	BD Biosciences	1:100	30 分
Integrin αV	21/CD51	611012	BD Biosciences	1:200	30 分
Integrin ß1	18/CD29	610467	BD Biosciences	1:100	30 分
MMP2	polyclonal	E18010	Spring Bioscience	1:80	60 分
MMP7	Polyclonal	LS-B1237	LifeSpan BioSciences	1:50	60 分
p53	DO-7	M7001	Dako	1:100	60 分
PDGFRα	Polyclonal	sc-338	Santa Cruz Biotechnology	1:400	60 分
PDGFRß	C82A3	#4564	Cell Signaling Technology	1:200	60 分
p-mTOR	49F9	#2976	Cell Signaling Technology	1:100	30 分
p-p38	D3F9	#4511	Cell Signaling Technology	1:100	60 分
Sox10	Polyclonal	383A-75	Cell Marque	1:50	30 分
VEGFR2	55B11	#2479	Cell Signaling Technology	1:200	30 分

表 3　使用した一次抗体

[+]；反応温度は全て室温。

免疫組織化学の評価は、陽性強度および腫瘍細胞における陽性率で行った。陽性強度（Intensity score, IS）を 0（陰性）、1（弱陽性）、2（中等度陽性）、3（強陽性）の 4 段階とし、陽性率（Percentage score, PS）を 0（0%）、1（1-10%）、2（11-50%）、3（>50%）の 4 段階とした。最終的な免疫組織化学スコアは両者の和（Total score, TS）とした。Sox10 は胃癌では癌抑制遺

伝子との報告があるため[34]、TS 2 点以下を陰性、3 点以上を陽性と評価した。それ以外の分子は TS 4 点以上を陽性、3 点以下を陰性と評価した。また、E-cadherin および ß-catenin においては陽性となる局在についても評価した。

ギムザ染色による *H. pylori* 感染の解析

正常組織の FFPE 標本で、最も口側にある標本を 4 μm に薄切してギムザ染色を施行した。組織学的に *H. pylori* の菌体を認めた症例を *H. pylori* 陽性、認めない症例を *H. pylori* 陰性と評価した。

EBER- ISH による EBV 感染の解析

REMBRANDT Series In Situ Hybridization and Detection kits (Pan Path) を用いて EBER-ISH を施行した。

腫瘍細胞を最も多く含む FFPE 標本を 4 μm に薄切して、キシレンにより脱パラフィンし、エタノール系列で水和した。抗原賦活液は 100 μl の 1N 塩酸、10 μl の 25 %ペプシン、900 μl の蒸留水をよく混和し作製した。風乾後、抗原賦活液を 37℃で 15 分間反応させ、抗原を賦活化した。Milli-Q 水で洗浄後に再び風乾し、DIG oligo EBER プローブ（Pan Path）を添加して室温で 2 時間インキュベートした。TBS で洗浄し、AP 標識 抗ジゴキシゲニン抗体（Pan Path）を 37℃で 30 分間反応させた。TBS で洗浄後、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸とニトロブルーテトラゾリウムの混合液（Pan Path）を 37℃で 15 分間反応させ、水洗した。ケルンエヒトロート染色液（武藤化学株式会社）を 1 分間反応させた。

PCR アレイによる mRNA の発現解析

1) RNA 抽出

腫瘍細胞を最も多く含む FFPE 標本を 8 μm の厚さに薄切したものを各標本で 5 枚、スライドガラス上に伸展させた。正常粘膜組織をはじめとする腫瘍細胞以外の組織を肉眼的にトリミングした (図 4)。

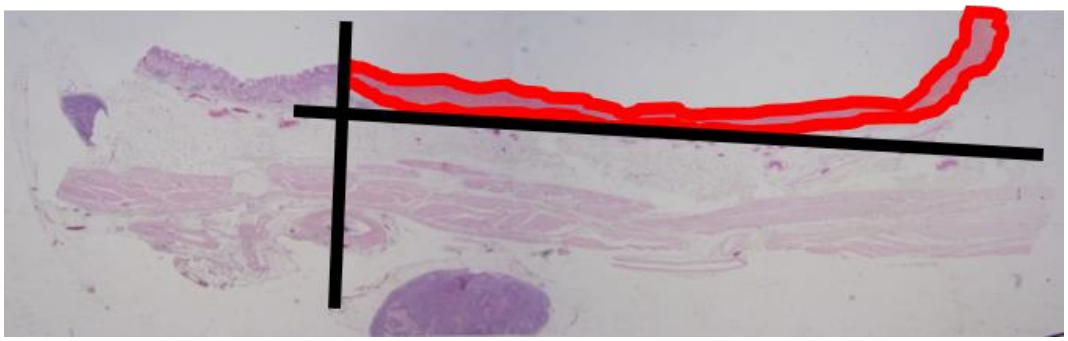


図 4　トリミングのモデル図

HE 標本で腫瘍の存在範囲（赤い枠線内)を確認し、その他の領域をミクロトーム刃で除去した（おおよそ黒い線の通り)。

RNeasy FFPE Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。トリミング後の標本を 2 ml ロック付きマイクロチューブに入れ、1 ml のキシレンを添加後に 10 秒間ボルテックスし、25℃で 15,000 rpm で 2 分間遠心してパラフィンを溶解した。ペレットが剥がれないようにピペットで遠心上清を取り除いた。1 ml の 100 %エタノールを添加して 10 秒間ボルテックスし、25℃で 15,000 rpm で 2 分間遠心して残留しているキシレンをエタノールで抽出した。ペレットが剥がれないようにピペットで遠心上清を取り除いた。エタノールを蒸発させるために 37℃で 10 分間インキュベートし、240 µl の Buffer PKD (Qiagen) を添加し、ボルテックスで混和した。10 µl の Proteinase K (Qiagen) を添加し、ピペッティングにより静かに混和した。56℃で 15 分間インキュベートの後、80℃で 15 分間インキュベートし、氷上で 3 分間インキュベートしてから、13,500 rpm で 15 分間遠心した。ペレットにはクロスリンクした DNA を含む組織残渣が含まれるため、剥がれないように上清のみを新しい 2 ml マイクロチューブに移し、25 µl の DNase Booster Buffer (Qiagen) と 10 µl の DNase I (Qiagen) を添加した。チューブを転倒混和し、スピンダウンの後に室温で 15 分間インキュベートした。500 µl の Buffer RBC (Qiagen) を添加し、ライセートを完全に混和した。さらに 1,200 µl の 100 %エタノールを添加し、ピペッティングでよく混和した。700 µl のサンプルを 2 ml コレクションチューブにセットされた RNeasy MinElute Spin Column (Qiagen) に入れ、蓋を閉めて 10,000 rpm で 30 秒間遠心した。コレクションチューブ内のフロースルーを捨て、残りのサンプルも同様に RNeasy MinElute Spin Column を通した。コレクションチューブ内のフロースルーを捨て、500 µl の Buffer RPE (Qiagen) を RNeasy MinElute Spin Column に添加し、蓋を閉めて 10,000

rpm で 30 秒間遠心した。コレクションチューブ内のフロースルーを捨て、500 µl の Buffer RPE を RNeasy MinElute Spin Column に添加し、蓋を閉めて 10,000 rpm で 2 分間遠心した。RNeasy MinElute Spin Column がコレクションチューブ内のフロースルーに触れないようにコレクションチューブを廃棄した。RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、RNeasy MinElute Spin Column のメンブレンを乾燥させるために蓋を開けて 15,000 rpm で 5 分間遠心した。RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、30 µl の滅菌蒸留水を RNeasy MinElute Spin Column のメンブレンに直接添加した。室温で 1 分間インキュベートさせ、蓋を閉めて 15,000 rpm で 1 分間遠心して RNA を溶出した。RNA の濃度は NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) で測定した。

2) cDNA 合成

SuperScript VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) を用い cDNA を合成した。500 ng 相当の RNA、4 µl の 5x VILOTM Reaction Mix、2 µl の 10x SuperScript Enzyme Mix、滅菌蒸留水を計 20 µl になるよう混合し、25℃で 10 分間、その後 42℃で 60 分間反応させた。85℃で 5 分間保温して反応を停止させ、cDNA を得た。

3) コンベンショナル PCR

ホルマリン固定により増幅能が失われていないかを判定するために、*GAPDH* の発現をコンベンショナル PCR により検討した。2 µl の cDNA を含む逆転写反応液、12.5 µl の 2x GoTaq Green Master Mix、1 µl の順方向プライマー、1 µl の順方向プライマー、滅菌蒸留水を計 25 µl になるよう混合した。*GAPDH* のプライマーは、5'- AGC CAC ATC GCT CAG ACA C -3'、5'- GCC CAA TAC GAC CAA ATC C -3'と設計した。使用機器は T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) で、95℃で 2 分間反応させた後、95℃で 30 秒間・55℃で 30 秒間・72℃で 30 秒間を 30 サイクル行い、その後 72℃で 5 分間反応させた。PCR 増幅産物は、エチジウムブロマイドを 1 µg/ml で希釈した 2 % アガロースゲルを用いて 100 V で 20 分電気泳動の後、2UV Transilluminator (UVP) で撮影した。

4) cDNA 合成とリアルタイム PCR (real-time PCR, RT-PCR) の前調整

コンベンショナル PCR で cDNA が増幅能を有することを確認した後に、

RT² PreAMP cDNA Synthesis Kit (Qiagen) を用いて cDNA を合成した。0.2 ml マイクロチューブに、1 μg 相当の RNA、2 μl の Buffer GE (Qiagen)、滅菌蒸留水を混合して計 10 μl とし、ピペッティング後に 42℃で 5 分間インキュベートさせ、直後に氷上で 1 分間インキュベートした。同チューブに 4 μl の 5x Buffer BC3 (Qiagen)、1 μl の Control P2 (Qiagen)、1 μl の cDNA Synthesis Enzyme Mix (Qiagen)、1 μl の RNase Inhibitor (Qiagen)、3 μl の滅菌蒸留水を混合して計 20 μl とし、ピペッティングで混和した。42℃で 30 分間インキュベートし、95℃で 5 分間加温することで反応を停止させて cDNA を得た。

続いて、RT² PreAMP Pathway Primer Mix (Qiagen) による cDNA の調整を行った。0.2 ml マイクロチューブに 12.5 μl の RT² PreAMP PCR Mastermix (Qiagen)、7.5 μl の RT² PreAMP Pathway Primer Mix (Qiagen)、5 μl の cDNA を含む逆転写反応液を混合し、ピペッティングにより混和した。T100™ Thermal Cycler で、95℃で 10 分間反応させた後、95℃で 15 秒間・60℃で 2 分間を 8 サイクル行った。直後に氷上へ移し、2 μl の Side Reaction Reducer (Qiagen) を添加し、ピペッティングで混和した。37℃で 15 分間インキュベートし、95℃で 5 分間加温して反応を停止させた。すぐに 84 μl の nuclease フリー水を加え、よくピペッティングして混和した。

5) RT-PCR

102 μl の調整したサンプル、1,275 μl の 2x RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen)、1,173 μl の滅菌蒸留水を加え、25 μl ずつを RT² Profiler PCR Arrays の各ウェルへ添加した。血管新生、アポトーシス、細胞周期、細胞の老化、DNA 傷害および修復、上皮間葉転移 (Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT)、低酸素環境、代謝、テロメアとテロメラーゼの 9 つの形態変化や腫瘍形成に関する経路に属する 84 遺伝子が含まれる Cancer PathwayFinder (Qiagen) (表 4) を使用した。使用機器は StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) であり、サイクリング条件は、95℃で 10 分間反応させた後、95℃で 15 秒間・60℃で 1 分間を 40 サイクル行った。Threshold cycle (C_T) は StepOne Software v2.2.2 (Thermo Fisher Scientific) で計算し、RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 (http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php) (Qiagen) で解析した。

ACLY	*ACSL4*	*ADM*	*ANGPT1*	*ANGPT2*	*APAF1*
ARNT	*ATP5A1*	*AURKA*	*BCL2L11*	*BIRC3*	*BMI1*
CA9	*CASP2*	*CASP7*	*CASP9*	*CCL2*	*CCND2*
CCND3	*CDC20*	*CDH2*	*CFLAR*	*COX5A*	*CPT2*
DDB2	*DDIT3*	*DKC1*	*DSP*	*E2F4*	*EPO*
ERCC3	*ERCC5*	*ETS2*	*FASLG*	*FGF2*	*FLT1*
FOXC2	*G6PD*	*GADD45G*	*GPD2*	*GSC*	*HMOX1*
IGFBP3	*IGFBP5*	*IGFBP7*	*KDR*	*KRT14*	*LDHA*
LIG4	*LPL*	*MAP2K1*	*MAP2K3*	*MAPK14*	*MCM2*
MIKI67	*NOL3*	*OCLN*	*PFKL*	*PGF*	*PINX1*
POLB	*PPP1R15A*	*SERPINB2*	*SERPINF1*	*SKP2*	*SLC2A1*
SNAI1	*SNAI2*	*SNAI3*	*SOD1*	*SOX10*	*STMN1*
TBX2	*TEK*	*TEP1*	*TERF1*	*TERF2IP*	*TINF2*
TNKS	*TNKS2*	*UQCRFS1*	*VEGFC*	*WEE1*	*XIAP*
ACTB	*B2M*	*GAPDH*	*HPRT1*	*RPLPO*	*HGDC*
RTC	*RTC*	*RTC*	*PPC*	*PPC*	*PPC*

表 4　CancerPathwayFinder

RT-PCR による mRNA の発現解析

1) RNA 抽出

同一症例内で腫瘍細胞を最も多く含む FFPE 標本を選択した。正常粘膜組織をはじめとする腫瘍細胞以外の組織を肉眼的にトリミングし、可能な限り腫瘍細胞の含有率を高くした。「PCR アレイによる mRNA の発現解析」時と同様に、RNeasy FFPE Kit を用いて RNA を抽出し、NanoDrop 2000c spectrophotometer で濃度を測定した。

2) cDNA 合成

SuperScript VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) を用い cDNA を合成した。500 ng 相当の RNA、4 µl の 5x VILOTM Reaction Mix、2 µl の 10x SuperScript Enzyme Mix、滅菌蒸留水を計 20 µl になるよう混合し、25℃で 10 分間反応させた後、42℃で 60 分間反応させた。85℃で 5 分間保温して反応を停止させ、cDNA を得た。

3) コンベンショナル PCR

ホルマリン固定により増幅能が失われていないかを判定するために、「PCR アレイによる mRNA の発現解析」時と同様に、2 μl の cDNA を含む逆転写反応液における *GAPDH* の発現を確認した。

4) RT-PCR

コンベンショナル PCR で cDNA が増幅能を有することを確認した後に、1 μl の cDNA を含む逆転写反応液、10 μl の Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)、0.18 μl の順方向プライマー、0.18 μl の逆方向プライマー、8.64 μl の滅菌蒸留水を混合して計 20 μl とした。各遺伝子において混合液 20 μl ずつを 3 ウェルに添加し、StepOnePlus™ で qRT-PCR を施行した。PCR アレイにより検出された 5 分子とハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* の順方向および逆方向プライマーを設計した (表 5)。サイクリング条件は、95℃で 10 分間反応させた後、95℃で 15 秒間・60℃で 1 分間を 40 サイクル行い、融解曲線を 95℃で 15 秒間反応させた後、60℃で 1 分間反応させ、その後 95℃で 15 秒間反応させて作製した。C_T は StepOne Software v2.2.2 で *GAPDH* により補正計算した。

GAPDH	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C
	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C
APAF1	CTT CTT CCA GTG TAA GGA CAG T
	GGA GAG CTT CTG CTG AAT TGC
SOX10	CCA GGC CCA CTA CAA GAG C
	TCG GGG TTC CCA TCT GAC A
VEGFC	GCC ACG GGA GGT GTG TAT AG
	GAC GGA CAC ACA TGG AGG TT
ARNT	GGC CGG CAG AGA ATT TCA GG
	ATC TGG GCC AAC ATC TGT CC
KDR	GGC TTG GCC CGG GAT ATT TA
	ATT TCA AAG GGA GGC GAG CA

表 5　RT-PCR で使用したプライマー

サンガーシーケンスによる *RHOA* 変異解析

1) DNA 抽出

腫瘍細胞を最も多く含む FFPE 標本を 8 μm の厚さに薄切したものを各標本で 5 枚、スライドガラス上に伸展させた。正常粘膜組織をはじめとする腫瘍細胞以外の組織を肉眼的にトリミングし、可能な限り腫瘍細胞の含有率を高くした。

QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。トリミング後の標本を 2 ml ロック付きマイクロチューブに入れ、1 ml のキシレンを添加後に 10 秒間ボルテックスし、25℃で 15,000 rpm で 2 分間遠心してパラフィンを溶解した。ペレットが剥がれないようにピペットで遠心上清を取り除いた。1 ml の 100 %エタノールを添加して 10 秒間ボルテックスし、25℃で 15,000 rpm で 2 分間遠心して残留しているキシレンをエタノールで抽出した。ペレットが剥がれないようにピペットで遠心上清を取り除いた。エタノールを蒸発させるために 37℃で 10 分間インキュベートし、360 μl の Buffer ATL (Qiagen) を添加し、ボルテックスで混和した。40 μl の Proteinase K 溶液 (Qiagen) を添加し、ボルテックスした。56℃で一晩インキュベートの後、90℃で 60 分間インキュベートした。室温に戻し、チューブを数秒遠心した後、400 μl の Buffer AL (Qiagen) を添加し、ボルテックスで混和した。さらに 400 μl の 100 %エタノールを添加し、ボルテックスでよく混和した。700 μl のサンプルを 2 ml コレクションチューブにセットされた QIAamp MinElute Column (Qiagen) に入れ、蓋を閉めて 8,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブを新しいものに変え、残りのサンプルも同様に QIAamp MinElute Column を通した。コレクションチューブを新しいものに変え、500 μl の Buffer AW1 (Qiagen) を QIAamp MinElute Column に添加し、蓋を閉めて 8,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブを新しいものに変え、500 μl の Buffer AW2 (Qiagen) を QIAamp MinElute Column に添加し、蓋を閉めて 8,000 rpm で 1 分間遠心した。QIAamp MinElute Column がコレクションチューブ内のフロースルーに触れないようにコレクションチューブを廃棄した。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、メンブレンを乾燥させるために蓋を開けて 15,000 rpm で 3 分間遠心した。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、50 μl の滅菌蒸留水を QIAamp MinElute Column のメンブレン中央に直接添加した。室温で 5 分間インキュベートさせ、蓋を閉めて

15,000 rpm で 1 分間遠心して DNA を溶出した。DNA の濃度は NanoDrop 2000c spectrophotometer で測定した。

2) コンベンショナル PCR

「PCR array による mRNA の発現解析のコンベンショナル PCR」と同様に 2 μl の DNA 抽出液を PCR で増幅し、電気泳動で増幅を確認した。プライマーは、5'- GTT TCA GCA ATG GCT GCC ATC -3'と 5'- CTG CTT TCC ATC CAC CTC -3'と設計した。

増幅を確認後、さらに増幅産物の濃度を高めるため、再度 PCR を施行した。5 μl の PCR 産物、12.5 μl の 2x GoTaq Green Master Mix、1 μl の順方向プライマー、1 μl の順方向プライマー、滅菌蒸留水を計 25 μl になるよう混合した。プライマーは、順方向は 1 回目の PCR と同様の 5'- GTT TCA GCA ATG GCT GCC ATC -3'を用い、PCR 増幅産物が 1 回目より短くなるように逆方向を 5'- CCA TCC ACC TCG ATA TCT GC -3'と設計した。増幅確認のために、1 回目と同様に電気泳動を行った。

3) サンガーシーケンス

サンガーシーケンスは北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。*RHOA* の hotspot と報告されている R5Q、G17E、Y42C[11,12] の有無について検討するため、一症例に対してプライマーは 5'- GTT TCA GCA ATG GCT GCC ATC -3'と 5'- CCA TCC ACC TCG ATA TCT GC -3'の 2 種類を用いてシーケンスした。

NGS による遺伝子変異解析

A. TruSeq Amplicon Cancer Panel を用いた NGS

48 の癌関連遺伝子における 212 の hotspot をターゲットとしている TruSeq Amplicon Cancer Panel (illumina) (表 6) を用いて NGS 解析を施行した。

