

博士論文

論文題目 EBウイルス関連胃癌における
LMP-2 Aの関与についての病理学的検討

氏名 市村 香代子

EBウイルス関連胃癌における
LMP-2 Aの関与についての病理学的検討

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻

指導教員 深山 正久

学位申請者 市村 香代子

目次

要旨	1
第1章 序文.....	2
1. Epstein-Barr ウイルスと胃癌	2
2. EB ウイルス関連胃癌の臨床病理学的特徴.....	3
3. EB ウイルス関連胃癌の発癌メカニズム.....	5
4. LMP-2A の機能	6
5. 胃癌と炎症.....	8
6. 本研究の目的.....	12
第2章 材料と方法.....	13
1. 材料.....	13
2. 方法.....	13
2-1. トランスジェニックマウスの作製.....	13
2-2. マウス解剖による胃粘膜の検討	15
2-3. 免疫組織学的検討	20
2-4. RNA 抽出と RT-PCR.....	22
2-5. 蛋白抽出.....	24
2-6. Western blotting	24
2-7. リン酸化受容体型チロシンキナーゼ抗体アレイ	27

2-8. 動物実験計画の申請と承認に関する事項.....	27
2-9. 統計学的評価	28
第3章 結果.....	29
1. トランスジェニックマウスの解剖による、胃粘膜に対する LMP-2A の機能 の検討.....	29
1-1. 胃粘膜解剖所見.....	29
1-2. 隆起病変部に対する免疫組織学的検討	46
1-3. まとめ	60
2. マウス胃粘膜を用いた腫瘍発生メカニズムの検討.....	61
2-1. LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部における Wnt/ β -catenin 経路活性化の検討	62
2-2. LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部における Wnt/ β -catenin 経路関連シグナル (Akt、 MTA1、GSK3 β) 亢進の検討	67
2-3. LMP2A/C2mE マウスにおける EGFR 発現と関連シグナルの検討.....	71
2-4. Western blotting 結果まとめ.....	81
第4章 考察.....	83
1. LMP-2A の造腫瘍能 (tumorigenicity)・腫瘍増殖促進能に関する考察.....	83
2. LMP-2A と背景の隆起性病変との関連についての考察	84
3. LMP-2A の発癌・腫瘍増殖促進のメカニズムに関する考察	85

4. 本研究の意義と今後の課題.....	91
第5章 結論.....	93
謝辞.....	95
参考文献.....	96

図 1	35 週 Gan マウスにできた腫瘍の肉眼・組織像（自験例）	10
図 2	LMP-2A トランスジェニックマウス作成時のベクター	13
図 3	マウス胃粘膜処理	15
図 4	隆起病変部の計測	16
図 5	Dysplasia のグレード基準作成上参考にしたスキーム	17
図 6	Dysplasia のグレード基準と組織像	19
図 7	免疫染色の評価	21
図 8	胃粘膜での LMP-2A 発現確認	23
図 9	解析に用いたトランスジェニックマウス内訳	29
図 10	肉眼的隆起性病変の形成率	30
図 11	隆起病変部の組織学的特徴	32
図 12	隆起病変部の大きさについての比較	33
図 13	C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔における隆起病変部 大きさの比較	34
図 14	LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔における隆起病変部大 きさの比較	35
図 15	Genotype ごとの Dysplasia グレードの内訳	36
図 16	LMP-2A トランスジェニックマウスの一例に見られた Dysplasia .	37

図 17	Ki67 免疫染色の染色像	38
図 18	組織学的腫瘍発生率 (25 週解剖マウス)	39
図 19	C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔群における病変発生率の比較	40
図 20	Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの同腹仔群での腫瘍発生率	41
図 21	腫瘍部 (Dysplasia グレード 2 以上) 面積の比較	42
図 22	C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔、LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔における腫瘍部断面積比較	43
図 23	隆起病変部において Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部が占める割合	44
図 24	C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔、および LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔における隆起病変部内で腫瘍部が占める割合比較	45
図 25	CD45(白血球共通抗原を認識) の染色像	47
図 26	CD45 陽性細胞 (白血球共通抗原) 浸潤数の比較	48
図 27	CD45R (B 細胞) の染色像	50
図 28	CD45R 陽性細胞 (B 細胞) 浸潤数の比較	51
図 29	F4/80 (マクロファージ) の染色像	53

図 30	F4/80 (マクロファージ) 陽性面積の比較.....	55
図 31	TFF2 の染色像	56
図 32	TFF2 陽性面積の比較	58
図 33	TFF2 陽性面積と Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部面積の相関...	59
図 34	非リン酸化型 β -catenin・total β -catenin の Western blotting.....	63
図 35	非リン酸化型 β catenin の Western blotting : 同腹仔での比較	64
図 36	非リン酸化型 β -catenin、total β -catenin の Western blotting 結果.....	66
図 37	P-Akt, Akt の Western blotting 結果	68
図 38	MTA1 の Western blotting 結果	69
図 39	P-GSK3 β , GSK3 β の Western blotting 結果	70
図 40	リン酸化受容体型チロシンキナーゼ抗体アレイ結果	72
図 41	P-EGFR, EGFR の Western blotting 結果.....	74
図 42	P-Stat3, Stat3 の Western blotting 結果.....	76
図 43	P-Stat3 の免疫染色	77
図 44	P-p70S6K, p70S6K の Western blotting 結果.....	79
図 45	P-Erk, Erk の Western blotting 結果.....	80
図 46	Western blotting 結果まとめ.....	81
図 47	LMP-2A の腫瘍発生・腫瘍増殖への関与メカニズム (仮説)	90

表 1	大島らの作成したトランスジェニックマウス	9
表 2	本研究に使用されたトランスジェニックマウス一覧	14
表 3	C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウスと LMP-2A/Gan マ ウスの比較まとめ	60
表 4	Western blotting による LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウスのシグナル 亢進結果比較	82

要旨

EB ウイルス潜伏感染遺伝子である *LMP-2A* の腫瘍発生・増殖への関与について、トランスジェニックマウスを用いて検討した。

炎症を背景に、*LMP-2A* 発現の加わったトランスジェニックマウスで腫瘍発生率増加と腫瘍増大を認め、*LMP-2A* の造腫瘍能と増殖促進能が示された。トランスジェニックマウス腫瘍部胃粘膜を用いた Western blotting と抗体アレイの結果、*LMP-2A* 発現が加わったトランスジェニックマウスの腫瘍部では Wnt/ β catenin 経路や PI3K/Akt 経路の亢進、MTA1 発現亢進、Stat3 の活性化が認められ、EGFR の発現およびリン酸化亢進の傾向がみられた。*LMP-2A* 発現に伴うこれらの細胞内シグナル異常が、EB ウイルス関連胃癌の発生や増殖に関与している可能性が示唆された。

第1章 序文

1. Epstein-Barr ウイルスと胃癌

ウイルスは癌症例のうち 10–15%の原因とされているが[1, 2]、Epstein-Barr ウイルス (EB ウイルス) は 1964 年に Epstein らによってヒトの癌と関連するウイルスとして初めて、Burkitt リンパ腫の培養リンパ腫細胞内で同定された[3]。EB ウイルスは約 180kb の二本鎖 DNA からなる γ -ヘルペスウイルスの一種で、大部分の健常人において初感染の後、少数の B リンパ球に終生にわたりウイルス抗原を発現しない潜伏感染状態で維持される。潜伏感染状態で発現する EB ウイルス遺伝子産物は、6 種類の EB ウイルス核抗原 EBNA (EBV determined nuclear antigen: EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP)、3 種類の膜蛋白質 (Latent membrane protein: LMP1, LMP-2A, LMP2B)、蛋白質に翻訳されない小 RNA (EB virus-encoded small RNA: EBER1, EBER2)、BamHI-A 断片領域にコードされる BARTs および BARF1 である。これらの発現パターンにより、潜伏感染状態は I 型、II 型、III 型の 3 種類に分けられ、全パターンに共通して発現しているのは EBNA1、EBERs、BARTs である。

EB ウイルスは B リンパ球に発現する CD21 を吸着レセプターとし、B リンパ球を主な感染標的とするが、その他にも T リンパ球や上皮細胞にも感染

する[4, 5]。EB ウイルスの感染は、悪性リンパ腫の一部（Burkitt リンパ腫、Hodgkin リンパ腫、NK/T cell リンパ腫、免疫不全関連リンパ腫など）や上咽頭癌の腫瘍細胞に見られる。胃癌においては、1990年に Burke らにより PCR 法にて EB ウイルス陽性胃癌病巣が初めて報告され[6]、以後 EBER を対象とした in situ hybridization（EBER-ISH）の開発により、EB ウイルスに感染した上皮細胞が増殖した一群があることが証明され[7]、EB ウイルス関連胃癌と呼ばれるようになった[8]。

EB ウイルス関連疾患のうち、地域特異性のある Burkitt リンパ腫（赤道アフリカ）や上咽頭癌（中国南部）とは異なり、EB ウイルス関連胃癌は世界中に広く分布しているが[8]、胃癌全体に占める割合は地域によりばらつきがあり、1.9-16.8%と報告されている[9]。本邦では胃癌全体の約 10%に EB ウイルス感染が関与しているとされ、年間約 5000 例発生していると推定されている。[10, 11]

2. EB ウイルス関連胃癌の臨床病理学的特徴

EB ウイルス関連胃癌は一般の胃癌に比べ、男性優位がより著明で、各年齢層での発生率に有意差はないとされる[8]。予後は比較的良好とされる[12-15]。

発生部位として、一般の胃癌は幽門前庭部に多く発生するが、EB ウイルス関連胃癌は噴門部から胃体上部の胃底腺領域に高頻度にみられる[16]。しばしば胃切除後の残胃に発生し、多発例も比較的多い[17]。内視鏡的には、癌部は表面が陥凹、境界不明瞭で、周囲胃粘膜では高度の萎縮性胃炎を伴っていることが多い[18]。断面は結節状で境界明瞭な像を示す。進行癌では潰瘍型や皿型の形状を示すことが多く、胃壁の肥厚を伴っている[19]。

組織学的には、中分化管状～充実性低分化腺癌の組織型をとる場合が多い。早期胃癌の粘膜内では lace pattern と呼ばれる管状構造を呈し、不完全な樹枝状の増殖像を示すことが特徴とされている[20, 21]。ほとんどの例で間質に様々の度合いでリンパ球の浸潤を伴い、その主体は CD8 陽性の細胞傷害性 T リンパ球であるが[20, 22]、これらの浸潤リンパ球には EB ウイルスの感染は認められない[19, 23]。リンパ球の浸潤が著しく、低分化腺癌の組織像を示すものはリンパ上皮腫類似胃癌 (LELC: Lymphoepithelioma-like carcinoma) と呼ばれるが、このタイプの胃癌では 80%以上の症例に EB ウイルスが存在している[14, 24-26]。背景粘膜は *H.pylori* 陽性で慢性胃炎の像を呈しており、腸上皮化生もしばしば認められる[20, 21, 27]。

3. EB ウイルス関連胃癌の発癌メカニズム

EB ウイルスでは、感染細胞ごとにウイルス DNA の末端の繰り返し配列 (terminal repeat) の反復数が異なっており、EB ウイルス関連胃癌から分離されたウイルス DNA は、症例ごとに単一の特異的な反復数を示す。このことから、EB ウイルスは持続感染細胞がモノクローナルに増殖していると考えられている[23]。早期胃癌と進行胃癌において EB ウイルス関連胃癌の頻度に差がないこと[28]、EBER がほとんどすべての腫瘍細胞に検出されることから、胃癌発生初期の段階で EB ウイルス感染が起きており、発癌・増殖の過程に関与していると考えられる[23, 29]。

EB ウイルス関連胃癌では I 型潜伏感染状態にあり、EBNA1、EBERs、BARF0 の他、一部の症例では LMP-2A が発現している (36.4~77.8%[30-34])。EB ウイルス関連胃癌は B リンパ球の不死化や線維芽細胞の形質転換に関連する EBNA-2 や LMP-1 の発現を欠いていることから、独自の発癌機構があると考えられる[35]。

EB ウイルス関連胃癌における EB ウイルス感染と発癌のメカニズムとしては、宿主 DNA の高メチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現抑制 [36, 37]や、*PIK3CA*[38]やクロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF のサブユニットをコードする *ARID1A* などの遺伝子変異[39, 40]、受容体型チロシンキ

ナーゼ JAK2 や免疫抑制作用を有する蛋白である PD-L1, PD-L2 をコードする遺伝子が乗った染色体 9P24.1 の増幅[38]、ヒト micororna (miRNA)の一種である miR-200 発現低下による転写因子 ZEB1, ZEB2 発現亢進と E-cadherin 発現抑制[41]、ウイルス由来 miRNA である BART 発現によるヒトや EB ウイルスの各種遺伝子発現低下[42]などが関連するとされるが、LMP-2A の発現も発癌に寄与すると考えられている[43-51]。

4. LMP-2A の機能

細胞膜蛋白 LMP-2 は、II 型の EB ウイルス関連腫瘍であるホジキンリンパ腫 RS 細胞や上咽頭癌細胞、III 型の lymphoblastoid cell line (LCL) だけでなく、LMP-1 の発現を欠く I 型のバーキットリンパ腫や胃癌の一部の症例でも発現が認められる。LMP-2A は 119 アミノ酸の N 末端側細胞内領域、12 回貫通細胞膜領域および 27 アミノ酸の C 末端側細胞内領域から構成される。細胞膜表面での自己凝集能を有しており、散在したパッチ状に存在し、コレステロールを多量に含んだ脂質ラフトに局在する[52]。LMP-2A の N 末端側細胞内領域は ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を有し、ITAM を有する B 細胞抗原レセプター (B cell antigen receptor; BCR) が活性化された場合と同様に Lyn、Syk などのチロシンキナーゼの会合・リン酸化

により PI3 キナーゼ (Phosphoinositide 3-kinase: PI3K)、Akt、MAP キナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase: MAPK) などの活性化をき起こす。このように LMP-2A は BCR シグナルを模倣すると考えられ[53]、LMP-2A のトランスジェニックマウスでは BCR を欠く B 細胞が末梢リンパ組に出現すると報告されている[54, 55]。LMP-2A はこの BCR 模倣により、CD40 シグナルを模倣するとされる LMP-1 と協調してホジキンリンパ腫 RS 細胞の不死化をもたらし、ホジキンリンパ腫の発生に寄与すると推測されている[56]。

LMP-1 の発現を欠く I 型の上皮系癌の発生においても、LMP-2A が発癌に関与していることが報告されている。LMP-2A は PI3K/Akt を活性化し、細胞増殖促進、アポトーシス抑制に関与している[43, 44, 49, 51]。また、Morrison らは、上皮細胞において LMP-2A が PI3K/Akt 経路を活性化し、GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β) を不活性化させ、 β catenin の安定化と核内移行、それによる核内での転写活性を促進し、発癌や細胞増殖に寄与すると報告している[50]。岩切らは、LMP-2A は ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) の恒常的活性化による Bim (BH3-only member of Bcl-2 family: アポトーシスシグナルの開始に必要な因子で Erk により活性が制御されている) の分解促進により anoikis (細胞接着不全に起因するアポトーシス) に対する抵抗性を誘導し、発癌に寄与するとしている[47]。また Lin らは、上咽頭癌

において LMP-2A は PI3K/Akt 経路の下流の mTOR (mammalian target of rapamycin)、eIF4G (eukaryotic translation initiation factor 4 gamma) を介して MTA1 (Metastasis-associated protein1) 発現を促し、Wnt シグナルを亢進させると報告している[48]。日野らは、LMP-2A が Stat3 (Signal Transducers and Activator of Transcription 3) を活性化し、DNMT1 (DNA-methyltransferase 1) の過剰発現をもたらす CpG アイランドのメチル化を引き起こすことや[46]、NF κ B (nuclear factor for κ -kinase gene in B cells) 経路を介して抗アポトーシス効果を持つ *survivin* 発現を亢進させること[45]を報告している。我々の研究室では、日比谷が LMP-2A トランスジェニックマウスを用いて生体における LMP-2A の発癌性について検討を行った。その結果 100 週において WT マウスでは腫瘍が発生しなかったのに対し、LMP-2A マウスでは 8% (2/25) で低分化な胃癌が発生した。発癌率の低さは、背景に炎症がなかったことが原因ではないかと指摘している[57]。

5. 胃癌と炎症

癌発生に慢性炎症が関与することは古くから指摘されており、現在では、癌全体の約 20%以上で感染症に伴う慢性炎症反応が関与すると考えられている[58, 59]。1990 年代に、アスピリンの長期服用者では、大腸癌や胃癌の

発生頻度が低いことが疫学的に示された[60-62]。また、非ステロイド性抗炎症薬（non-steroidal antiinflammatory drug: NSAIDs）により活性が阻害される COX2（cyclooxygenase-2）やその合成物である PGE2（prostaglandin E2）は消化管をはじめ様々な組織で発癌を促進することが明らかになっている[63, 64]。ピロリ菌感染とこれに伴う慢性炎症が胃癌発生のリスクファクターとされているが[65-68]、この慢性炎症に伴って COX2 や mPGES-1（Microsomal PGE Synthase-1）の発現が誘導されている。

大島らはサイトケラチン 19 遺伝子のプロモーター制御下に、マウス胃粘膜で COX2 や mPGES-1 発現により PGE2 産生を亢進させた K19-C2mE マウス、および *Wnt1* 遺伝子を胃粘膜上皮で発現させた K19-Wnt1 マウスを作成し、さらに両者の交配からダブルトランスジェニックマウスである K19-Wnt1/C2mE マウス（Gan マウス）を作成した[69]（表 1）。

表 1 大島らの作成したトランスジェニックマウス

系統名 略称	系統名	胃粘膜上皮で 発現する分子名	胃粘膜の症状
WT	wild type	なし	正常
Wnt	K19-Wnt1	Wnt1	散発性の前癌病変
C2mE	K19-C2mE	Cox-2, mPGES-1(PGE2)	炎症反応、過形成病変
Gan	K19-Wnt1/C2mE	Wnt1, Cox-2, mPGES-1 (PGE2)	炎症反応依存的な胃癌

金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍遺伝学研究分野ホームページより改変作成

その結果、K19-C2mE マウスでは、粘液細胞化生を伴う過形成病変が[70]、K19-Wnt1 マウスでは、未分化な上皮細胞で構成された腺管が異常に分岐しながら増殖する前癌病変が観察された[71]。K19-Wnt1/C2mE (Gan) マウスでは、100%の効率で大きな腫瘍が発生し、組織学的には異型性を呈する腫瘍上皮細胞が異常に分岐しながら増殖しており、増生した間質では血管形成が亢進していた、と報告している (図 1) [69]。そして 50 週の時点では多くのマウスで平滑筋層への浸潤が見られたため、Wnt1 と PGE2 双方のシグナル活性化により胃癌が発生したと結論づけている。

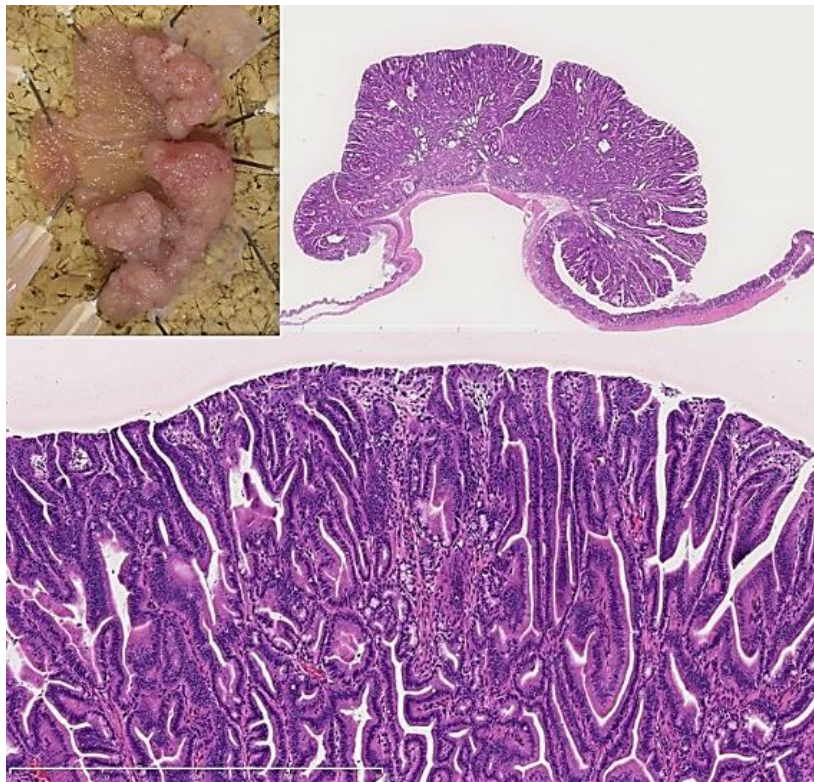


図 1 35 週 Gan マウスにできた腫瘍の肉眼・組織像 (自験例)

扁平上皮円柱上皮境界部を中心に、外向性隆起性病変が認められ、組織学的には核異型・腺管の構造異型を伴った異型上皮が認められる。

さらに大島らは、K19-C2mE マウスにおいて、ヒトの胃癌に付随した病変と類似した SPEM (spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia) と呼ばれる粘液化生性過形成がみられ、同時に炎症反応を伴っていることを報告している[72]。SPEM とは trefoil factor 2 (TFF2: 以前は spasmolytic polypeptide と呼ばれていた) を発現する、胃体部腺領域に生じる胃幽門腺あるいは十二指腸 Brunner 腺に類似した化生性粘膜のことをいう[73]。Nomura らは慢性萎縮性胃炎に際して壁細胞・主細胞が消失し、SPEM に置換されると述べている[74]。SPEM は胃癌周囲に高率に認められ、直接の前癌病変あるいは発癌環境を提供する状態、あるいは発癌と同じ刺激により惹起される化生であると考えられている。

大島らは、K19-C2mE マウスを TNF- α ノックアウトマウスと交配すると炎症もこの SPEM 様の粘液化生性過形成病変も消失することから、マクロファージが産生する TNF- α がその原因である可能性を指摘している[71, 72]。さらに、Gan マウスでは 5-10 週までにこの粘液化生性過形成病変が発現し、加齢に伴い成長するが、10 週以降から異型を伴う腫瘍上皮細胞が増殖を開始、50 週齢で大半の化生細胞が腫瘍細胞と置き換わると報告している[69]。

6. 本研究の目的

本研究の目的は、EB ウイルス潜伏遺伝子産物である細胞膜蛋白 LMP-2A が胃粘膜に発現するトランスジェニックマウスと炎症性胃癌モデルマウスである Gan マウスを交配させて得られたトランスジェニックマウスを用いて、LMP-2A が胃粘膜に対してどのような影響を及ぼすのかについて、腫瘍発生・増殖促進の観点から病理組織学的に検討することである。さらに、もし LMP-2A が腫瘍発生や増殖促進に関わっていると考えられる場合には、そのメカニズムを分子生物学的に探り、EB ウイルス関連胃癌における LMP-2A の造腫瘍能 (tumorigenicity) や増殖過程への関与について検討することを目的とした。

第2章 材料と方法

1. 材料

マウスは C57/BL6-J (日本クレア) を用いた。また、Gan マウス (cytokeratin19 遺伝子のプロモーターの制御下に、Wnt1、Cox-2、mPGES-1 を胃粘膜で発現するように作製され、PCR 法で 3 種類全てが陽性であることが確認されたトランスジェニックマウス) は、寄託先の熊本大学生命資源研究支援センターから提供を受けた 7 匹 (雄 1 匹、雌 6 匹) を交配用として使用した。

2. 方法

2-1. トランスジェニックマウスの作製

我々の研究室で作製し飼育している *LMP-2A* 陽性トランスジェニックマウス (胃壁細胞のプロトンポンプである H,K-ATPase をプロモーターとして、EB ウイルス潜伏遺伝子である *LMP-2A* の cDNA を組み込んだトランスジェニックベクターを作成し (図 2)、C57BL/6 マウス受精卵に注入し、仮親に移植して作成したもの) を熊本大学から供与された Gan マウスと交

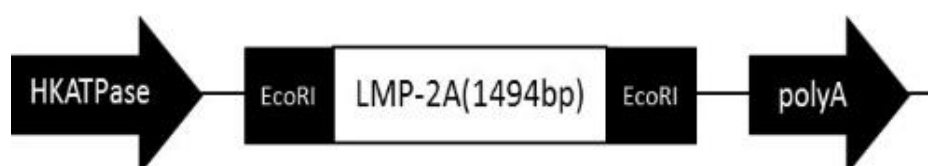


図 2 *LMP-2A* トランスジェニックマウス作成時のベクター

配させ、トランスジェニックマウスを作製した。

産まれた仔の尾先端部を切断採取して DNA を抽出し、KOD FX NEO (TOYOBO, 大阪) を用いた PCR 法にて Genotype を確認した。LMP-2A が陽性のものを LMP-2A マウス、Wnt1 が陽性のもの (K19-Wnt1) を Wnt マウス、COX-2・mPGES-1 が陽性のもの (K19-C2mE) を C2mE マウス、LMP-2A と COX-2・mPGES-1 が陽性のもの (LMP-2A/K19-C2mE) を LMP-2A/C2mE マウス、Wnt1 と COX-2・mPGES-1 が陽性のもの (K19-Wnt1/C2mE) を Gan マウス、LMP-2A と Wnt1、COX-2・mPGES-1 が陽性のものを LMP-2A/Gan マウスと呼ぶ。4 種類全て陰性となったものは WT と表す (表 2)。

表 2 本研究に使用されたトランスジェニックマウス一覧

系統名 略称	系統名	胃粘膜上皮で発現する分子名
WT	wild type	なし
LMP-2A	LMP-2A	LMP-2A
Wnt	K19-Wnt1	Wnt1
LMP-2A/Wnt	LMP-2A/K19-Wnt1	LMP-2A, Wnt1
C2mE	K19-C2mE	Cox-2, mPGES-1 (PGE2)
Gan(Wnt/C2mE)	K19-Wnt1/K19-C2mE	Wnt1, Cox-2, mPGES-1 (PGE2)
LMP-2A/C2mE	LMP-2A/K19-C2mE	LMP-2A, Cox-2, mPGES-1 (PGE2)
LMP-2A/Gan	LMP-2A/K19-Wnt1/C2mE	LMP-2A, Wnt1, Cox-2, mPGES-1 (PGE2)

2-2. マウス解剖による胃粘膜の検討

マウスは生後 25 週で頸椎脱臼にて屠殺し解剖した。摘出した胃を大弯線で切開し、ゴム板に固定した。小弯線から半分の粘膜を採取し、扁平上皮、体部腺、幽門腺、十二指腸の各部に切離して-80℃にて凍結保存した。肉眼的に隆起性病変を認めた場合は短径 (W)・長径 (L) を計測後、周囲体部腺粘膜と別に採取し凍結保存した。残り半分の胃はゴム板に固定したまま 10%ホルマリンを浸透させた綿にて表面を被覆し、一時間程度半固定した後に、10%ホルマリン溶液に沈め一晚固定した。

