

論文の内容の要旨

論文題目 胃癌におけるクロマチン修飾因子 BRD4 及びポリコーム抑制因子 EZH2
の臨床病理学的検討
氏名 大井手 慶

胃癌は世界における主要な死因のひとつであり、特に日本や中国等の東アジアで罹患率が高いとされる。本邦においては近年早期発見や内視鏡治療の発達により治療成績は向上してきているが、依然として患者数・死亡数の多い疾患である。the Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) によれば、胃癌は分子生物学的に Epstein-Barr virus (EBV) 関連、マイクロサテライト不安定性、ゲノム安定型、染色体不安定性の 4 型に分類される。近年、胃癌の分子生物学的解析や癌の発生、進展に関わる分子の研究が進んできており、様々な分子が胃癌の治療標的となることが期待されている。クロマチン修飾因子のひとつである BRD4 やポリコーム抑制因子のひとつである EZH2 は近年特に注目されている分子であるが、これらの分子に対して胃癌の分子生物学的サブタイプごとに臨床病理組織学的意義を詳細に検討した報告は未だなされていないため、これらの分子の発現を分子生物学的サブタイプごとに比較・検討し、さらにその意義の解明に向けて研究を行った。

本研究は東京大学医学部附属病院で 2006 年～2013 年に切除された胃癌手術検体 306 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を対象とし、TMA（組織マイクロアレイ）を用いて免疫組織化学染色を行い、胃癌における各分子の発現の臨床病理学的特徴を検討した。また、TCGA の提唱する分子生物学的サブタイプの分類には免疫組織化学的手法を代用することとし、EBER-*in situ* hybridization 陽性の症例を EBV 関連胃癌、EBER-*in situ* hybridization 陰性の症例のうち、ミスマッチ修復 (MMR: Mismatch repair) 遺伝子である *MLH1*、*PMS2*、*MSH2*、*MSH6* の 4 つのいずれかのタンパク発現が消失している症例をマイクロサテライト不安定性胃癌に相当するものとした。EBER-*in situ* hybridization 陰性で上記 4 つの MMR 遺伝子の発現が保たれている症例は、組織型がびまん型のものをゲノム安定型胃癌、腸型のものを染色体不安定性胃癌に相当するものとして分類した。以下、これらの群をそれぞれ EBV 関連胃癌、MMR 欠損型、びまん型、腸型と呼ぶこととする。

BRD4 は BET ファミリーに属するクロマチンアダプターの一つであり、遺伝子の転写活性化に関与し、様々な腫瘍において腫瘍細胞の BRD4 の過剰発現と予後不良の相関が報告されている。また EBV 陽性の鼻咽頭癌において BET 阻害剤が腫瘍進展を抑制し、PD-L1 の発現を抑制するという報告もみられる。本研究での免疫組織化学的検討では、胃癌における BRD4 発現例はびまん型が多く、腫瘍径が大きく、リンパ管侵襲が高頻度であり、

予後不良と相関していた。サブタイプごとの解析では EBV 関連胃癌では予後との相関はみられなかったが、BRD4 発現例は進行癌が多く、リンパ管侵襲、リンパ節転移が高頻度であった。またびまん型では BRD4 発現例は腫瘍径が大きく、リンパ管侵襲が高頻度で、有意ではないが BRD4 非発現例よりも予後不良の傾向を示した。MMR 欠損型、びまん型、腸型を合わせた EBV 陰性胃癌においては、BRD4 発現例は高齢、びまん型が多く、腫瘍径が大きく、リンパ管侵襲が高頻度で、有意な予後不良因子であった。TCGA の胃癌の BRD4 mRNA データでは EBV による発現量の有意な差はみられないが、本研究では EBV 関連胃癌の約 90% に BRD4 の発現が認められており、EBV 陰性胃癌よりも有意に高頻度であった。以上の結果から BRD4 発現が胃癌の進展に寄与している可能性があること、BRD4 発現は EBV 関連胃癌において高発現していることが示された。EBV 関連胃癌では、EBV は Latency I と呼ばれる潜伏感染状態にあり、核内抗原である EBNA-1 を発現しているが、BRD4 はこの EBNA-1 と相互作用をして転写制御を行うことが分かっており、EBV 関連胃癌でも BRD4 がこの機序を介してウイルスと相互作用している可能性が考えられた。

また BRD4 は PD-L1 をコードする *CD274* を標的遺伝子とし INF- γ の作用を介して PD-L1 を制御しており、卵巣癌などにおいて BET 阻害剤が PD-L1 の発現を抑制することが報告されているが、本研究において EBV 関連胃癌における BRD4 と PD-L1 の発現率は相関する傾向を示した。EBV 関連胃癌で PD-L1 発現率が高い理由のひとつとして BRD4 発現の亢進が関係している可能性があり、PD-L1 陽性の EBV 関連胃癌で BRD4 が治療標的として考慮されうる可能性が示唆された。