ABL1	*AKT1*	*ALK*	*APC*	*ATM*	*BRAF*
CDH1	*CDKN2A*	*CSF1R*	*CTNNB1*	*EGFR*	*ERBB2*
ERBB4	*FBXW7*	*FGFR1*	*FGFR2*	*FGFR3*	*FLT3*
GNA11	*GNAQ*	*GNAS*	*HNF1A*	*HRAS*	*IDH1*
JAK2	*JAK3*	*KDR*	*KIT*	*KRAS*	*MET*
MLH1	*MPL*	*NOTCH1*	*NPM1*	*NRAS*	*PDGFRA*
PIK3CA	*PTEN*	*PTPN11*	*RB1*	*RET*	*SMAD4*
SMARCB1	*SMO*	*SRC*	*STK11*	*TP53*	*VHL*

表 6　TruSeq Amplicon Cancer Panel

1) DNA 抽出

同一症例内で腫瘍細胞を最も多く含む FFPE 標本と正常組織の FFPE 標本を一ブロックずつ選択した。腫瘍標本は、正常粘膜組織をはじめとする腫瘍細胞以外の組織を肉眼的にトリミングし、可能な限り腫瘍細胞の含有率を高くした。正常標本は、正常粘膜組織以外の組織を肉眼的にトリミングした。その後、「サンガーシーケンスによる *RHOA* 変異解析」時と同様に QIAamp DNA FFPE Tissue を用いて DNA を抽出した。DNA の濃度は Qubit dsDNA BR Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。200 µl の Qubit dsDNA BR Buffer (Thermo Fisher Scientific) に 1 µl の Qubit dsDNA BR Reagent (Thermo Fisher Scientific) を添加し、ボルテックスでよく混和した。190 µl の混和液に 10 µl の Qubit dsDNA BR Standard #1 (Thermo Fisher Scientific) を添加してボルテックスし、Standard #1 を調整した。また、190 µl の混和液に 10 µl の Qubit dsDNA BR Standard #2 (Thermo Fisher Scientific) を添加してボルテックスし、Standard #2 を調整した。同様に、198 µl の混和液に 2 µl の DNA 抽出液を添加してボルテックスし、DNA 混合液を調整した。室温で 2 分間インキュベートし、Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて Standard #1 および#2 を測定後に DNA 濃度を測定した。

2) DNA の質的評価

DNA の増幅能を評価するために、Infinum HD FFPE QC Assay (illumina) を用いた。DNA を 1 ng/µl の濃度に調整した。1.5 ml マイクロチューブに QC Template Reagent (QCT) (illumina) を 10 µl 添加し、990 µl の滅菌蒸留水で 100 倍希釈後にボルテックスにより混合した。96-well プレートに次のように添加した。ポジティブコントロールとして 100 倍希

釈した QCT を 2 µl ずつ 3 ウェルに添加した。ネガティブコントロールとして滅菌蒸留水を 2 µl ずつ 3 ウェルに添加した。2 µl の DNA (1 ng/µl) を各ウェルに添加した。各サンプルは 3 ウェルずつ添加した。5 µl の 2x KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems)、1 µl の QC Primer Reagent (illumina)、2 µl の滅菌蒸留水を混合し、8 µl ずつ各ウェルへ分注し、計 10 µl とした。使用機器は StepOnePlus™ であり、95℃で 3 分間反応させた後、95℃で 3 秒間・60℃で 30 秒間を 40 サイクル行った。C_T は StepOne Software v2.2.2 で計算した。ポジティブコントロールとサンプル毎の C_T 値の平均値を計算し、サンプルの平均 C_T 値からポジティブコントロールの平均 C_T 値を引いた値を⊿C_T とした。$-3 < \Delta C_T < 3$ のサンプルはライブラリ作製へ進み、それ以外の⊿C_T 値のサンプルは除外した。

3) ライブラリ作成

まず、オリゴ（アンプリコンにつき上流側と下流側の一組）を含むカスタムプールをゲノム DNA に混成した。5 µl のゲノム DNA を 96-well プレートに添加した。DNA 濃度が 50 ng/µl 未満の症例はエタノール沈殿の後に 5 µl の滅菌蒸留水で溶解し、添加した。5 µl の Amplicon Fixed Panel 1 (illumina) を各ウェルに添加した。40 µl の Oligo Hybridization for Sequencing Reagent 1 (illumina) を各ウェルに添加し、ピペッティングにより混和した。96-well プレートに粘着性のプラスチックシールおよびアルミシールをし、25℃で 1,000 xg で 1 分間遠心した。95℃に予熱したヒートブロックで 1 分間インキュベートした。ヒートブロックの設定温度を 40℃に変更し、徐々に温度が下がる中 80 分間インキュベートした。

次に、フィルターにより未結合のオリゴを除去した。45 µl の Stringent Wash 1 (SW1) (illumina) を MIDI プレート (illumina) にセットしたフィルタープレート (illumine) の各ウェルに加え、蓋をして 25℃で 2,400 xg で 4 分間遠心し、フィルターを洗浄した。ヒートブロックからオリゴを混成したゲノム DNA を含むプレートを取り出し、各ウェルからフィルターの同部位へ全量移した。フィルタープレートに蓋をして 25℃で 2,400 xg で 4 分間遠心した。45 µl の SW1 (illumina) をフィルタープレートの各ウェルに加え、蓋をして 25℃で 2,400 xg で 4 分間遠心し、フィルターを洗浄した。再び 45 µl の SW1 をフィルタープレートの各ウェルに加え、蓋をして 25℃で 2,400 xg で 4 分間遠心し、フィルターを洗浄した。新しい MIDI プレートをフィルタープレートにセットし、45 µl の Universal

Buffer 1 (illumina) をフィルタープレートの各ウェルに加え、蓋をして25℃で 2,400 xg で 4 分間遠心し、フィルターを洗浄した。

DNA ポリメラーゼにより上流のオリゴから DNA の伸長反応を行い、DNA リガーゼを用いて下流のオリゴと連結することで、増幅に必要な配列を両端にもつターゲット領域を含む産物を作製した。45 µl の Extension-Ligation Mix 3 (illumina) をフィルタープレートの各ウェルに加えて粘着性のアルミシールをし、蓋をして 37℃で 45 分間インキュベートした。

次にインデックスプライマーを付加し、PCR 増幅した。Illumina Experiment Manager (illumina) で有効なインデックスプライマーの組み合わせを作製した。4 µl の i5 プライマー (illumina) と 4 µl の i7 プライマー (illumina) を新しい 96-well PCR プレートの各ウェルに加えた。フィルタープレートのアルミシールを剥がして蓋をして、25℃で 2,400 xg で 4 分間遠心した。25 µl の 50 mM NaOH をフィルタープレートの各ウェルに加え、ピペットチップがメンブレンに触れている状態で NaOH を 5-6 回ピペッティング後に、室温で 5 分間インキュベートした。PCR Master Mix 2 (illumine) : TruSeq DNA Polymerase 1 (illumine) = 50 : 1 で混合し、22 µl ずつを 96-well プレートの各ウェルに加えた。ピペットチップをフィルタープレートのメンブレンに触れさせ、5-6 回ピペッティング後に 20 µl を 96-well プレートの同位置のウェルに移した。5-6 回ピペッティングし、よく混合させた。96-well プレートにシールし、25℃で 1,000 xg で 1 分間遠心し、PCR を行った。使用機器は SimpliAmp Thermal Cycler (life technologies) であり、95℃で 3 分間反応させた後、95℃で 30 秒間・62℃で 30 秒間・72℃で 60 秒間を 27 サイクル行い、その後 72℃で 5 分間反応させた。

PCR 終了後、PCR 産物を Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) で精製した。新しい MIDI プレートに 45 µl の AMPure XP ビーズを各ウェルに添加した。PCR 産物の全量を MIDI プレートに添加し、透明の粘着シールをしてプレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌する。室温で 10 分間静置し、その後プレートをマグネットスタンド (DynaMag-96 Side Skirted, Invitrogen) 上に 2 分間静置した。プレートをマグネットスタンド上に置いたまま上清を破棄した。ビーズを吸い込んでしまった場合はプレートに戻し、2 分間静置後に再度上清を破棄した。プレートをマグネットスタンドに置いたまま、200 µl の 80%エタノールを各ウェルに添加した。30 秒間静置後、上清を破棄した。プレートをマグネットスタンドに置いたまま、再度、200 µl の 80%エタノールを各ウェルに添加した。30 秒間静置

後、上清を完全に破棄した。マグネットスタンドから下ろし、ビーズを 10 分間乾燥させた。30 µl の Elution Buffer with Tris (illumina) を各ウェルに加え、粘着シールをしてプレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌した。プレートを室温で 2 分間静置し、マグネットスタンド上に 2 分間静置した。新しい MIDI プレートへ 20 µl の上清を移し、透明の粘着シールをした後に 1,000 xg で 1 分間遠心した。

残った上清を用いて PCR 増幅が成功したかどうかを Bioanalyzer-Agilent DNA 1000 Assay (Agilent Technologies) を用いて確認した。

各ライブラリが均一になるようにノーマライゼーションした。Library Normalization Additives 1 (illumina)：Library Normalization Beads 1 (illumina) = 11：2 でよく混合し、45 µl ずつ MIDI プレートの各ウェルに添加した。透明の粘着シールを貼り、プレートシェーカーで 1,800 rpm で 30 分間撹拌した。プレートをマグネットスタンド上で 2 分間静置し、その後上清を破棄した。プレートをマグネットスタンドから下ろし、45 µl の Library Normalization Wash 1 (LNW1) (illumina) を各ウェルに添加した。透明の粘着シールをし、プレートシェーカーで 1,800 rpm で 5 分間撹拌した。プレートをマグネットスタンド上で 2 分間静置し、その後上清を破棄した。再度、45 µl の LNW1 を各ウェルに添加して透明の粘着シールをし、プレートシェーカーで 1,800 rpm で 5 分間撹拌した。プレートをマグネットスタンド上で 2 分間静置し、その後上清を破棄した。プレートをマグネットスタンドから下ろし、30 µl の 0.1N NaOH を各ウェルに添加した。透明の粘着シールをし、プレートシェーカーで 1,800 rpm で 5 分間撹拌した。プレートをマグネットスタンド上で 2 分間静置し、30 µl の上清を 0.5 ml マイクロチューブに移した。30 µl の Library Normalization Storage buffer 1 (illumina) を各ウェルへ添加し、混合した。

4) NGS run

5 µl の各ライブラリを 1.5 ml マイクロチューブ内で混合した。そのうち 6 µl と 594 µl の Hibridization buffer (illumine) をピペッティングおよびボルテックスにより混合し、96℃で 2 分間インキュベートした。転倒混和後、氷上で 5 分間インキュベートした。MiSeq reagent cartridge (illumina) に 600 µl の調整したサンプルを添加し、MiSeq (illumina) でシーケンスを行った。

5) 解析

シーケンスにより Miseq から得られた FastQ ファイルをクラウドベースのコンピューティング環境である BaseSpace Sequence Hub (https://basespace.illumina.com/analyses/) (illumina) に取り込み、VCF ファイルを作成して Illumina VariantStudio 2.2 (illumina) で解析し、変異を検出した。VariantStudio が設定した Filter を通過し、解析結果の Quality スコアが 100 であり、リード数は 100 以上、変異陽性率 (Variant frequency, VF)は 10%以上である変異のうち、COSMIC ID を有したアミノ酸置換を生じさせる一塩基多型 (single nucleotide variants, SNV) と塩基の挿入/欠失 (insertion/deletion, indel) を検出した。胚細胞性変異は VF および the Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP) を参考に除外した。また、同時に作成された BAM ファイルは Integrative Genomics Viewer 2.3 (Broad Institute) で解析した。また、FastQ ファイルを The Clinical Sequence Data Analysis Server (Amelieff) でも解析した。Integrative Onco Genomics (IntOGen) version1412 にがんドライバー遺伝子として登録のある遺伝子上に存在し、the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) version 72 に登録のある変異である SNV と indel を検出した。胚細胞性変異は正常組織のシーケンス結果から検出された変異や VF、dbSNP を参考に除外した。両者の解析サーバーから得られた結果を比較し、両者に共通する SNV および indel を検出した。

B. GeneRead™ DNAseq Targeted Panels V2 を用いた NGS

癌に関与する 160 遺伝子が載っている Human Comprehensive Cancer GeneRead DNAseq Targeted Panel V2 (Qiagen) と *PDGFRB*、*RHOA*、*VEGFA* の 3 遺伝子を載せた GeneRead Custom DNAseq Gene Panel (Qiagen) を用いて、計 163 遺伝子 (表 7) のエクソンの領域のディープシーケンスを行った。GeneRead Custom DNAseq Gene Panel のデザインは Web ベースのデザインツールである GeneRead DNAseq Custom Builder (https://www.qiagen.com/jp/shop/genes-and-pathways/custom-products/custom-array-products/generead-designer/) (Qiagen) で行った。

ABL1	*AKT1*	*AKT2*	*ALK*	*AMER1*	*APC*
AR	*ARID1A*	*ARID2*	*ASXL1*	*ATM*	*ATRX*
BAP1	*BCL6*	*BCOR*	*BRAF*	*BRCA1*	*BRCA2*
BRIP1	*BTK*	*BUB1B*	*CARD11*	*CBL*	*CBLB*
CD79A	*CD79B*	*CDC73*	*CDH1*	*CDK12*	*CDK4*
CDKN2A	*CHEK2*	*CIC*	*CREBBP*	*CRLF2*	*CSF1R*
CTNNB1	*CYLD*	*DAXX*	*DDB2*	*DDR2*	*DICER1*
DNMT3A	*ECT2L*	*EGFR*	*EP300*	*EPCAM*	*ERBB2*
ERBB3	*ERBB4*	*ERCC5*	*ESR1*	*EZH2*	*FAM46C*
FANCA	*FANCD2*	*FANCE*	*FAS*	*FBXO11*	*FBXW7*
FGFR2	*FGFR3*	*FH*	*FLCN*	*FLT3*	*FUBP1*
GATA1	*GATA2*	*GATA3*	*GNA11*	*GNAQ*	*GNAS*
GPC3	*GRIN2A*	*H3F3A*	*HIST1H3B*	*HNF1A*	*HRAS*
HSPH1	*IDH1*	*IDH2*	*IKZF1*	*IL6ST*	*IL7R*
JAK1	*JAK2*	*JAK3*	*KDM6A*	*KDR*	*KIT*
KLF6	*KMT2D*	*KRAS*	*MAP2K1*	*MAP2K2*	*MAP2K4*
MAP3K1	*MAP4K3*	*MDM2*	*MED12*	*MEN1*	*MET*
MLH1	*MSH2*	*MSH6*	*MTOR*	*MUTYH*	*MYC*
MYD88	*NF1*	*NF2*	*NFE2L2*	*NFKBIA*	*NOTCH1*
NOTCH2	*NPM1*	*NRAS*	*PALB2*	*PAX5*	*PBRM1*
PDGFRA	*PHF6*	*PIK3CA*	*PIK3R1*	*PMS2*	*PPP2R1A*
PRDM1	*PRKAR1A*	*PTCH1*	*PTEN*	*PTPN11*	*RAC1*
RB1	*RET*	*ROS1*	*SDHB*	*SETD2*	*SF3B1*
SLC7A8	*SMAD4*	*SMARCA4*	*SMARCB1*	*SMO*	*SPOP*
SRC	*STK11*	*SUFU*	*TERT*	*TNFAIP3*	*TNFRSF14*
TP53	*TSC1*	*TSC2*	*TSHR*	*U2AF1*	*VHL*
WT1	*XPC*	*ZNF2*	*ZRSR2*		

表 7　GeneRead™ DNAseq Targeted Panels V2

1) DNA 抽出

同一症例内で腫瘍細胞を最も多く含む FFPE 標本を選択した。腫瘍標本は、正常粘膜組織をはじめとする腫瘍細胞以外の組織を肉眼的にトリミングし、可能な限り腫瘍細胞の含有率を高くした。その後、GeneRead DNA

FFPE Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。トリミング後の標本を 2 ml ロック付きマイクロチューブに入れ、160 µl の Deparaffinization Solution (Qiagen) を添加後に 10 秒間ボルテックスし、遠心した。56℃で 3 分間インキュベートし、室温に戻した。55 µl の滅菌蒸留水、25 µl の Buffer FTB (Qiagen)、20 µl の proteinase K (Qiagen) を添加し、ボルテックスでよく混和した。56℃で 1 時間インキュベートし、その後 90℃で 1 時間インキュベートした。蓋についたサンプルを全て遠心して落とし、下層の透明なサンプルを新しい 2 ml マイクロチューブに移し、115 µl の滅菌蒸留水を添加した。35 µl の UNG (Qiagen) を加え、ボルテックス後に 50℃で 1 時間インキュベートした。2 µl の RNase A (Qiagen) を添加し、室温で 2 分間インキュベートした。250 µl の Buffer AL (Qiagen) を添加し、ボルテックスで混和した。さらに 250 µl の 100 %エタノールを添加し、ボルテックスでよく混和した。700 µl のサンプルを 2 ml コレクションチューブにセットされた QIAamp MinElute Column に入れ、蓋を閉めて 15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブを新しいものに変え、残りのサンプルも同様に QIAamp MinElute Column を通した。コレクションチューブを新しいものに変え、500 µl の Buffer AW1 (Qiagen) を QIAamp MinElute Column に添加し、蓋を閉めて 15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブを新しいものに変え、500 µl の Buffer AW2 (Qiagen) を QIAamp MinElute Column に添加し、蓋を閉めて 15,000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションチューブを新しいものに変え、250 µl の 100% エタノールを QIAamp MinElute Column に添加し、蓋を閉めて 15,000 rpm で 1 分間遠心した。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、メンブレンを乾燥させるために蓋を開けて 15,000 rpm で 1 分間遠心した。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、40 µl の滅菌蒸留水を QIAamp MinElute Column のメンブレン中央に直接添加した。室温で 5 分間インキュベートさせ、蓋を閉めて 15,000 rpm で 1 分間遠心して DNA を溶出した。DNA の濃度は「TruSeq Amplicon Cancer Panel (illumina) を用いた NGS」と同様、Qubit dsDNA BR Assay Kits を用いて測定した。

2) DNA の質的評価

DNA の増幅能を評価するために、GeneRead DNA QuantiMIZE Assay (Qiagen) を用いた。1 サンプルあたり triplicate で検討するため、37.5 µl

の GeneRead qPCR SYBR Green Mastermix (Qiagen)、3 µl の Primer assay 100 (Qiagen)、19.5 µl の滅菌蒸留水を混合し、計 60 µl の PCR 用 mix (Assay 100) を作製した。同様に、Primer assay 200 (Qiagen) を混合し、計 60 µl の PCR 用 mix (Assay 200) を作製した。96-well プレートに、PCR 用 mix (Assay 100) を 20 µl ずつ 3 ウェルに添加し、同様に PCR 用 mix (Assay 200) を 20 µl ずつ別の 3 ウェルに添加した。4 µl の DNA 抽出液と 28 µl の滅菌蒸留水を混和し、5 µl ずつ PCR 用 mix (Assay 100) を添加した 3 ウェルと PCR 用 mix (Assay 200) を添加した 3 ウェルの計 6 ウェルに添加した。96-well プレートにシールをし、1,000 xg で 1 分間遠心した。使用機器は StepOnePlus™ であり、95℃で 10 分間反応させた後、95℃で 15 秒間・60℃で 2 分間を 40 サイクル行った。C_T は StepOne Software v2.2.2 で計算した。結果を Microsoft Excel のシートで取り出し、GeneRead DNA QuantiMIZE Assay KitExcel-based data analysis file (http://www.qiagen.com/us/products/next-gen-sequencing/sample-technologies/generead-dna-quantimize-kits/#resources) (Qiagen) をダウンロードして解析した。QC score≦0.04 を High quality とし、QC score ＞0.04 を Low quality とした。Low quality の場合、サンプル DNA の損傷の程度によってライブラリ作製時の PCR のサイクル数を増やすように指示が出たため、それに従って後述する「ライブラリ作製」では PCR の条件を設定した。