ホルマリン固定後に約 4 mm幅で縦方向に分割し (図 3)、パラフィン包埋ブロック作製後 3 μm 厚で薄切し、HE 標本を作製した。スライド標本は、対物 20 倍の倍率で NanoZoomer Digital Pathology (NDP) System (Hamamatsu

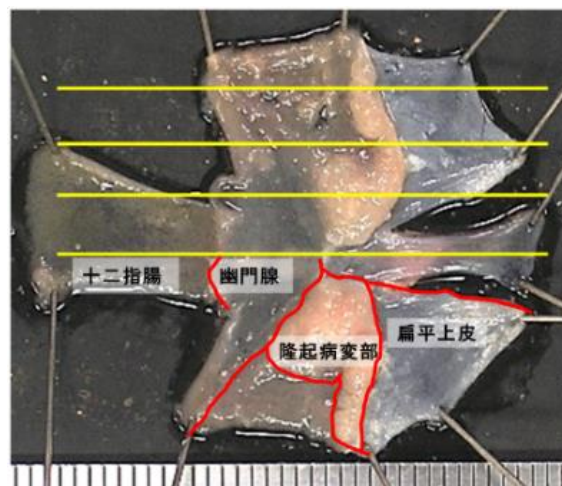


図 3 マウス胃粘膜処理

大弯側で切開し貼り付け後、小弯線にて半割。半分は 4 mm 間隔で小弯線と平行に切り出し組織標本を作製。もう半分は隆起病変部、扁平上皮、体部腺、幽門腺、十二指腸に切り分けて-80℃にて冷凍保存した。

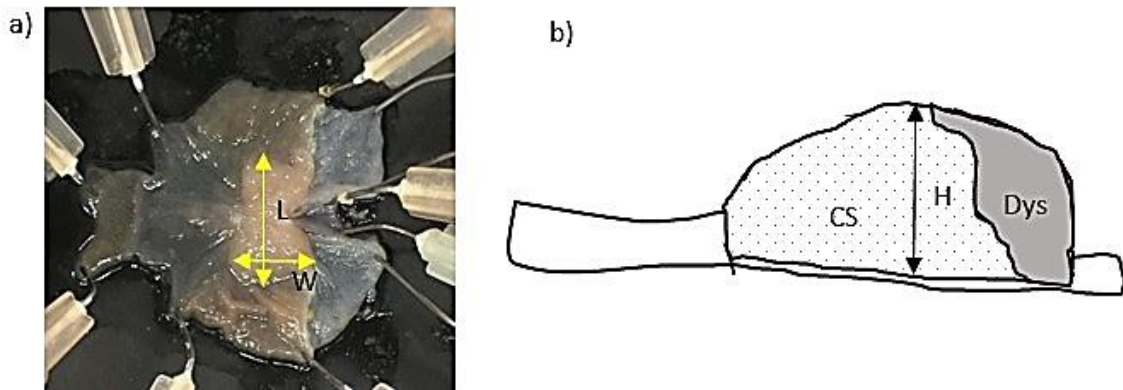


図 4 隆起病変部の計測

- a) 肉眼的に認識できた隆起性病変の長径 (L) 短径 (W) (mm) を解剖時に計測。肉眼的に腫瘍が認識できない場合は 0 とした。
- b) ガラス標本をデジタル画像 (Hamamatsu Nano zoomer) に取り込み、最大断面における隆起性病変部 (粘膜筋板まで) の面積 (mm^2)、(CS) および高さ (mm) (H) を測定した。組織学的に Dysplasia グレード 2 以上に相当する箇所面積 (mm^2) (Dys) を測定した。

Photonics, Hamamatsu, Japan) を用いてデジタル画像として取り込んだ。

HE 標本上、周囲粘膜から急峻な立ち上がりをもって隆起している部分を隆起性病変部とし、最大断面にて同部の高さ (H) と面積 (CS) をデジタル画像にて測定した (図 4)。肉眼的に計測した病変部の長径短径の積を「肉眼的面積 (LW)」、デジタルで計測した最大断面の面積を「標本上隆起病変部面積 (CS)」とし、肉眼的面積と標本上の高さの積 (LWH)、標本上隆起病変部面積と直角方向の長さ (L) の積 (CSL) を体積の指標とした。

また組織学的に、Rogers のマウス胃粘膜の炎症・癌のスコアリング[75, 76] (図 5) を参照に、腺窩上皮部分の腺管構造の乱れや細胞異型・核密度等を考慮して Dysplasia グレード 0 から 4 までのグレードを定義し、各個体の

	1	2	3	4
Dysplasia	Multifocal dysplastic glands characterized by elongation, altered shapes, back-to-back forms, etc.	Coalescing dysplasia with glandular ectasia, branching, infolding, cell piling up, globoid cells, etc.	Gastric intraepithelial neoplasia (GIN); loss of normal architecture and columnar orientation; atypical hyperchromatic cells	Invasive adenocarcinoma extending into submucosa, vessels, lymphatics, and/or deeper layers

図 5 Dysplasia のグレード基準作成上参考にしたスキーム
ヘリコバクター感染時のマウス胃粘膜組織像を対象とした Dysplasia のグレード (Rogers, Histologic scoring of gastritis and gastric cancer in mouse models, 2012 より一部抜粋)

Dysplasia グレードを評価した。評価に際しては病理専門医を含む 3 名の病理医が判定し、意見の異なったものについては議論により統一した。各グレードの基準は以下のとおりである (図 6 に組織像を示す)。

グレード 0 Dysplasia はみられない

グレード 1 Indeterminate for neoplasia :

拡張、伸長、変形、back-to-back などのある異型腺管が局所的に見られ、次の①から③のいずれかに当てはまるもの

① 腺管の伸長により完全に固有腺上皮が消失したもの

② 固有腺は残存するが、腺窩上皮の細胞異型があり、かつ腺管構造が単純であるもの

③ 粘液や化生の上にやや異型のある上皮が見られるが、腺管上皮は単純であり、過形成や化生と迷うようなもの

グレード2 Definite neoplasia :

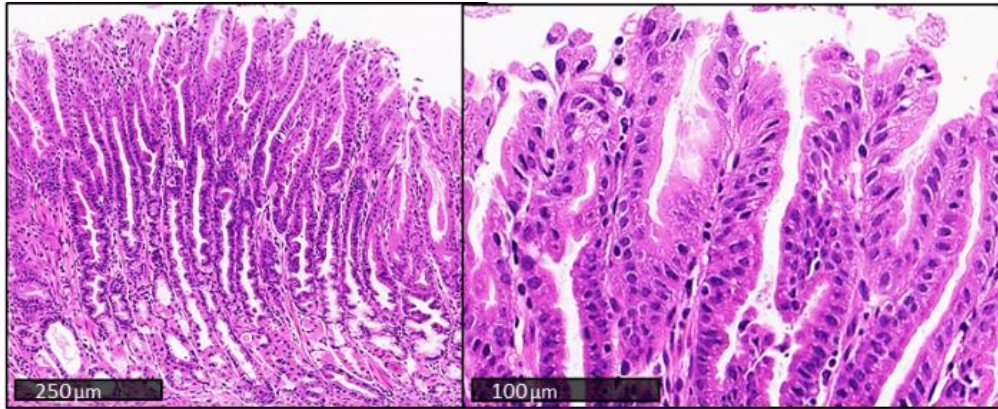
ヒトでいう Adenoma (腺腫) あるいは Low grade Dysplasia (軽度異型上皮) 相当の細胞異型があり、核は細長く基底側に配列し、粘膜表層までの腺管全体にわたって核の密度が高い。腺管の拡張、分枝、陥入、癒合など腺管構造がやや複雑である。

グレード3 Definite neoplasia with severe atypia :

ヒトでいう上皮内癌あるいは High grade Dysplasia (高度異型上皮) 相当の細胞異型があり、核は丸く、極性が乱れており、クロマチンの増加や核分裂像が見られる。または高度の構造異型があり、腺管の開口部が予測できないようなもの。

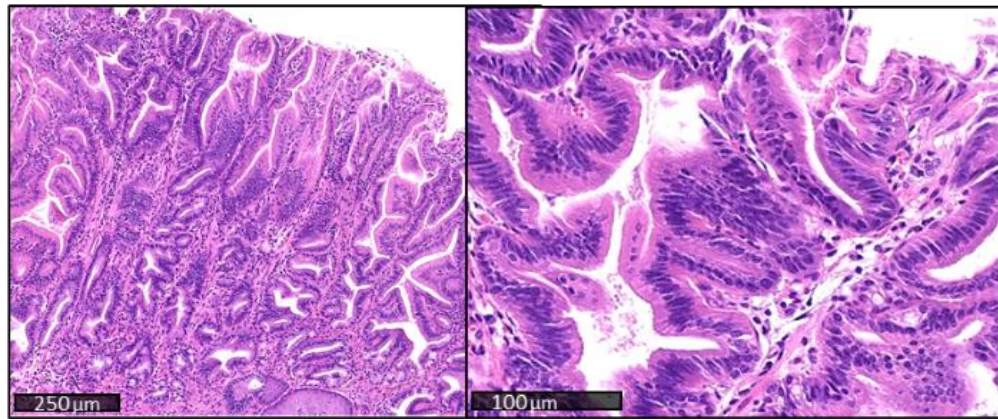
グレード4 : Invasive adenocarcinoma : 浸潤癌

Dysplasia グレード 1 は構造異型・細胞異型的に腫瘍であるとは断定し難い病変であり Dysplasia グレード 2 以上の病変を腫瘍性病変と定義し、腫瘍部面積 (Dys) としてデジタル画像上で計測した (図 4)。

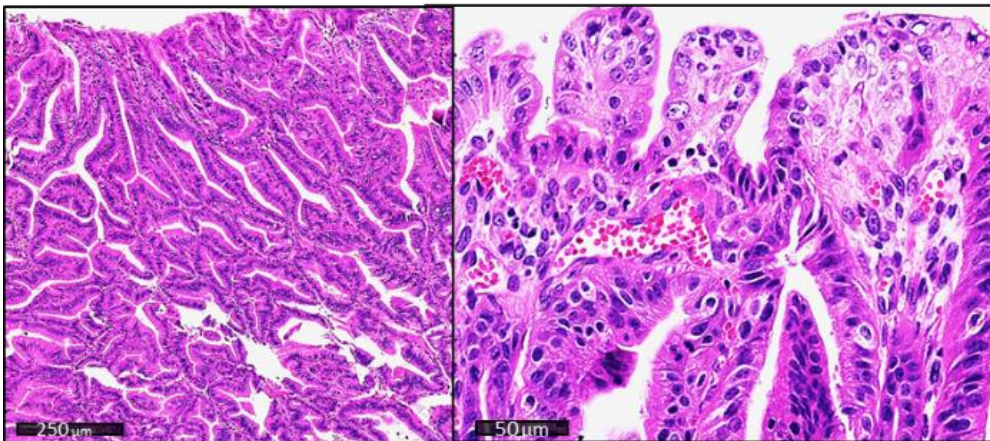


グレード1 : (indefinite for neoplasia)

- ①完全に固有腺上皮が消失
- ②固有腺上皮が残存する場合、腺窩上皮に細胞異型あるが腺管構造が単純
- ③過形成/化生と迷うようなもの



グレード2 (definite neoplasia) : adenoma (low-grade dysplasia)相当の細胞異型
腺管構造がグレード1より複雑



グレード3 (definite neoplasia with severe atypia) : 上皮内癌(high-grade dysplasia)相当の細胞異型
あるいは高度の構造異型 (腺の分岐が複雑で腺の癒合あり)

図 6 Dysplasia のグレード基準と組織像
構造異型、細胞異型の点から、グレード 2 以上を腫瘍性病変と定義した。

2-3. 免疫組織学的検討

25週で解剖したマウスのうち、同腹仔（同一の親から同時に生まれた仔）のペア（C2mE マウス 10 匹・LMP-2A/C2mE マウス 10 匹 13 組、Wnt/C2mE (Gan) マウス 8 匹・LMP-2A/Gan マウス 10 匹 14 組）のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し、CD45, CD45R, F4/80, TFF2, Ki67, リン酸化 Stat3 (P-Stat3) の免疫染色を行った。Ki67 については、同腹仔群の中に C2mE マウスで Dysplasia グレード 2 以上に相当する病変がなかったため、同腹仔でないが Dysplasia グレード 2 以上を示す 5 症例についても染色した。なお、Phospho-Stat3 については Western blotting 後の確認として、C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/C2mE マウス 2 例について免疫染色を施行した。

使用した一次抗体と希釈倍率は抗マウス CD45 ラットモノクローナル抗体 (clone 30-F11, 1:400, BD Biosciences, NY, USA)、抗マウス CD45R ラットモノクローナル抗体 (clone RA3-6B2, 1:1000, BD Biosciences, NY, USA)、抗マウス F4/80 ラットモノクローナル抗体 (clone Cl:A3-1, 1:1000, AbD Serotec, NC, USA)、TFF2 (Terifoil factor2) ウサギポリクローナル抗体 (1:1000, proteintech, IL, USA)、抗ヒト Ki67 ウサギモノクローナル抗体 (clone SP6, 1:400, SPRING BIOSCIENCE, CA, USA)、ラビットモノクローナル抗 phospho-Stat3 (Tyr705) XP 抗体 (clone D3A7, 1:100, Cell Signaling, USA) である。二次抗体と希釈倍

率はビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (BA-1000, goat polyclonal, 1:500, Vector Laboratories, UK)、ビオチン標識抗マウス IgG 抗体 (BA-9200, goat polyclonal, 1:250, Vector Laboratories, UK)、ビオチン標識抗ラット IgG 抗体 (BA-9400, goat polyclonal, 1:250, Vector Laboratories, UK) を使用した。

自動染色装置である Ventana BenchmarkRXT Autostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) を用いて、染色条件は抗原賦活が Cell Conditioning solution (CC1-Tris based EDTA buffer, pH 8.0, Ventana Medical Systems) を用いて Standard60 分、一次抗体の反応時間は 32 分、発色は I-VIEW DAB Universal Kit (Ventana Medical Systems) を使用した。

免疫組織化学染色がなされた各スライド標本は、対物 20 倍の倍率で NanoZoomer Digital Pathology (NDP) System (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を用いてデジタル画像として取り込んだ。CD45, CD45R, F4/80, TFF2 については取り込んだデジタル画像を、画像解析ソフト (Tissue Studio v.3.5, Definiens AG, Munich, Germany) を用い、図 7 のように①隆起病

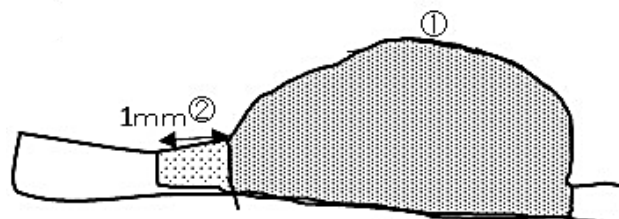


図 7 免疫染色の評価

CD45, CD45R, F4/80, TFF2 は粘膜内 (粘膜筋板より上) を隆起病変部 (①) と隣接部 (②) としてエリア設定し、評価した。

変部、②隣接部としてエリアを設定し解析した。

Tissue Studio (TS) の条件は以下の通りである。CD45 は Solution: Nuclear Detection、Hematoxylin Threshold 1.2、IHC Threshold 0.2、Typical Nucleus Size $30 \mu\text{m}^2$ 、Active area $10 \mu\text{m}^2$ 以上とした。CD45R は Solution: Nuclear Detection、Hematoxylin Threshold 1.2、IHC Threshold 0.2、Typical Nucleus Size $35 \mu\text{m}^2$ 、Active area $10 \mu\text{m}^2$ 以上とした。F4/80 は Solution: Marker Area Detection、Hematoxylin Threshold 2、IHC Threshold 0.2、Minimum Area $0 \mu\text{m}^2$ とした。TFF2 は Solution: Marker Area Detection、Hematoxylin Threshold 2.0、IHC Threshold 0.3、Minimum Area $100 \mu\text{m}^2$ とした。いずれもすべての解析結果の画像を見直し、アーチファクトを陽性と判定した部分を除外、正しい部分を採用という作業を繰り返して、目的とする部分のみが陽性となるようにした。

2-4. RNA 抽出と RT-PCR

解剖時に採取し、 -80°C にて凍結保存してあったマウス胃粘膜 (WT マウスと C2mE マウスの体部腺粘膜、LMP-2A/C2mE マウス、Wnt/C2mE (Gan) マウス、LMP-2A/Gan マウスの隆起病変部と周囲体部腺粘膜) から RNA を抽出し、逆転写、PCR により LMP-2A/C2mE マウス、LMP-2A/Gan マウスにおける LMP-2A の発現を確認した。

ISOGEN II (ニッポンジーン、富山) を用いて、バイオマッシャー II (ニ

ッピ、東京)でホモジナイズし、ISOGEN IIのプロトコールに従いRNAを抽出した。得られたRNAにDNase処理を加え(Recombinant DNase I (RNase-free), TaKaRa)、NanoDrop (Thermo Scientific, MA, USA)にて定量後、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, 大阪)を用いて逆転写しcDNAを得た。得られたcDNAをサンプルとしてKAPA SYBR FAST qPCR MASTER MIX (Life technologies, CA, USA)を用い、Illumina ECO realtime PCR (アズワン、大阪)にてLMP-2Aの発現を確認した(LMP-2Aのプライマーは92bp)。PCR条件は50°C2分→95°C1分→(95°C5秒→63度30秒)×40サイクル→95°C15秒→55秒15秒→95°C15秒である。PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動した(100V30分)(図8)。

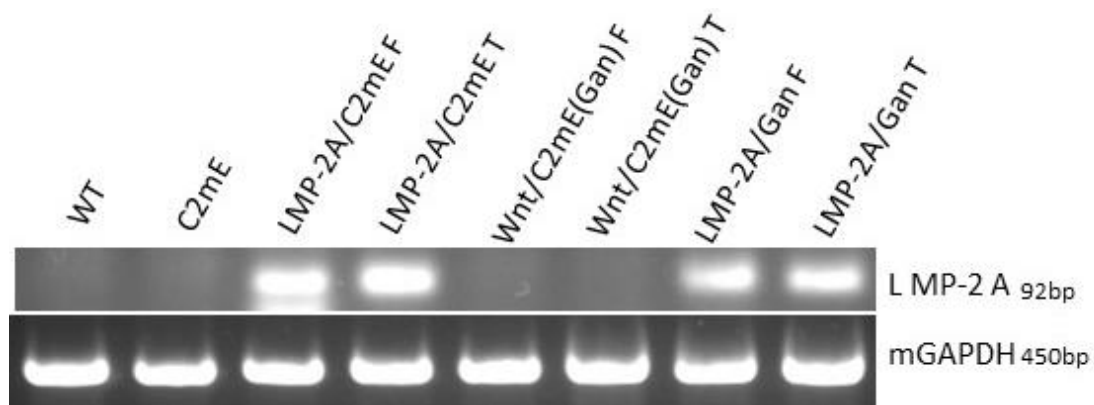


図8 胃粘膜でのLMP-2A発現確認

LMP-2A/C2mEマウスとLMP2-A/Ganマウスの胃粘膜でLMP-2Aの発現が確認された。
(T: 隆起病変部 F: 周囲体部腺粘膜)

2-5. 蛋白抽出

Lysis buffer とマウス胃粘膜凍結検体 (WT マウス、C2mE マウス、LMP-2A/C2m マウス E、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスの隆起病変部と周囲体部腺粘膜) を、Minilys (エムエス機器、大阪) を用いて、専用のチューブと酸化ジルコニウムビーズ 5 mm 2 個、2.8 mm 6 個と共にホモジナイズし、上清を蛋白溶液とした。マウス胃粘膜からの蛋白抽出に用いた Lysis Buffer の組成は以下の通りである。50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl, 1% Trion-X, 0.1%SDS、10% glycerol, 2mM EDTA、10mM NaF、Protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland)、Phosphatase inhibitor (PhosStop, Roche, Switzerland)。

BCA 法 (BCA Protein Assaying Reagent, Pierce Laboratories) にてこの溶液の蛋白濃度を定量した。

2-6. Western blotting

濃度測定後の上記蛋白溶液を Lysis buffer にて希釈し、蛋白 20 μ g あるいは 10 μ g 相当のサンプルを準備した。6xSDS sample buffer (0.35M Tris-HCl (pH6.8), 10% SDS, 30% glycerol, 9.3% DTT Bromophenol Blue) を加え、95°C で 5 分加熱して泳動の試料とした。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (10% polyacrylamide gel、100V 定圧、90 分泳動) により蛋白を分離した後、250mV、90 分にて PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレン

(Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore, MA, USA) へ転写した。転写したメンブレンは 5%スキムミルクを含む 0.1%Tween20-TBS に浸漬し、室温で 30 分ブロッキングを行った後、各一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。リン酸化抗体については、その後 0.1%Tween20-TBS による洗浄とストリッピング溶液（和光純薬、大阪）によるストリッピング後に再度 Total 抗体による免疫染色を行った（抗 EGFR 抗体については、先に Total 抗体、次に Phospho-EGFR 抗体とした）。使用した一次抗体の種類と希釈倍率は以下のとおりである。マウスモノクローナル抗 β -catenin 抗体（clone 14/Beta-Catenin, 1:5000, BD Biosciences, NY, USA）およびマウスモノクローナル抗 Active β -catenin 抗体（clone 8E7, 1:1000, Millipore, CA, USA, Ser37 と Thr41 がリン酸化されていない β -catenin = 非リン酸化型 β -catenin を認識）、ラビットモノクローナル抗 phospho-Akt (Ser473) XP 抗体 (clone D9E, 1:1000, Cell Signaling, USA) 、ラビットモノクローナル抗 Akt (Pan) 抗体 (clone C67E7, 1:1000, Cell Signaling, USA)、ラビットモノクローナル抗 MTA1 XP 抗体（clone D40D1, 1:1000, Cell Signaling, USA）、ラビットモノクローナル抗 Phospho-GSK-3 β (Ser9) XP 抗体（clone D85E12, 1:1000, Cell Signaling, USA）、ラビットモノクローナル抗 GSK-3 β 抗体（clone 3D10, 1:1000, Cell Signaling, USA）、ラビットモノクローナル抗 phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) 抗体 (clone 108D2, 1:1000, Cell Signaling,

USA) 、ラビットモノクローナル抗 p70 S6 Kinase 抗体 (clone 49D7, 1:1000, Cell Signaling, USA)、ラビットポリクローナル抗 phospho-p44/42MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体 (1:1000, Cell Signaling, USA) 、ラビットポリクローナル抗 p44/42MAPK (Erk1/2) 抗体 (1:1000, Cell Signaling, USA) 、ラビットモノクローナル抗 Phospho-EGF Receptor(tyr1068) XP 抗体 (clone D7A5, 1:1000, Cell Signaling, USA)、ラビットモノクローナル抗 EGF Receptor XP 抗体 (clone D38B1, 1:200, Cell Signaling, USA)、ラビットモノクローナル抗 phospho-Stat3 (Tyr705) 抗体 (clone D3A7, 1:2000, Cell Signaling, USA) 、ラビットモノクローナル抗 Stat3 抗体 (clone 124H6, 1:1000, Cell Signaling, USA) 、ラビットモノクローナル抗 GSK-3 β 抗体 (clone 3D10, 1:1000, Cell Signaling, USA)、マウスモノクローナル抗 β -Actin (clone AC-15, 1:10000, Sigma Aldrich, MO, USA)。翌日、HRP 酵素標識二次抗体 (Jackson Immuno Research, PA, USA 1:10000) と室温で1時間反応させた。メンブレンを化学発光試薬 (Immunostar Reagent およびより高感度である Immunostar LD、和光純薬工業、大阪) と反応させた後、発生した光をルミノイメージアナライザーLAS4000mini (FUJIFILM、東京) または ChemiDoc touch (BIO RAD, CA, USA) を用いて検出、シグナルの volume を定量し、 β -Actin のシグナルの値で除し、各バンドのシグナル値とした。

2-7. リン酸化受容体型チロシンキナーゼ抗体アレイ

Proteome Profiler Mouse Phospho-RTK Array Kit (R&D Systems, MN, USA) を使用し、プロトコールに従ってリン酸化受容体型チロシンキナーゼの検出を行った。上記のように抽出した蛋白溶液 (LMP-2A/C2mE マウス隆起病変部、Gan マウス隆起病変部、C2mE マウス隆起病変部、WT 体部腺粘膜) にて蛋白 $90\mu\text{g}$ 相当ずつを使用し、各々 Array buffer と Lysis buffer にて 1.5ml に希釈しサンプルとした。マルチディッシュの各ウェルにアレイ (メンブレン) と block buffer を入れ一時間振盪後、block buffer を捨てサンプルを入れ、 4°C で一晩インキュベートした。Wash buffer にて洗浄後乾燥させたメンブレンをマルチディッシュの各ウェル内に戻し HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体を各ウェルに加え、室温にて二時間振盪させた。付属の発光試薬で反応させ、発生した光を ChemiDoc touch (BIO RAD, CA, USA) を用いて検出し、各スポットの Pixel Density を算出し、同じ抗体に対する 2 か所のスポットの平均値をとり、WT を 1 としたときの相対値を求めた。

2-8. 動物実験計画の申請と承認に関する事項

本実験を実施するに当たって、東京大学動物実験実施規則及び東京大学動物実験実施マニュアルに基づき、動物実験計画書を提出、承認を受けた (医-P08-125、医-P13-088)。また、遺伝子改変動物の作製に当たっては遺伝子

組み換え実験等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）及び東京大学遺伝子組み換え実験等の使用等実施規則に基づき、第二種使用等拡散防止措置承認を受けた（承認番号 10）。

2-9. 統計学的評価

すべての統計学的解析は R version 3.0.2（The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）を組み込んだ EZR version 1.23（自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉）を用いた[77]。すべての P 値は両側 0.05 未満で有意とした。マウス解剖所見および免疫染色の所見についての分析では、名義変数の比較には Fisher の正確検定を、連続変数の 2 群間比較には Mann-Whitney U 検定（独立するデータ）と Wilcoxon 符号付順位和検定（同腹仔間比較や同一個体内比較などの対応データ）を行った。3 群以上の独立する連続変数の比較には Kruskal-Wallis 検定を行った。二つの連続変数の相関は Spearman の順位相関係数を用いた。また、ウェスタンブロッティングにおける腫瘍部と周囲体部腺粘膜のシグナル比較には対応のある t 検定を用いた。

第3章 結果

1. トランスジェニックマウスの解剖による、胃粘膜に対する LMP-2A の機能の検討

1-1. 胃粘膜解剖所見

LMP-2A が胃に発現するトランスジェニックマウスと、Wnt1 と PGE2 が胃に発現する Gan マウスの交配によって得られたマウス 171 匹 (表 2) のうち 106 匹を 25 週で解剖した。交配により得られたトランスジェニックマウスと、そのうち 25 週で解剖したマウスの内訳を図 9 に示す。