近年では白血病をはじめとする様々な腫瘍に対して BET 阻害剤による治療が期待されているが、胃癌においては BRD4 そのものの発現の他、PD-L1 発現や分子生物学的サブタイプの違いも考慮した検討が重要と考えられる。

EZH2 はポリコム抑制複合体 2 (PRC2) を構成するタンパクの一つであり、遺伝子の転写抑制に関与し、様々な腫瘍において腫瘍細胞の EZH2 過剰発現と予後不良の相関が報告されている。胃癌においては癌組織での EZH2 発現率が正常組織よりも高いことが分かっているが、EZH2 過剰発現による予後への影響については意義が定まっていない。本研究の免疫組織化学的検討では、胃癌全体での EZH2 過剰発現例は静脈侵襲、リンパ節転移が高頻度であったが、予後の有意な相関は認めなかった。また EBV 関連胃癌の約 60% に EZH2 の過剰発現が認められ、それは EBV 陰性胃癌よりも高頻度であったが、この結果は公開データベースの TCGA の胃癌の *EZH2* mRNA データと概ね一致している。サブタイプ別の解析では、EBV 関連胃癌では、EZH2 過剰発現例はリンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移が多く、有意ではないが予後不良となる傾向を示した。またびまん型では約 7% に EZH2 の過剰発現が認められ、過剰発現の頻度は低いものの、EZH2 過剰発現例は静脈侵襲が多く、予後不良であった。これらの結果から、EZH2 発現は EBV 関連胃癌で EBV 陰性胃癌よりも多くなること、また EBV 関連胃癌、びまん型において EZH2 発現は

悪性度の指標となりうる可能性が示唆された。EZH2 の属する PRC2 は EBV 関連 B 細胞リンパ腫では H3K27 のメチル化において EBV が関与していることが報告されているが、EBV 関連胃癌での EZH2 と EBV の関連性のメカニズムについては今後の研究課題として取り組んでいく必要があると考えられる。また、びまん型は EMT（上皮間葉転換）のプロセスを介したびまん性浸潤を特徴とするが、EZH2 は胃癌において EMT を誘導する働きが報告されており、びまん型で EZH2 が予後不良因子となる一因となっている可能性が考えられた。

EZH2 は卵巣癌においてクロマチンリモデリング因子の一つである ARID1A との拮抗作用が報告されており、また悪性中皮腫においてポリコーム群タンパクの一つである BAP1 との拮抗作用も報告されている。しかし本研究において胃癌における EZH2 発現と ARID1A、BAP1 発現との関係を検討したところ有意な相関は認められず、胃癌における EZH2 と ARID1A、BAP1 との明らかな関係は示されなかった。胃癌における ARID1A は約 15% に発現低下がみられ、予後との有意な相関はみられなかったが、ARID1A 発現低下例は女性に多く、EBV 陽性例、MMR 欠損例で頻度が高かった。この結果は TCGA データにほぼ合致する結果であり、また *ARID1A* 変異が EBV 関連胃癌およびマイクロサテライト不安定性胃癌で高頻度であるという既報告にも矛盾しないものであった。一方、胃癌における BAP1 の発現低下は約 3% であり、TCGA データの *BAP1* の変異率に近い割合であったが、臨床病理学的特徴、予後ともに相関はみられなかった。また、胃癌における胎児型マーカーの過剰発現が予後不良因子となるという報告がみられるが、本研究では EZH2 発現と胎児性マーカーの発現は相関する傾向を認め、びまん型胃癌では有意に正の相関を示した。EZH2 は発生の初期段階で機能するタンパクであるが、胎児形質を持つ腫瘍にも発現しやすいという可能性が考えられた。

近年ではリンパ腫をはじめとする様々な腫瘍に対して EZH2 阻害剤による治療が期待されているが、胃癌においては EBV 関連胃癌、びまん型において EZH2 発現が悪性度の指標となる可能性が示唆された。胃癌における EZH2 発現の解釈や EZH2 阻害剤の有効性の検討の際には、分子生物学的サブタイプの違いを考慮することが重要と考えられる。

クロマチン修飾因子 BRD4 およびポリコーム抑制因子 EZH2 は分子生物学的サブタイプごとに異なる臨床病理学的特徴を示すことが本研究で明らかになった。胃癌は分子生物学的背景の異なる 4 種のサブタイプから構成される疾患であり、個々の分子の臨床病理学的特徴について研究するにあたっては、分子生物学的サブタイプごとに分けて検討することが重要と考えられた。