3) ライブラリ作製

サンプルとなる DNA を PCR 増幅した。DNA を 10 mg/µl に調整し、4 µl の DNA、4 µl の GeneRead DNAseq Panel 5x PCR Buffer (Qiagen)、10 µl の Primer mix pool (Qiagen)、1.36 µl の GeneRead HotStar Taq DNA Polymerase (Qiagen)、0.64 µl の滅菌蒸留水を混合し、計 20 µl とした。Primer mix pool は、Human Comprehensive Cancer GeneRead DNAseq Targeted Panel V2 に 4 種類、GeneRead Custom DNAseq Gene Panel に 4 種類あるため、各 Prime mix pool において同様に混合液を作製した。PCR は SimpliAmp Thermal Cycler で行い、Human Comprehensive Cancer GeneRead DNAseq Targeted Panel V2 は 95℃で 15 分間反応させた後、95℃で 15 秒間・60℃で 8 分間・72℃で 10 分間を 18 サイクル行い、GeneRead Custom DNAseq Gene Panel は 95℃で 15 分間反応させた後、95℃で 15 秒間・60℃で 4 分間・72℃で 10 分間を 26 サイクル行った。

PCR 産物を Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) で精製した。サンプルごとに 4 種類の PCR 産物を混合し、Midi プレートに移した。72 µl の AMPure XP ビーズを加えて透明な粘着シールで蓋をし、プレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌した。室温で 5 分間静置後、マグネットスタンド上で 5 分間静置し、上清 140 µl を新しいウェルに移した。Midi プレートをマグネットスタンドからおろし、128 µl の AMPure XP ビーズを加えて透明な粘着シールで蓋をし、プレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌した。室温で 5 分間静置後、マグネットスタンド上で 10 分間静置し、上清を破棄した。400 µl の 80%エタノールを加えて 30 秒後に上清を捨て、これを再度行った。室温で 15 分間乾燥させ、28 µl の滅菌蒸留水を加えた。透明の粘着シールを貼った後にプレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌後、室温で 3 分間静置し、マグネットスタンド上で 3 分間静置した。上清 25 µl を新しい 0.5 ml マイクロチューブに移した。

TapeStation D1000 (Agilent Tachnologies) で PCR 増幅の解析と濃度測定を行った。Human Comprehensive Cancer GeneRead DNAseq Targeted Panel V2 のアンプリコン数は 7951 で、GeneRead Custom DNAseq Gene Panel のアンプリコン数は 88 であるため、PCR 増幅後の DNA 濃度をもとに、計 100 ng となるようにアンプリコン比で両者を混合し、計 20.5 µl になるように滅菌蒸留水で調整した。混合しても 100 ng に満たない場合は、アンプリコン比を保ったまま混合液のみで計 20.5 µl とした。

DNA の末端修復をした。2.5 µl の End-Repair Buffer 10x (Qiagen)、2 µl の End-Repair Enzyme Mix (Qiagen)、20.5 µl の PCR 後 DNA 混合液を計 25 µl になるように混合した。25℃で 30 分間インキュベート後、75℃で 20 分間インキュベートした。

A(アデニン) を付加した。25 µl の末端修復後 DNA、3 µl の A-addition Buffer 10x (Qiagen)、3 µl の Klenow Fragment (Qiagen) を混合し、計 31 µl の混合液を作製した。37℃で 30 分間インキュベート後、75℃で 10 分間インキュベートした。

アダプターを連結させた。31 µl の A 付加済み DNA、45 µl の Ligation Buffer 2x (Qiagen)、1 µl の Adapter (Qiagen)、4 µl の T4 DNA Ligase (Qiagen)、9 µl の滅菌蒸留水を混合し、計 90 µl の混合液を作製した。25℃で 10 分間 (サーマルサイクラーを使用する際は蓋をせずに) インキュベートした。

アダプターを連結させた DNA を精製した。90 µl の反応液を Midi プレ

ートに移し、108 µl の AMPure XP ビーズを添加し、透明の粘着シールで蓋をした。プレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌後、室温で 5 分間静置し、マグネットスタンド上で 5 分間静置した。上清を捨て、400 µl の 80%エタノールを加えて 30 秒後に上清を捨てた。再度 400 µl の 80%エタノールを加えて 30 秒後に上清を捨て、室温で 10 分間乾燥させた。19 µl の滅菌蒸留水を加え、透明の粘着シールをしてプレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌後、室温で 3 分間静置した。マグネットスタンド上で 3 分間静置し、上清 17 µl を新しい 0.5 ml PCR チューブに移した。

精製したライブラリを PCR 増幅した。17 µl のライブラリ DNA、25 µl の Hi-Fi PCR Master Mix 2x (Qiagen)、1.5 µl の Primer Mix (Qiagen)、6.5 µl の滅菌蒸留水を混合し、計 50 µl とした。PCR は SimpliAmp Thermal Cycler で行い、98℃で 2 分間反応させた後、98℃で 20 秒間・60℃で 30 秒間・72℃で 30 秒間を 4 サイクル行い、その後 72℃で 1 分間反応させた。

PCR 増幅後のライブラリを精製した。50 µl の PCR 増幅後のライブラリを Midi プレートに移し、40 µl の AMPure XP ビーズを加えて透明の粘着シールで蓋をした。プレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌後、室温で 5 分間静置した。さらにマグネットスタンド上で 5 分間静置後、上清 86 µl を新しいウェルに移し、20 µl の AMPure XP ビーズを加えて透明な粘着シールで蓋をし、プレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌した。室温で 5 分間静置後、マグネットスタンド上で 5 分間静置し、上清を破棄した。200 µl の 80%エタノールを加えて 30 秒後に上清を捨て、これを再度行った。室温で 10 分間乾燥させ、30 µl の滅菌蒸留水を加えた。透明の粘着シールを貼った後にプレートシェーカーで 1,800 rpm で 2 分間撹拌後、室温で 3 分間静置し、マグネットスタンド上で 3 分間静置した。上清 28 µl を新しい 0.5 ml マイクロチューブに移した。

TapeStation D1000 でライブラリの濃度測定を行った。

4) NGS run

ライブラリを 4 nM に調整し、5 µl ずつ 1.5 ml マイクロチューブに移した。0.2 N NaOH：4 nM ライブラリ＝1：1 で混合し、室温で 5 分間インキュベートして変性させた。6 µl の変性したライブラリ混合液と 994 µl の Hibridization buffer を混和し、12 pM の変性ライブラリ混合液を作製した。5 µl の 20 pM PhiX と 3 µl の Hibridization buffer を転倒混和して計 8 µl とした。792 µl の 12 pM の変性ライブラリ混合液と 8 µl の 12.5 pM PhiX を混合し、そのうち 600 µl を MiSeq reagent cartridge に添加

し、MiSeq でシーケンスを行った。

5) 解析

シーケンスにより Miseq から得られた FastQ ファイルを Web 上の解析サーバーである GeneRead DNAseq Varinat Calling Service (Qiagen) (http://ngsdataanalysis.sabiosciences.com/NGS2/) で解析し、変異を検出した。リード数は 100 以上で、COSMIC ID を有したアミノ酸置換を生じさせる SNV と indel を検出した。胚細胞性変異は VF、Human Genetic Variation Database (HGVD) version 2.0 、 Exome Aggregation Consortium (ExAC) version 0.3.1 を参考に除外した。また、dbSNP を元に ClinVar でも胚細胞性変異か体細胞性変異かを検証し、胚細胞性変異を除外した。また、同時に作成された BAM ファイルは Integrative Genomics Viewer 2.3 で解析した。

統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics ver.24 (IBM) を用いた。2 つ以上のパラメーター間の相関については Kruskal-Wallis 検定、X^2 検定または Fisher の正確確立検定を行った。予後解析は生存率を Kaplan-Meier 法により算出し、2 群間の比較は log-rank test を用いた。P 値は 0.05 未満を統計学的に有意差ありと判定した。

実験結果

免疫組織化学染色によるタンパク質発現解析と臨床病理学的検討

胃癌におけるリンパ管侵襲や静脈侵襲、発症年齢などの臨床病理学的因子に関連する分子を検索するために、パイロット実験として最も簡便な方法である免疫組織化学染色を用いて、どのシグナル伝達経路が関与しているのかを検討することとした。

1）胃癌 21 症例による検討

対象とした 102 例のうち、リンパ管侵襲が高度な群（ly2, 3)、リンパ管侵襲および静脈侵襲が高度な群（ly2, 3 かつ v2, 3)、リンパ管侵襲および静脈侵襲が軽度な群（ly0, 1 かつ v0, 1)、若年発症の群（50 歳未満）が各群 5 症例前後となるように 21 例を選定し（表 7）、受容体群 7 種類（EGFR、PDGFRα、PDGFRβ、c-Kit、HER2、VEGFR2、CD44）とシグナル伝達分子 15 種類（CrkII、CrkL、Dock180、Cox2、E-cadherin、β-catenin、CyclinD1、p53、p-p38、MMP2、MMP7、Claudin 5、Integrinα5、IntegrinαV、Integrinβ1）の計 22 種類の免疫組織化学染色を施行した。

年齢	中央値		［年齢幅］	
	72		[33-90]	
	50 歳未満		50 歳以上	
	4		17	
性別	男性		女性	
	12		9	
組織型	tub		por/sig	
	10		11	
深達度	T1	T2	T3	T4
	8	0	3	10
間質量	med	int	sci	
	9	7	5	
リンパ管侵襲	ly0	ly1	ly2	ly3
	7	2	0	12
静脈侵襲	v0	v1	v2	v3
	9	6	1	5

表 8　胃癌 21 症例の臨床病理学的因子の要約

以下に、各分子における陽性を呈した症例の一部を提示する（図 5)。

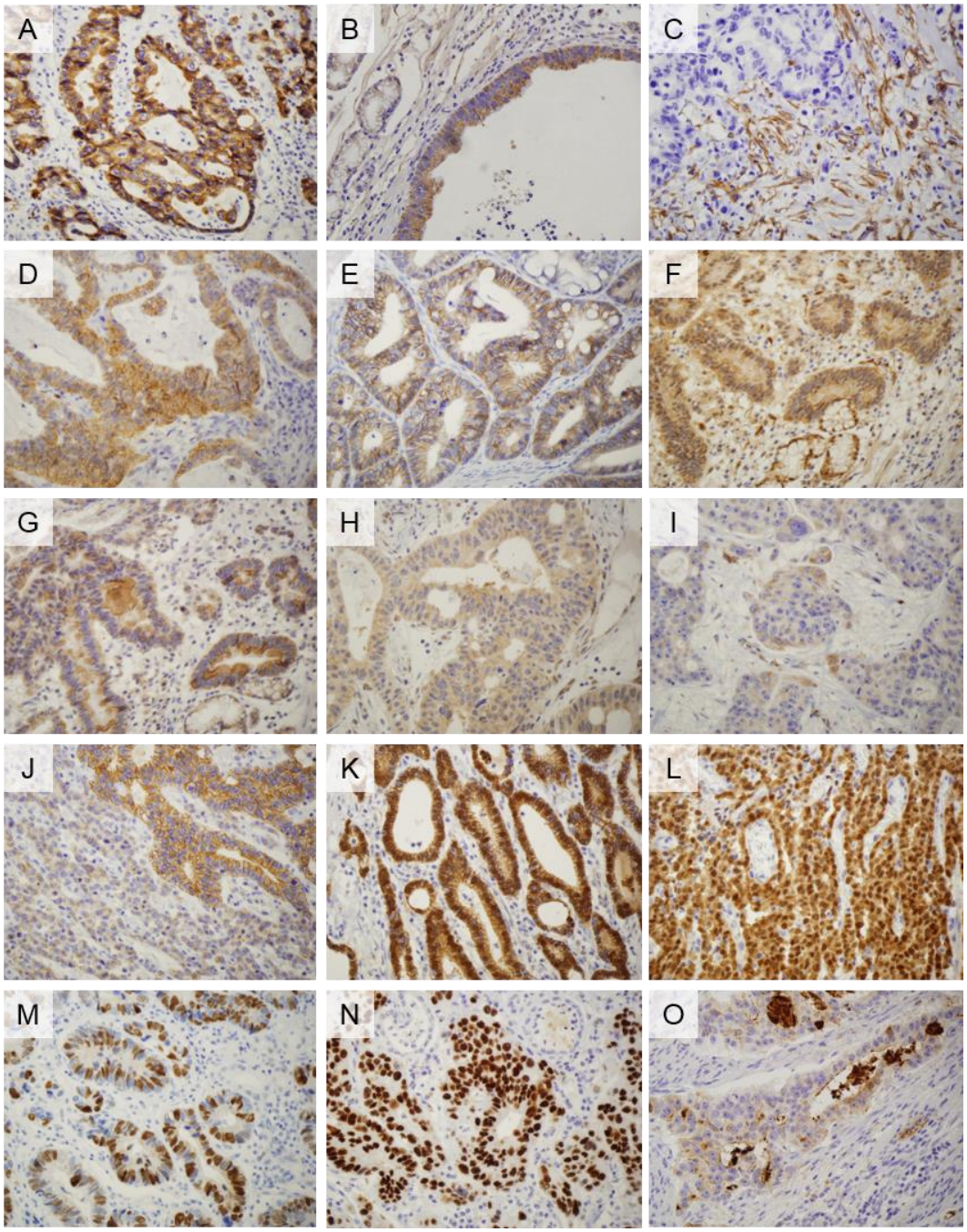


図 5　免疫組織化学染色の陽性像

A：(IS) 3 + (PS) 2 = (TS) 5 (EGFR、400 倍)。B：(IS) 3 + (PS) 2 = (TS) 5 (PDGFR α、400 倍)。C：PDGFR β は間質の染色程度を評価した。(IS) 3 + (PS) 3 = (TS) 6 (PDGFR β、400 倍)。D：(IS) 2 + (PS) 2 = (TS) 4 (c-Kit、400 倍)。E：(IS) 3 + (PS) 2 = (TS) 5 (HER2、400

倍)。F：(IS) 2 + (PS) 3 = (TS) 5 (CrkII、400 倍)。G：(IS) 2 + (PS) 3 = (TS) 5 (CrkL、400 倍)。H：(IS) 1 + (PS) 3 = (TS) 4 (Dock180、400 倍)。I：(IS) 1 + (PS) 3 = (TS) 4 (Cox2、400 倍)。J、K、L：同一症例で、E-cadherin が細胞膜に陽性の領域ではβ-catenin も細胞膜に陽性であり、E-cadherin が陰性または細胞質に軽度陽性の領域ではβ-catenin は核に陽性であった。J：(IS) 3 + (PS) 1 = (TS) 4 (E-cadherin、400 倍)。K：β-catenin は細胞膜に陽性。(IS) 3 + (PS) 1 = (TS) 4 (β-catenin、400 倍)。L：β-catenin は核に陽性。(IS) 3 + (PS) 2 = (TS) 5 (β-catenin、400 倍)。M：(IS) 3 + (PS) 2 = (TS) 5 (CyclinD1、400 倍)。N：(IS) 3 + (PS) 3 = (TS) 6 (p53、400 倍)。O：(IS) 1 + (PS) 3 = (TS) 4 (MMP7、400 倍)。

間質量が多い症例では EGFR 陽性率が高い傾向があった（med：22.2%、int：71.4%、sci：80.0%)。また、高分化胃癌（tubular adenocarcinoma, tub）では HER2 陽性率が高い傾向があった（陽性：80.0%、陰性：20.0%)。低分化胃癌（poorly differentiated carcinoma, por / signet-ring cell carcinoma, sig）では β-catenin の核での陽性率が高い傾向があった（陽性：63.6%、陰性：36.4%)。若年発症症例では、E-cadherin が細胞膜陰性で β-catenin が核に陽性を呈した（図 6)。

また、5 例（23.8%）と少数ではあるが、c-Kit 陽性症例を認めた。しかし、リンパ管侵襲および静脈侵襲と関連する因子は見られなかった。

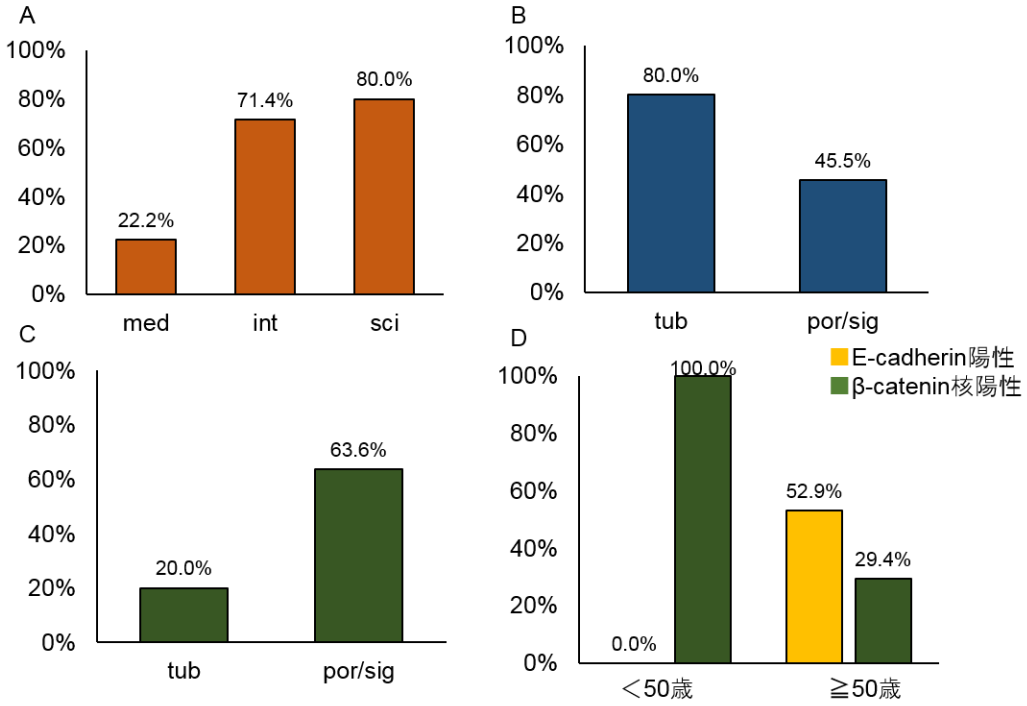


図 6　胃癌 21 症例における臨床病理学的因子と各分子の発現率

A：各間質量における EGFR の陽性率。B：各組織型における HER2 の陽性率。C：各組織型における β-catenin の核陽性率。D：発症年齢における E-cadherin と β-catenin の陽性率。med；髄様型（medullary type）、int；中間型（intermediate type）、sci；硬性型（scirrhous type）、tub；管状腺癌（tubular adenocarcinoma）、por；低分化腺癌（poorly differentiated carcinoma）、sig；印環細胞癌（signet-ring cell carcinoma）。

2）胃癌 TMA 72 症例によるリンパ管侵襲および静脈侵襲と発症年齢に関する検討

21 症例の検討では、間質量や組織型と関連傾向を示す分子として EGFR や HER2 が候補に上がり、発症年齢と関与する可能性がある分子として β-catenin と E-cadherin を認めた。そこで統計学的に解析するために症例数を増やし、リンパ管侵襲が高度な群（ly2, 3）、リンパ管侵襲および静脈侵襲が高度な群（ly2, 3 かつ v2, 3）、リンパ管侵襲および静脈侵襲が軽度な群（ly0, 1 かつ v0, 1）、若年発症の群（50 歳未満）が各群 15 症例前後となるように 72 例（表 9）を選定した。また、効率的に免疫組織化学染色および評価作業を行うために、TMA 標本を作成した。検討する分子は前述した 21 症例の検討結果を参考にし、分子標的薬の治療標的となる受容体群 6 種類（PDGFRα、PDGFRβ、EGFR、HER2、c-Kit、c-Met）とその下流に位

置するシグナル伝達分子 8 種類（p-mTOR、COX2、p53、E-cadherin、β-catenin、CrkL、CrkII、DOCK180）の計 14 種類とした。