解剖後、25 週胃粘膜における肉眼的・組織学的変化を観察し、隆起病変部

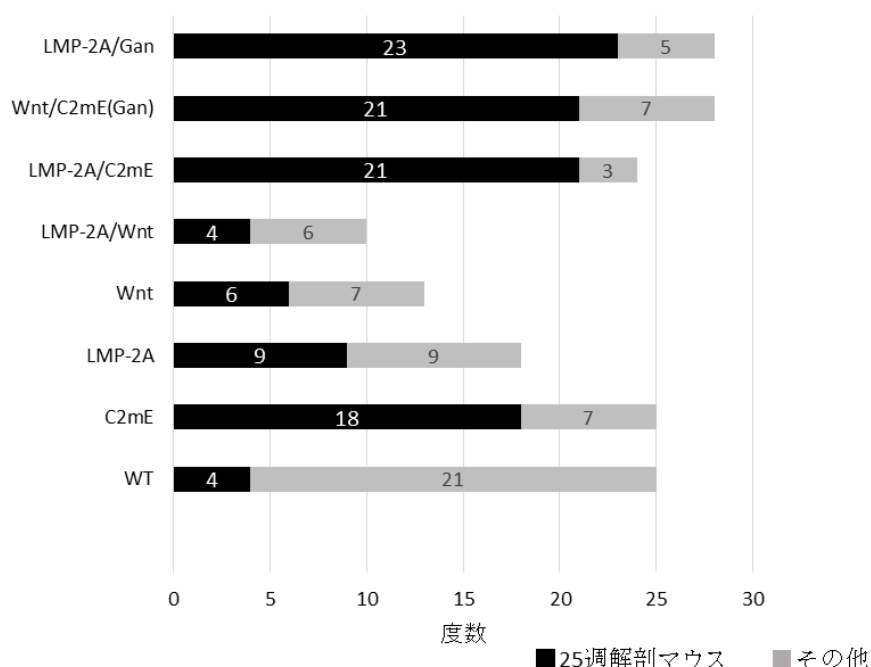


図 9 解析に用いたトランスジェニックマウス内訳

25 週での解剖は、C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの比較を念頭に、これらのマウスを中心に行った。

の大きさ、組織学的基準に基づき評価した腫瘍の発生率と大きさ、隆起病変部に占める腫瘍部の面積割合について Genotype により比較し、LMP-2A 発現が加わることによる胃粘膜への影響を検討した。

1) 胃粘膜の肉眼的変化

25 週解剖マウスでは、WT マウスと Wnt マウス、LMP-2A マウス、LMP-2A/Wnt マウスでは、明らかな肉眼病変は認められなかった。

一方、C2mE マウスで 61.1%、LMP-2A/C2mE マウスで 90.5%、Wnt/C2mE (Gan) マウスで 100%、LMP-2A/Gan マウスで 95.7%のマウスで胃粘膜に隆起性病変が生じた (図 10)。

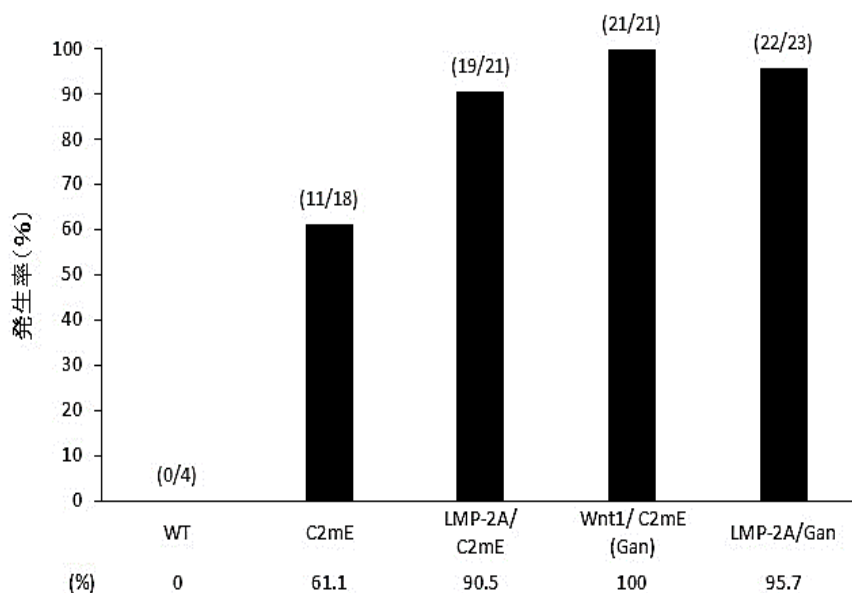


図 10 肉眼的隆起性病変の形成率

LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスの肉眼的隆起性病変の形成率 (25 週解剖時) は WT に比べ有意に高かった ($p=0.00949$, $P=0.00285$, $P=0.00079$)。棒グラフ上の数値は (発生個体数/解剖個体数) を示す。

2) 隆起病変部の組織学的特徴

25 週解剖マウスを組織学的に観察したところ、C2mE マウス、LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスについてはいずれの個体においても組織学的に何らかの変化を伴った隆起性病変が認められた。

隆起性病変部は多彩な成分からなるが、Genotype により全く性質が異なるものではなく、一連の病変として説明可能なものであった。

主な成分として腺窩上皮細胞の増加からなる過形成 (Hyperplasia) と十二指腸 Brunner 腺や胃幽門腺様の粘液細胞が多数出現する粘液化生 (Mucinous metaplasia)、および扁平上皮円柱上皮境界部を起点とした異型腺窩上皮の増生からなる Dysplasia が認められ (図 11)、隆起病変部は、Dysplasia と背景の過形成・粘液化生を含めた病変全体に相当するものであった。

隆起病変部にはリンパ球を主体とし、好中球を含む炎症細胞浸潤が起こっていた。炎症の激しい症例では、好中球浸潤が高度である傾向があり、粘膜下層あるいは筋層にまで炎症細胞浸潤が及び、粘膜筋板下で巣状の炎症細胞集塊を成していた。

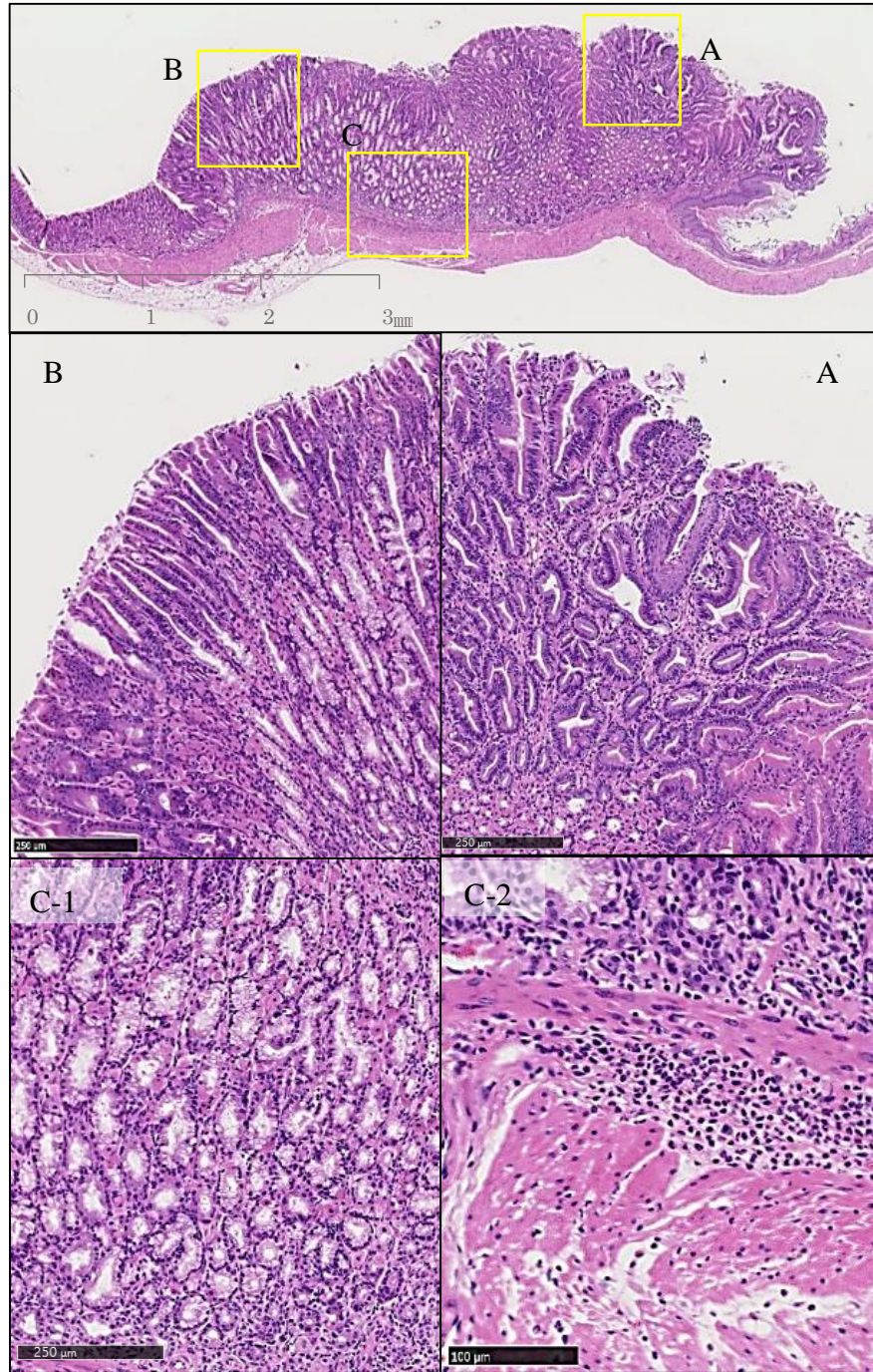


図 11 隆起病変部の組織学的特徴

LMP-2A/C2mE マウス (25 週) にできた病変。(A) 明瞭な隆起性病変を形作り、核の腫大・核密度上昇などの細胞異型や不規則に分枝する腺管などの構造異型を伴った異型腺窩上皮 (Dysplasia)、(B) 腺窩上皮や体部腺の伸長からなる過形成 (Hyperplasia) と過形成的な粘液化生 (Mucinous metaplasia) の成分 (B・C-1) が主体をなし、粘膜間質から筋層にかけて炎症細胞浸潤を認め、炎症の程度が強いものでは粘膜筋板下に巣状の浸潤が見られた (C-2)。

3) 隆起病変部の大きさ

C2mE マウス、LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスの隆起病変部の大きさについて、解剖時に計測した長径短径から算出した肉眼面積 (LW)、デジタル画像上で計測した断面積 (CS) と、体積 (LWH)、体積 (CSL) で比較し、LMP-2A の発現が加わることで隆起性病変全体の大き

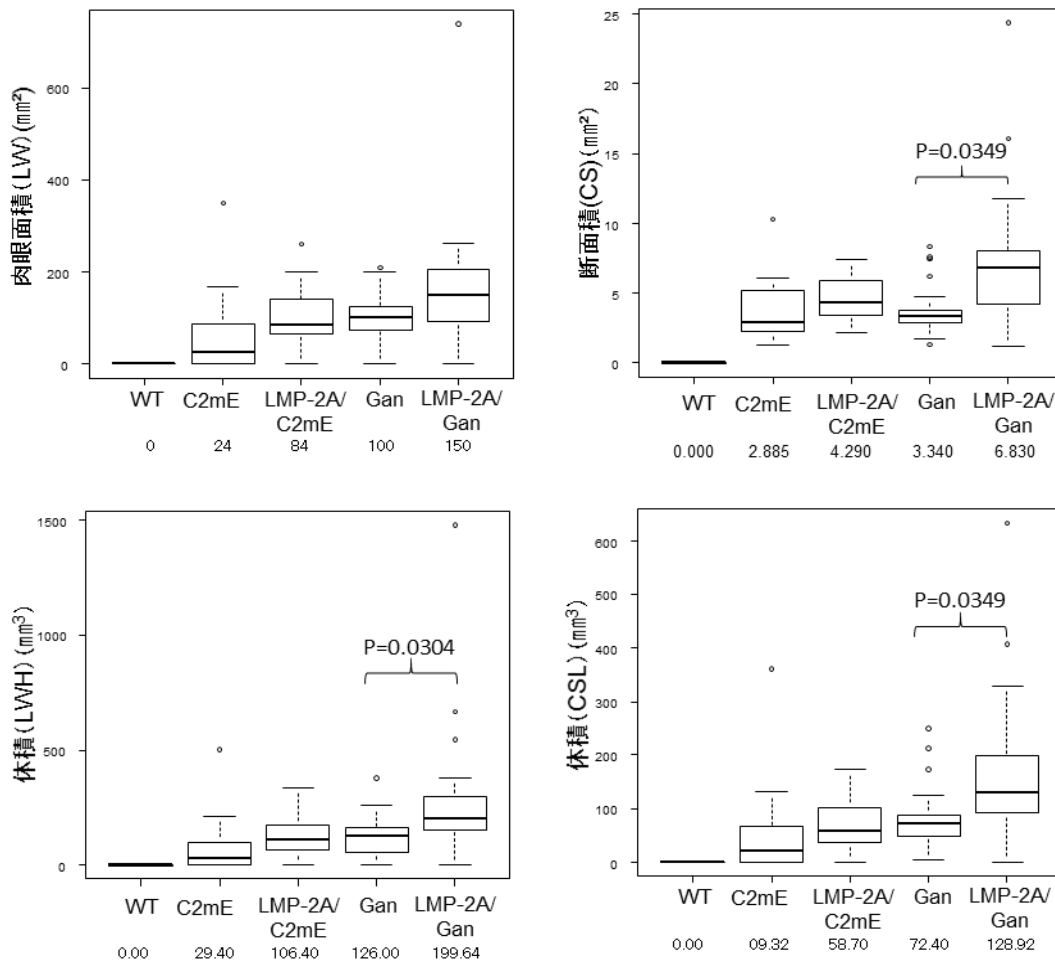


図 12 隆起病変部の大きさについての比較

組織標本上の断面積 (CS)、体積 (長径×短径×標本上の高さ:LWH、標本上断面積×短径:CSL) において LMP-2A/Gan マウスと Gan マウス、LMP-2A/C2mE マウス、C2mE マウスの各 Genotype との間に有意差がみられた。(Genotype 下の数字は median を示す。)

さに影響があるか検討した。

その結果、断面積と体積は LMP-2A/Gan マウスのほうが Gan マウスよりも大きかった (CS: $p=0.0349$, CS×L: $p=0.0349$, L×W×H: $p=0.0304$) (図 12)。

また、C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔で比較すると、隆起病変部の肉眼サイズ、切片上断面積ともに、LMP-2A/C2mE マウスが C2mE マウスよりも有意に大きかった ($p=0.0327$, $p=0.0215$) (図 13)。

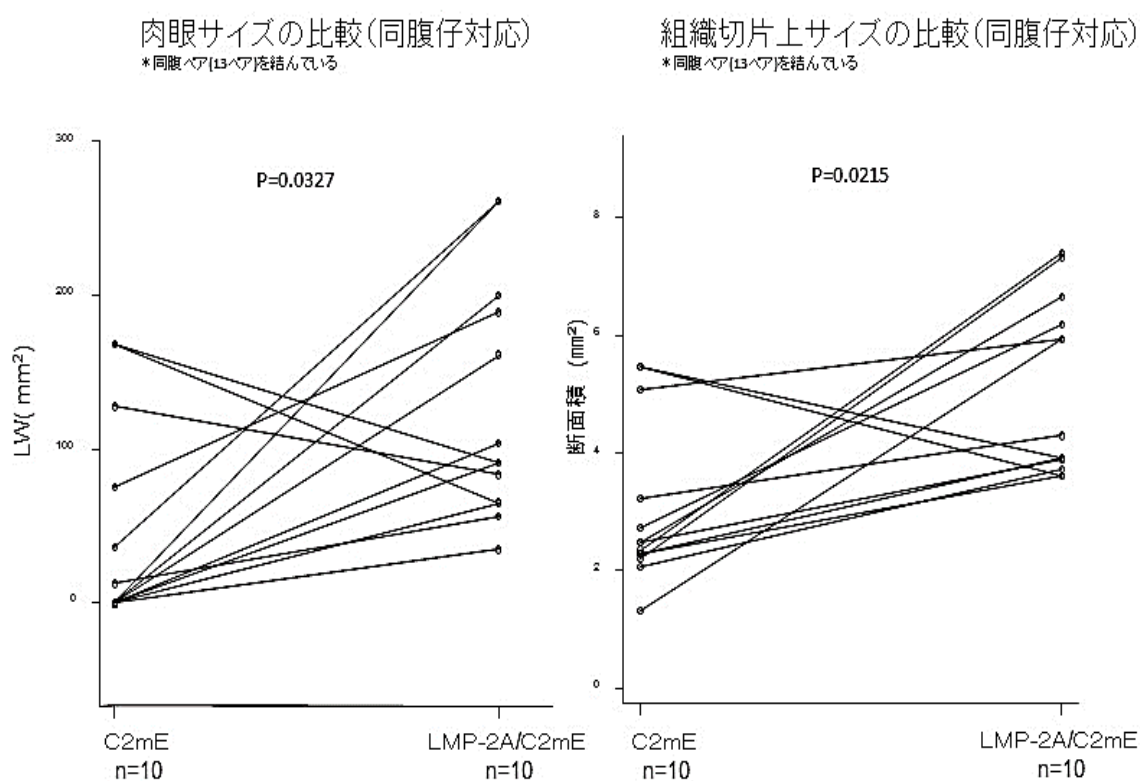
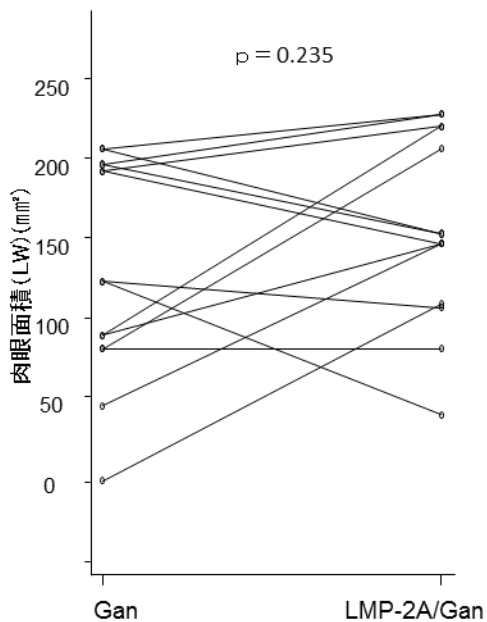


図 13 C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔における隆起病変部大きさの比較

肉眼サイズ、組織切片上サイズともに LMP-2A/C2mE マウスのほうが大きかった。

LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部の断面積では、LMP-2A/Gan マウスが Gan マウスより有意に大きかった (LMP-2A/Gan マウス平均 $5.80 \mu\text{mm}^2$ 、median $6.53 \mu\text{mm}^2$ 、Gan マウス平均 $3.79 \mu\text{mm}^2$ 、median $2.91 \mu\text{mm}^2$ 、 $p=0.0419$) (図 14)。

肉眼的サイズの比較(同腹仔対応)
*同腹仔(14ペア)を結んでいる



組織切片上サイズの比較(同腹仔対応)
*同腹仔(14ペア)を結んでいる

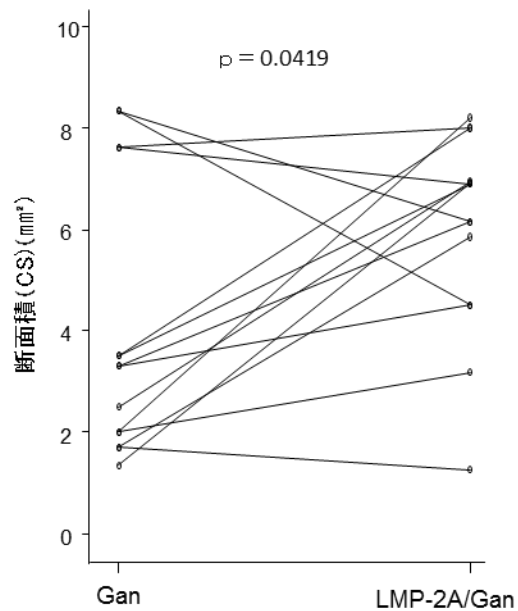


図 14 LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔における隆起病変部大きさの比較

組織切片上サイズは LMP-2A/Gan マウスのほうが有意に大きかった。

4) Dysplasia グレードの評価

25 週で解剖したマウスの胃粘膜について組織像を観察し、Dysplasia について、図 6 の Dysplasia 評価基準に従いグレーディングを行った。Genotype ごとのグレードの内訳を図に示す (図 15)。グレード 1 は C2mE マウスに多く、グレード 3 は LMP2A マウスや Gan マウスに多かった。LMP-2A マウスでは 1/9 例 (11.1%) で、1 mm 以下の微細な Dysplasia 病変 (2 か所) が認められた (図 16)。WT マウスと Wnt マウス、LMP-2A/Wnt マウスでは、組織学的にも明らかな変化は認めなかった。

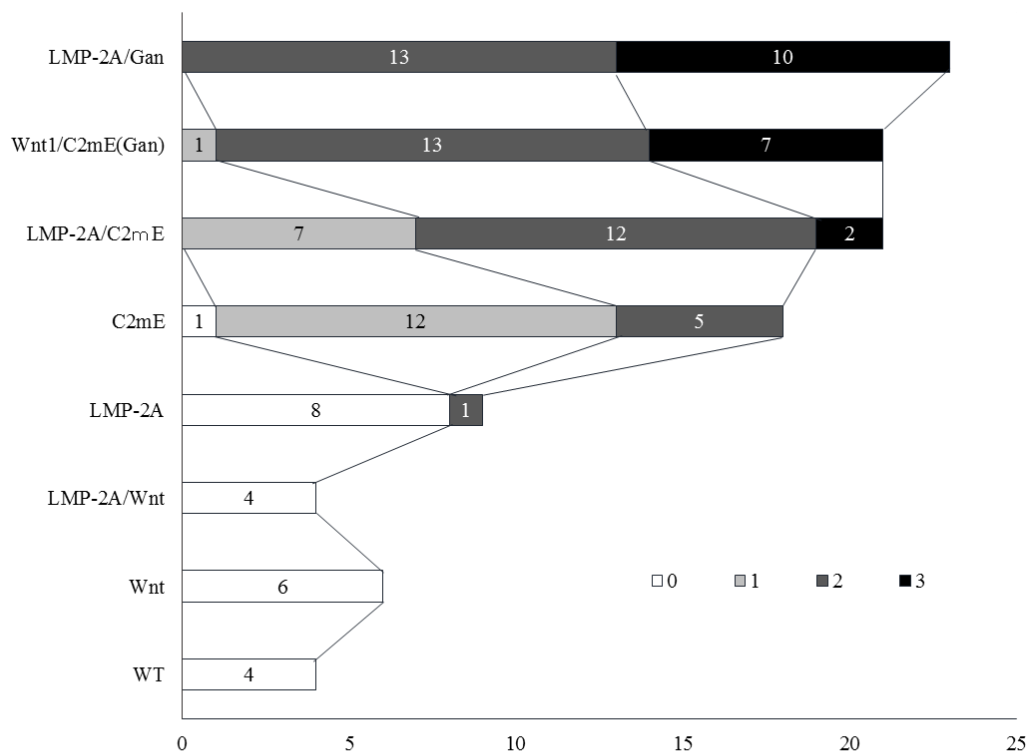


図 15 Genotype ごとの Dysplasia グレードの内訳

C2mE マウスではグレード 1、LMP2A/C2mE マウスではグレード 2 が多く、LMP2A/Gan マウスや Gan マウスではグレード 2 やグレード 3 が多かった。

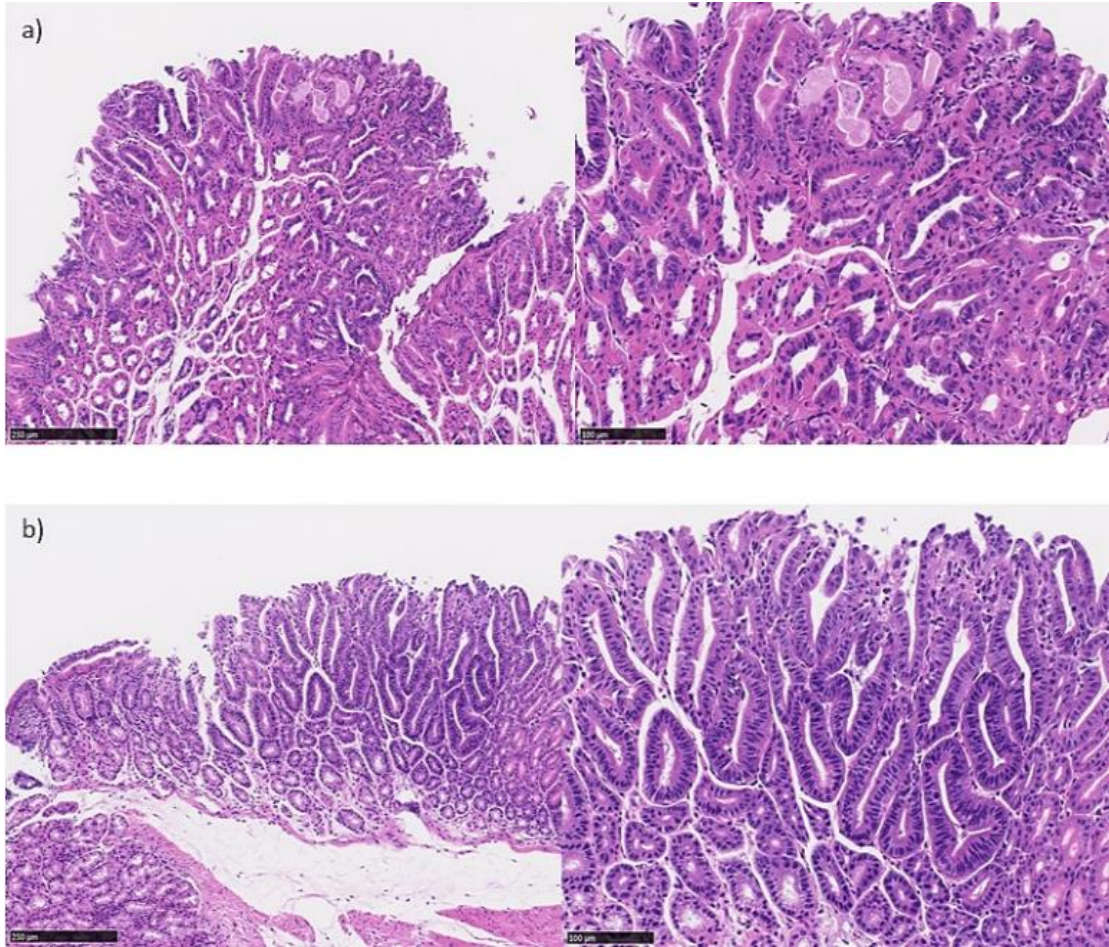


図 16 LMP-2A トランスジェニックマウスの一例に見られた Dysplasia

9 例中 1 例に a) Dysplasia グレード 1 相当 (体部腺領域) b) Dysplasia グレード 2 相当 (幽門腺領域) の微小病変が見られた。