年齢	中央値		［年齢幅］	
	70		[33-90]	
	50 歳未満		50 歳以上	
	15		57	
性別	男性		女性	
	46		26	
組織型	tub	por/sig	AFP 産生	
	25	45	2	
深達度	T1	T2	T3	T4
	8	10	24	30
リンパ管侵襲	ly0	ly1	ly2	ly3
	23	4	1	44
静脈侵襲	v0	v1	v2	v3
	29	28	2	13
リンパ節転移	N0	N1	N2	N3
	23	19	19	11
Stage	I	II	III	IV
	19	16	22	15

表 9　胃癌 TMA72 症例の臨床病理学的因子の要約

低分化胃癌と比較して高分化胃癌では、PDGFRα (por/sig : 24.4%、tub : 64.0%、P= 0.003) と DOCK180 (por/tub : 26.7%、tub : 52.0%、P= 0.025) の陽性率が高かった (図 7)。

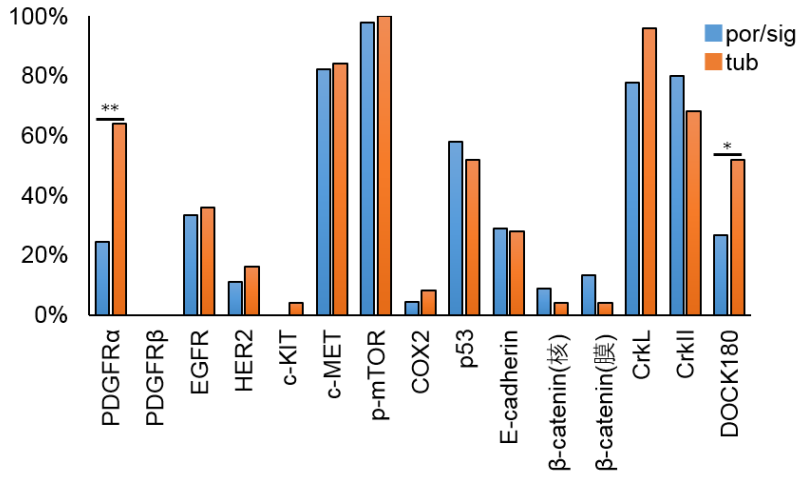


図 7　胃癌 TMA72 症例における各組織型と各分子の陽性率
管状腺癌において PDGFR α と DOCK180 は陽性率が高かった。
＊；P < 0.05、＊＊；P < 0.01。

高度のリンパ管侵襲を呈する症例では、リンパ管侵襲が軽度の症例よりも EGFR 陽性率が高かった (ly0, 1 : 18.5%、ly2, 3 : 42.2%、P= 0.039) (図 8)。

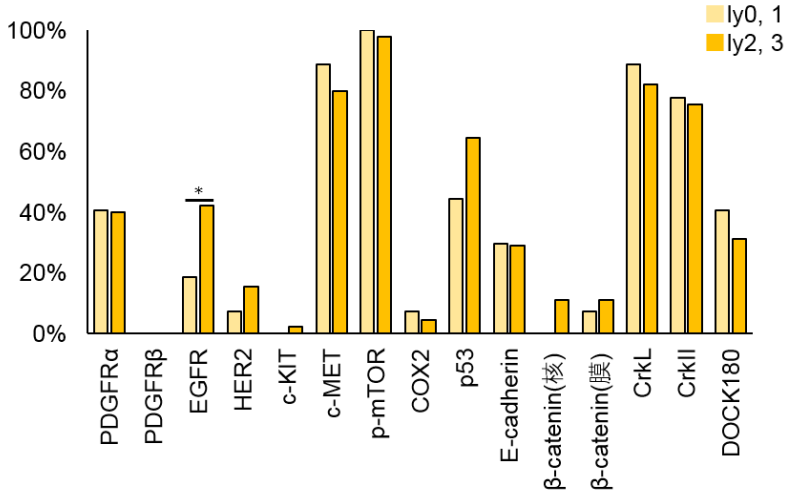


図 8　胃癌 TMA72 症例におけるリンパ管侵襲と各分子の陽性率
高度のリンパ管侵襲を呈する症例は EGFR の陽性率が高かった。＊；P < 0.05。

静脈侵襲を呈する症例では、静脈侵襲を呈さない症例より p53 の陽性率が高かった（v0：41.4%、v1-3：67.4%、P= 0.028）(図 9)。

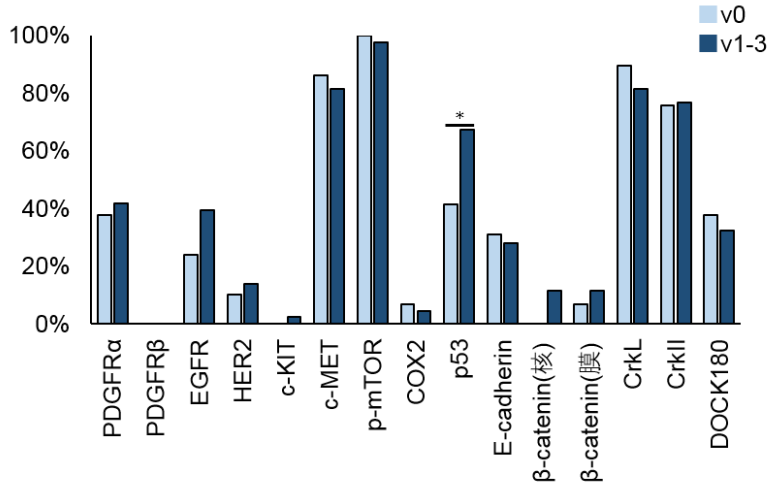


図 9　胃癌 TMA72 症例における静脈侵襲と各分子の陽性率
静脈侵襲を呈する症例は静脈侵襲を認めない症例より、p53 の陽性率が高かった。＊；P < 0.05。

リンパ節転移を認める症例では、リンパ節転移を認めない症例より p53 の陽性率が高かった（N0：39.1%、N1-3：64.6%、P= 0.036）(図 10)。

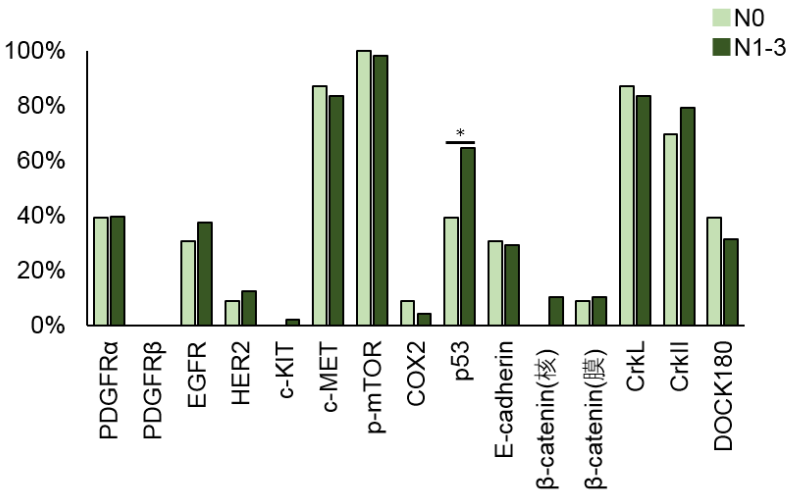


図 10　胃癌 TMA72 例におけるリンパ節転移と各分子の陽性率
リンパ節転移を認める症例はリンパ節転移を認めない症例より、p53 の陽性率が高かった。＊；P < 0.05。

遠隔転移に関与する特異的な分子発現の傾向は認めなかった（図 11)。

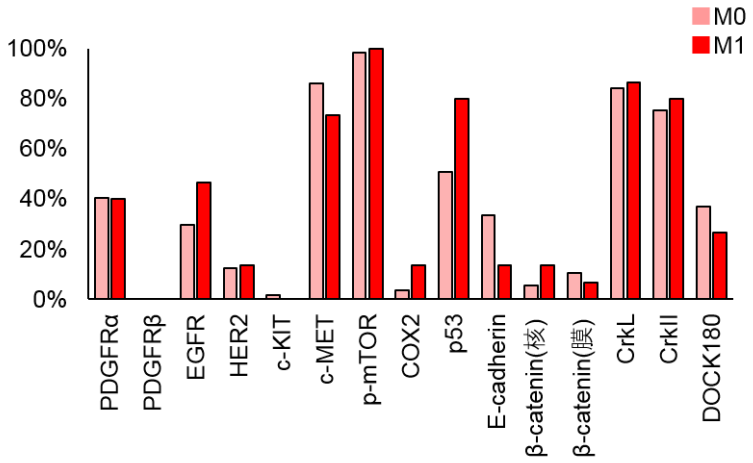


図 11　胃癌 TMA72 例における遠隔転移と各分子の陽性率
遠隔転移と有意に相関する分子は認めなかった。

若年発症症例では低分化胃癌の症例を多く認めたが（por/sig：80%、tub：20%）(図 12A)、特異的な分子発現の傾向は認めなかった（図 12B)。

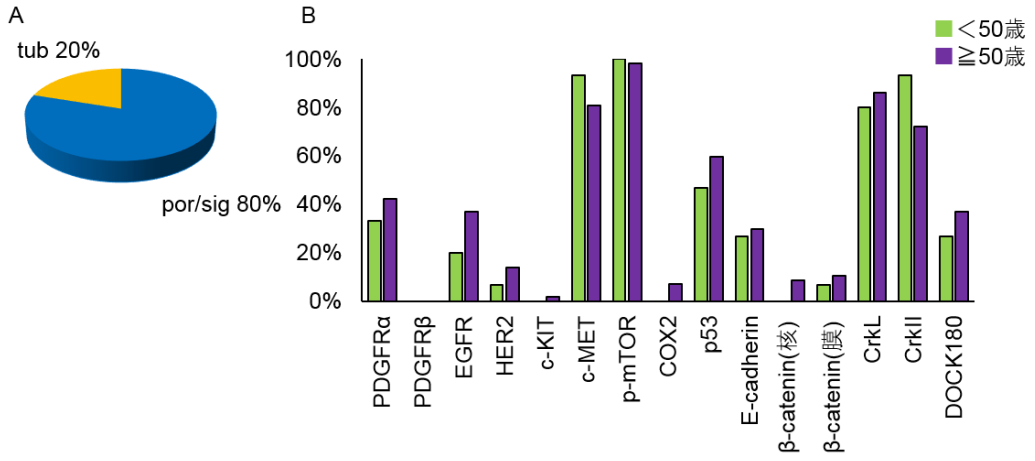


図 12　発症年齢における組織型と各分子の陽性率
A：若年発症症例における組織型の内訳。低分化胃癌の症例が多かった。B：胃癌 TMA72 症例における発症年齢と各分子の陽性率。発症年齢に特異的な分子発現は認めなかった。

3）低分化胃癌 41 症例による検討

若年発症症例では低分化胃癌が多く見られることがわかったため、組織型を por および sig に絞った。発症年齢で両群が約同数になり、かつ、病理学的因子が各群とも同じような内訳になるような 41 症例（表 10）の検討をした。胃癌には heterogenity があり、TMA ではその腫瘍の特性を十分に評価できない可能性がある。そのため、腫瘍細胞を最も多く含むブロックでの免疫組織化学染色を施行した。分子標的薬の治療標的となる受容体群 4 種類（EGFR、HER2、c-Kit、c-Met）とシグナル伝達分子 2 種類（E-cadherin、β-catenin）の計 6 種類の免疫組織化学染色を施行した。

年齢	中央値		［年齢幅］	
	75		[30-91]	
	50 歳未満		50 歳以上	
	20		21	
性別	男性		女性	
	19		22	
深達度	T1	T2	T3	T4
	12	2	11	16
リンパ管侵襲	ly0	ly1	ly2	ly3
	18	12	5	6
静脈侵襲	v0	v1	v2	v3
	23	9	7	2
リンパ節転移	N0	N1	N2	N3
	19	6	7	9
Stage	I	II	III	IV
	13	11	13	4

表 10　低分化胃癌 41 症例の臨床病理学的因子の要約

41 例から標準治療を施行していない 5 例を除外した 36 例において、リンパ管侵襲および静脈侵襲の程度による生存率を解析した（図 13)。リンパ管侵襲が高度な症例（ly2, 3）は軽度な症例（ly0, 1）よりも生存率が低かった（P= 0.011)。また、静脈侵襲が高度な症例（v2, 3）は軽度な症例（v0, 1）よりも生存率が低かった（P< 0.001)。

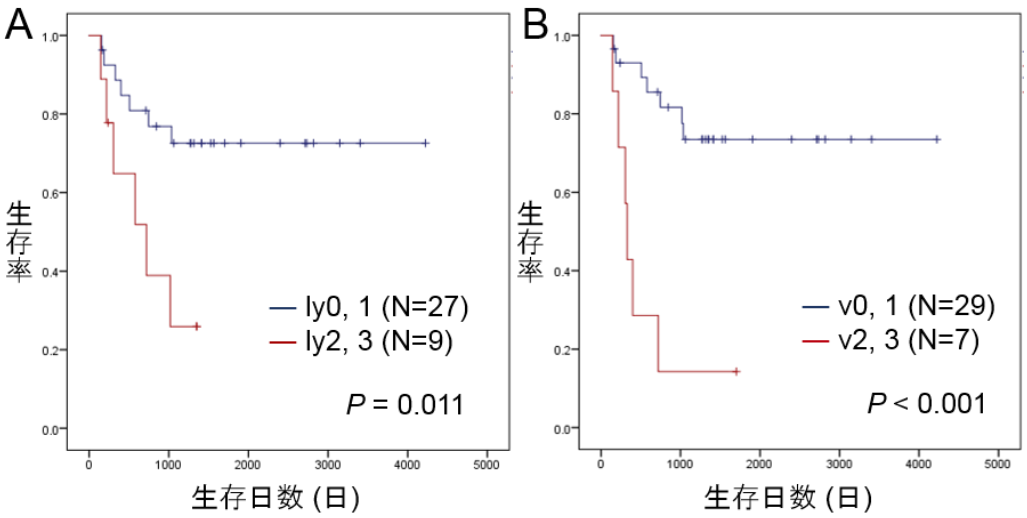


図 13　低分化胃癌 36 症例におけるリンパ管侵襲および静脈侵襲の程度による予後解析

A：リンパ管侵襲の程度による予後解析。高度なリンパ管侵襲（ly2, 3）を呈する症例は生存率が低かった。B：静脈侵襲の程度による予後解析。高度な静脈侵襲（v2, 3）を呈する症例は生存率が低かった。

β-catenin 陽性を示した症例は 28 例で、そのうち核陽性を示した症例は 2 例、細胞膜陽性を示した症例は 26 例であった。高度なリンパ管侵襲（ly2, 3）を呈する症例では、β-catenin 細胞膜陽性率が低かった（ly0, 1：22 例（73.3%）、ly2, 3：4 例（36.3%）、$P = 0.036$）（図 14）。

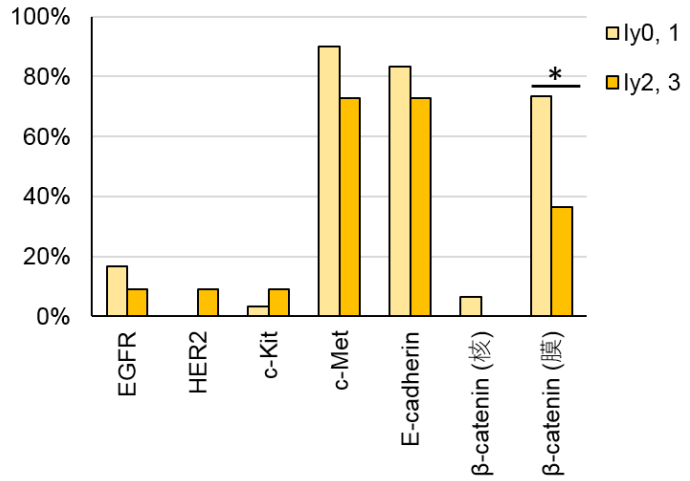


図 14　低分化胃癌 41 例におけるリンパ管侵襲と各分子の陽性率
高度なリンパ管侵襲（ly2, 3）を呈する症例は軽度なリンパ管侵襲（ly0, 1）を呈する症例よりも、β-catenin 陽性率が低かった。**；$P < 0.05$。

高度な静脈侵襲（v2, 3）を呈する症例では、β-catenin 細胞膜陽性率が低かった（v0, 1：23 例（71.9%）、v2, 3：3 例（33.3%）、$P = 0.044$）（図 15）。

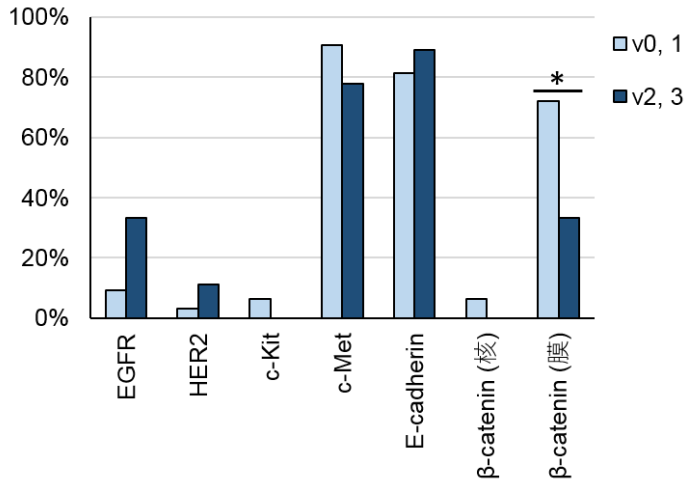


図 15　低分化胃癌 41 症例における静脈侵襲と各分子の陽性率
高度な静脈侵襲（v2, 3）を呈する症例は軽度な静脈侵襲（v0, 1）を呈する症例よりも β-catenin 陽性率が低かった。*；$P < 0.05$。

リンパ節転移を有する症例において EGFR 陽性の症例を多く認めたが、有意差はつかなかった（N0：2 例（10.5%）、N1-3：4 例（81.8%）、P= 0.386）（図 16）。

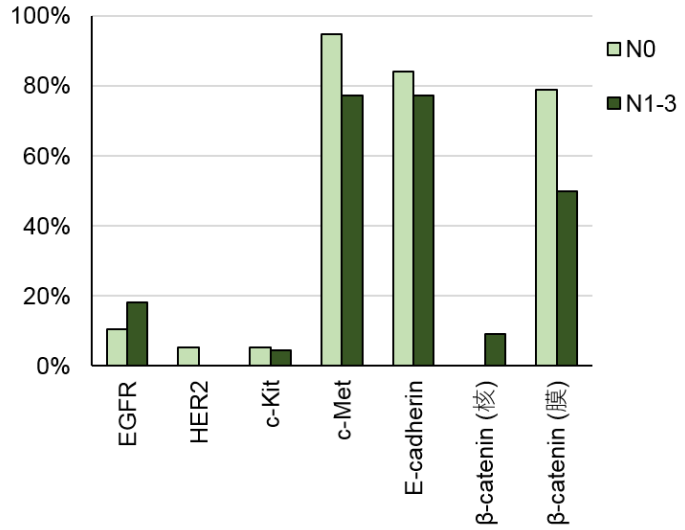


図 16　低分化胃癌 41 症例におけるリンパ節転移と各分子の陽性率
リンパ節転移の有無による特異的な分子発現の傾向は認めなかった。

発症年齢による特異的な分子発現の傾向は見られなかった（図 17）。

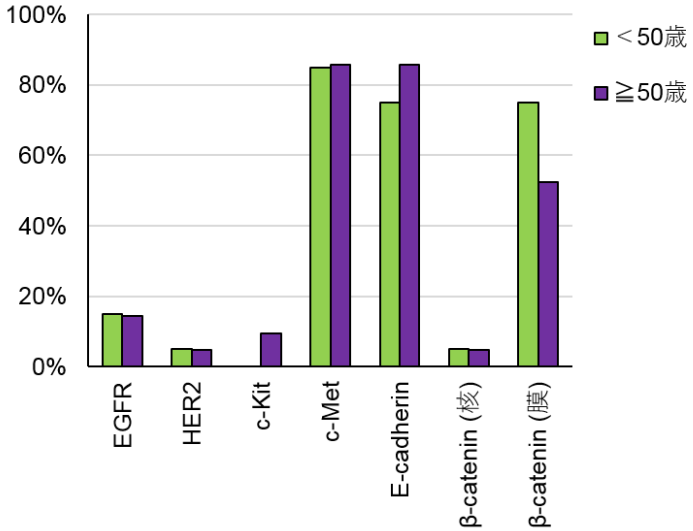


図 17　低分化胃癌 41 症例における発症年齢と各分子の陽性率
発症年齢による特異的な分子発現の傾向は認めなかった。

HER2 陽性症例は 1 例（2.4%）のみ認められ、c-Kit 陽性症例は 2 例（4.9%）認められた。

予後解析の結果（図 18)、β-catenin 細胞膜陰性である症例は β-catenin が細胞膜陽性である症例よりも生存率が低かった（P = 0.018)。また、EGFR 陽性の症例は EGFR 陰性の症例よりも生存率が低かった（P = 0.005)。

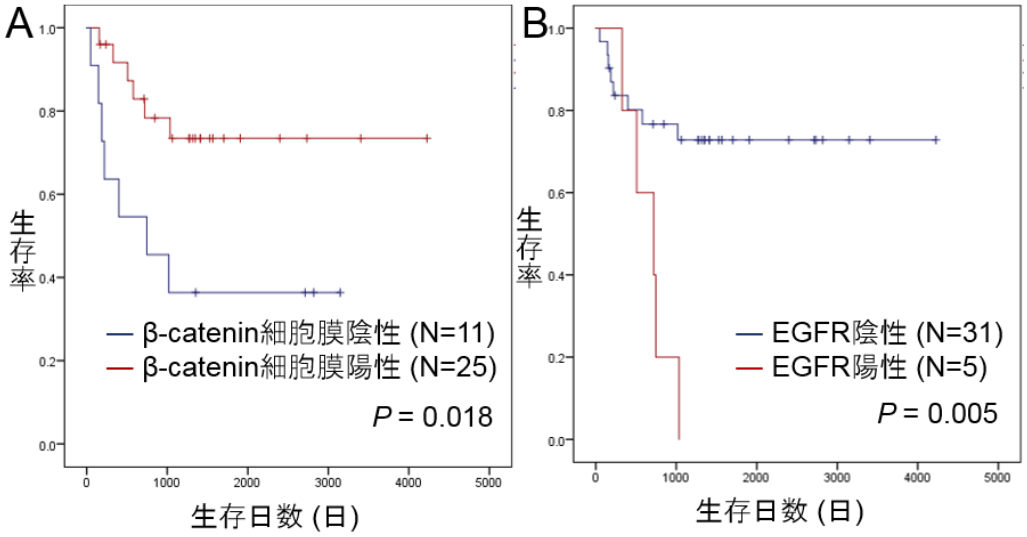


図 18　低分化胃癌 41 症例における免疫組織化学と予後解析

A：β-catenin の発現による予後解析。β-catenin の細胞膜での発現が低下した症例は生存率が低かった。B：EGFR の発現による予後解析。EGFR 陽性の症例は生存率が低かった。

特殊染色および ISH による微生物感染解析と臨床病理学的検討

胃癌の発生には環境因子も大きく影響しており、中でも *H. pylori* 感染や EBV 感染は主な発癌要因である。そこで、これらの感染を有する症例を検索し、感染の有無が臨床病理学的因子および生存率と関連があるかを検討した。

1) *H. pylori* 感染と臨床病理学的因子の検討

免疫組織化学染色を施行した「低分化胃癌 41 症例」と同じ 41 症例（表 10）を対象とした。41 例中、ギムザ染色で *H. pylori* を認めた（図 19A）症

例は 12 例（29.3%）であった。その内訳としては、若年発症症例で 4 例（若年発症の 20.0%）、高齢発症症例で 8 例（高齢発症の 38.1%）であった。各臨床病理学的因子と有意差を持った関連はなく、また予後解析で感染の有無との有意差は検出されなかった。

2) EBV 感染と臨床病理学的因子の検討

免疫組織化学染色を施行した「低分化胃癌 41 症例」と同じ 41 症例（表 10）を対象とした。41 例中、EBER-ISH で EBV を認めた（図 19B）症例は 3 例（7.3%）であった。その内訳としては、若年発症症例で 2 例（若年発症の 10%）、高齢発症症例で 1 例（高齢発症の 4.8%）であった。各臨床病理学的因子と有意差を持った関連はなく、また予後解析で感染の有無との有意差は検出されなかった。

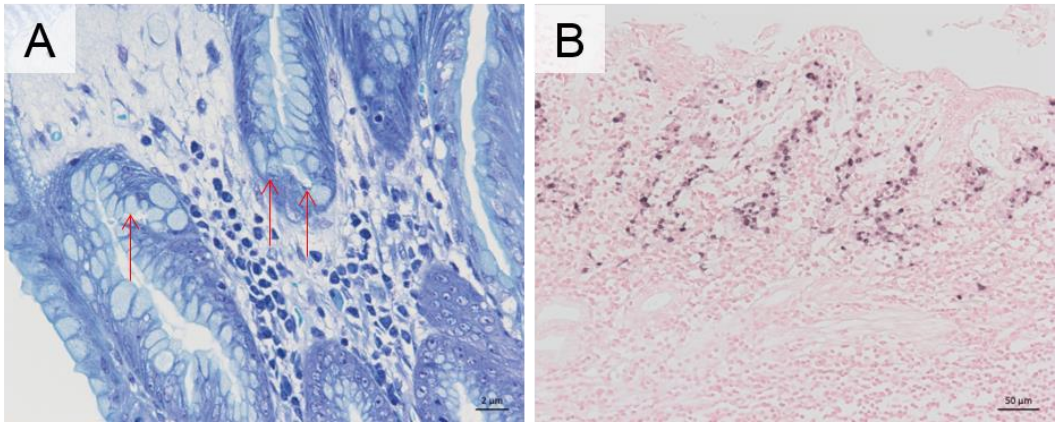


図 19　微生物感染の評価

A：腺窩上皮の表層にギムザ染色で青く染まる桿菌（矢印）が集簇していた（ギムザ染色、400 倍）。B：暗紫色に染まる EBV に感染した腫瘍細胞を多数認めた（EBER-ISH、50 倍）。

PCR アレイおよび RT-PCR による mRNA 発現解析と臨床病理学的検討

免疫組織化学染色より定量性な発現解析が可能である RT-PCR で mRNA の発現解析を行った。また、免疫組織化学染色による検討では発症年齢に関与する分子を認めなかったため、まずは検索する分子数を増やした PCR アレイで網羅的に検討し、その際に候補分子に上がったものについては RT-PCR で再現性を確認することとした。

1）発症年齢に関与する因子の検討

若年発症症例 5 例と高齢発症症例 4 例に対して PCR アレイを施行し、若年発症症例 - 高齢発症症例の組み合わせ（図 20）を計 20 通り作成した。10 通り以上の組み合わせにおいて、若年群のみで高発現の傾向を示した分子を検索したところ、*APAF1*、*SOX10*、*VEGFC* の 3 分子が候補に上がった。

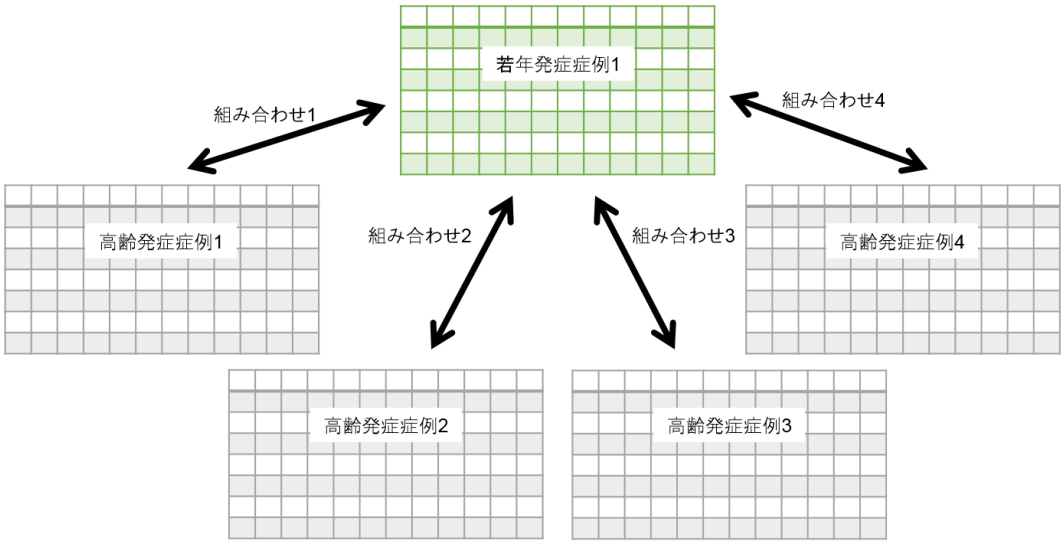


図 20　若年発症症例 - 高齢発症症例の組み合わせ

若年発症症例 - 高齢発症症例の組み合わせを計 20 通り作成した。

これら 3 分子の発現を、免疫組織化学染色を施行した「低分化胃癌 41 症例」と同じ 41 症例（表 10）を対象として、RT-PCR で再現性を確認した。*GAPDH* の C_T 値が 30 以上の 8 例を解析から除外し、33 例で検討を行った。*APAF1* は PCR 増幅された症例と増幅不良な症例が混在しており、発現解析をするには不適切と判断した。*SOX10* および *VEGFC* は、PCR 増幅は良好な結果が得られたが、その発現の程度は発症年齢と有意な相関関係は認められなかった（*SOX10*：$P = 0.092$、*VEGFC*：$P = 0.393$）。

そこで、解析対象を他の臨床病理学的因子にも拡げてみたところ、*SOX10* はリンパ管侵襲と有意な相関を示し（$P = 0.022$）、リンパ管侵襲を呈する症例（ly0）はリンパ管侵襲を呈する症例（ly1-3）よりも *SOX10* 低発現率が高かった（$P = 0.007$）（表 11）。*VEGFC* では臨床病理学的因子との有意な関連は認めなかった（表 12）。

	SOX10 発現				*SOX10* 発現		
	低発現	高発現	*P* 値		低発現	高発現	*P* 値
年齢			0.453	静脈侵襲			0.63
＜50	4	10		v0	6	13	
≧50	7	12		v1	2	6	
性別			0.267	v2	3	2	
男性	3	10		v3	0	1	
女性	8	12		静脈侵襲 なし vs あり			0.547
深達度			0.64	v0	6	13	
T1	3	9		v1-3	5	9	
T2	0	2		静脈侵襲 軽度 vs 高度			0.308
T3	3	5		v0, 1	8	19	
T4	5	6		v2, 3	3	3	
リンパ管侵襲			0.022*	リンパ節転移			0.465
ly0	1	13		N0	6	11	
ly1	5	6		N1	0	4	
ly2	3	1		N2	3	3	
ly3	2	2		N3	2	4	
リンパ管侵襲 なし vs あり			0.007**	リンパ節転移 なし vs あり			0.805
ly0	1	13		N0	6	11	
ly1-3	10	9		N1-3	5	11	
リンパ管侵襲 軽度 vs 高度			0.059	pStage			0.554
ly0, 1	6	19		I	3	9	
ly2, 3	5	3		II	3	6	
				III	5	5	
				IV	0	2	

表 11　低分化胃癌 33 症例における RT-PCR による *SOX10* 発現と臨床病理学的検討

＊；$P < 0.05$、＊＊；$P < 0.01$。

	VEGFC 発現				*VEGFC* 発現		
	低発現	高発現	*P* 値		低発現	高発現	*P* 値
年齢			0.393	静脈侵襲			1
＜50	6	8		v0	10	9	
≧50	11	8		v1	4	4	
性別			0.226	v2	3	2	
男性	5	8		v3	0	1	
女性	12	8		静脈侵襲 軽度 vs 高度			0.642
深達度			0.179	v0, 1	14	13	
T1	5	7		v2, 3	3	3	
T2	2	0		リンパ節転移			0.421
T3	6	2		N0	11	6	
T4	4	7		N1	1	3	
リンパ管侵襲			0.843	N2	3	3	
ly0	6	8		N3	2	4	
ly1	7	4		リンパ節転移 なし vs あり			0.118
ly2	2	2		N0	11	6	
ly3	2	2		N1-3	6	10	
リンパ管侵襲 軽度 vs 高度			0.619	pStage			0.165
ly0, 1	13	12		I	6	6	
ly2, 3	4	4		II	7	2	
				III	4	6	
				IV	0	2	

表 12　低分化胃癌 33 症例における *VEGFC* 発現と臨床病理学的検討

また、*GAPDH* の C_T 値が 30 未満の 33 例から標準治療を行わなかった 4 例を除外した 29 症例で *SOX10* および *VEGFC* の発現による予後解析を行ったが、有意差は認めなかった（*SOX10*：$P = 0.928$、*VEGFC*：$P = 0.502$）（図 21）。

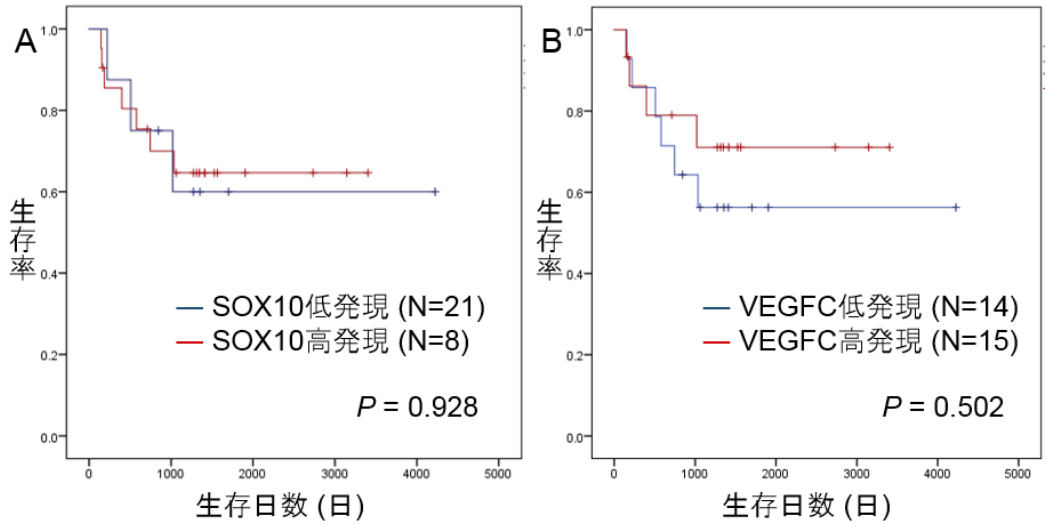


図 21　低分化胃癌 29 症例における *SOX10* および *VEGFC* 発現による予後解析

A：*SOX10* 発現による予後解析。*SOX10* の発現は生存率に関連しなかった。B：*VEGFC* 発現による予後解析。*VEGFC* 発現は生存率に関連しなかった。

2）リンパ管侵襲および静脈侵襲に関与する因子の検討

1）と同様に、リンパ管侵襲および静脈侵襲が高度な症例（ly2, 3 かつ v2, 3）3 例と軽度な症例（ly0, 1 かつ v0, 1）4 例に対して PCR アレイを施行し、リンパ管侵襲および静脈侵襲が高度 - 軽度の組み合わせ（図 22）を計 12 通り作成した。6 通り以上の組み合わせにおいて、高度群のみで高発現の傾向を示した分子を検索したところ、*ARNT* と *KDR* の 2 分子が候補に上がった。

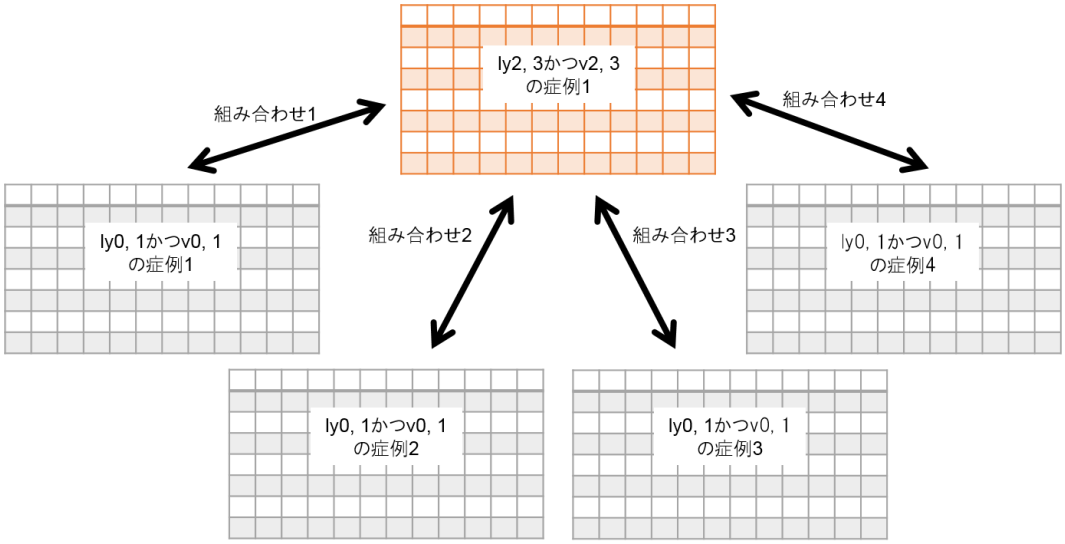


図 22　リンパ管侵襲および静脈侵襲が高度 - 軽度の組み合わせ

リンパ管侵襲および静脈侵襲が高度 - 軽度の組み合わせを計 12 通り作成した。

発症年齢で両群が約同数になり、かつ、病理学的因子が各群とも同様な内訳となるような 26 例（表 13）において RT-PCR を行った。

年齢	中央値		［年齢幅］	
	75.5		[33-91]	
	50 歳未満		50 歳以上	
	12		14	
性別	男性		女性	
	12		14	
深達度	T1	T2	T3	T4
	8	2	5	11
リンパ管侵襲	ly0	ly1	ly2	ly3
	13	8	2	3
静脈侵襲	v0	v1	v2	v3
	14	5	5	2
リンパ節転移	N0	N1	N2	N3
	12	3	5	6
Stage	I	II	III	IV
	8	6	9	3

表 13　低分化胃癌 26 症例の臨床病理学的因子の要約

GAPDH の C_T 値が 30 以上の 6 例を解析から除外し、20 例で検討を行った。*ARNT* および *KDR* いずれも PCR 増幅は良好な結果が得られたが、*ARNT*（表 14）および *KDR*（表 15）はいずれもリンパ管侵襲と有意な相関は認めず（*ARNT*：$P = 0.490$、*KDR*：$P = 0.964$）、静脈侵襲とも有意な相関関係は認めなかった（*ARNT*：$P = 0.895$、*KDR*：$P = 0.477$）。その他の臨床病理学的因子との有意な関連も認めなかった。

	ARNT 発現		
	低発現	高発現	*P* 値
年齢			0.608
＜50	5	3	
≧50	8	4	
性別			0.392
男性	6	2	
女性	7	5	
深達度			0.117
T1	3	5	
T2	1	1	
T3	4	0	
T4	5	1	
リンパ管侵襲			0.49
ly0	5	5	
ly1	6	2	
ly2	1	0	
ly3	1	0	
リンパ管侵襲 軽度 vs 高度			0.411
ly0, 1	11	7	
ly2, 3	2	0	

	ARNT 発現		
	低発現	高発現	*P* 値
静脈侵襲			0.895
v0	7	4	
v1	3	2	
v2	2	1	
v3	1	0	
静脈侵襲 軽度 vs 高度			0.561
v0, 1	10	6	
v2, 3	3	1	
リンパ節転移			0.686
N0	7	4	
N1	2	0	
N2	2	2	
N3	2	1	
リンパ節転移 なし vs あり			0.63
N0	7	4	
N1-3	6	3	
pStage			0.518
I	4	4	
II	3	2	
III	5	1	
IV	1	0	