腫瘍部での細胞増殖の様子を検討するために、Ki67 の免疫染色を施行したところ、過形成や Dysplasia グレード 1 に相当する部分では増殖帯が染色されるのに対し、Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部においては粘膜表層部から深部まで腫瘍細胞が散在性に染色され (図 17)、粘膜構造が異常を来とし極性が失われていることが伺われた。

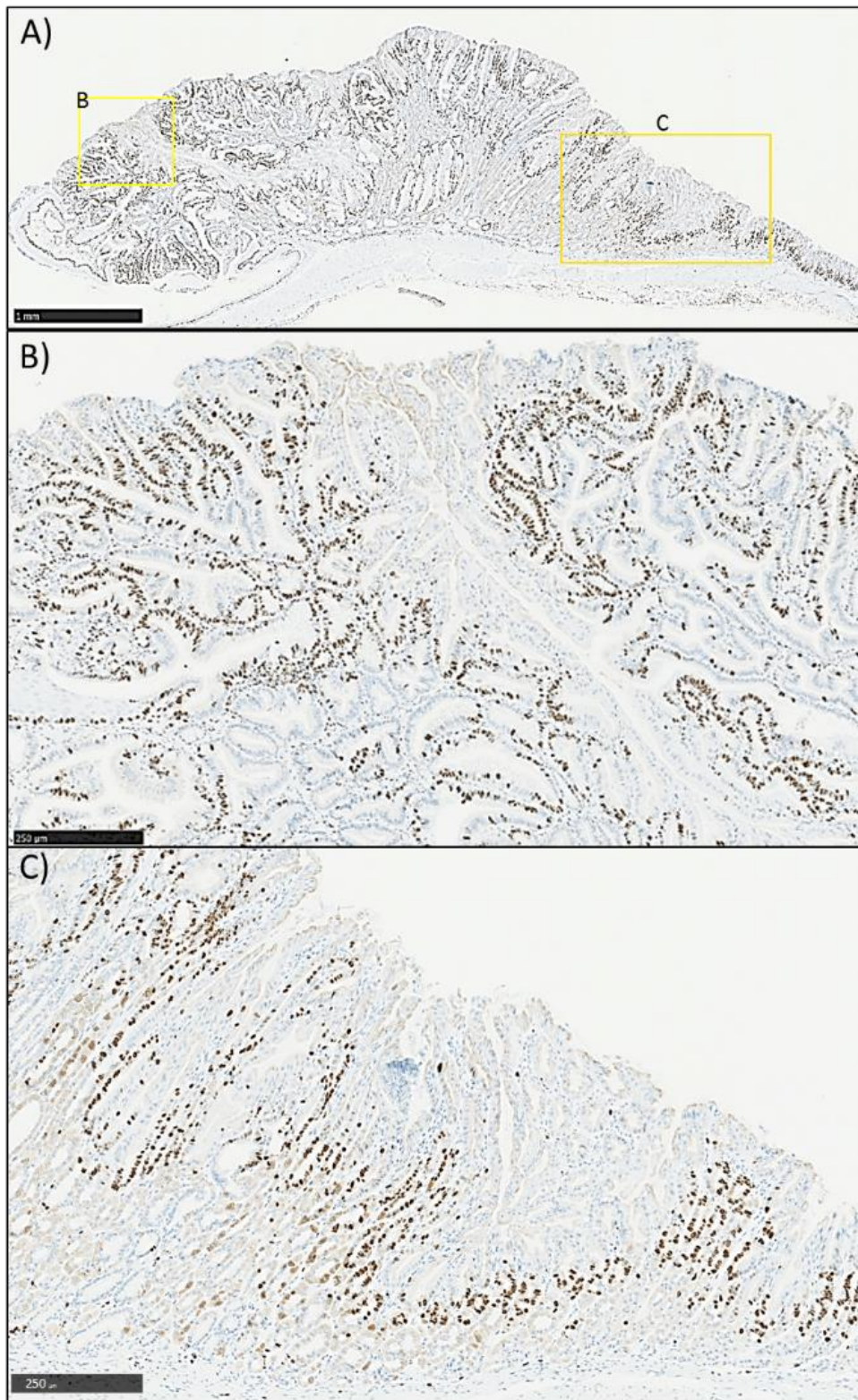


図 17 Ki67 免疫染色の染色像

過形成や Dysplasia グレード 1 相当の箇所では増殖帯が保たれていたが、Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部では粘膜表層部から深部まで腫瘍細胞が散在性に染色された。
 (写真は LMP-2A/C2mE マウス。)

5) 腫瘍発生率

Dysplasia グレード 2 以上の病変を腫瘍と定義し、C2mE マウス、LMP-2A/C2mE、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスでその発生率を Genotype 間で比較、LMP-2A 発現が加わることで腫瘍発生に影響があるかを検討した。

腫瘍発生率は C2mE マウスで 27.8%、LMP-2A/C2mE マウスで 66.6%、Gan マウスで 95.2%、LMP-2A/Gan マウスで 100%であり、C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの間には有意な差がみられた ($p=0.0248$) (図 18)。

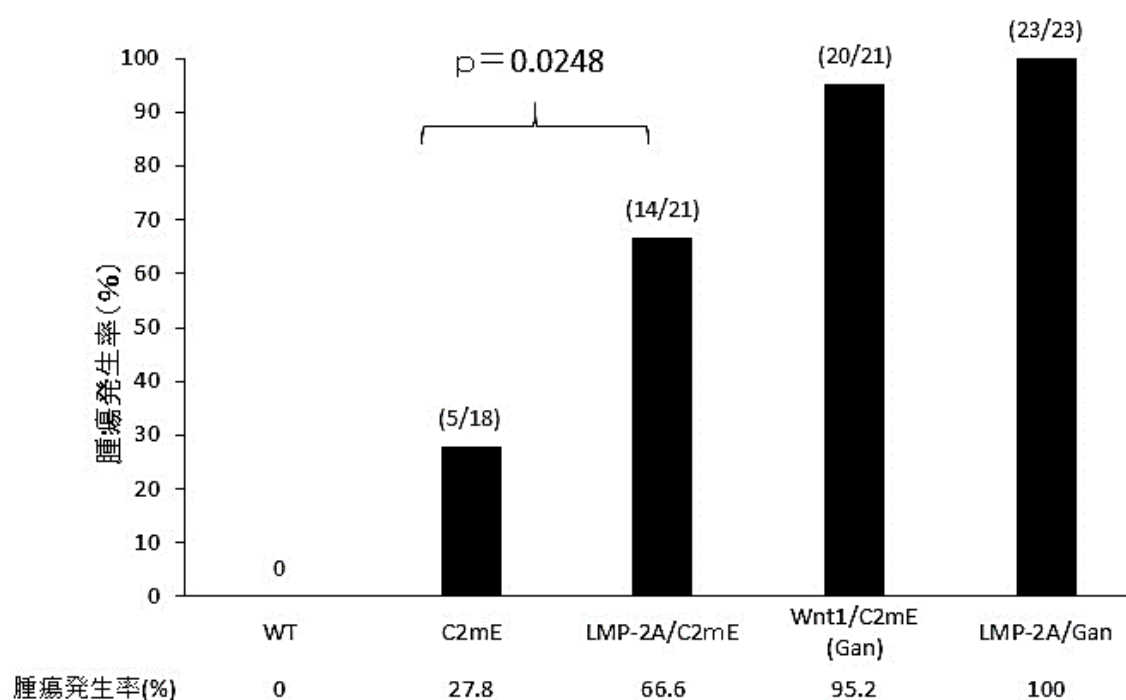


図 18 組織学的腫瘍発生率 (25 週解剖マウス)

Dysplasia グレード 2 以上の病変を腫瘍と定義すると、C2mE マウスよりも LMP-2A/C2mE マウスの腫瘍発生率が高かった ($p=0.0248$)。Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの腫瘍発生率には有意差がなかった ($P=0.477$)。

Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスでは腫瘍発生率に差はなく (P=0.477)

(図 18)、Dysplasia グレード 3 病変の発生率においても差はなかった (p=0.371)。

LMP-2A が加わる効果をさらに詳細に検討するため、C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔ペア、および Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの同腹仔ペアを全て抽出し、それぞれ比較した。

25 週で解剖したマウスのうち、C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスで同腹仔がいる個体は、C2mE マウス 10 匹、LMP-2A/C2mE マウス 10 匹で、ペアとしては 13 対であった。肉眼的隆起性病変は C2mE マウスで 5 匹 (50%)、LMP-2A/C2mE マウスで 10 匹 (100%) に認め、LMP-2A/C2mE マウスで有

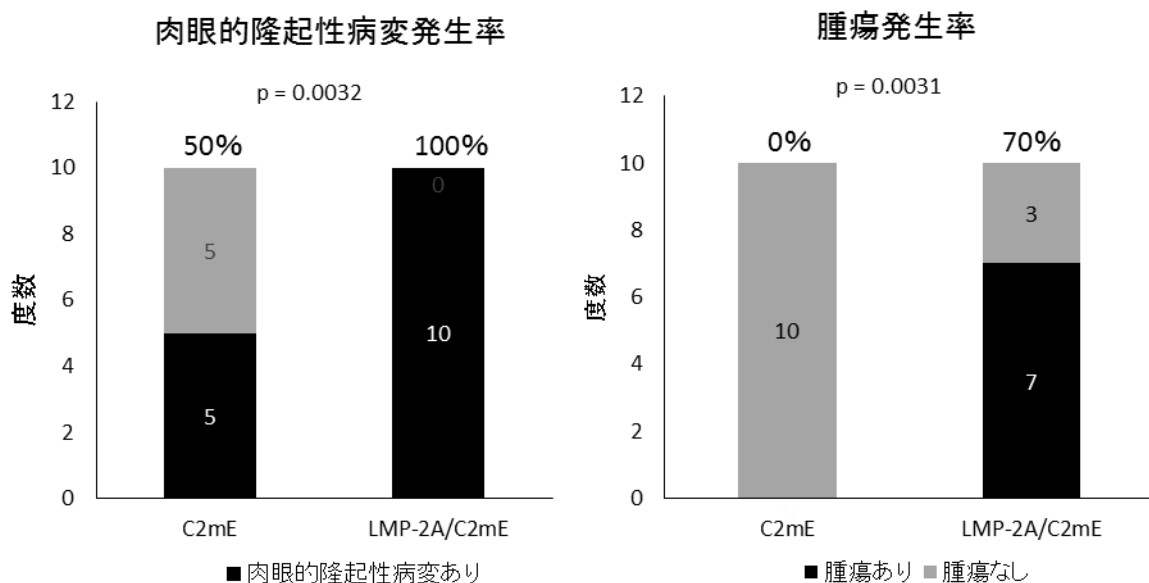


図 19 C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔群における病変発生率の比較

肉眼的隆起病変、腫瘍 (Dysplasia グレード 2 以上) とともに LMP-2A/C2mE マウスのほうで発生率が高かった。

意に多かった ($p=0.0325$)。Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍発生を示した個体は C2mE マウス 0 匹 (0%)、LMP-2A/C2mE7 匹 (70%) で、発生率に有意差を認めた ($p=0.0031$) (図 19)。

また、25 週で解剖したマウスのうち、Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスで同腹仔がいる個体は、Gan マウス 8 匹、LMP-2A/Gan マウス 10 匹で、ペアとしては 14 対であった。肉眼的隆起性病変は全個体で認められ、そのうち組織学的に Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍発生を示した個体は、Gan マウス 7/8 匹 (87.5%)、LMP-2A/Gan マウス 10/10 匹 (100%) で、発生率には有意差を認めなかった ($p=0.444$) (図 20)。Dysplasia グレードの分布にも有意な差はみられなかった (図 20)。

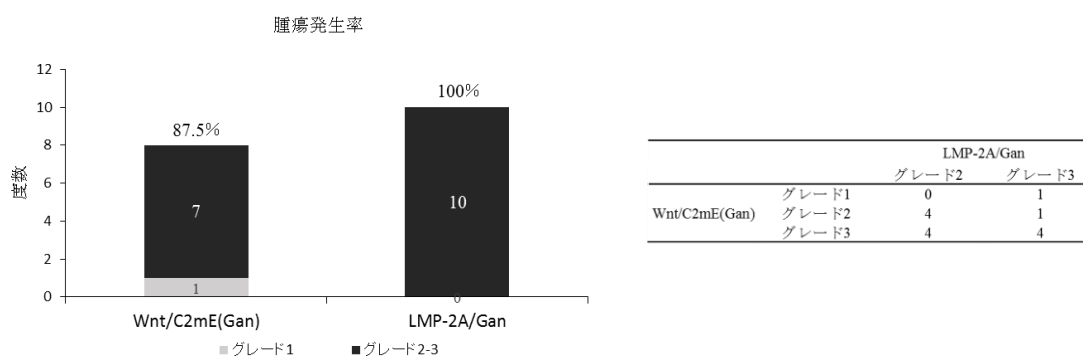


図 20 Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの同腹仔群での腫瘍発生率

両群の腫瘍発生率に有意な差は見られなかった ($p=0.444$)。また、同腹仔ペア(14 組)同士を対応させた比較ではグレードの差は有意でなかった ($p=0.824$)。

6) 腫瘍部面積

C2 mE マウス、LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスについて、最大断面における Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部面積 (Dys) をデジタル画像上で計測し Genotype 間で比較、LMP-2A 発現が加わることにより腫瘍の大きさに影響があるかを検討した。

腫瘍部面積には LMP-2A/Gan とその他の Genotype の間に有意差が見られ (図 21)、Gan マウスよりも LMP-2A/Gan マウスで腫瘍部面積が広いことが判明した ($p=0.0386$)。C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの間には有意差は見られなかった($p=0.170$)。

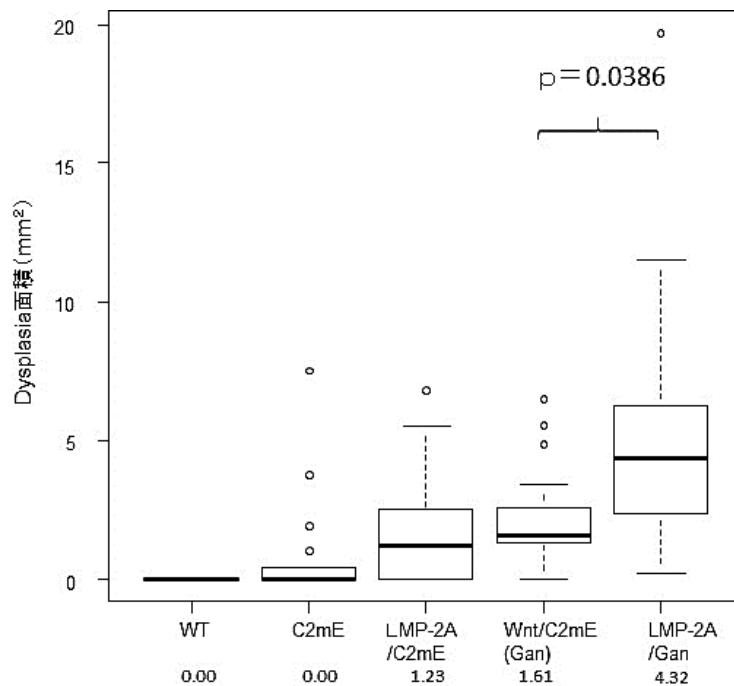


図 21 腫瘍部 (Dysplasia グレード 2 以上) 面積の比較

標本上での Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部面積は、Gan マウスよりも LMP-2A/Gan マウスで有意に広がった ($p=0.0386$)。C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの間には有意差は見られなかった($p=0.170$)。Genotype 下の数字はそれぞれの median を表す。

腫瘍部断面積の比較(同腹仔対応)
*同腹仔(13ペア)を結んでいる

腫瘍部断面積の比較(同腹仔対応)
*同腹仔(14ペア)を結んでいる

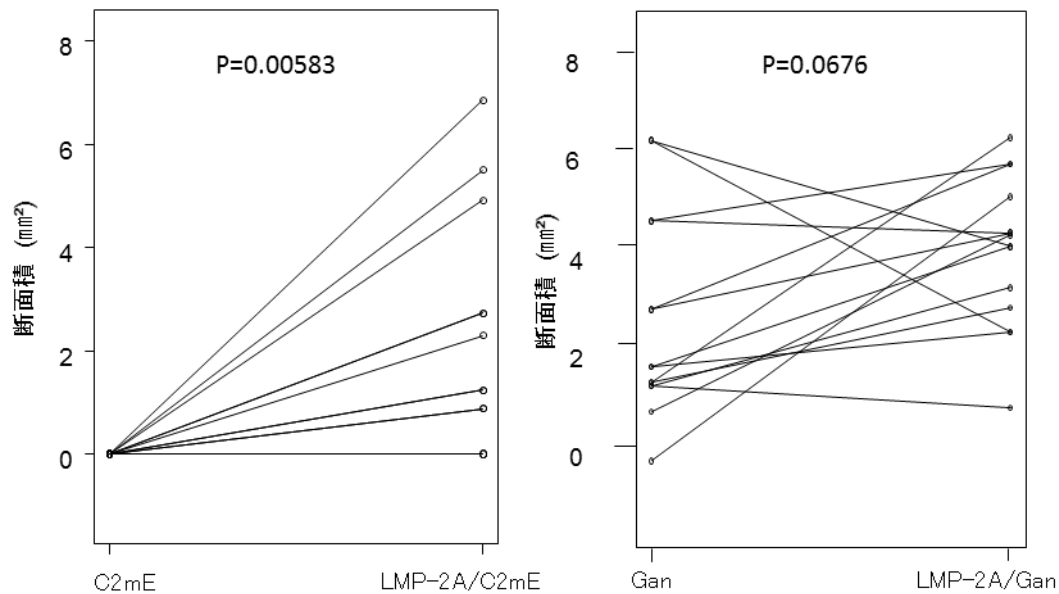


図 22 C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔、LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔における腫瘍部断面積比較

C2mE には Dysplasia グレード 2 以上に相当する腫瘍部は見られなかった。LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスは同腹仔ペアで比べると有意な差が得られなかった(p=0.0676)。

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔ペアで比較すると、Dysplasia グレード 2 以上の面積は C2mE マウス 0 に対し、LMP-2A/C2mE マウスの平均値は $2.43 \mu \text{mm}^2$ 、median は $1.23 \mu \text{mm}^2$ であった (p=0.00583) (図 22)。

LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスは、同腹仔ペアで比較すると、Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部面積に有意な差が見られなかった (LMP-2A/Gan マウス平均 $4.16 \mu \text{mm}^2$ 、median $4.44 \mu \text{mm}^2$ 、Gan マウス平均 $2.54 \mu \text{mm}^2$ 、median $1.75 \mu \text{mm}^2$ 、p=0.0676) (図 22)。

7) 隆起病変部において腫瘍部が占める面積の割合

C2mE マウス、LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスについて、隆起病変部の中で Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部面積がどの程度の割合を示すかを算出し Genotype 間で比較した。

その結果、C2mE マウス・LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウス・LMP-2A/Gan マウスの間に有意差が認められた (LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウスで $p=0.0430$ 、C2mE マウスと Gan マウス、C2mE マウスと LMP-2A/Gan マウス、LMP-2A/C2mE マウスと LMP-2A/Gan マウスで $p<0.001$) が、C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウス ($p=0.142$) および Gan マウスと LMP-2A/Gan マウス ($p=0.360$) の間では有意差は認められなかった (図 23)。

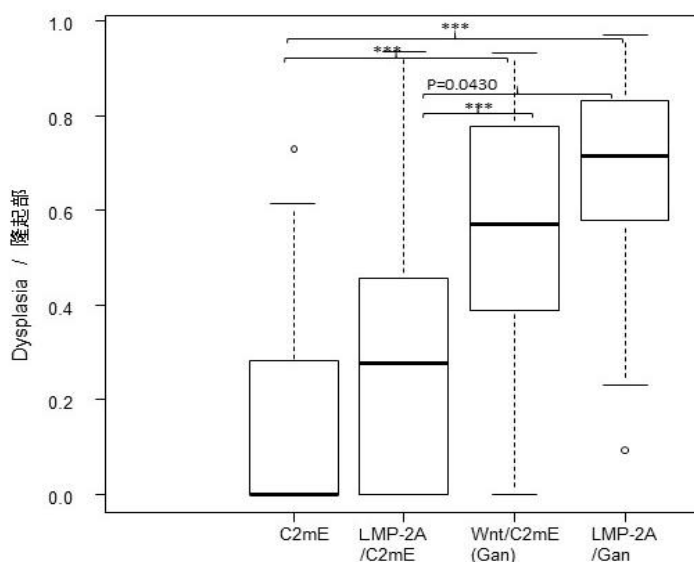


図 23 隆起病変部において Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部が占める割合
C2mE マウス・LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウス・LMP-2A/Gan マウスの間に有意差が認められた。C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウス ($p=0.142$) および Gan マウスと LMP-2A/Gan マウス ($p=0.360$) の間では有意差は認められなかった。*** $p<0.001$

LMP-2A/C2mE マウスと C2mE マウスの同腹仔ペアの比較では、隆起性病変部において腫瘍部の占める割合は、C2mE で 0% に対し、LMP-2A/C2mE マウスでは平均値 38.8%、median34.0%であった (p=0.00583) (図 24)。

また LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔ペアの比較では、隆起性病変部に占める腫瘍部の割合に有意差は認めなかった (LMP-2A/Gan マウス平均 73%、median73%、Gan マウス平均 66%、median76%、P=0.761) (図 24)。

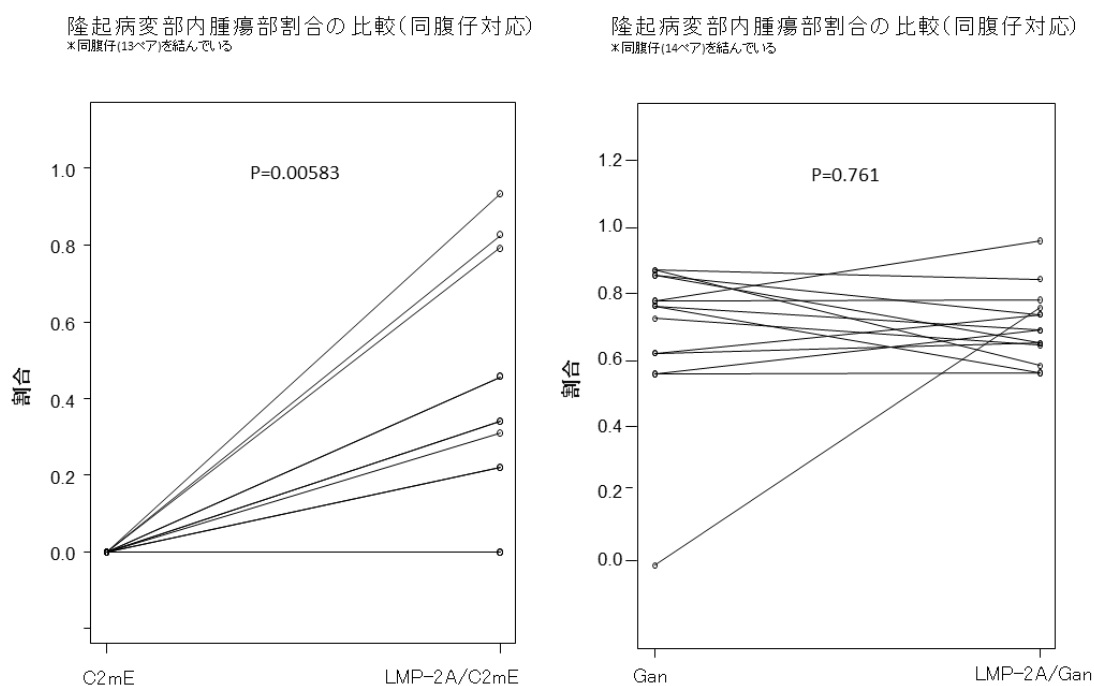


図 24 C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔、および LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔における隆起病変部内で腫瘍部が占める割合比較

C2mE マウスでは LMP-2A/C2mE マウスとの同腹仔群の中で Dysplasia グレード 2 以上に相当する腫瘍部は見られなかった。LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの同腹仔の比較では、隆起病変部のなかで腫瘍部が占める割合には差がなかった。

1 - 2. 隆起病変部に対する免疫組織学的検討

25 週で解剖したマウスのうち、同腹仔のペア (C2mE マウス 10 匹・LMP-2A/C2mE マウス 10 匹 : 13 組、Gan マウス 8 匹・LMP-2A/Gan マウス 10 匹 : 14 組) のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し、白血球共通抗原である CD45 (炎症細胞一般を認識)、B 細胞を認識する CD45R、マクロファージを認識する F4/80、粘液化生である SPEM を認識する TFF2 の免疫染色を行い、隆起性病変部および隣接部における陽性細胞浸潤数 (CD45, CD45R) あるいは浸潤面積 (F4/80, TFF2) を測定、同腹仔ペア間で比較し、炎症細胞浸潤や SPEM (spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia) が LMP-2A 発現が加わることでどう変わるかの検討を行った。

1) CD45

白血球共通抗原を認識し炎症細胞一般で陽性となる CD45 陽性細胞は、病変部間質に散在性に浸潤し、浸潤の強い症例では粘膜筋板下に巣状の集簇が見られた (図 25)。