表 14　低分化胃癌 20 症例における *ARNT* 発現と臨床病理学的検討

	KDR 発現				*KDR* 発現		
	低発現	高発現	*P* 値		低発現	高発現	*P* 値
年齢			0.347	静脈侵襲			0.477
＜50	8	0		v0	10	1	
≧50	10	2		v1	5	0	
性別			0.653	v2	2	1	
男性	7	1		v3	1	0	
女性	11	1		静脈侵襲 軽度 vs 高度			0.368
深達度			0.797	v0, 1	15	1	
T1	7	1		v2, 3	3	1	
T2	2	0		リンパ節転移			0.477
T3	4	0		N0	10	1	
T4	5	1		N1	2	0	
リンパ管侵襲			0.964	N2	4	0	
ly0	9	1		N3	2	1	
ly1	7	1		リンパ節転移 なし vs あり			0.711
ly2	1	0		N0	10	1	
ly3	1	0		N1-3	8	1	
リンパ管侵襲 軽度 vs 高度			0.805	pStage			0.797
ly0, 1	16	2		I	7	1	
ly2, 3	2	0		II	5	0	
				III	5	1	
				IV	1	0	

表 15　低分化胃癌 20 症例における *KDR* 発現と臨床病理学的検討

また、*GAPDH* の C_T 値が 30 未満の 20 例から標準治療を行わなかった 3 例を除外した 17 症例で *ARNT* および *KDR* の発現による予後解析を行ったが、有意差は認めなかった（*ARNT*：$P = 0.513$、*KDR*：$P = 0.671$）(図 23)。

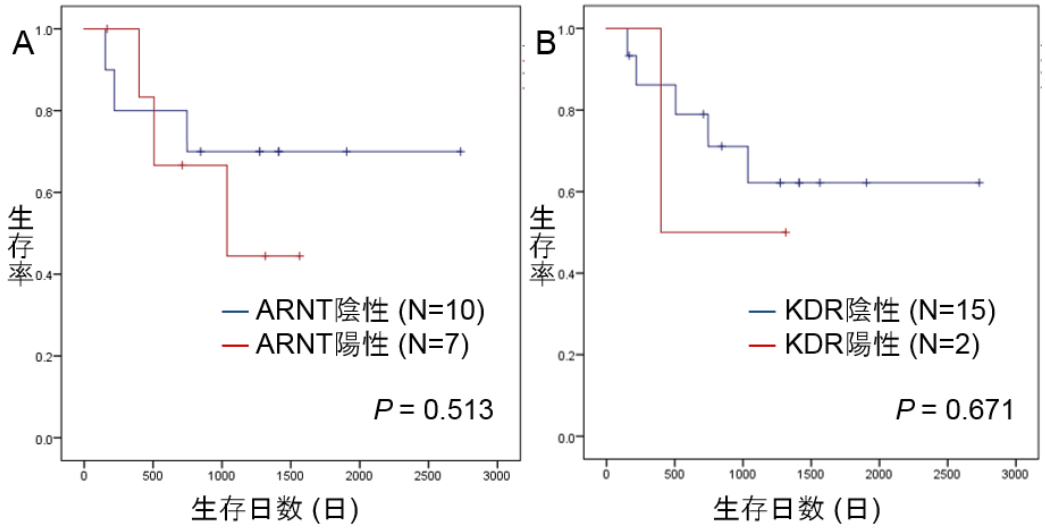


図 24　低分化胃癌 17 症例における *ARNT* および *KDR* 発現による予後解析

A：*ARNT* 発現による予後解析。*ARNT* の発現は生存率に関連しなかった。B：*KDR* 発現による予後解析。*KDR* 発現は生存率に関連しなかった。

免疫組織化学染色による Sox10 の解析

若年発症症例と高齢発症症例を PCR アレイにより比較検討したところ、発症年齢に関与する可能性がある因子として *SOX10* が浮上したが、RT-PCR による検討で再現性が得られず、発症年齢には関与しないことが判明した。しかし、その他の臨床病理学的因子および生存率との検討を行った結果、*SOX10* とリンパ管侵襲に相関が見られた。そこで、免疫組織化学染色を施行した「低分化胃癌 41 症例」と同じ 41 症例（表 10）を対象として、Sox10 の免疫組織化学染色を施行した。

腫瘍細胞における Sox10 の核陽性率は 2.4%で、Sox10 の細胞質陽性率は 34.1%、Sox10 の陰性率は 63.5%であった（図 24)。

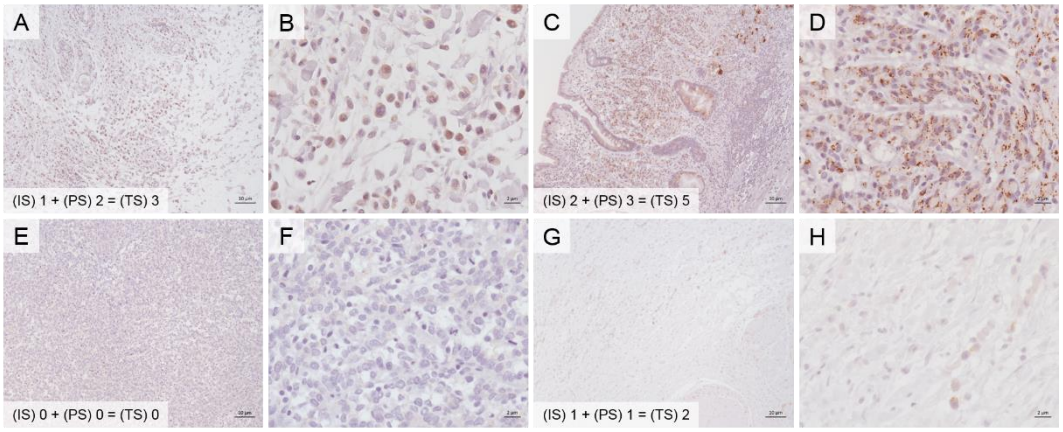


図 24　Sox10 の陽性像

A：Sox10 が核に陽性であった一例。(IS) 1 + (PS) 2 = (TS) 3 (Sox10、100 倍)。 B：A の拡大像。核を主体として、細胞質にもわずかに Sox10 が陽性であった (Sox10、400 倍)。C：Sox10 が細胞質に陽性であった一例。(IS) 2 + (PS) 3 = (TS) 5 (Sox10、100 倍)。 D：C の拡大像。細胞質に点状に Sox10 が染まっていた (Sox10、400 倍)。E：Sox10 が陰性の一例。(IS) 0 + (PS) 0 = (TS) 0 (Sox10、100 倍)。 F：E の拡大像 (Sox10、400 倍)。G：Sox10 が陰性の一例。(IS) 1 + (PS) 1 = (TS) 2 (Sox10、100 倍)。 H：G の拡大像 (Sox10、400 倍)。

41 例中、RT-PCR の結果が良好であった症例は 33 例であった。そのうち、免疫組織化学染色と RT-PCR の結果が一致した症例は 21 例 (63.6%) であった。免疫組織化学染色が陽性で、かつ、RT-PCR で高発現である症例は 14 例 (42.4%) であり、免疫組織化学染色が陰性で、かつ、RT-PCR で低発現である症例は 7 例 (21.2%) であった 。(表 16)

		RT-PCR		
		高発現	低発現	計
免疫組織化学染色	陽性	14 (42.4%)	9 (27.3%)	23 (69.7%)
	陰性	3 (9.1%)	7 (21.2%)	10 (30.3%)
	計	17 (51.5%)	16 (48.5%)	33 (100.0%)

表 16　低分化胃癌 33 症例における免疫組織化学染色による Sox10 発現と RT-PCR による *SOX10* 発現

Sox10 は静脈侵襲と有意な相関を示し、陰性症例は高度な静脈侵襲を呈した (P= 0.026) (表 17)。また、標準治療を行った 36 例において Sox10 発現による予後解析をしたが、Sox10 の免疫組織化学の結果は生存率と関連

しなかった（P ＝ 0.987）（図 25）。

	Sox10 発現				Sox10 発現		
	陰性	陽性	P値		陰性	陽性	P値
年齢			0.89	静脈侵襲			0.065
＜50	9	11		v0	7	16	
≧50	9	12		v1	4	5	
性別			0.093	v2	6	1	
男性	11	8		v3	1	1	
女性	7	15		静脈侵襲 なし vs あり			0.05
深達度			0.394	v0	7	16	
T1	3	9		v1-3	11	7	
T2	1	1		静脈侵襲 軽度 vs 高度			0.026*
T3	5	6		v0, 1	11	21	
T4	9	7		v2, 3	7	2	
リンパ管侵襲			0.852	リンパ節転移			0.278
ly0	7	11		N0	6	13	
ly1	5	7		N1	2	4	
ly2	3	2		N2	4	3	
ly3	3	3		N3	6	3	
リンパ管侵襲 なし vs あり			0.567	リンパ節転移 なし vs あり			0.139
ly0	7	11		N0	6	13	
ly1-3	11	12		N1-3	12	10	
リンパ管侵襲 軽度 vs 高度			0.316	pStage			0.558
ly0, 1	12	18		I	4	9	
ly2, 3	6	5		II	5	6	
				III	6	7	
				IV	3	1	

表 17　低分化胃癌 41 症例における免疫組織化学染色による Sox10 発現と臨床病理学的検討

＊；P < 0.05。

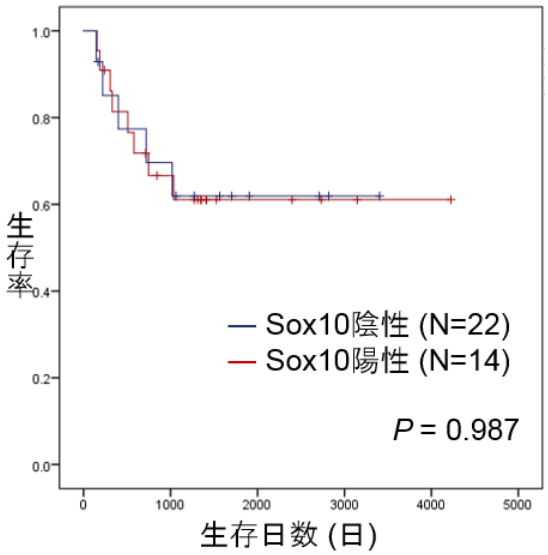


図 25　低分化胃癌 36 症例における Sox10 発現による予後解析
免疫組織化学染色での Sox10 の発現は予後に関与しなかった。

サンガーシーケンスによる *RHOA* 変異解析

RT-PCR で「リンパ管侵襲および静脈侵襲に関与する因子の検討」を施行した 26 症例（表 13）を対象に、低分化胃癌のドライバー遺伝子である *RHOA* の hotspot（R5Q、G17E、Y42C）をサンガーシーケンスで解析した。しかし、どの hotspot の変異も検出されなかった（図 26）。

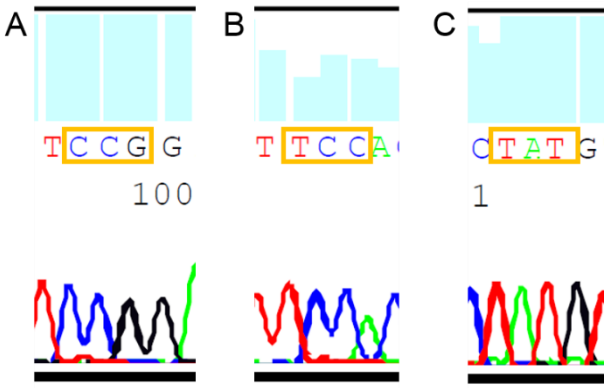


図 26　サンガーシーケンスによる *RHOA* の hotspot 解析
A：コドン 5 の解析。B：コドン 17 の解析。C：コドン 42 の解析。

NGS による遺伝子変異解析と臨床病理学的検討

低分化胃癌を対象に免疫組織化学染色および RT-PCR で分子発現について検討したところ、β-catenin、Sox10 において臨床病理学的因子との関連を認め、EGFR、β-catenin において予後との相関を認めた。そこで、分子発現よりもさらに上流の変化である遺伝子変異について網羅的に検討することとした。

1) TruSeq Amplicon Cancer Panel

RT-PCR で「リンパ管侵襲および静脈侵襲に関与する因子の検討」を施行した 26 症例（表 13）を対象とした。DNA の質的評価で増幅能が不良であった 7 例を除き、19 例を NGS 解析した。

認められた遺伝子変異は全て SNV で、non synonymous coding であった。高齢発症症例に比較して若年発症症例で遺伝子変異を有する症例が多く見られた（若年：6 例（60.0%）、高齢：2 例（22.2%））。また *H. pylori* 陽性症例において、変異を有する症例は 1 例であり、さらに変異遺伝子数は 1 つであった（図 27）。

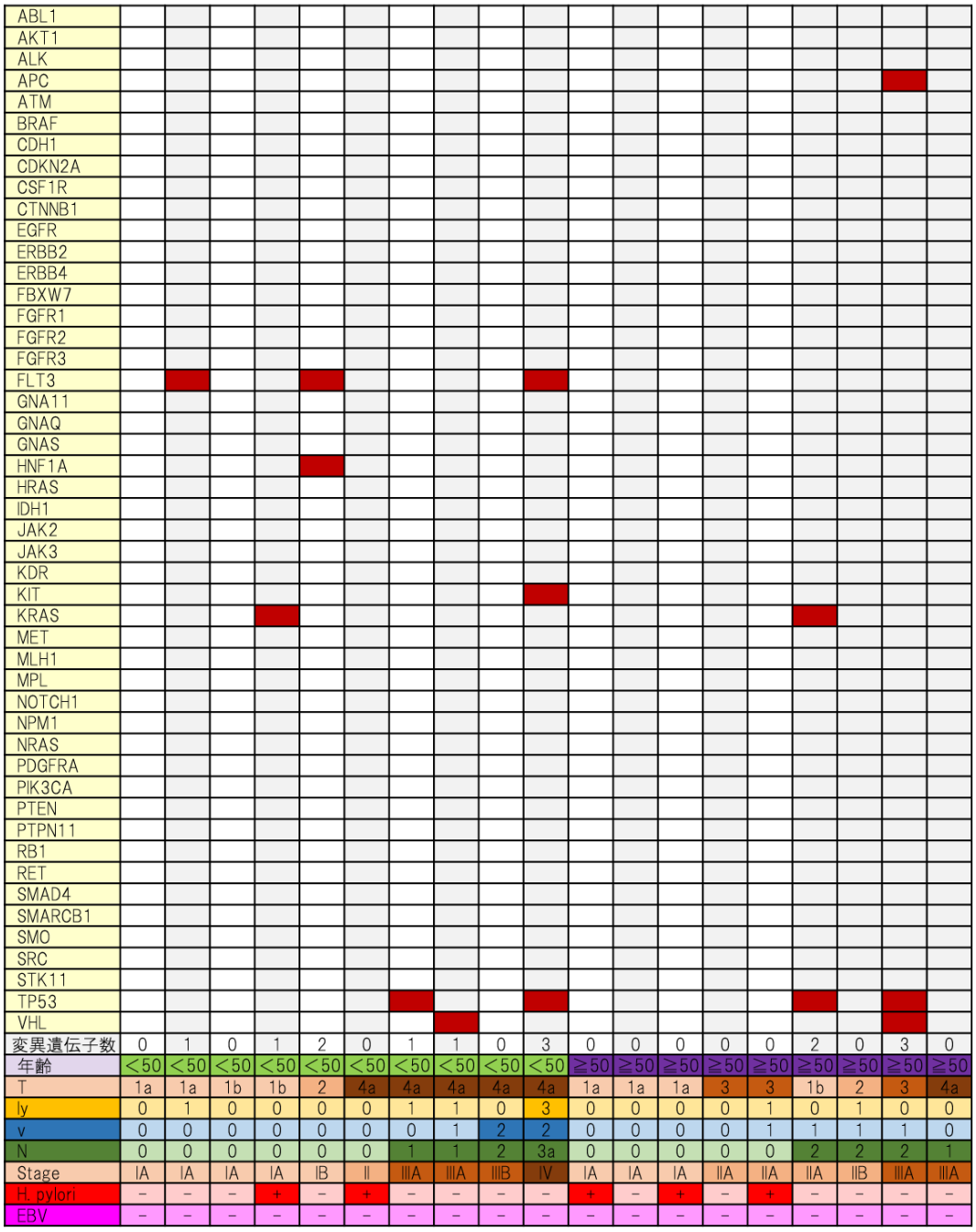


図 27　低分化胃癌 19 症例の Truseq Amplicon Cancer Panel における遺伝子変異と臨床病理学的因子の一覧

各臨床病理学的因子を以下のように色分けした。発症年齢：■50 歳未満、■50 歳以上。深達度：■T1a/T1b、■T2、■T3、■T4a/T4b。リンパ管侵襲：■ly0/ly1、■ly2/ly3。静脈侵襲：■v0/v1、■v2/v3。リンパ節転移：■N0、■N1/N2/N3。Stage：■IA/IB、■IIA/IIB、■IIIA/IIIB/IIIC、■IV。*H. pylori* 感染：■陽性、■陰性。

2) GeneRead™ DNAseq Targeted Panels V2

TruSeq Amplicon Cancer Panel は 48 遺伝子の Hotspot のみの解析であったため、解析する遺伝子数を増やし、さらに 95%前後のエクソン領域の解析を行った。既存の 160 遺伝子に加え、低分化胃癌でドライバー遺伝子とされる *RHOA*、脈管新生に関与する *VEGFA*、現存する分子標的薬のターゲットとなる *PDGFRB* の 3 遺伝子の計 163 遺伝子を検討した。症例は、RT-PCR で「リンパ管侵襲および静脈侵襲に関与する因子の検討」を施行した 26 症例（表 13）を対象とした。

変異遺伝子数の中央値は、若年発症症例が 0.5 個 [0-2]、高齢発症症例が 2 個 [0-4] であり、高齢発症症例の方が変異遺伝数を多く有していた（P= 0.021)。また、*H. pylori* 陽性症例は 1 個 [0-4]、陰性症例は 1 個 [0-3] であり、感染の有無による変異遺伝子数の差は無かった（図 28)。

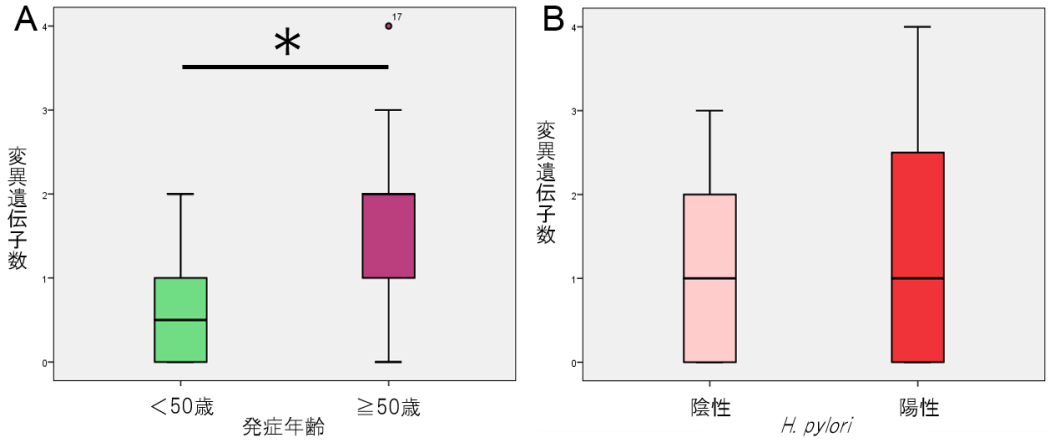


図 28　低分化胃癌 26 症例における変異遺伝子数

A：発症年齢における変異遺伝子数。高齢発症症例は変異遺伝数が多かった。B：*H. pylori* 感染の有無における変異遺伝子数。感染の有無で変異遺伝子数に有意差は無かった。＊；P < 0.05。

H. pylori 陽性症例では、*TP53* 変異を 2 例に認めたが、*ARID1A* 変異を有する症例は認めなかった。*ARID1A* 変異を有する症例は、1 例を除き、*TP53* 変異を有していなかった。*H. pylori* 陰性症例において、*RHOA* 変異の hotspot である G17E および Y42C を有する症例を 1 例ずつ認めた。また、*RHOA* L81P を 26 例中 8 例（30.8%）に認めた。*TP53* 変異を有する症例は全例リンパ節転移を有していた。*KRAS* G13D を有する症例を 1 例

認めたが、薬剤感受性に関与する actionable 変異を有する症例を他に認めなかった（図 29）。

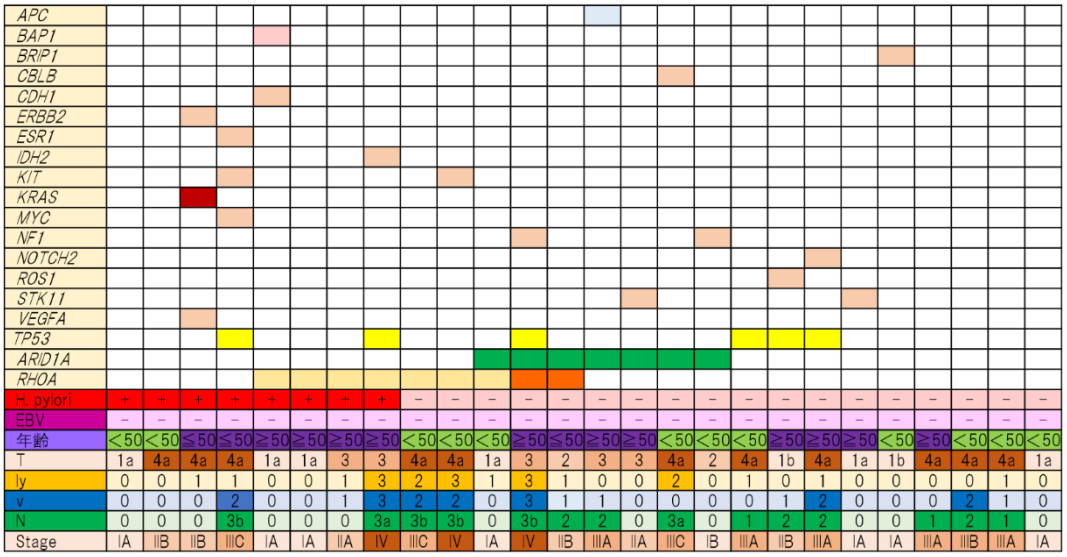


図 29　低分化胃癌 26 例の GeneRead™ DNAseq Targeted Panels V2 における遺伝子変異と臨床病理学的因子の一覧

癌の発生・進展・予後予測・治療標的となる遺伝子を actionable 遺伝子とし、また癌の発生・進展・予後予測・治療標的となる変異を actionable 変異とした。Actionable 遺伝子である *RHOA* は橙、*ARID1A* は緑、*TP53* は黄で示した。Actionable 遺伝子の SNV または actionable 変異は濃色で表した。*RHOA* で得られた SNV はいずれも COSMIC ID を有していなかったが、actionable 遺伝子であるため図に記載し、G17E と Y42C は濃色で表した。また、それ以外の SNV は薄色で表した。Non synonymous coding は茶、frame shift は青、stop gained は赤で表した。

また、各臨床病理学的因子を以下のように色分けした。発症年齢：■50 歳未満、■50 歳以上。深達度：■T1a/T1b、■T2、■T3、■T4a/T4b。リンパ管侵襲：■ly0/ly1、■ly2/ly3。静脈侵襲：■v0/v1、■v2/v3。リンパ節転移：■N0、■N1/N2/N3。Stage：■IA/IB、■IIA/IIB、■IIIA/IIIB/IIIC、■IV。*H. pylori* 感染：■陽性、■陰性。

考　察

本研究では、胃癌手術検体を胃癌取り扱い規約（第 14 版）に則り再評価した後に、タンパク質発現・mRNA 発現・DNA 変異と多角的な方向から検討を行い、臨床病理学的因子との関連や予後検討を行った。その結果、低分化胃癌の発生に関与する因子として *H. pylori* 感染の有無、*RHOA* 変異、*ARID1A* 変異が候補として上がり、リンパ管侵襲および静脈侵襲に関する因子として β-catenin の細胞膜での発現、Sox10 発現が候補として上がった。また、リンパ管侵襲および静脈侵襲が予後に関与する因子であると認められ、EGFR 発現や β-catenin の細胞膜での発現も予後予測因子の候補に上がった。

本研究における微生物感染解析および NGS の結果、低分化胃癌は 1) *H. pylori* 陽性、2) *RHOA* 変異あり、3) *ARID1A* 変異あり、4) その他、の 4 つのグループに分類でき、これらは発生機序に基づく低分化胃癌の分類になりうる可能性が考えられた。*H. pylori* 陽性症例では、慢性炎症により生じる DNA メチル化や CagA による Ras/Erk 経路の活性化、ペプチドグリカンによる NF-κB 経路・STAT3 経路・PI3K 経路の活性化、活性化誘導シチジンデアミナーゼによる TP53 変異などで癌化する [5-10]。癌と同時に *H. pylori* を認める場合は、慢性炎症による変化よりも H. pylori による CagA やペプチドグリカン、活性化誘導シチジンデアミナーゼによる変化の方が癌化に影響していると考えられる。*RHOA* は低分子量 G 蛋白質の一つで、主に細胞の収縮や運動など骨格制御に関わる [35,36]。低分化胃癌の 14-25% に変異が見られ、hotspot として R5Q、G17E、Y42C が報告されている [11,12,17]。*ARID1A* は SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体のサブユニットの一つで [37]、卵巣明細胞癌の 50%程度に変異を認め [38,39]、胃癌では変異や機能低下が予後不良因子になるという報告 [40,41] と *ARID1A* 変異は予後には影響しないという報告 [42] があり、意見が分かれている。また、*ARID1A* 変異と *TP53* 変異は相反して出現すると報告されている [42-44]。*H. pylori* 陽性または *RHOA* 変異を呈する症例の半数に *TP53* 変異も同時に認めた。

また低分化胃癌において、病理学的因子であるリンパ管侵襲および静脈侵襲に、β-catenin、Sox10 が関与することを認めた。免疫組織化学染色による検討で、β-catenin の細胞膜での発現が低下すると高度なリンパ管侵襲および静脈侵襲を呈し、Sox10 が陰性であると高度な静脈侵襲を呈した。

RT-PCR による検討で *SOX10* が低発現であるとリンパ管侵襲を呈した。さらに、高度なリンパ管侵襲および静脈侵襲は予後不良因子であり、β-catenin 細胞膜陰性や EGFR 陽性も予後不良因子であった。β-catenin はカドヘリンを介した細胞接着や細胞骨格形成に関与する細胞骨格関連蛋白であり、Wnt シグナル伝達系の媒体として核へ移行することで遺伝子発現調節にも関与しており [45,46]、胃癌 [47] だけではなく他の癌腫 [48] でも予後関連因子との報告がある。Sox10 は核内転写因子の SRY-related HMG-box (SOX) ファミリーの一つで、核細胞質シャトル蛋白であり、メラノサイトやグリア細胞などの神経細胞の分化に関与する [49]。癌腫によって Sox10 の発現と臨床病理学的因子との関連の報告は異なっており、上咽頭癌 [50]、乳癌 [51]、卵巣癌 [52] では Sox10 高発現が悪性度に相関し、前立腺癌 [53] と消化管癌 [34] では Sox10 低発現が悪性度に相関する。また、消化管癌において Sox10 は Wnt/β-catenin 経路を抑制して腫瘍細胞の EMT や幹細胞性を抑制することで、がん抑制遺伝子として働いていると報告されている [34]。EGFR は細胞の増殖や成長を制御する上皮成長因子を認識してシグナル伝達を行うチロシンキナーゼ型受容体であり [54]、他の癌腫においてその発現はリンパ節転移や予後に関与する因子との報告がある [55,56]。

これらの結果をもとに、次のような低分化胃癌のための診断スキーム (図 30) を作成した。

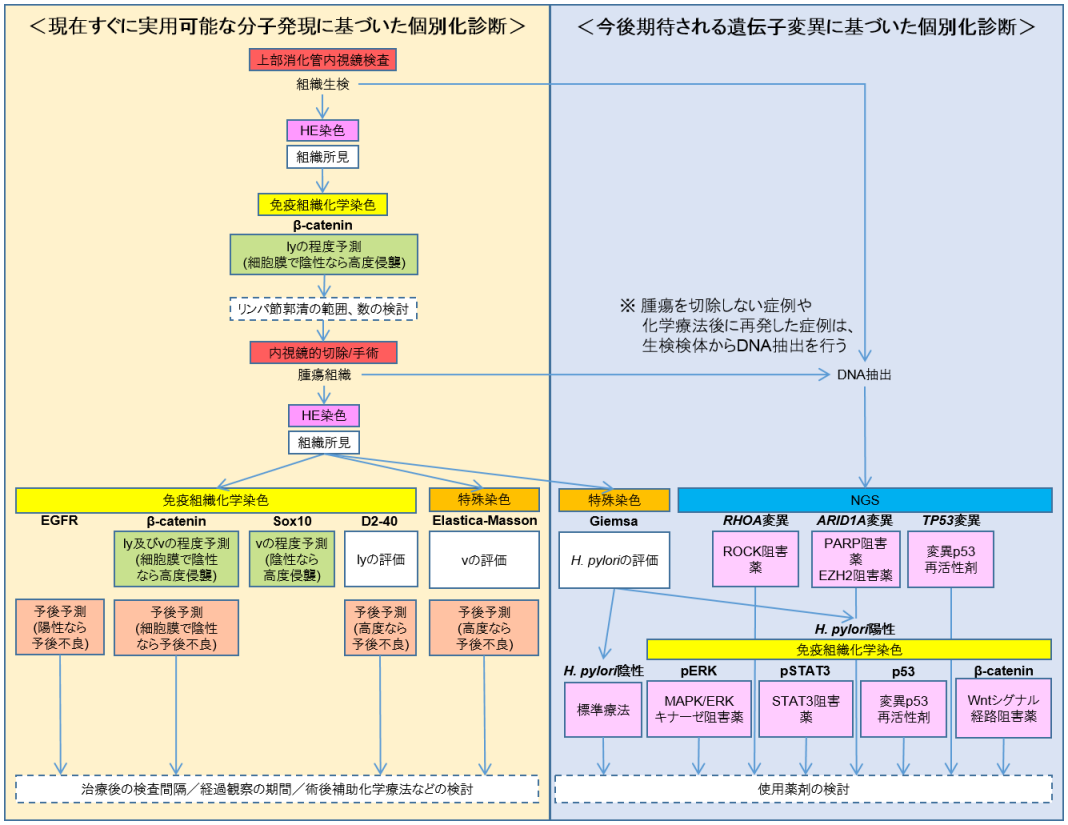


図 30　低分化胃癌の診断スキーム

現時点ですぐに実用可能な分子発現に基づいた個別化診断（左側）と、今後実施されることが期待される遺伝子変異に基づいた個別化診断（右側）の 2 つから構成される。ly；リンパ管侵襲、v；静脈侵襲。

本スキームは、現時点ですぐに実用可能な分子発現に基づいた個別化診断（図 30 の左側）と、今後実施されることが期待される遺伝子変異に基づいた個別化診断（図 30 の右側）の 2 つから構成される。分子発現に基づいた個別化診断における検討方法は免疫組織化学染色であり、これは現時点において通常業務で行われている作業のためすぐに実用可能である。また、遺伝子変異に基づいた個別化診断における検討方法は NGS と免疫組織化学染色である。現在 NGS を有する施設は限られているものの、現在進行形で北海道大学病院がん遺伝子診断部では行われている作業であり、検体採取から約 2 週間で解析が終了していることから、今後さらなる広い臨床応用が期待される。

cStage IA - IIIC では術前の上部消化管内視鏡検査で組織生検を行い、従来通り HE 標本による組織型の評価を行う。腺癌であった場合、β-catenin の免疫組織化学染色を施行し、細胞膜での発現を評価する。細胞膜

での発現が低下していると高度リンパ管侵襲を呈していることが予測されるため、リンパ節郭清の範囲や数を検討し、手術方針を立てる。切除された検体は、通常通り HE 標本による組織型の評価の他、D2-40 の免疫組織化学染色によるリンパ管侵襲の評価及び Elastica-Masson 染色や Elastica van Gieson 染色による静脈侵襲の評価を行う。しかしリンパ管侵襲および静脈侵襲の評価は病理医の主観によるところが大きいため、β-catenin、Sox10 の免疫組織化学染色を行い、これら 2 分子の発現結果を併せて評価することでより正確なリンパ管侵襲および静脈侵襲の評価が期待できる。またリンパ管侵襲および静脈侵襲に加えて EGFR と β-catenin の発現も予後予測因子となるため、これらの免疫組織化学染色の結果も pStage の結果と併せて総合的に評価し、術後の検査間隔や経過観察の期間、術後補助化学療法の適応など、術後の治療方針を決定する。

また、cStageIA - IIIC は術後補助化学療法や再発時の使用薬剤検討のため、切除検体を材料として DNA を抽出する。そして NGS で *RHOA*、*ARID1A*、*TP53* の全エクソンシーケンスを行い、そのプロファイル結果から使用薬剤を選択する。*TP53* は DNA 修復や細胞増殖停止、アポトーシスを誘導する細胞増殖に関与する癌抑制遺伝子で [57]、多くの癌腫で変異が見られる [58]。また、多段階発癌に関与する遺伝子の一つであり [9,44,59]、それ単独で発癌を引き起こすドライバー遺伝子としての役割を果たしているとは考えにくいため、低分化胃癌の発生機序分類のひとつとはしなかった。しかし、*TP53* は多くの症例で変異を示す可能性があり、使用薬剤選択に寄与することが期待されるため解析対象とした。*RHOA* に変異を有する場合は、*RHOA* の下流にある ROCK の阻害薬 [60] が有効と考えられる。クロマチンリモデリング遺伝子である *ARID1A* に変異を有する場合は、poly ADP-ribose polymeras (PARP) 阻害薬 [61,62] や EZH2 阻害薬 [63] が有効と考えられる。癌抑制遺伝子である *TP53* に変異を有する場合は、変異 p53 再活性剤 [64] が有効と考えられる。いずれの変異も有さないが *H. pylori* 陽性の場合は、さらに pERK、pSTAT3、p53 の免疫組織化学染色を追加する。pERK が陽性である場合は MAPK/ERK キナーゼ阻害薬 [65] の効果が期待され、pSTAT3 が陽性である場合は STAT3 阻害薬 [66] が有効の可能性がある。p53 がびまん性に陽性であれば *TP53* 変異症例と同様に変異 p53 再活性剤を選択し、β-catenin が核で陽性であるか細胞膜での発現が低下している場合は Wnt シグナル経路阻害薬 [67] が有効と考えられる。いずれの変異も有さず *H. pylori* 陰性の場合は、現行の標準治療を行う。

cStage IV の場合は、手術適応に無いため、上部消化管内視鏡検査での

生検組織で、免疫組織化学染色および NGS の解析を行う。再発の場合は、術後検査で調べておいた適応となる薬剤を用いてすぐに治療を開始する。術後補助化学療法後に再発した場合は、化学療法により薬剤耐性変異が生じた可能性も考えられるため、再度上部消化管内視鏡検査で組織生検を行い、NGS による網羅的な検索で治療薬剤を検討する。

ちなみに、本スキームにサンガーシーケンスおよび RT-PCR を組み込まなかった理由を以下に述べる。

サンガーシーケンスによる *RHOA* 変異解析をしたが、いずれの症例においても *RHOA* の変異は検出できなかった。これは、低分化胃癌はトリミングをしたとしてもサンプルにおける腫瘍細胞の含有率は低く、その結果、*RHOA* 変異の VF も低くなるためである。サンガーシーケンスは約 20%以上の割合で存在する変異ならば検出することができるが、それ以下である *RHOA* 変異は検出できなかったと考える。そのため *RHOA* 変異の検出にはディープシーケンスが必要と考え、*RHOA* の全エクソン領域をカバーするアンプリコンをデザインして NGS で解析した。その結果、Hotspot である G17E と Y42C を 1 例ずつ検出した。しかし、R5Q を有する症例は認めなかった。その他の *RHOA* 変異として L81P を認めたが、その臨床的意義については現時点でまだ報告が無く、今後の研究に期待する。

Sox10 の発現を RT-PCR と免疫組織化学染色で検討したところ、両者において Sox10 の発現が低下すると高度なリンパ管侵襲および静脈侵襲を呈するという傾向は認めたが、両者の一致率は 63.6%にとどまった。その理由として、検討した症例数が少ないこと、免疫組織化学染色では「腫瘍細胞のみ」の Sox10 発現を評価しているが、RT-PCR は「腫瘍細胞＋周囲に存在する神経細胞の RNA」の *SOX10* 発現を評価していることが考えられる。そのため、より腫瘍細胞の特徴を正確に反映し、またすぐに臨床現場で実用可能な方法であることから免疫組織化学染色での検討を採用した。

また、本スキームには HER2 評価を記載していないが、それは、低分化胃癌では HER2 陽性症例が少ないためである。本研究での低分化胃癌における HER2 陽性症例はごく少数（2.4%）であった。これは diffuse/mixed type の約 2-25%で HER2 過剰発現が見られたという既知の報告[68-73]と矛盾しない結果であった。

本研究では、低分化胃癌において発生に関与する分子の解明に至らなかった群を認め、また、若年発症症例に特徴的な分子発現や遺伝子変異は認

めなかった。その理由として、今回は症例数が少ないこと、遺伝子増幅や融合遺伝子、胚細胞性変異の検討を行っていないことが上げられる。さらに、若年発症に有意な結果が得られなかった理由として、社会的役割を大きく担っている 50 歳未満を若年と定義し検討を行ったことがあげられる。年齢が若い方が環境要因による影響が少なく、遺伝的要因の検討に則していることは確かであるが、今回は単一施設での検討であり、発症年齢を下げると症例数が極端に少なくなってしまうことから 50 歳未満と定義した。

今回は retrospective な検討であるため、*H. pylori* の存在診断は組織学的評価のみで行ったが、今後は各種抗体検査など、複数の手法を用いることでより正確な存在診断が可能になると思われる。

今後は、アンブレラ型の臨床試験を実施し、各群における使用薬剤の有効性の検証が必要である。また、症例数を増やし、遺伝子増幅や融合遺伝子、胚細胞性変異など検討対象を広げ、発症年齢の基準を下げる大規模解析を行うことで、さらなる低分化胃癌の発生機序や若年発症症例に特徴的な因子の発見が期待される。

総括および結論

本研究では、低分化胃癌をタンパク質発現・mRNA 発現・DNA 変異と多角的な方向から網羅的な検討を行い、臨床病理学的因子と関連する因子や予後予測因子、また若年発症症に特徴的な因子の検討を行った。その結果、以下の新知見を得た。

1）低分化胃癌の発生に関与する因子として、*H. pylori* 感染、*RHOA* 変異、*ARID1A* 変異が候補として上がった。
2）低分化胃癌のリンパ管侵襲および静脈侵襲に関する因子として、β-catenin の細胞膜での発現、Sox10 発現が候補として上がった。
3）リンパ管侵襲および静脈侵襲に加え、EGFR 発現や β-catenin の細胞膜での発現も予後予測因子となることがわかった。

これらの新知見をもとに、臨床現場で実施可能な低分化胃癌のための個別化病理診断スキームを作成した。今後は、本スキームをもとにしたアンブレラ型の臨床試験による使用薬剤の有効性の検証が必要である。

また本研究では、低分化胃癌において発生に関与する因子の解明に至らなかった群を認め、さらに、若年発症症例に特徴的な分子発現や遺伝子変異は認めなかった。これらについては今後、症例数を増やしての遺伝子増幅や融合遺伝子、胚細胞性変異など検討対象を広げた大規模解析により、低分化胃癌の発生機序の解明や若年発症症例に特徴的な因子の発見が期待される。

謝　辞

本研究の機会を与えてくださった北海道大学大学院医学研究科病理学講座腫瘍病理学分野　田中伸哉教授に深く感謝いたします。また、直接ご指導いただいた北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座　西原広史特任教授に心より御礼申し上げます。

さらに、本研究を支えてくださった腫瘍病理学分野・探索病理学講座・北海道大学病院臨床研究開発センター生体試料管理室の皆様に、そして最後に、私自身を支えてくれた家族に感謝いたします。

引用文献

1 Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65, 87-108, (2015).