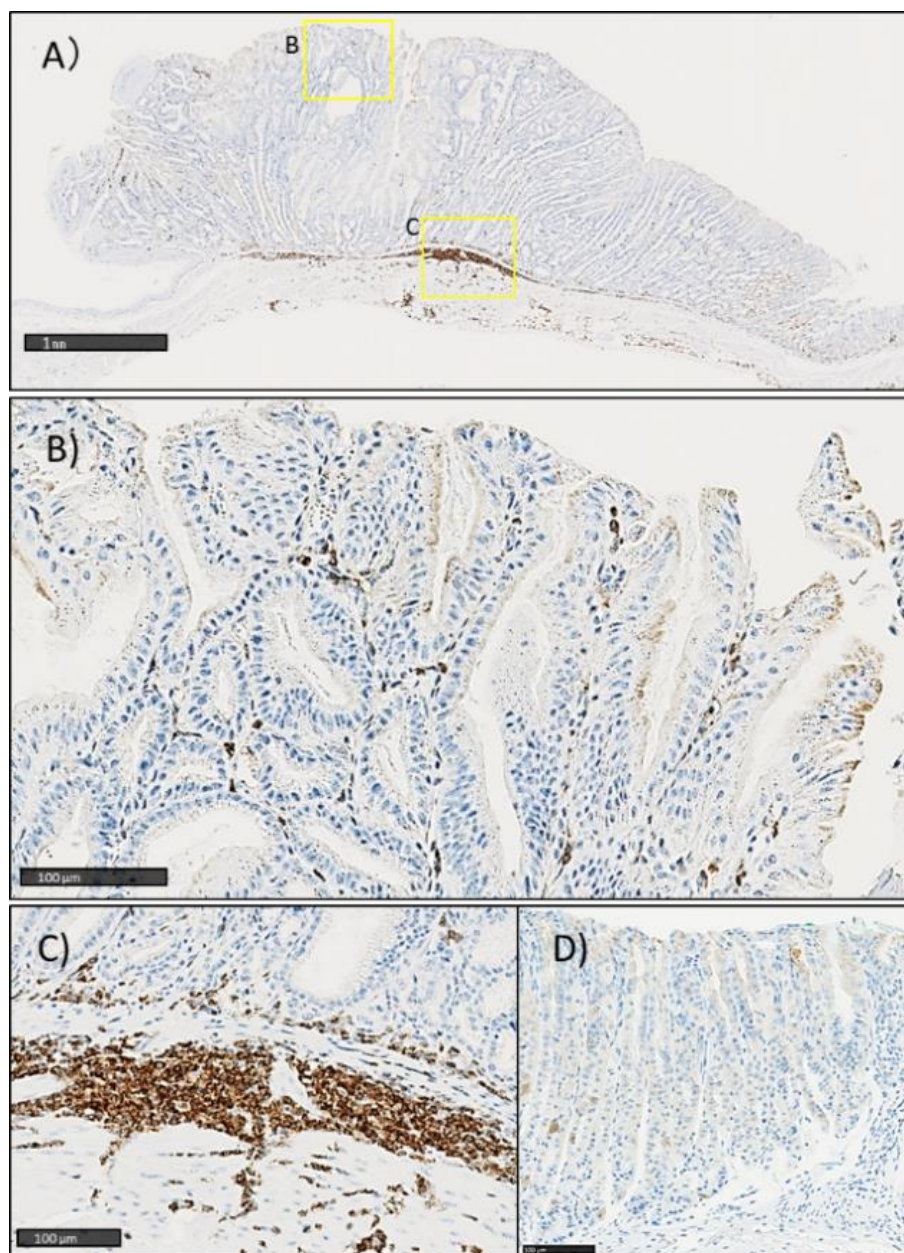
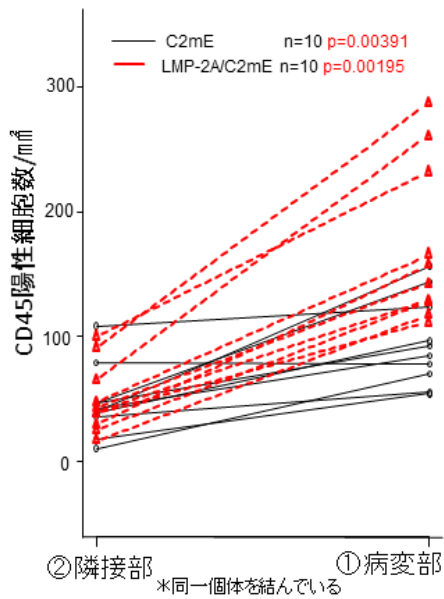


図 25 CD45(白血球共通抗原を認識)の染色

A) LMP-2A/C2mE マウスの一例 B) 間質の間に散在して浸潤していた。 C) 粘膜筋板下に集簇を形成していた。 D) WT 粘膜にはほとんど浸潤がみられなかった。

C2mEマウスとLMP-2A/C2mEマウスの比較



GanマウスとLMP-2A/Ganマウスの比較

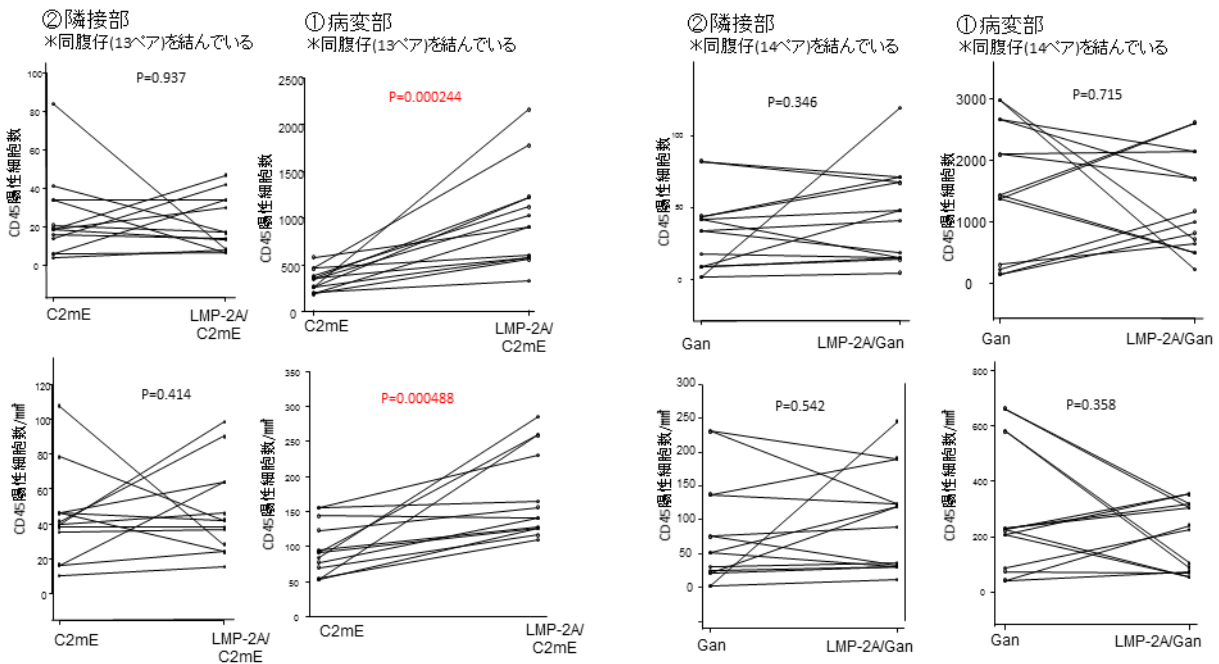
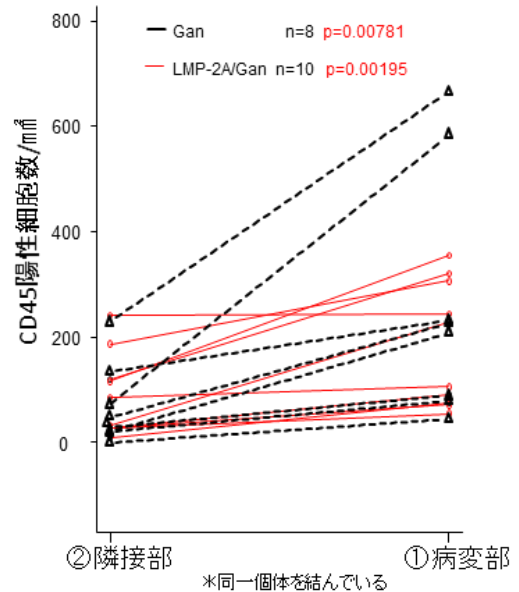


図 26 CD45 陽性細胞（白血球共通抗原）浸潤数の比較

いずれの Genotype でも、隆起病変部のほうが単位当たり浸潤数が多かった。

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの比較では隆起病変部 (①) では実数、単位面積当たり数ともに LMP-2A/C2mE マウスのほうが多かったが、隣接部 (②) では有意差はなかった。LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの比較では隆起病変部 (①)・隣接部 (②) ともに有意差がなかった。

単位面積当たりの CD45 陽性細胞数は、全 Genotype で隣接部より隆起病変部のほうが有意に多かった (C2mE マウス: $p=0.00391$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.00195$ 、Gan マウス: $p=0.00781$ 、LMP-2A/Gan マウス: $p=0.00195$)。

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部では陽性細胞数・単位当たり陽性細胞数、ともに LMP-2A/C2mE マウスでのほうが C2mE マウスでよりも有意に多かった (陽性細胞数: $p=0.000244$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=0.000488$)。隣接部では、陽性細胞数・単位当たり陽性細胞数、ともに LMP-2A/C2mE と C2mE に有意な差はみられなかった (陽性細胞数: $p=0.937$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=0.414$)。

Gan マウス・LMP-2A/Gan マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部では陽性細胞数・単位当たり陽性細胞数、ともに有意差は見られなかった (陽性細胞数: $p=0.715$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=0.358$)。腫隣接部でも、陽性細胞数・単位当たり陽性細胞数、ともに有意な差はみられなかった (陽性細胞数: $p=0.346$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=0.542$) (図 26)。

2) CD45R

B細胞を表すCD45R陽性細胞の浸潤は散在性に少数認められた(図 27)。

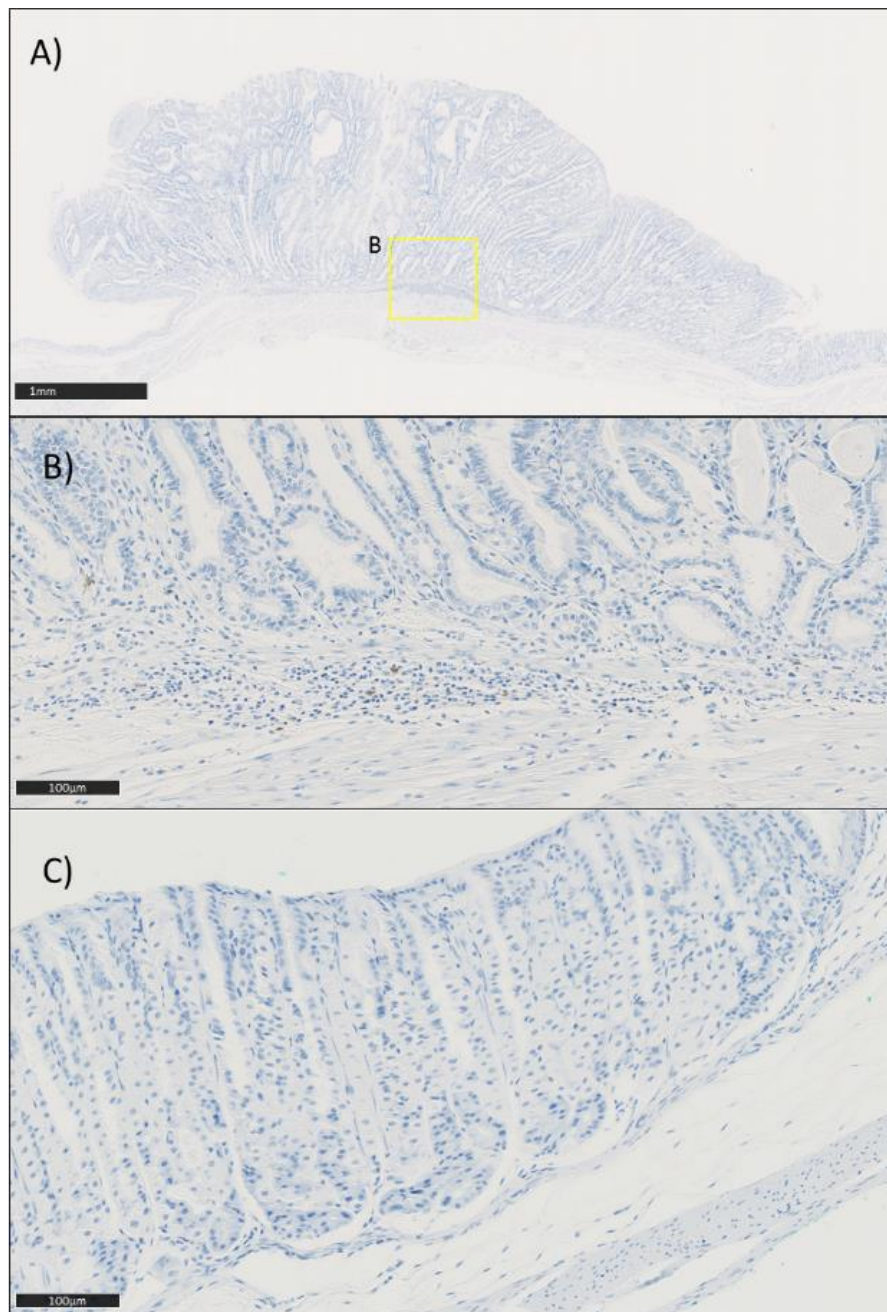


図 27 CD45R (B細胞) の染色像

A) LMP-2A/C2mE マウスの一例 B) 散発的に少数が染色された。 C) WT の粘膜。正常粘膜にはほとんど浸潤がみられない。

単位面積当たりの CD45R の陽性細胞数は、いずれの Genotype でも隣接部より隆起病変部のほうが有意に多かった (図 28) (C2mE マウス: $p=0.00195$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.00195$ 、Gan マウス: $p=0.00781$ 、LMP-2A/Gan マウス: $p=0.00195$)。

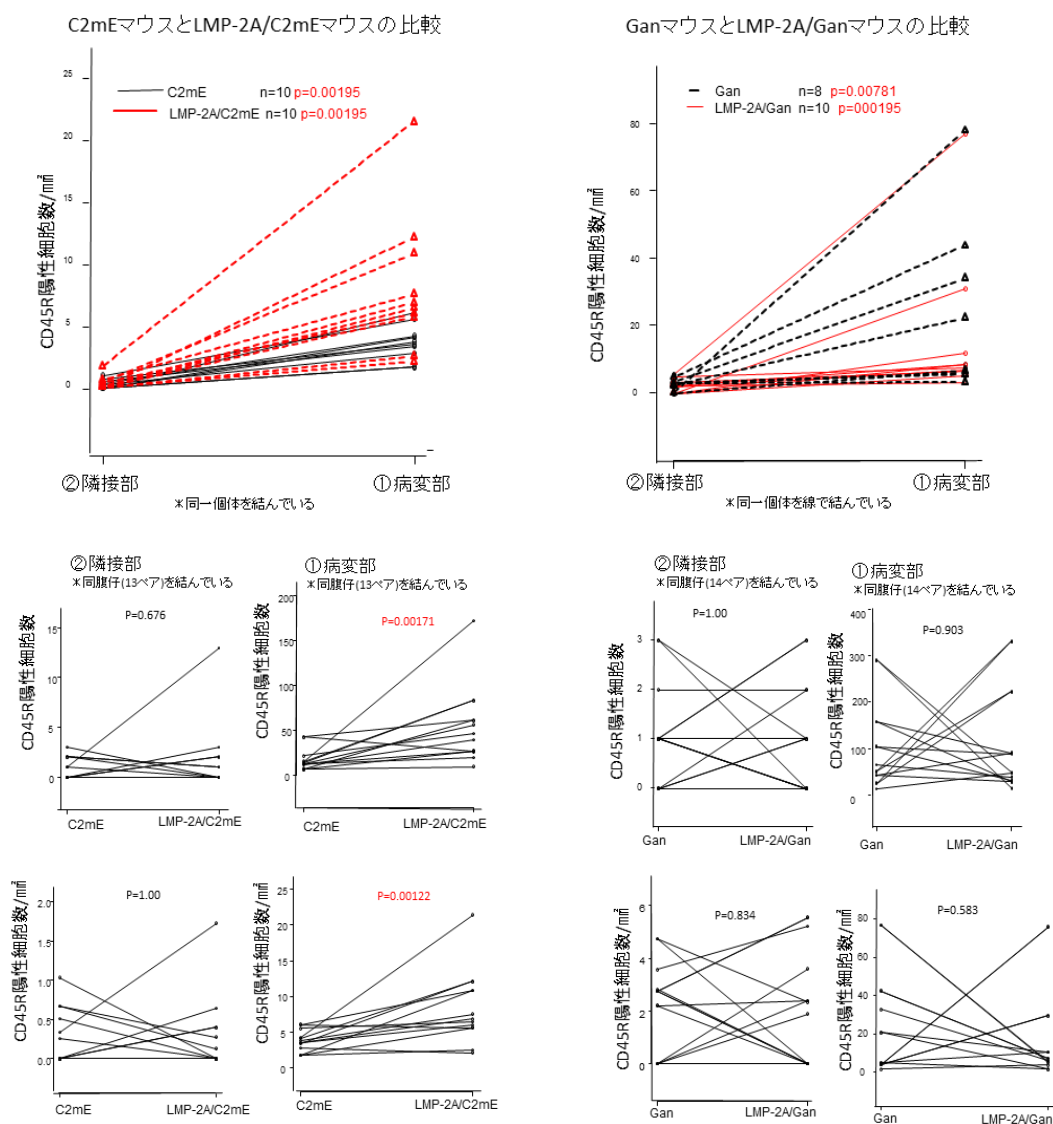


図 28 CD45R 陽性細胞 (B 細胞) 浸潤数

いずれの Genotype においても、隆起病変部のほうが単位当たり浸潤数が多かった。C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの比較では病変部 (①) では実数、単位面積当たり数ともに LMP-2A/C2mE マウスのほうが多かったが、隣接部 (②) では有意差はなかった。LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの比較では病変部 (①)・隣接部 (②) ともに有意差がなかった。

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部では陽性細胞数・単位当たり陽性細胞数ともに LMP-2A/C2mE マウスでのほうが有意に多かった（陽性細胞数: $p=0.00171$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=0.00122$ ）。隣接部では陽性細胞数・単位当たり陽性細胞数ともに LMP-2A/C2mE マウスと C2mE マウスに有意な差はみられなかった（陽性細胞数: $p=0.676$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=1.00$ ）（図 28）。

Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部では陽性細胞数・単位当たり陽性細胞数、ともに有意差はなかった（陽性細胞数: $p=0.903$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=0.583$ ）。隣接部では陽性細胞数・単位当たり陽性細胞数とも Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスに有意な差はみられなかった（陽性細胞数: $p=1.0$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=0.834$ ）（図 28）。

3) F4/80

マクロファージを表す F4/80 陽性細胞は、隆起病変部間質の間を這うように浸潤し、程度の強いものでは、筋板下に集簇する浸潤巣がみられた(図 29)。

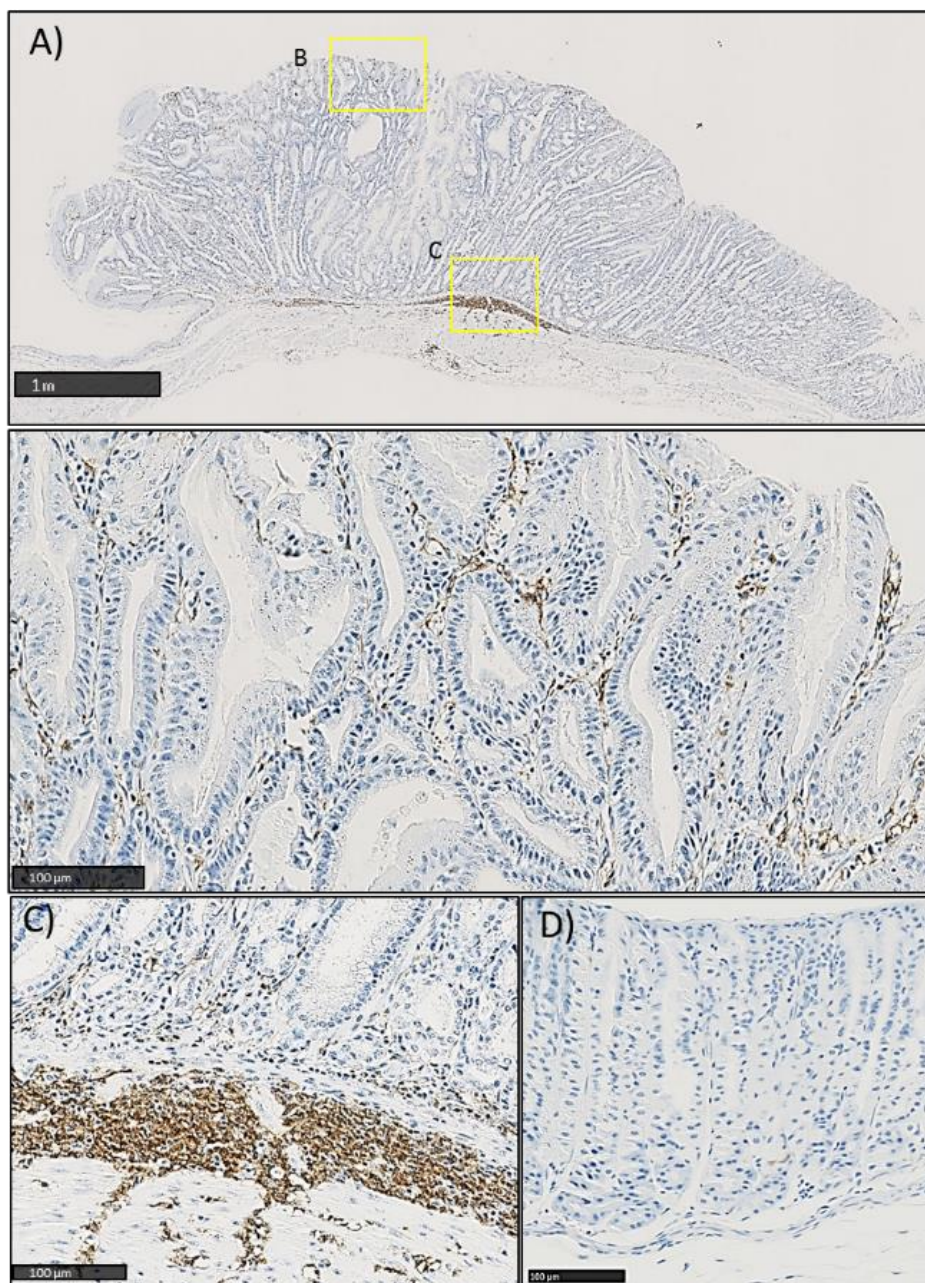


図 29 F4/80 (マクロファージ) の染色像

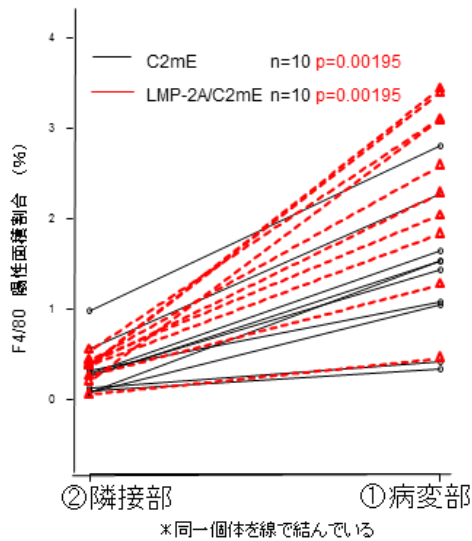
A) LMP-2A/C2mE マウスの一例 B) 間質の間を這うように浸潤していた。 C) 粘膜筋板下に集簇を形成していた。 D) WT の粘膜。正常粘膜にはほとんど浸潤がみられない。

対象領域に占める F4/80 の陽性面積割合は、いずれの Genotype でも隣接部より隆起病変部のほうが有意に高かった (図 30) (C2mE マウス: $p=0.00195$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.00195$ 、Gan マウス: $p=0.00781$ 、LMP-2A/Gan マウス: $p=0.00195$)。

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部では陽性面積・単位当たり陽性面積、ともに LMP-2A/C2mE マウスのほうが高かった (図 30) (陽性細胞面積: $p=0.00244$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞面積: $p=0.00244$)。隣接部では、陽性細胞面積・単位当たり陽性細胞面積、ともに LMP-2A/C2mE マウスと C2mE マウスに有意な差はみられなかった (陽性細胞面積: $p=0.685$ 、 1 mm^2 あたり陽性細胞数: $p=0.529$)。

Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部では陽性面積・陽性面積割合、ともに有意差は認めなかった (図 30) (陽性面積: $p=0.903$ 、陽性面積割合: $p=0.583$)。隣接部では陽性面積・陽性面積割合、ともに Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスに有意な差はみられなかった (陽性細胞面積: $p=0.173$ 、陽性細胞数: $p=0.0906$)。

C2mEマウスとLMP-2A/C2mEマウスの比較



GanマウスとLMP-2A/Ganマウスの比較

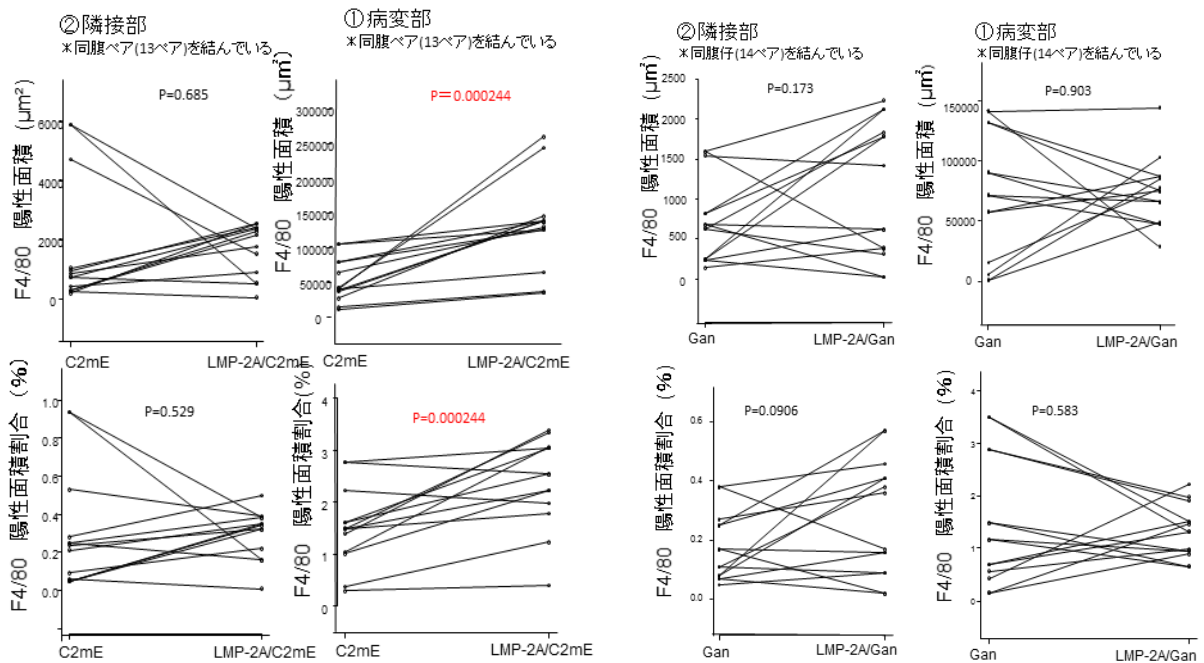
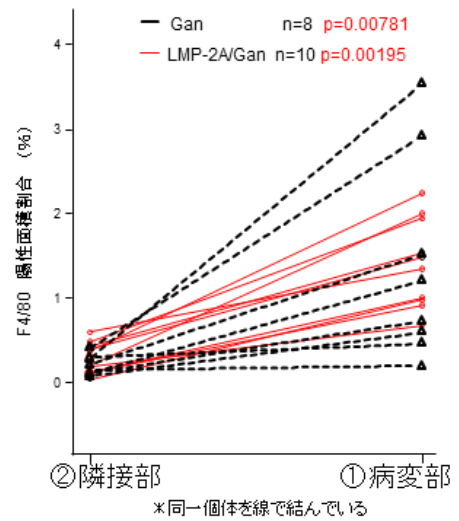


図 30 F4/80 (マクロファージ) 陽性面積の比較

C2mE マウス、LMP-2A/C2mE マウスともに隆起病変部 (①) のほうが単位面積あたりの浸潤面積が広い。C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの比較では、隆起病変部では実面積、単位面積当たりの面積、ともに LMP-2A/C2mE マウス のほうが広がったが、隣接部では有意差は見られなかった。LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスの比較では隆起病変部 (①)・隣接部 (②) ともに有意差はなかった。