2 Hori, M., Matsuda, T., Shibata, A., Katanoda, K., Sobue, T. & Nishimoto, H. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 45, 884-891, (2015).

3 Cancer Registry and Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan., (2016).

4 Zhao, J., Liang, Q., Cheung, K. F., Kang, W., Lung, R. W., Tong, J. H., To, K. F., Sung, J. J. & Yu, J. Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells. *Cancer* 119, 304-312, (2013).

5 Ohba, R. & Iijima, K. Pathogenesis and risk factors for gastric cancer after Helicobacter pylori eradication. *World. J. Gastrointest. Oncol.* 8, 663-672, (2016).

6 Castano-Rodriguez, N., Kaakoush, N. O. & Mitchell, H. M. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Front. Immunol.* 5, 336, (2014).

7 Kim, S. S., Ruiz, V. E., Carroll, J. D. & Moss, S. F. Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett.* 305, 228-238, (2011).

8 Ding, S. Z., Goldberg, J. B. & Hatakeyama, M. Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future Oncol.* 6, 851-862, (2010).

9 Sue, S., Shibata, W. & Maeda, S. Helicobacter pylori-Induced Signaling Pathways Contribute to Intestinal Metaplasia and Gastric Carcinogenesis. *BioMed research international* 2015, 737621, (2015).

10 Zhang, R. G., Duan, G. C., Fan, Q. T. & Chen, S. Y. Role of Helicobacter pylori infection in pathogenesis of gastric carcinoma. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 7, 97-107, (2016).

11 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. & Ishikawa, S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat. Genet.* 46, 583-587, (2014).

12 Wang, K., Yuen, S. T., Xu, J., Lee, S. P., Yan, H. H., Shi, S. T., Siu, H. C., Deng, S., Chu, K. M., Law, S., Chan, K. H., Chan, A. S., Tsui, W. Y., Ho, S. L., Chan, A. K., Man, J. L., Foglizzo, V., Ng, M. K., Chan, A. S., Ching, Y. P., Cheng, G. H., Xie, T., Fernandez, J., Li, V. S., Clevers, H., Rejto, P. A., Mao, M. & Leung, S. Y. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat. Genet.* 46, 573-582, (2014).

13 角南久仁子 & 河野隆志. 次世代シークエンサーを用いた肺癌ゲノム解析と個別化治療. *日本呼吸器学会誌* 3, 637-642, (2014).

14 Meric-Bernstam, F., Brusco, L., Shaw, K., Horombe, C., Kopetz, S., Davies, M. A., Routbort, M., Piha-Paul, S. A., Janku, F., Ueno, N., Hong, D., De Groot, J., Ravi, V., Li, Y., Luthra, R., Patel, K., Broaddus, R., Mendelsohn, J. & Mills, G. B. Feasibility of Large-Scale Genomic Testing to Facilitate Enrollment Onto Genomically Matched Clinical Trials. *J. Clin. Oncol.* 33, 2753-2762, (2015).

15 Chen, K., Yang, D., Li, X., Sun, B., Song, F., Cao, W., Brat, D. J., Gao, Z., Li, H., Liang, H., Zhao, Y., Zheng, H., Li, M., Buckner, J., Patterson, S. D., Ye, X., Reinhard, C., Bhathena, A., Joshi, D., Mischel, P. S., Croce, C. M., Wang, Y. M., Raghavakaimal, S., Li, H., Lu, X., Pan, Y., Chang, H., Ba, S., Luo, L., Cavenee, W. K., Zhang, W. & Hao, X. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese: implications for prognosis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1107-1112, (2015).

16 Wong, S. S., Kim, K. M., Ting, J. C., Yu, K., Fu, J., Liu, S., Cristescu, R., Nebozhyn, M., Gong, L., Yue, Y. G., Wang, J., Ronghua, C., Loboda, A., Hardwick, J., Liu, X., Dai, H., Jin, J. G., Ye, X. S., Kang, S. Y., Do, I. G., Park, J. O., Sohn, T. S., Reinhard, C., Lee, J., Kim, S. & Aggarwal, A. Genomic landscape and genetic heterogeneity in gastric adenocarcinoma revealed by whole-genome sequencing. *Nature communications* 5, 5477, (2014).

17 Network, C. G. A. R. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513, 202-209, (2014).

18 Cristescu, R., Lee, J., Nebozhyn, M., Kim, K. M., Ting, J. C., Wong, S. S., Liu, J., Yue, Y. G., Wang, J., Yu, K., Ye, X. S., Do, I. G., Liu, S., Gong, L., Fu, J., Jin, J. G., Choi, M. G., Sohn, T. S., Lee, J. H., Bae, J. M., Kim, S. T., Park, S. H.,

Sohn, I., Jung, S. H., Tan, P., Chen, R., Hardwick, J., Kang, W. K., Ayers, M., Hongyue, D., Reinhard, C., Loboda, A., Kim, S. & Aggarwal, A. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat. Med.* 21, 449-456, (2015).

19 Theuer, C. P., de Virgilio, C., Keese, G., French, S., Arnell, T., Tolmos, J., Klein, S., Powers, W., Oh, T. & Stabile, B. E. Gastric adenocarcinoma in patients 40 years of age or younger. *Am. J. Surg.* 172, 473-476; discussion 476-477, (1996).

20 Nakamura, R., Saikawa, Y., Takahashi, T., Takeuchi, H., Asanuma, H., Yamada, Y. & Kitagawa, Y. Retrospective analysis of prognostic outcome of gastric cancer in young patients. *Int. J. Clin. Oncol.* 16, 328-334, (2011).

21 Smith, B. R. & Stabile, B. E. Extreme aggressiveness and lethality of gastric adenocarcinoma in the very young. *Arch. Surg.* 144, 506-510, (2009).

22 Saito, H., Takaya, S., Fukumoto, Y., Osaki, T., Tatebe, S. & Ikeguchi, M. Clinicopathologic characteristics and prognosis of gastric cancer in young patients. *Yonago Acta Med.* 55, 57-61, (2012).

23 Takatsu, Y., Hiki, N., Nunobe, S., Ohashi, M., Honda, M., Yamaguchi, T., Nakajima, T. & Sano, T. Clinicopathological features of gastric cancer in young patients. *Gastric Cancer* 19, 472-478, (2016).

24 Lopez-Basave, H. N., Morales-Vasquez, F., Ruiz-Molina, J. M., Namendys-Silva, S. A., Vela-Sarmiento, I., Ruan, J. M., Rosciano, A. E., Calderillo-Ruiz, G., Diaz-Romero, C., Herrera-Gomez, A. & Meneses-Garcia, A. A. Gastric cancer in young people under 30 years of age: worse prognosis, or delay in diagnosis? *Cancer Manag. Res.* 5, 31-36, (2013).

25 Piazuelo, M. B. & Correa, P. Gastric cancer: Overview. *Colombia medica (Cali, Colombia)* 44, 192-201, (2013).

26 Marques-Lespier, J. M., Gonzalez-Pons, M. & Cruz-Correa, M. Current Perspectives on Gastric Cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 45, 413-428, (2016).

27 Mita, M. T., Marchesi, F., Cecchini, S., Tartamella, F., Ricco, M., Abongwa, H. K. & Roncoroni, L. Prognostic assessment of gastric cancer: retrospective analysis of two decades. *Acta Biomed.* 87, 205-211, (2016).

28 Park, H. J., Ahn, J. Y., Jung, H. Y., Lim, H., Lee, J. H., Choi, K. S., Kim, D. H., Choi, K. D., Song, H. J., Lee, G. H. & Kim, J. H. Clinical characteristics and outcomes for gastric cancer patients aged 18-30 years. *Gastric Cancer* 17, 649-660, (2014).

29 *TNM 悪性腫瘍の分類　第 7 版* (UICC 日本委員会 TNM 委員会). 金原出版, 日本, 2010.

30 *胃癌取扱い規約　第 14 版* (日本胃癌学会). 金原出版, 日本, 2010.

31 Bang, Y. J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., Aprile, G., Kulikov, E., Hill, J., Lehle, M., Ruschoff, J. & Kang, Y. K. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376, 687-697, (2010).

32 Wilke, H., Muro, K., Van Cutsem, E., Oh, S. C., Bodoky, G., Shimada, Y., Hironaka, S., Sugimoto, N., Lipatov, O., Kim, T. Y., Cunningham, D., Rougier, P., Komatsu, Y., Ajani, J., Emig, M., Carlesi, R., Ferry, D., Chandrawansa, K., Schwartz, J. D. & Ohtsu, A. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 1224-1235, (2014).

33 Fuchs, C. S., Tomasek, J., Yong, C. J., Dumitru, F., Passalacqua, R., Goswami, C., Safran, H., dos Santos, L. V., Aprile, G., Ferry, D. R., Melichar, B., Tehfe, M., Topuzov, E., Zalcberg, J. R., Chau, I., Campbell, W., Sivanandan, C., Pikiel, J., Koshiji, M., Hsu, Y., Liepa, A. M., Gao, L., Schwartz, J. D. & Tabernero, J. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 383, 31-39, (2014).

34 Tong, X., Li, L., Li, X., Heng, L., Zhong, L., Su, X., Rong, R., Hu, S., Liu, W., Jia, B., Liu, X., Kou, G., Han, J., Guo, S., Hu, Y., Li, C., Tao, Q. & Guo, Y. SOX10, a novel HMG-box-containing tumor suppressor, inhibits growth and metastasis of digestive cancers by suppressing the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncotarget* 5, 10571-10583, (2014).

35 Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. & Horwitz, A. R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709, (2003).

36 Thumkeo, D., Watanabe, S. & Narumiya, S. Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 303-315, (2013).

37 Wu, R. C., Wang, T. L. & Shih Ie, M. The emerging roles of ARID1A in tumor

suppression. *Cancer Biol. Ther.* 15, 655-664, (2014).

38 Jones, S., Wang, T. L., Shih Ie, M., Mao, T. L., Nakayama, K., Roden, R., Glas, R., Slamon, D., Diaz, L. A., Jr., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E. & Papadopoulos, N. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 330, 228-231, (2010).

39 Wiegand, K. C., Shah, S. P., Al-Agha, O. M., Zhao, Y., Tse, K., Zeng, T., Senz, J., McConechy, M. K., Anglesio, M. S., Kalloger, S. E., Yang, W., Heravi-Moussavi, A., Giuliany, R., Chow, C., Fee, J., Zayed, A., Prentice, L., Melnyk, N., Turashvili, G., Delaney, A. D., Madore, J., Yip, S., McPherson, A. W., Ha, G., Bell, L., Fereday, S., Tam, A., Galletta, L., Tonin, P. N., Provencher, D., Miller, D., Jones, S. J., Moore, R. A., Morin, G. B., Oloumi, A., Boyd, N., Aparicio, S. A., Shih Ie, M., Mes-Masson, A. M., Bowtell, D. D., Hirst, M., Gilks, B., Marra, M. A. & Huntsman, D. G. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N. Engl. J. Med.* 363, 1532-1543, (2010).

40 Yang, L., Wei, S., Zhao, R., Wu, Y., Qiu, H. & Xiong, H. Loss of ARID1A expression predicts poor survival prognosis in gastric cancer: a systematic meta-analysis from 14 studies. *Sci. Rep.* 6, 28919, (2016).

41 Wang, D. D., Chen, Y. B., Pan, K., Wang, W., Chen, S. P., Chen, J. G., Zhao, J. J., Lv, L., Pan, Q. Z., Li, Y. Q., Wang, Q. J., Huang, L. X., Ke, M. L., He, J. & Xia, J. C. Decreased expression of the ARID1A gene is associated with poor prognosis in primary gastric cancer. *PLoS One* 7, e40364, (2012).

42 Wang, K., Kan, J., Yuen, S. T., Shi, S. T., Chu, K. M., Law, S., Chan, T. L., Kan, Z., Chan, A. S., Tsui, W. Y., Lee, S. P., Ho, S. L., Chan, A. K., Cheng, G. H., Roberts, P. C., Rejto, P. A., Gibson, N. W., Pocalyko, D. J., Mao, M., Xu, J. & Leung, S. Y. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat. Genet.* 43, 1219-1223, (2011).

43 Bitler, B. G., Fatkhutdinov, N. & Zhang, R. Potential therapeutic targets in ARID1A-mutated cancers. *Expert Opin. Ther. Targets* 19, 1419-1422, (2015).

44 Yamamoto, H., Watanabe, Y., Maehata, T., Morita, R., Yoshida, Y., Oikawa, R., Ishigooka, S., Ozawa, S., Matsuo, Y., Hosoya, K., Yamashita, M., Taniguchi, H., Nosho, K., Suzuki, H., Yasuda, H., Shinomura, Y. & Itoh, F. An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa. *World J. Gastroenterol.* 20, 3927-3937, (2014).

45 Kraus, C., Liehr, T., Hulsken, J., Behrens, J., Birchmeier, W., Grzeschik, K. H. & Ballhausen, W. G. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1)

to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 23, 272-274, (1994).

46 MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9-26, (2009).

47 Sereno, M., De Castro, J., Cejas, P., Garcia-Cabezas, M. A., Belda, C., Casado, E., Feliu, J., Gomez, C., Lopez, M. & Baron, M. G. Expression profile as predictor of relapse after adjuvant treatment in gastric cancer. *J. Gastrointest. Cancer* 43, 181-189, (2012).

48 Nazemalhosseini Mojarad, E., Kashfi, S. M., Mirtalebi, H., Almasi, S., Chaleshi, V., Kishani Farahani, R., Tarban, P., Molaei, M., Zali, M. R. & P, J. K. K. Prognostic Significance of Nuclear beta-Catenin Expression in Patients with Colorectal Cancer from Iran. *Iranian Red Crescent medical journal* 17, e22324, (2015).

49 Mollaaghababa, R. & Pavan, W. J. The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* 22, 3024-3034, (2003).

50 Zhao, Y., Liu, Z. G., Tang, J., Zou, R. F., Chen, X. Y., Jiang, G. M., Qiu, Y. F. & Wang, H. High expression of Sox10 correlates with tumor aggressiveness and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *Onco Targets Ther.* 9, 1671-1677, (2016).

51 Cimino-Mathews, A., Subhawong, A. P., Elwood, H., Warzecha, H. N., Sharma, R., Park, B. H., Taube, J. M., Illei, P. B. & Argani, P. Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas. *Hum. Pathol.* 44, 959-965, (2013).

52 Kwon, A. Y., Heo, I., Lee, H. J., Kim, G., Kang, H., Heo, J. H., Kim, T. H. & An, H. J. Sox10 expression in ovarian epithelial tumors is associated with poor overall survival. *Virchows Arch.* 468, 597-605, (2016).

53 Zhong, W. D., Qin, G. Q., Dai, Q. S., Han, Z. D., Chen, S. M., Ling, X. H., Fu, X., Cai, C., Chen, J. H., Chen, X. B., Lin, Z. Y., Deng, Y. H., Wu, S. L., He, H. C. & Wu, C. L. SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. *BMC Cancer* 12, 248, (2012).

54 Gschwind, A., Fischer, O. M. & Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 361-370, (2004).

55 Araujo, M. R., Campos, L. C., Damasceno, K. A., Gamba, C. O., Ferreira, E. & Cassali, G. D. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node

metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Res. Vet. Sci.* 106, 121-130, (2016).

56 Parvin, M., Sabet-Rasekh, P., Hajian, P., Mohammadi Torbati, P., Sabet-Rasekh, P. & Mirzaei, H. Evaluating the Prevalence of the Epidermal Growth Factor Receptor in Transitional Cell Carcinoma of Bladder and its Relationship With Other Prognostic Factors. *Iranian journal of cancer prevention* 9, e4022, (2016).

57 Baniak, N., Senger, J. L., Ahmed, S., Kanthan, S. C. & Kanthan, R. Gastric biomarkers: a global review. *World J. Surg. Oncol.* 14, 212, (2016).

58 Dancey, J. E., Bedard, P. L., Onetto, N. & Hudson, T. J. The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 148, 409-420, (2012).

59 Tan, P. & Yeoh, K. G. Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology* 149, 1153-1162.e1153, (2015).

60 Xi, Y., Niu, J., Shen, Y., Li, D., Peng, X. & Wu, X. AT13148, a first-in-class multi-AGC kinase inhibitor, potently inhibits gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 330-336, (2016).

61 Shen, J., Peng, Y., Wei, L., Zhang, W., Yang, L., Lan, L., Kapoor, P., Ju, Z., Mo, Q., Shih Ie, M., Uray, I. P., Wu, X., Brown, P. H., Shen, X., Mills, G. B. & Peng, G. ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors. *Cancer Discov.* 5, 752-767, (2015).

62 Lazar, D. C., Taban, S., Cornianu, M., Faur, A. & Goldis, A. New advances in targeted gastric cancer treatment. *World J. Gastroenterol.* 22, 6776-6799, (2016).

63 Bitler, B. G., Aird, K. M., Garipov, A., Li, H., Amatangelo, M., Kossenkov, A. V., Schultz, D. C., Liu, Q., Shih Ie, M., Conejo-Garcia, J. R., Speicher, D. W. & Zhang, R. Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat. Med.* 21, 231-238, (2015).

64 Liu, D. S., Read, M., Cullinane, C., Azar, W. J., Fennell, C. M., Montgomery, K. G., Haupt, S., Haupt, Y., Wiman, K. G., Duong, C. P., Clemons, N. J. & Phillips, W. A. APR-246 potently inhibits tumour growth and overcomes chemoresistance in preclinical models of oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 64, 1506-1516, (2015).

65 Gao, J. H., Wang, C. H., Tong, H., Wen, S. L., Huang, Z. Y. & Tang, C. W. Targeting inhibition of extracellular signal-regulated kinase kinase pathway with AZD6244 (ARRY-142886) suppresses growth and angiogenesis of gastric

cancer. *Sci. Rep.* 5, 16382, (2015).

66 Kim, M. J., Nam, H. J., Kim, H. P., Han, S. W., Im, S. A., Kim, T. Y., Oh, D. Y. & Bang, Y. J. OPB-31121, a novel small molecular inhibitor, disrupts the JAK2/STAT3 pathway and exhibits an antitumor activity in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 335, 145-152, (2013).

67 Nagaraj, A. B., Joseph, P., Kovalenko, O., Singh, S., Armstrong, A., Redline, R., Resnick, K., Zanotti, K., Waggoner, S. & DiFeo, A. Critical role of Wnt/beta-catenin signaling in driving epithelial ovarian cancer platinum resistance. *Oncotarget* 6, 23720-23734, (2015).

68 Dang, H. Z., Yu, Y. & Jiao, S. C. Prognosis of HER2 over-expressing gastric cancer patients with liver metastasis. *World J. Gastroenterol.* 18, 2402-2407, (2012).

69 Fan, X. S., Chen, J. Y., Li, C. F., Zhang, Y. F., Meng, F. Q., Wu, H. Y., Feng, A. N. & Huang, Q. Differences in HER2 over-expression between proximal and distal gastric cancers in the Chinese population. *World J. Gastroenterol.* 19, 3316-3323, (2013).

70 He, C., Bian, X. Y., Ni, X. Z., Shen, D. P., Shen, Y. Y., Liu, H., Shen, Z. Y. & Liu, Q. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 2171-2178, (2013).

71 Kim, K. C., Koh, Y. W., Chang, H. M., Kim, T. H., Yook, J. H., Kim, B. S., Jang, S. J. & Park, Y. S. Evaluation of HER2 protein expression in gastric carcinomas: comparative analysis of 1,414 cases of whole-tissue sections and 595 cases of tissue microarrays. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 2833-2840, (2011).

72 Liang, J. W., Zhang, J. J., Zhang, T. & Zheng, Z. C. Clinicopathological and prognostic significance of HER2 overexpression in gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Tumour Biol.* 35, 4849-4858, (2014).

73 Oh, H. S., Eom, D. W., Kang, G. H., Ahn, Y. C., Lee, S. J., Kim, J. H., Jang, H. J., Kim, E. J., Oh, K. H. & Ahn, H. J. Prognostic implications of EGFR and HER-2 alteration assessed by immunohistochemistry and silver in situ hybridization in gastric cancer patients following curative resection. *Gastric Cancer* 17, 402-411, (2014).