4) TFF2 (trefoil factor 2)

SPEM (spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia) で陽性となる TFF2 は、過形成的な粘液細胞化生の部分に陽性となった (図 31)。

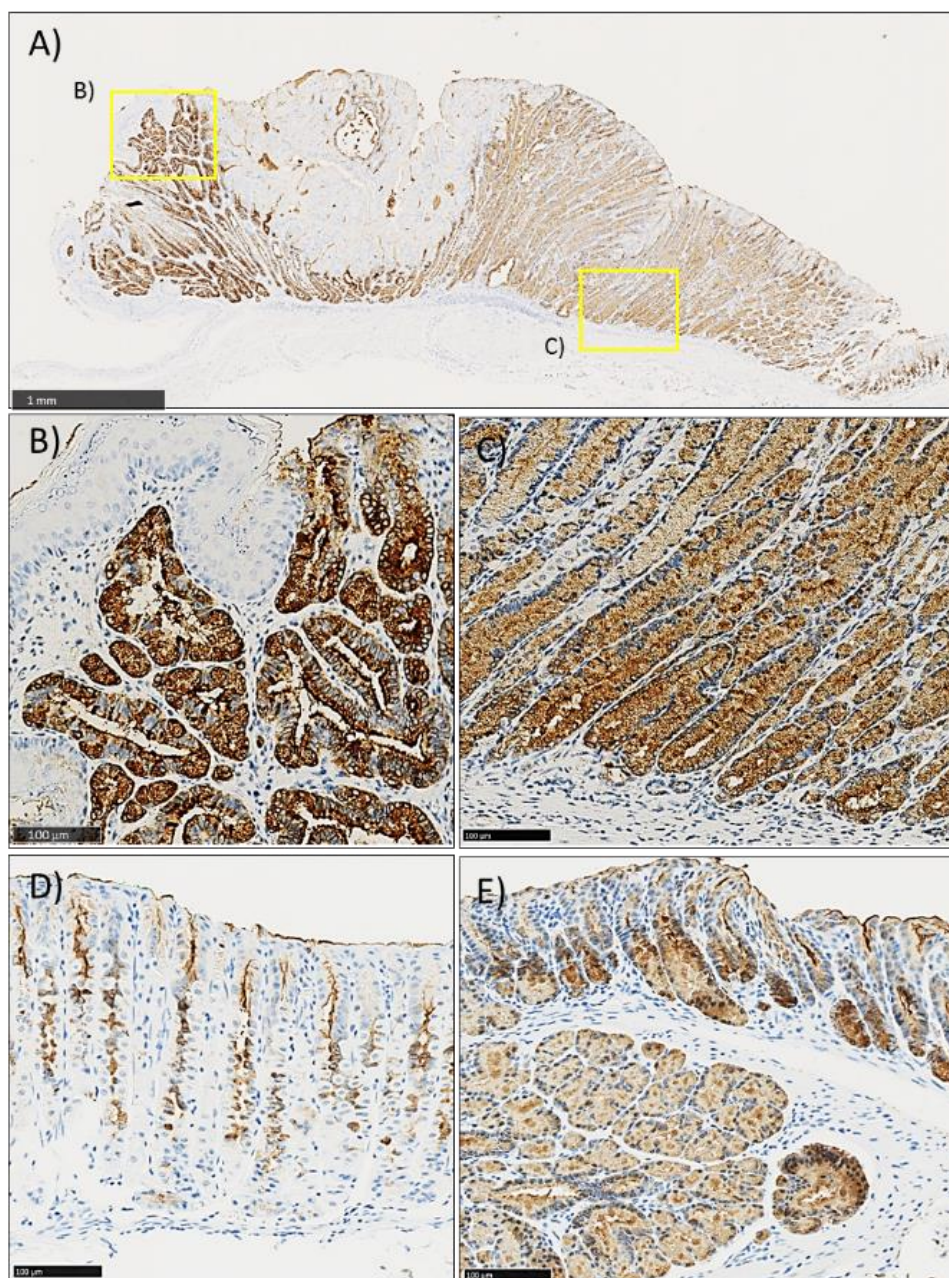


図 31 TFF2 の染色像

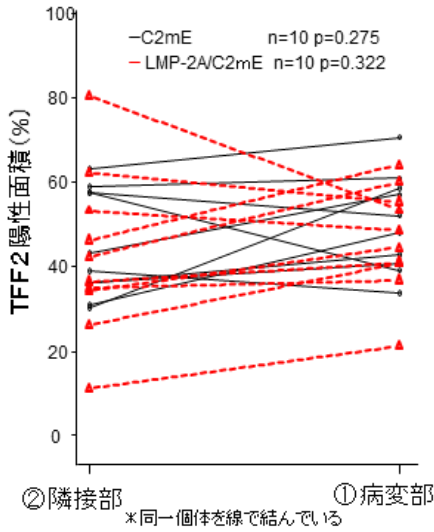
A) LMP-2A/C2mE マウスの一例。B) Dysplasia 内の粘液化生部分および C) 過形成性粘液化生部分の細胞質に陽性となった。D) E) 正常マウス胃粘膜では体部腺頸部粘液細胞、幽門腺、ブルネル腺の細胞質に陽性となった。

対象領域に占める TFF2 の陽性面積割合は、C2mE マウス・LMP-2A/C2mE マウスでは隣接部と隆起病変部で有意な差は認めなかった (C2mE マウス: $p=0.275$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.322$) が、Gan マウス・LMP-2A/Gan マウスでは、隆起病変部のほうが多かった (Gan マウス: $p=0.00781$ 、LMP-2A/Gan マウス: $p=0.00391$)。

C2mE マウス・LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部では LMP-2A/C2mE マウスのほうが陽性面積は有意に広がったが、対象領域に占める陽性面積の割合には有意な差が見られなかった (陽性面積: $p=0.00394$ 、陽性面積割合: $p=0.542$)。隣接部では、陽性細胞面積・陽性面積割合、ともに LMP-2A/C2mE マウスと C2mE マウスに有意な差はみられなかった (陽性面積: $p=0.237$ 、陽性面積割合: $p=0.945$)。

Gan マウス・LMP-2A/Gan マウスの同腹仔ペアで比較すると、隆起病変部では、陽性面積に有意な差は見られなかったが、陽性面積割合は、Gan マウスのほうが有意に高かった (陽性細胞面積: $p=0.391$ 、陽性細胞面積割合: $p=0.0494$)。隣接部では、陽性細胞面積・単位当たり陽性細胞面積ともに Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスに有意な差はみられなかった (陽性細胞面積: $p=0.715$ 、陽性面積割合: $p=0.715$) (図 32)。

C2mEマウスとLMP-2A/C2mEマウスの比較



GanマウスとLMP-2A/Ganマウスの比較

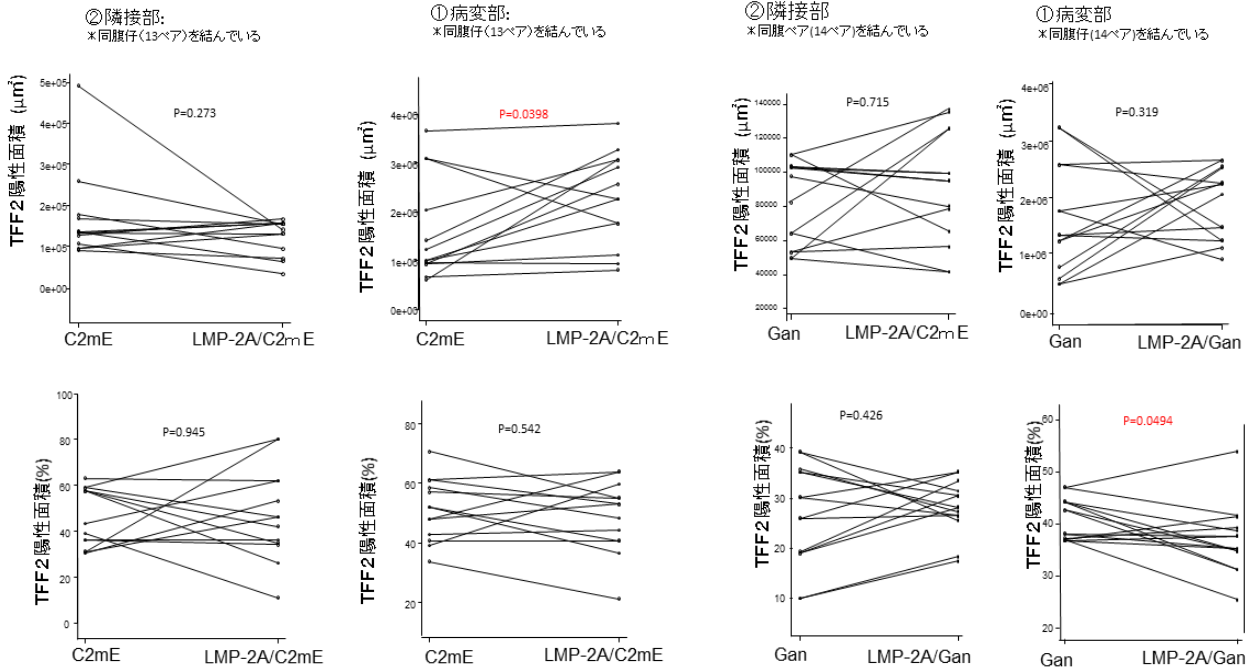
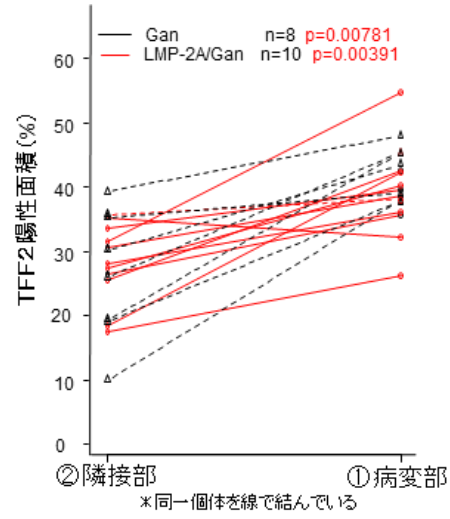


図 32 TFF2 陽性面積の比較

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスでは病変部と隣接部で陽性面積に有意差は見られなかった。 LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスはともに TFF2 陽性面積は病変部のほうが高かった。

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの比較では LMP-2A/C2mE マウスのほうが病変部における陽性面積が広がったが、陽性面積の割合では差がなかった。隣接部では有意差がみられなかった。 LMP-2A/Gan マウスと Gan マウスを比較すると、病変部では LMP-2A/Gan マウスのほうが陽性面積の割合が高かった。隣接部では有意差は見られなかった。

また TFF2 の陽性面積と Dysplasia グレード 2 以上範囲面積の間には正の相関が見られた ($\rho = 0.772, p < 0.001$) (図 33)。Genotype ごとに検討したところ、LMP-2A/C2mE マウスと LMP-2A/Gan マウスにおいて強い相関が認められた (LMP-2A/C2mE マウス: $\rho = 0.804$ $p = 0.00508$, Gan マウス: $\rho = 0.690$ $p = 0.0693$, LMP-2A/Gan マウス: $\rho = 0.709$ $p = 0.0275$)。

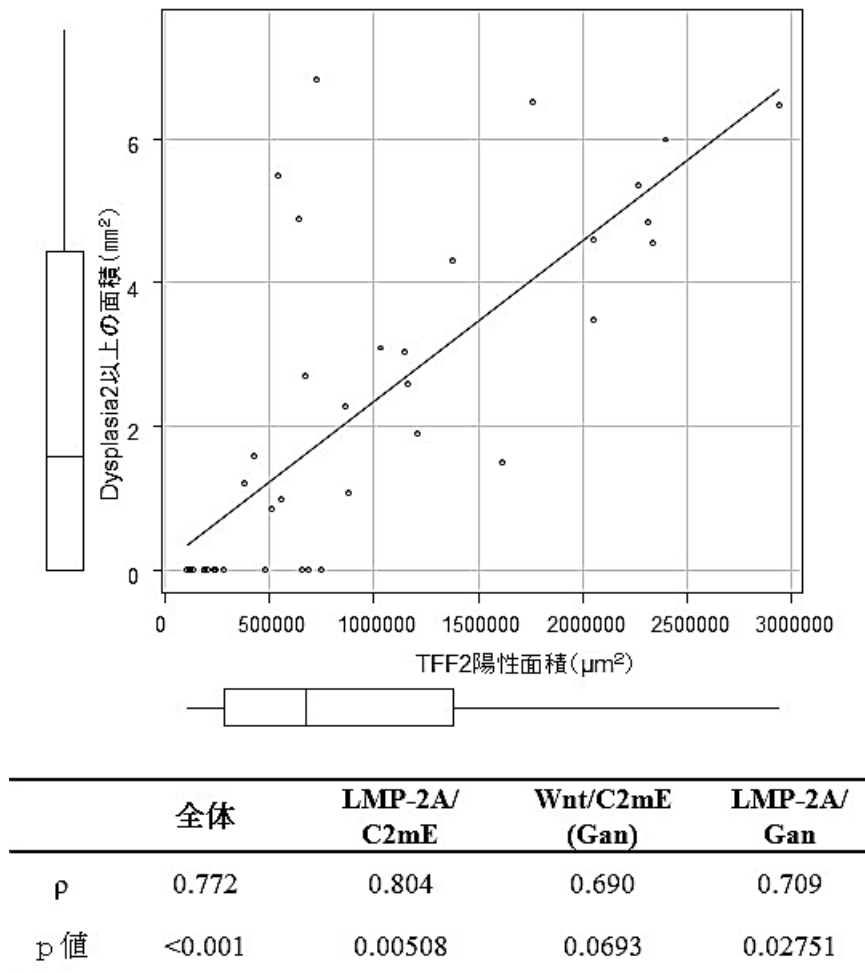


図 33 TFF2 陽性面積と Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部面積の相関
TFF2 陽性面積と Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部面積には LMP-2A/C2mE マウスと LMP-2A/Gan マウスにおいて有意な正の相関が見られた。

1-3. まとめ

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの比較結果について、表 3 にまとめる。

表 3 C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの比較まとめ

	C2mE と LMP-2A/C2mE	Gan と LMP-2A/Gan
腫瘍発生率	C2mE < LMP-2A/C2mE (全体・同腹仔)	有意差なし (全体・同腹仔)
腫瘍大きさ	C2mE < LMP-2A/C2mE (同腹仔)	Gan < LMP-2A/Gan (全体)
隆起病変部大きさ	C2mE < LMP-2A/C2mE (同腹仔)	Gan < LMP-2A/Gan (全体・同腹仔)
隆起病変部炎症細胞浸潤 (CD45, CD45R, F4/80)	C2mE < LMP-2A/C2mE	有意差なし
隆起病変部SPEM面積 (TFF2陽性面積)	C2mE < LMP-2A/C2mE	有意差なし

2. マウス胃粘膜を用いた腫瘍発生メカニズムの検討

トランスジェニックマウスの解剖の結果、Wnt1 発現が組み込まれていない LMP-2A/C2mE マウスにおいて腫瘍性病変が発生したことから、解剖時に採取した胃粘膜を用いてその背後にある LMP-2A の造腫瘍能 (tumorigenicity) のメカニズムを探った。分析には C2mE マウス、LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスの Dysplasia グレード 2 以上の腫瘍部粘膜と周囲体部腺粘膜と、WT の体部腺粘膜を使用した。

まず、LMP-2A/C2mE マウスにおいて、LMP-2A が Wnt/ β -catenin 経路を活性化させる可能性を考え、 β -catenin の Western blotting により LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部における Wnt/ β -catenin 経路活性化の検討を行った。

次に LMP-2A と Wnt/ β -catenin 経路をつなぐシグナルとされる Akt、MTA1、GSK3 β の活性化や発現亢進について Western blotting で検討した。

また、リン酸化受容体型チロシンキナーゼの抗体アレイを施行後、LMP-2A/C2mE マウスにおいてリン酸化亢進が見られた EGFR についてその発現とリン酸化を Western blotting で検討し、さらに EGFR 周辺のシグナルである Stat3、Erk(p44/42MAPK)、p70S6K についての活性化を Western blotting で検討した。

2-1. LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部における Wnt/ β -catenin 経路活性化の検討

LMP-2A/C2mE マウスにおいて、Gan マウスと同様の組織像を示す腫瘍性病変が発生したことから、LMP-2A が Wnt/ β -catenin 経路を活性化させる可能性を考え、WT マウスと C2mE マウスの体部腺粘膜、LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスの腫瘍部（いずれも Dysplasia グレード 2）粘膜からの抽出蛋白（各 1 例ずつ）を用いて Total β -catenin および細胞質内や核内に蓄積する非リン酸化型 β -catenin（Ser37, Thr41 がリン酸化されていない β -catenin を認識：商品名 Active β -catenin）について Western blotting を施行した。

その結果 Total β -catenin については、Genotype 間のシグナルの差が目立たなかったのに対し、非リン酸化型 β -catenin については LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部では Gan マウス、LMP-2A/Gan マウスの腫瘍部と同様に高いシグナルが認められた（図 34）。

さらに同腹仔同士の組み合わせ 2 グループ：グループ①WT マウスと C2mE マウス体部腺粘膜、Gan マウスと LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部（いずれも Dysplasia グレード 2）、グループ②：Gan マウスと LMP-2A/C2mE マウス、LMP-2A/Gan マウスの腫瘍部（いずれも Dysplasia グレード 3）粘膜からの抽出蛋白各 1 例ずつで同様に Western blotting を施行し比較したところ、やは

りどちらの同腹仔グループにおいても、LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部では Gan マウスや LMP-2A/Gan マウスと同様に非リン酸化型 β -catenin のシグナル亢進が見られた (図 35)。

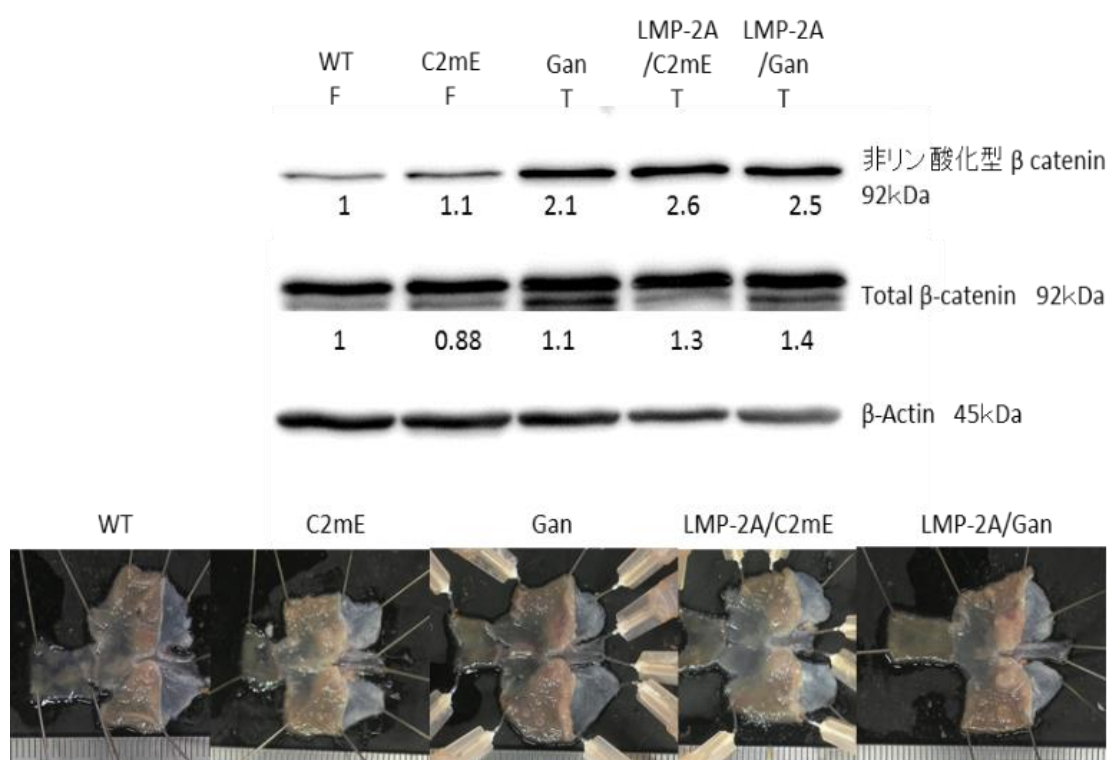


図 34 非リン酸化型 β -catenin ・ total β -catenin の Western blotting

LMP-2A/C2mE マウスの腫瘍部では、Wnt/C2mE (Gan) マウスや LMP-2A/Gan マウスの腫瘍部と同様に、非リン酸化型 β -catenin のシグナルが強く認められた。数字は各シグナル値を β -Actin のシグナル値で除し、WT を 1 としたときのそれぞれの相対値を示す。

T: 腫瘍部(Dysplasia グレード 2)、 F: 周囲体部腺粘膜

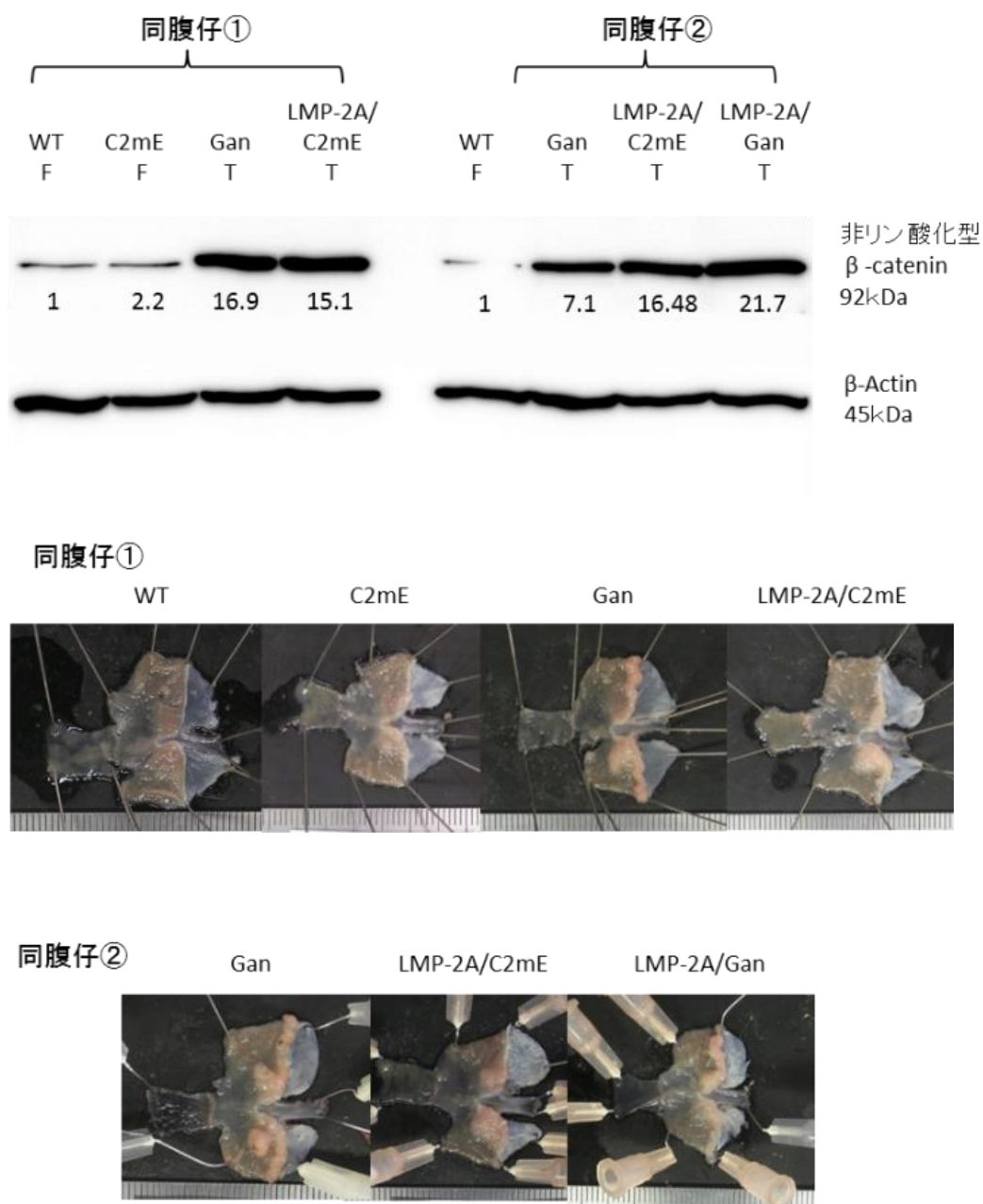


図 35 非リン酸化型 β catenin の Western blotting : 同腹仔での比較

同腹仔グループ①と②は別のグループで、WTは同一個体。全て一枚のメンブレン上で同時に施行した Western blotting の結果である。いずれのグループでも LMP-2A/C2mE マウスにおいて Wnt/C2mE (Gan) マウスや LMP-2A/Gan マウスの腫瘍部と同様に強いシグナルが認められた。数字は各シグナル値を β -Actin のシグナル値で除し、WT を 1 としたときのそれぞれの相対値を示す。

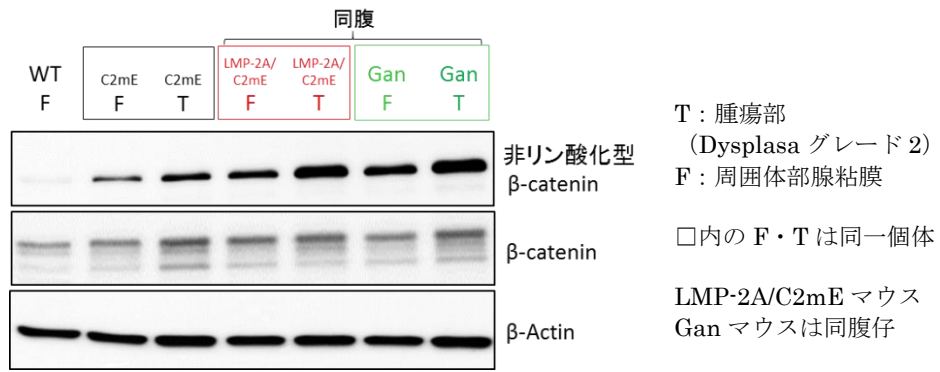
T: 腫瘍部 (グループ①は Dysplasia グレード 2、グループ②は Dysplasia グレード 3)

F: 周囲体部腺粘膜

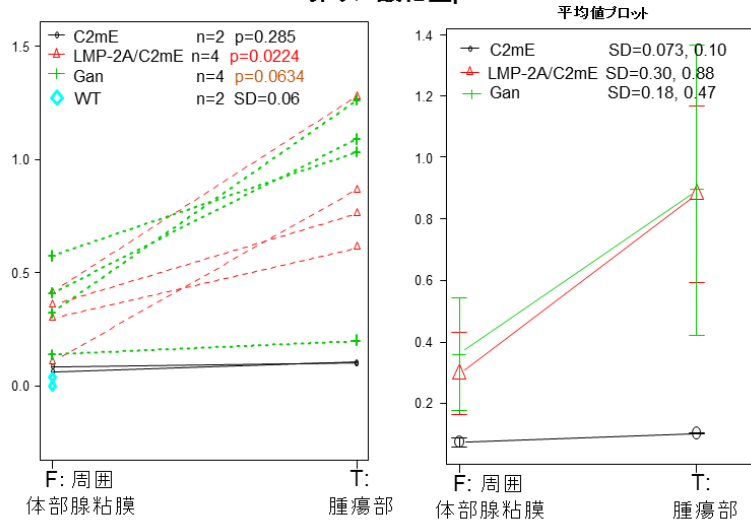
C2mE マウスで腫瘍性病変を形成する個体(n=2)、および LMP-2A/C2mE マウス(n=4)、Gan マウス(n=4)についてそれぞれ腫瘍部 (Gan マウス 1 例がグレード3、その他は Dysplasia グレード2) と周囲体部腺粘膜について蛋白質を抽出し、Genotype ごとに Western blotting を施行した (図 36) (写真は各 Genotype の中から代表的な一例ずつを抽出して泳動・転写し直したもの)。

その結果、非リン酸化型 β -catenin については、LMP-2A/C2mE マウスにおいて、周囲体部腺粘膜よりも隆起病変部にての有意なシグナル上昇が見られ、Gan マウスについても同様の傾向がみられた (C2mE マウス: $p=0.285$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.0223$ 、Gan マウス: $p=0.0634$)。

Total β -catenin についてはいずれの Genotype においても周囲体部腺粘膜と隆起病変部で有意な差は見られなかった (C2mE マウス: $p=0.782$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.347$ 、Gan マウス: $p=0.286$)。



非リン酸化型β-catenin



β-catenin

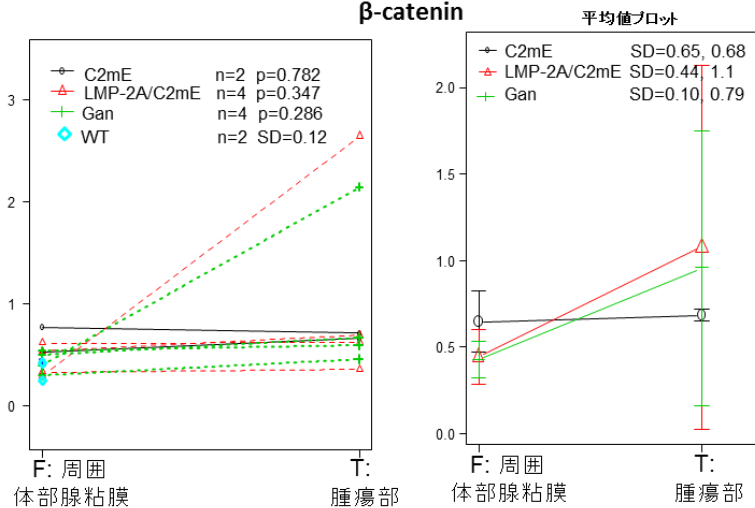


図 36 非リン酸化型 β-catenin、total β-catenin の Western blotting 結果

縦軸は各シグナル値を β-Actin の値で割った数値。非リン酸化型 β-catenin では LMP-2A/C2mE マウスの隆起病変部で周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル上昇が見られた (LMP-2A/C2mE: p=0.0224, Gan: p=0.0634)。β-catenin はいずれの Genotype でも周囲体部腺粘膜と隆起病変部に有意な差は見られなかった。(SD は周囲体部腺粘膜、隆起病変部での値を順に記載。)

2-2. LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部における Wnt/ β -catenin 経路関連シグナル

(Akt、MTA1、GSK3 β) 亢進の検討

LMP2A がどのようにして Wnt/ β -catenin 経路を亢進させるのか探るため、先行研究[48, 50]にて LMP2A と Wnt/ β -catenin 経路を関連付けるとされている Akt、MTA1、GSK3 β に関して、WT マウス体部腺粘膜(n=2)、および C2mE マウス (n=2)、LMP-2A/C2mE マウス(n=3)、Wnt/C2mE (Gan) マウス(n=3)の腫瘍部 (Gan マウス 1 例がグレード3、その他は Dysplasia グレード2) と周囲体部腺粘膜の抽出蛋白溶液を用いて、Genotype ごとに Western blotting を施行した (図 37)。写真は各 Genotype の中から代表的な一例ずつ抽出して泳動・転写し直したもので β -catenin の写真 (図 36) と同一の個体群である。

1) Akt

リン酸化 Akt (P-Akt) では、LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウスにおいて、腫瘍部で周囲体部腺粘膜よりも有意に高いシグナルが認められた (図 37) (C2mE マウス: $p=0.247$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.0496$ 、Gan マウス: $p=0.0470$)。Akt については、いずれの Genotype でも周囲体部腺粘膜と腫瘍部における差は見られなかった (図 37) (C2mE マウス: $p=0.843$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.728$ 、Gan マウス: $p=0.809$)。

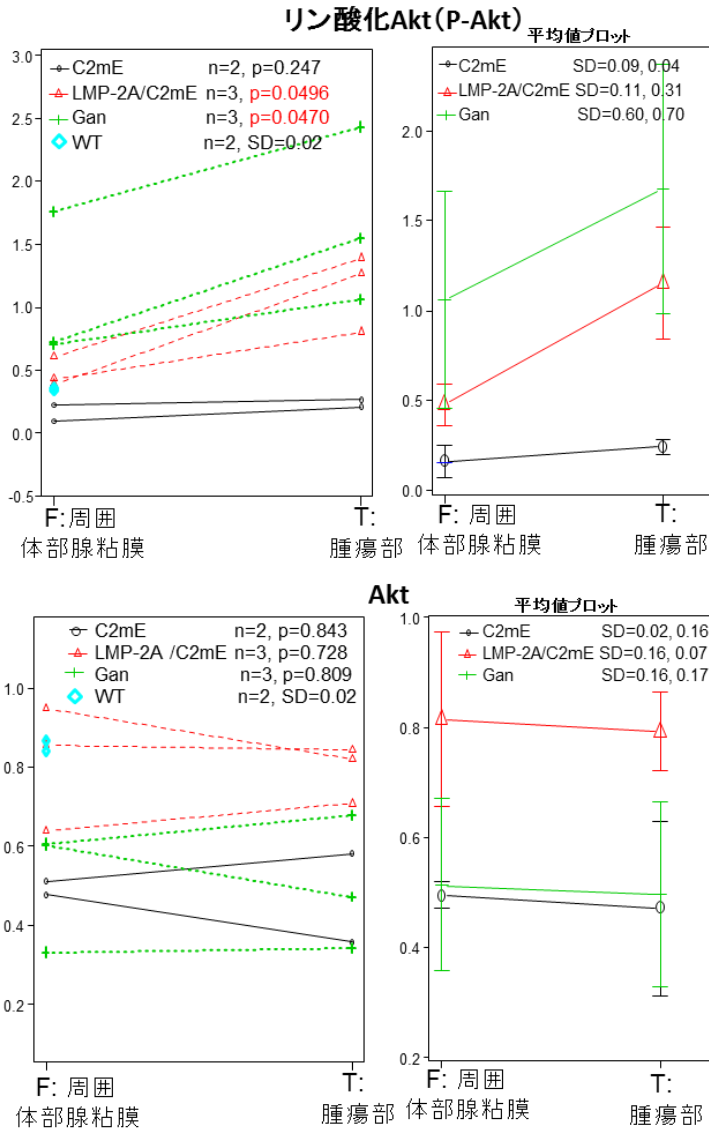
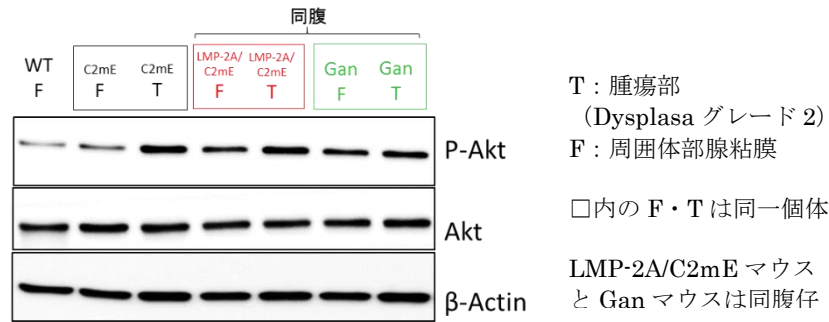


図 37 P-Akt, Akt の Western blotting 結果

縦軸は各シグナル値を β -Actin の値で割った数値。リン酸化 Akt(P-Akt) では LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウスの隆起病変部で周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル上昇が見られた(LMP-2A/C2mE: $p=0.0496$, Gan: $p=0.0470$)。Akt はいずれの Genotype でも周囲体部腺粘膜と隆起病変部に有意な差は見られなかった。(SD は周囲体部腺粘膜、隆起病変部での値を順に記載。)

2) MTA1

MTA1 では、LMP-2A/C2mE マウスにおいて、腫瘍部で周囲体部腺粘膜よりも高いシグナルが認められた (図 38) (C2mE マウス: $p=0.856$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.0266$ 、Gan マウス: $p=0.422$)。

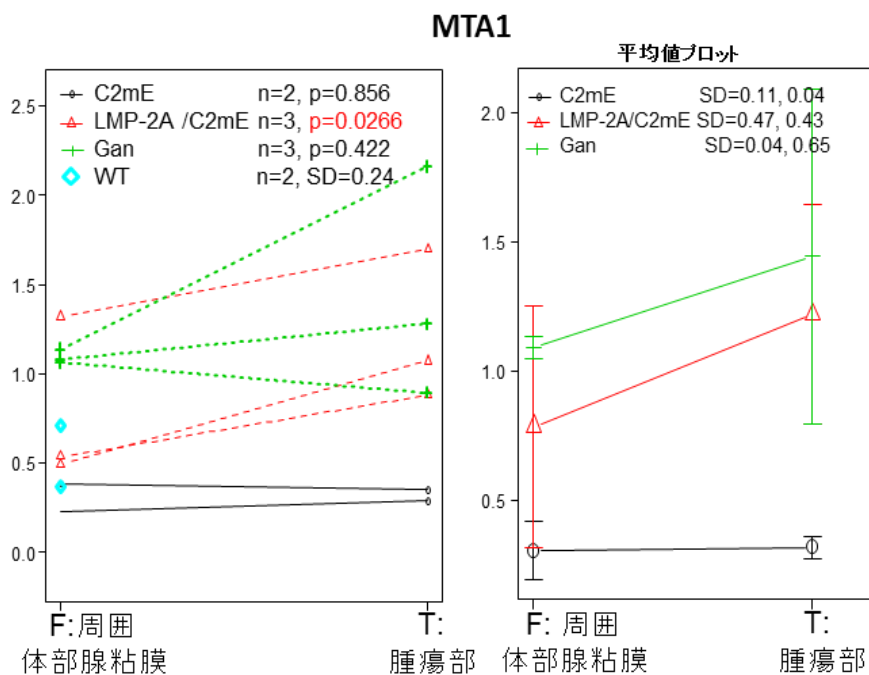
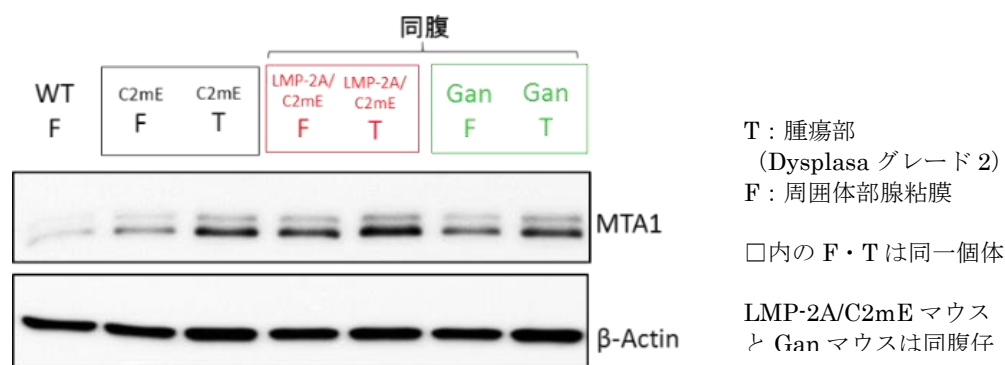


図 38 MTA1 の Western blotting 結果

縦軸は各シグナル値を β -Actin の値で割った数値。MTA1 では LMP-2A/C2mE マウスの隆起病変部で周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル上昇が見られた ($P=0.0266$)。(SD は周囲体部腺粘膜、隆起病変部での値を順に記載。)

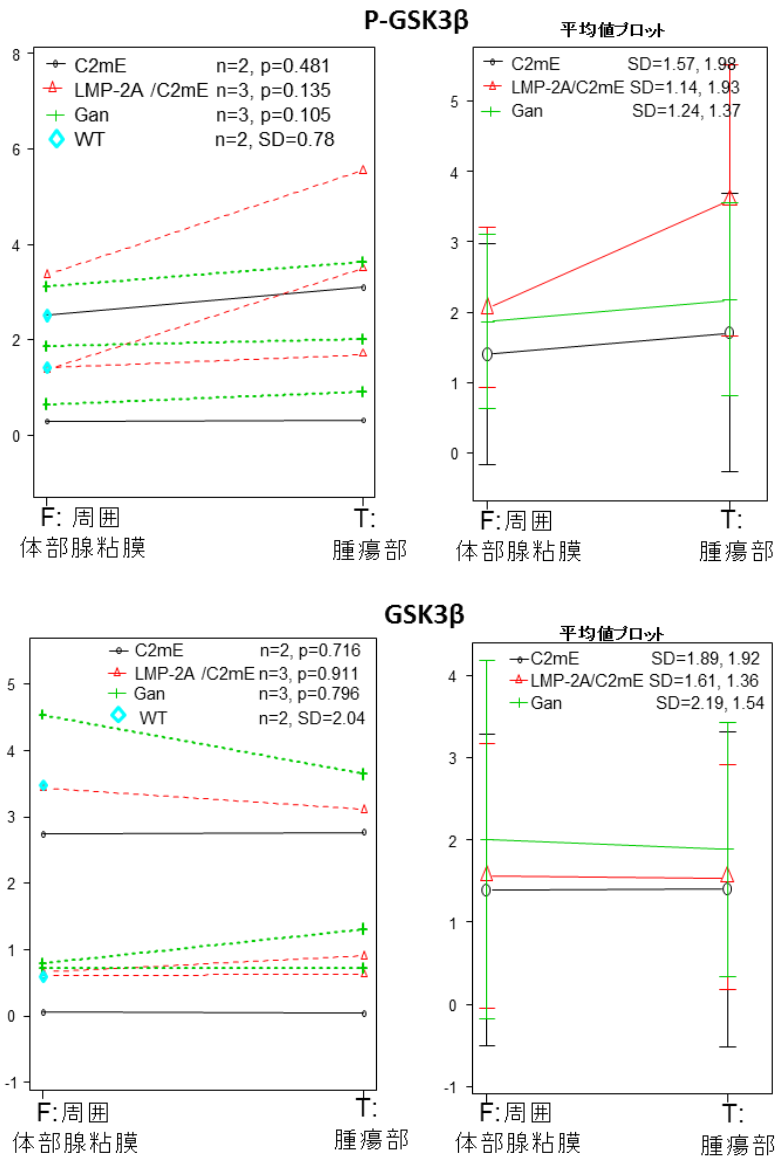
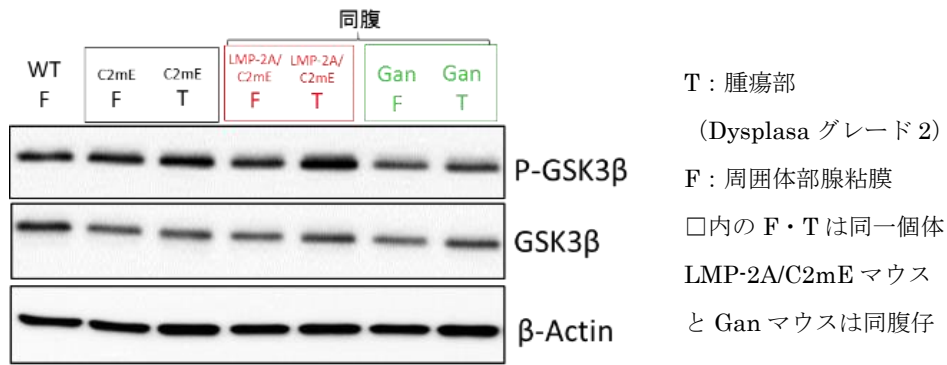


図 39 P-GSK3β, GSK3β の Western blotting 結果

縦軸は各シグナル値を β -Actin の値で割った数値。リン酸化 GSK3 β (P-GSK3 β), GSK3 β ともにいずれの Genotype でも周囲体部腺粘膜と隆起病変部に有意な差は見られなかった。(SD は周囲体部腺粘膜、隆起病変部での値を順に記載。)

3) GSK3 β

非活性型であるリン酸化 GSK3 β (P-GSK3 β) ではいずれの Genotype においても周囲体部腺粘膜と腫瘍部のシグナルの強さに統計学的に有意な差が得られなかった (図 39) (C2mE マウス: p=0.481、LMP-2A/C2mE マウス: p=0.135、Gan マウス: p=0.105)。GSK3 β については、いずれの Genotype においても周囲体部腺粘膜と腫瘍部における差は見られなかった (図 39) (C2mE マウス: p=0.716、LMP-2A/C2mE マウス: p=0.911、Gan マウス: p=0.796)。

2-3. LMP2A/C2mE マウスにおける EGFR 発現と関連シグナルの検討

1) リン酸化受容体型チロシンキナーゼの抗体アレイ

さらに LMP2A/C2mE マウスで亢進しているシグナルを探るため、図 36～図 39 の写真に用いた WT マウス体部腺粘膜、および C2mE マウス、LMP2A/C2mE マウス、Gan マウスの個体群における腫瘍部 (いずれも Dysplasia グレード 2) 粘膜のタンパク溶液 (各 1 例ずつ) を用いて、リン酸化受容体型チロシンキナーゼの抗体アレイを施行し、Genotype 間の比較をした。各個体の発光結果および各抗体における Pixel Density の相対値 (WT を 1 とする) を図 40 に示す。

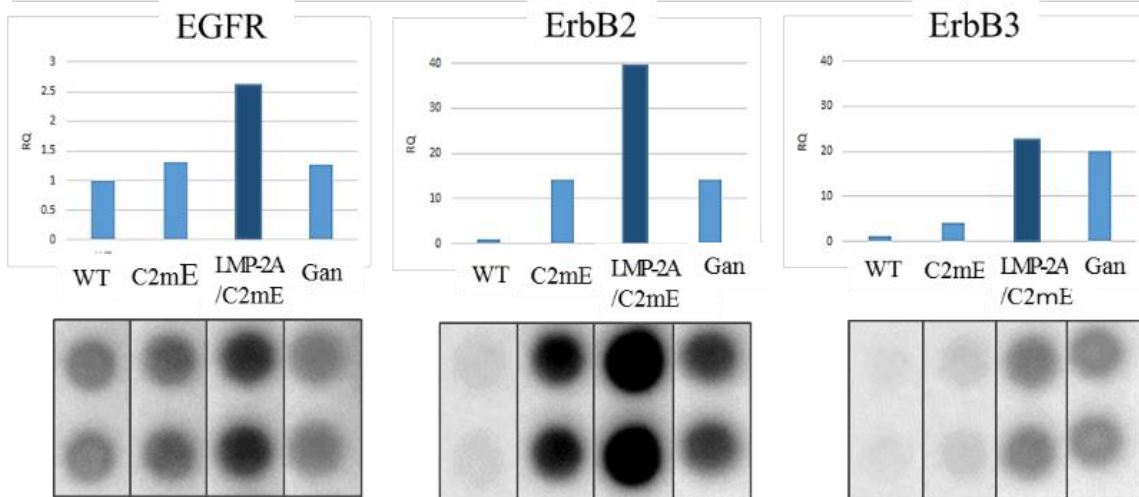
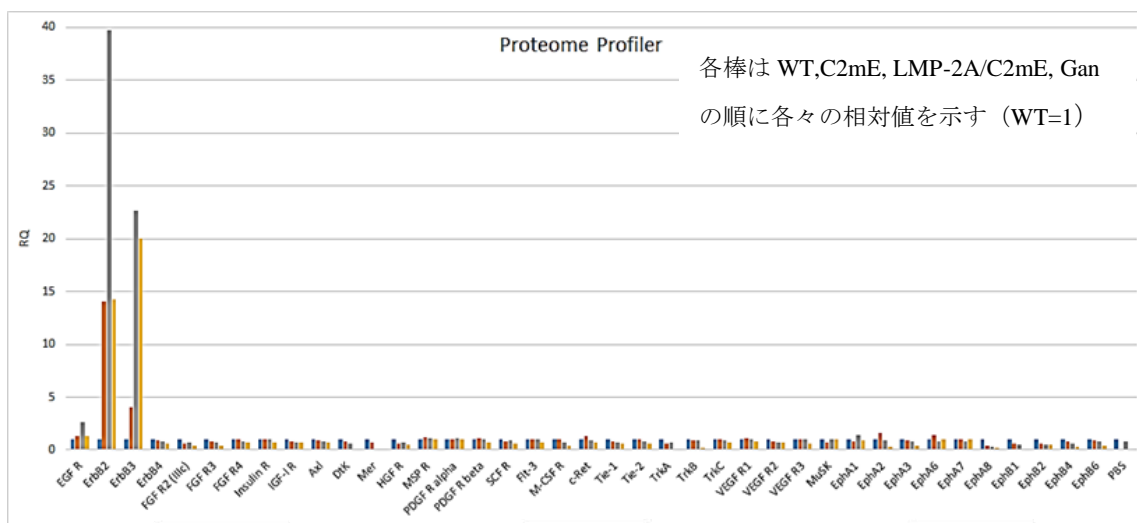
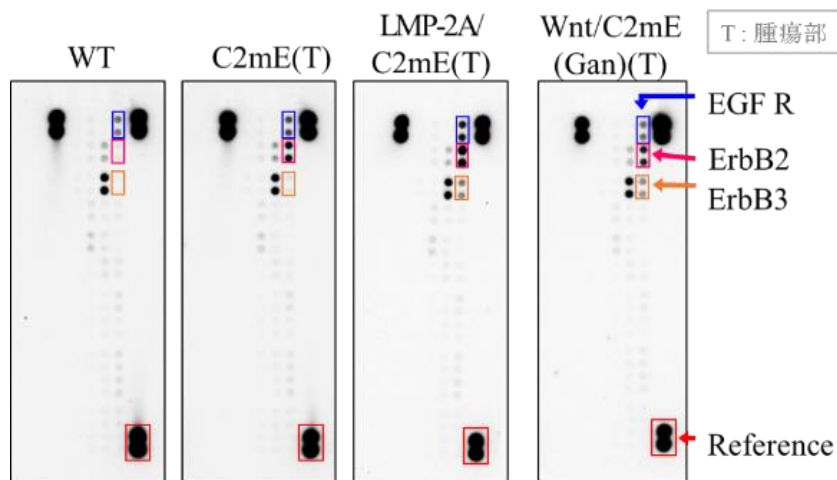


図 40 リン酸化受容体型チロシンキナーゼ抗体アレイ結果

LMP-2A/C2mE マウスでEGFRとErbB2のリン酸化の亢進が顕著であった。またLMP-2A/C2mE マウスと Gan マウスで共通して ErbB3 の活性化が見られた。C2mE マウスでは ErbB2 で Gan マウスと同等の活性化が見られた。T: 隆起病変部 (Dysplasia グレード 2)、F: 周囲体部腺粘膜

LMP-2A/C2mE マウスでは、EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) と ErbB2 (Her2) のリン酸化亢進が他の Genotype よりも著明であった。また、LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウスで ErbB3 (Her3) の活性化が見られた。C2mE マウスでは、ErbB2 で Gan マウスと同等 (WT の約 14 倍) の活性化が認められた。

2) LMP-2A/C2mE マウスにおける EGFR の発現・リン酸化亢進検討

抗体アレイの結果の再現性の検討と、EGFR の過剰発現か個々の受容体のリン酸化亢進かの検討を行うため、WT マウス体部腺粘膜(n=2)、および C2mE マウス (n=2)、LMP-2A/C2mE マウス(n=3)、Gan マウス(n=3)の腫瘍部 (Gan マウス 1 例が Dysplasia グレード 3、その他はグレード 2) と周囲体部腺粘膜の蛋白溶液を用い、EGFR とリン酸化 EGFR (p-EGFR) について Western blotting を行った (図 41)。写真は抗体アレイ (図 40) と同一の個体群で、EGFR と P-EGFR を同時に別のメンブレンで泳動・転写したものである。

その結果、p-EGFR (C2mE マウス: $p=0.363$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.0773$ 、Gan マウス: $p=0.281$) と EGFR (C2mE マウス: $p=0.430$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.0559$ 、Gan マウス: $p=0.334$) の両方で、LMP-2A/C2mE マウスの腫瘍部で周囲体部腺粘膜よりシグナルが高い傾向が見られたが、いずれも統計学的には有意な差は認められなかった。

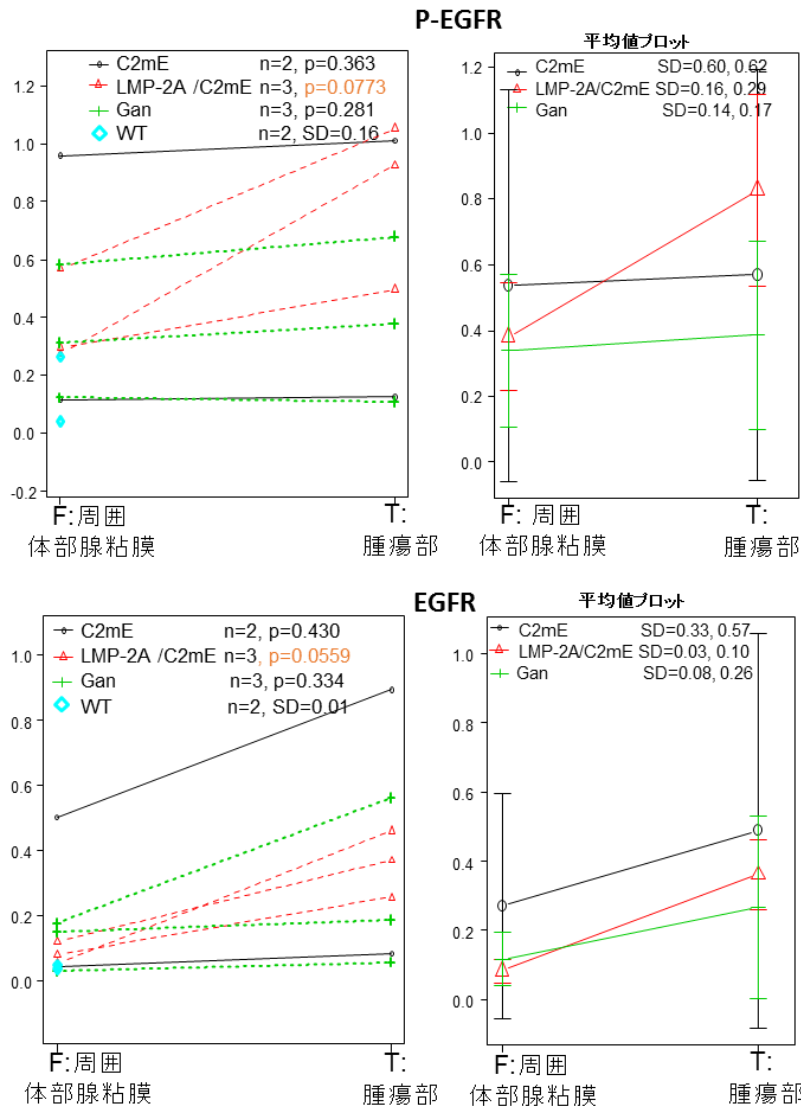
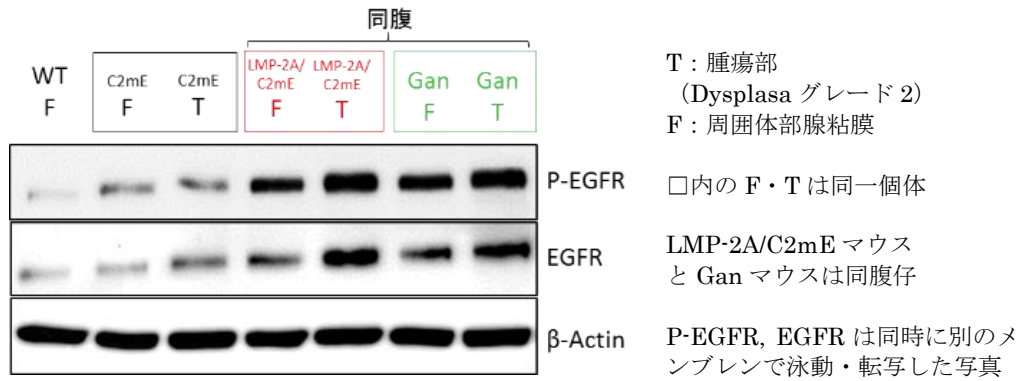


図 41 P-EGFR, EGFR の Western blotting 結果

縦軸は各シグナル値を β -Actin の値で割った数値。リン酸化 EGFR (P-EGFR)、EGFR とともに LMP-2A/C2mE マウスの隆起病変部で周囲体部腺粘膜よりもシグナル上昇の傾向がうかがわれたが (P-EGFR: $P=0.0773$, EGFR: $p=0.0559$)、統計学的に有意な差は認められなかった (SD は周囲体部腺粘膜、隆起病変部での値を順に記載。)

3) LMP-2A/C2mE マウスにおける EGFR 関連シグナル(Stat3, p70S6K, ERK,) の検討

さらに EGFR に関連するシグナルである Stat3、Erk(p44/42MAPK)、p70S6K について、WT マウス 体部腺粘膜(n=2)、C2mE マウス (n=2)、LMP-2A/C2mE マウス(n=3)、Gan マウス(n=3)の腫瘍部と周囲体部腺粘膜の蛋白溶液を用いて、Western blotting によりその活性化の検討を行った。写真は抗体アレイ (図 40) と同一の個体群である。

(1) Stat3

リン酸化 Stat3 (P-Stat3) では、LMP-2A/C2mE マウスにおいて、腫瘍部で周囲体部腺粘膜より有意に高いシグナルが認められた (図 42) (C2mE マウス: p=0.247、LMP-2A/C2mE マウス: p=0.0105、Gan マウス: p=0.117)。Stat3 に関してはいずれの Genotype においても周囲体部腺粘膜と腫瘍部における有意な差は見られなかった (C2mE マウス: p=0.551、LMP-2A/C2mE マウス: p=0.299、Gan マウス: p=0.134)。

P-Stat3 について免疫染色を施行したところ、LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウスでは隆起病変部において明瞭な核への陽性像が認められた。一方、周囲体部腺粘膜では LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウス、ともにほとんど陽性像が認められなかった。

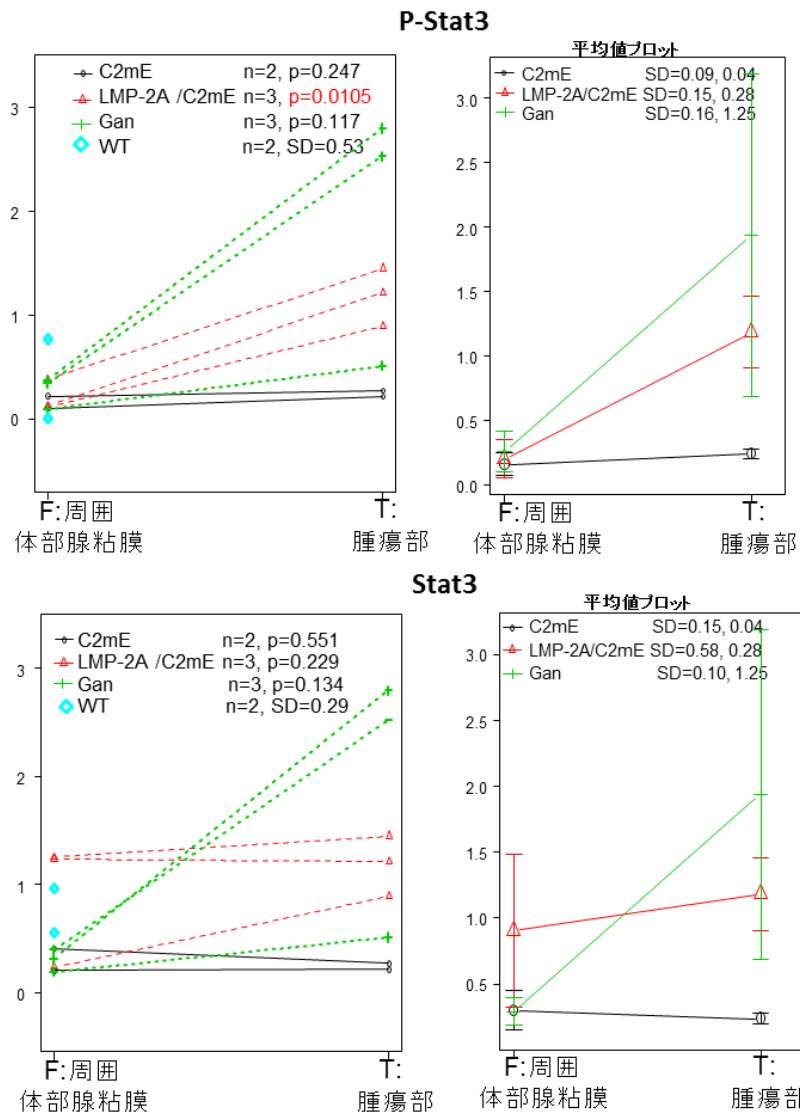
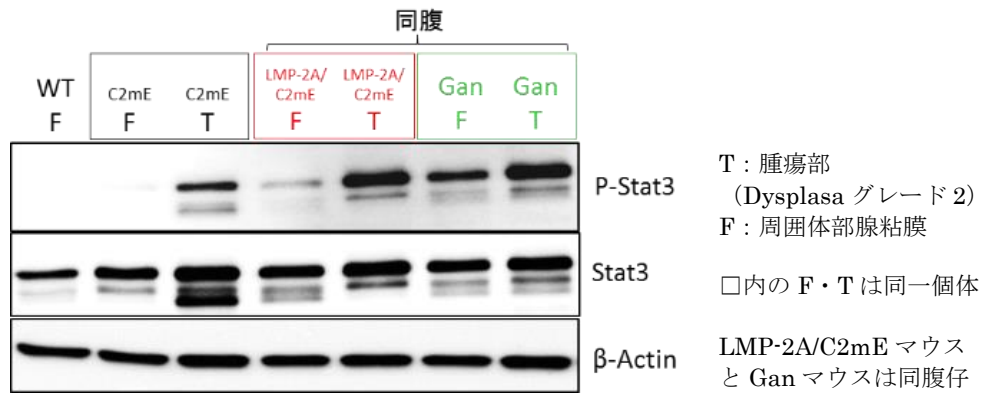


図 42 P-Stat3, Stat3 の Western blotting 結果

縦軸は各シグナル値を β -Actin の値で割った数値。リン酸化 Stat3(P-Stat3)では LMP-2A/C2mE マウスの隆起病変部で周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル上昇が見られた($p=0.0105$)。Stat3 はいずれの Genotype でも周囲体部腺粘膜と隆起病変部に有意な差は見られなかった。(SD は周囲体部腺粘膜、隆起病変部での値を順に記載。)

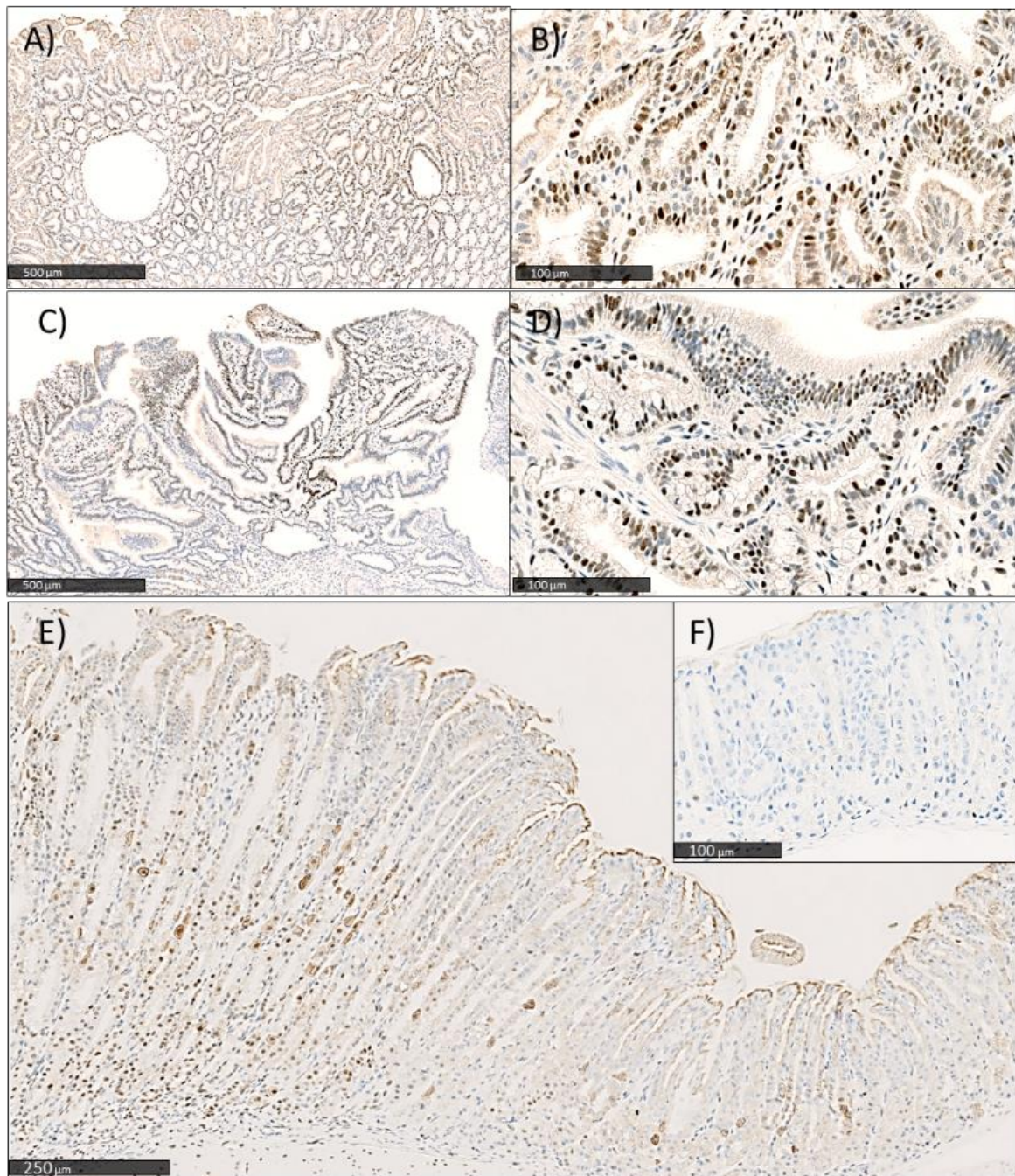


図 43 P-Stat3 の免疫染色

A)B) LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部：腫瘍部の核に陽性像が見られる。 C) D) Gan マウス腫瘍部：腫瘍部の核に陽性像が見られる。 E) LMP-2A/C2mE マウス隆起病変部と周囲体部腺粘膜境界部：隆起病変部では核の陽性像が見られるが、隣接する体部腺粘膜では核への陽性像は見られない。 F) Gan マウス周囲体部腺粘膜：核への陽性像は見られない。

(2) P70S6K

リン酸化 P70S6K (P-P70S6K) は、いずれの Genotype でも腫瘍部、周囲体部腺粘膜の間に統計学的に有意な差は認められず (C2mE マウス: $p=0.513$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.220$ 、Gan マウス: $p=0.189$)、また、C2mE マウスでは腫瘍部、周囲体部腺粘膜ともにほとんどシグナルが検出されなかった (図 44)。P70S6K では Gan マウスにおいて腫瘍部で周囲体部腺粘膜より高いシグナルが認められた (C2mE マウス: $p=0.624$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.0481$ 、Gan マウス: $p=0.0441$)。

(3) Erk (p44/42MAPK)

Erk については、LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウスで、腫瘍部のほうが周囲体部腺粘膜よりも高信号を示したが (図 45) (C2mE マウス: $p=0.549$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.0467$ 、Gan マウス: $p=0.0147$)、リン酸化 Erk (P-Erk) のシグナルは腫瘍部において一定の傾向を示さなかった (C2mE マウス: $p=0.782$ 、LMP-2A/C2mE マウス: $p=0.202$ 、Gan マウス: $p=0.109$)。

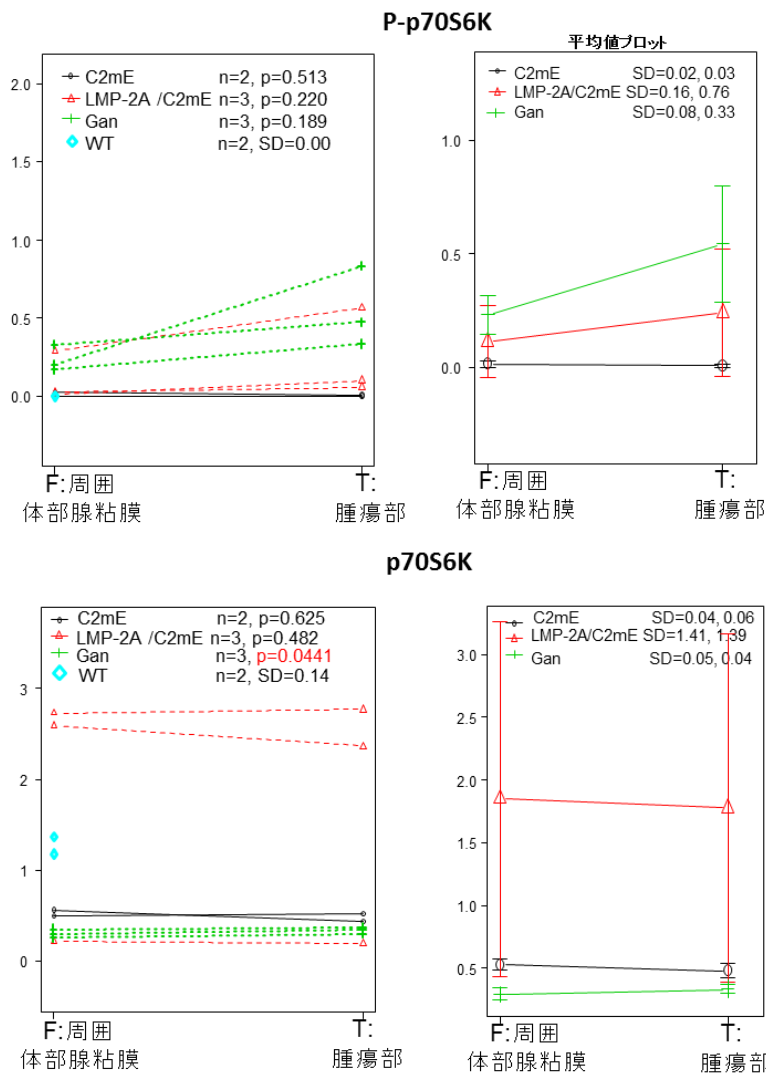
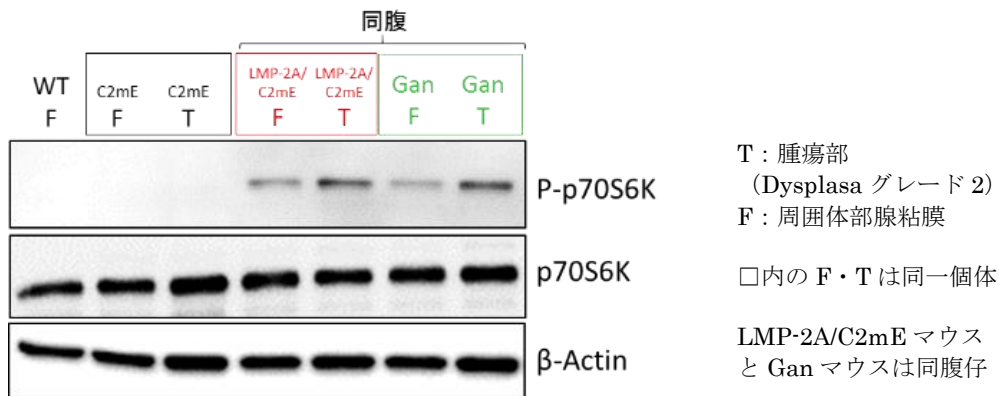


図 44 P-p70S6K, p70S6K の Western blotting 結果

縦軸は各シグナル値を β -Actin の値で割った数値。リン酸化 p70S6K(P-p70S6K)ではいずれの Genotype でも周囲体部腺粘膜と隆起病変部に有意な差は見られなかった。p70S6K は Gan マウスの隆起病変部で周囲体部腺粘膜との間に有意差を認めた ($p=0.0441$)。(SD は周囲体部腺粘膜、隆起病変部での値を順に記載。)

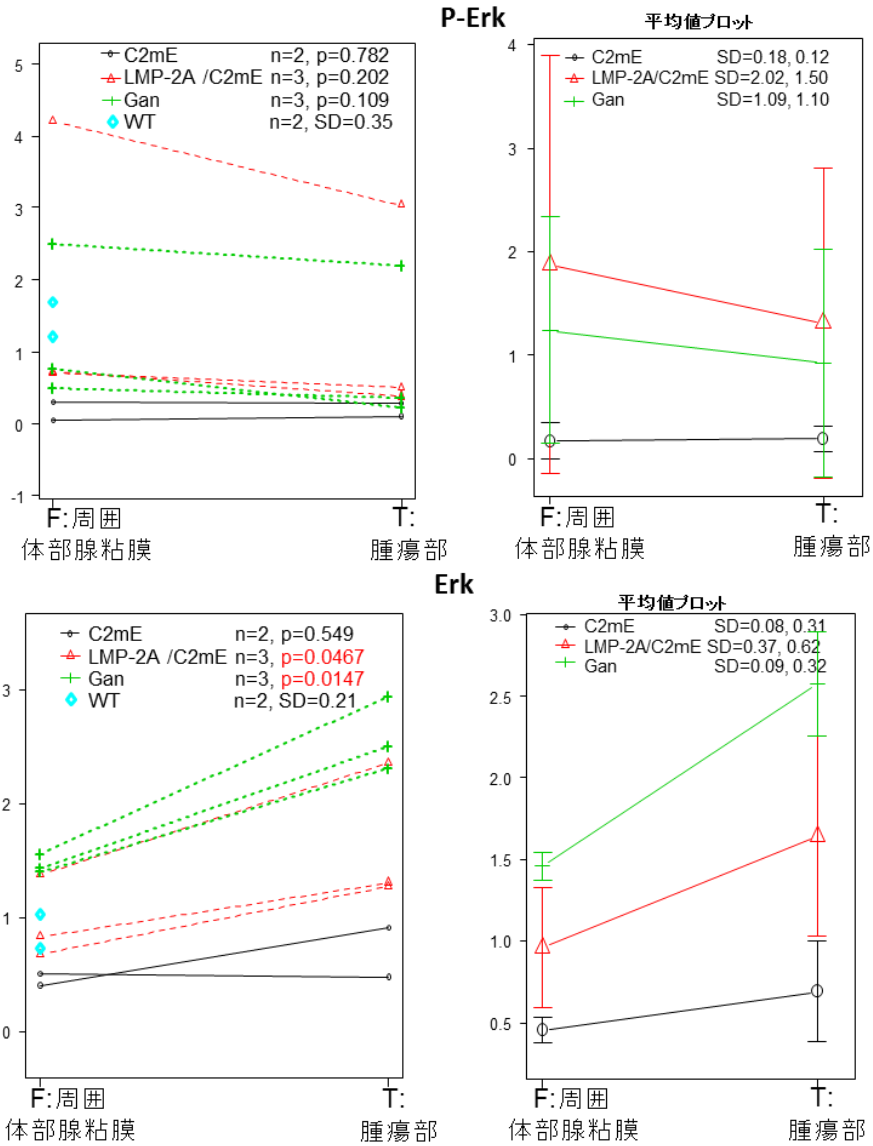
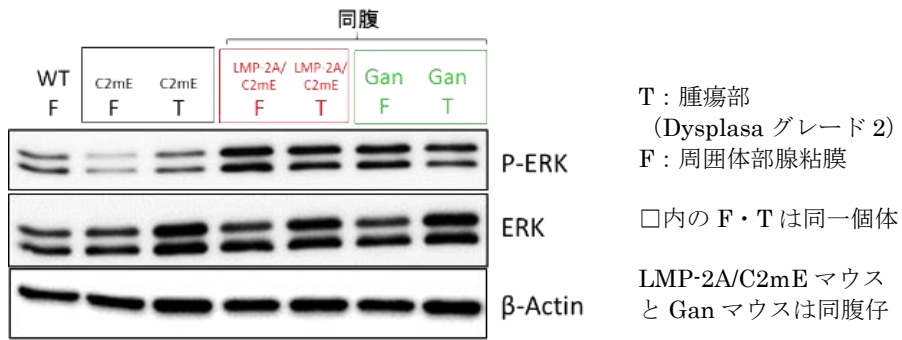


図 45 P-Erk, Erk の Western blotting 結果

縦軸は各シグナル値を β -Actin の値で割った数値。リン酸化 Erk(P-Erk)ではいずれの Genotype でも周囲体部腺粘膜と隆起病変部に有意な差は見られなかった。Erk は LMP-2A/C2mE マウス、Gan マウスの隆起病変部で周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル上昇が見られた(LMP-2A/C2mE: p=0.0467, Gan: p=0.0147)。(SD は周囲体部腺粘膜、隆起病変部での値を順に記載。)

2-4. Western blotting 結果まとめ

以上の Western blotting の結果を図 46 および表 4 にまとめる。

LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部では非リン酸化型 β -catenin, P-Akt, MTA1, P-Stat3 で周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル上昇を認めた。また、統計学的には有意な差を認められなかったが、EGFR の発現とリン酸化が亢進する傾向がうかがわれた。Gan マウス腫瘍部では P-Akt で周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル上昇を認め、統計学的には有意な結果が認められなかったが、非リン酸化型 β -catenin もシグナル上昇の傾向が見られた。

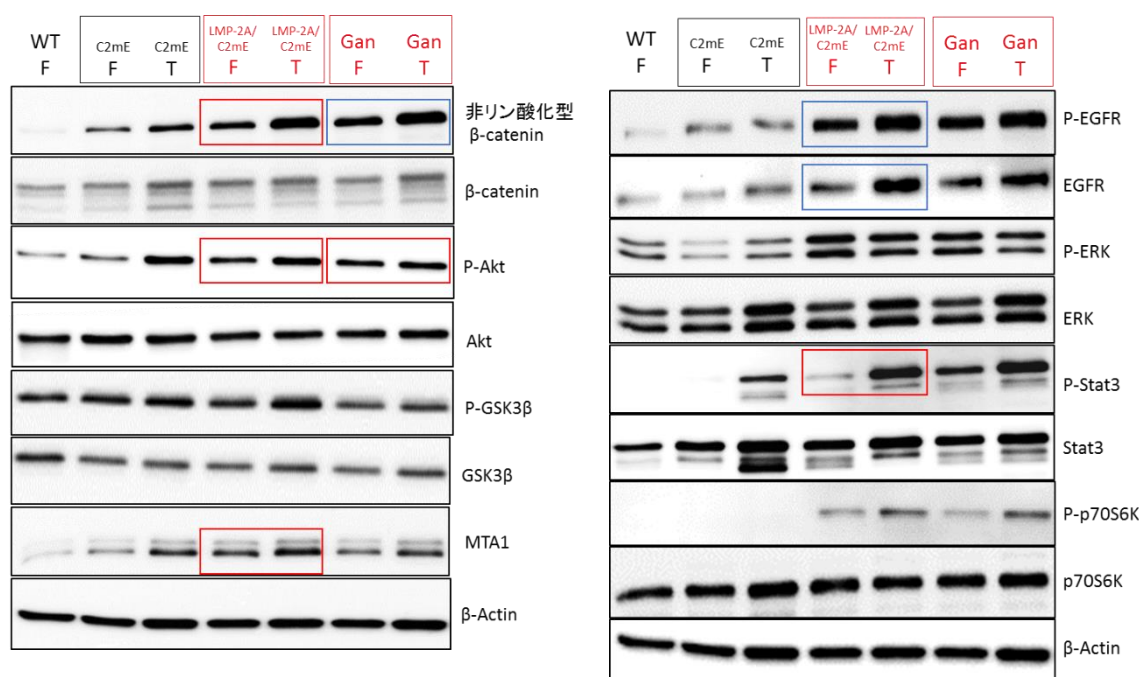


図 46 Western blotting 結果まとめ

いずれも同一の個体群による代表写真。□内の F・T は同一個体で、LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウス (赤字) は同腹仔ペアである。

腫瘍部と周囲体部腺粘膜の間のシグナル値に有意差 ($p < 0.05$) が出た箇所を赤枠で、有意差は認められなかったが $p < 0.1$ であった箇所を青枠で囲んでいる。

T: 腫瘍部 (いずれも Dysplasia グレード 2) F: 周囲体部腺粘膜

表 4 Western blotting による LMP-2A/C2mE マウスと Gan マウスのシグナル亢進結果比較

腫瘍部において周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル亢進が認められたもの(P<0.05)を↑↑(黒)、有意差は認められなかったがシグナル亢進の傾向が示唆されるもの(p<0.1)を↑(灰色)で示した。LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部では非リン酸化型 β-catenin, P-Stat3, P-Akt, MTA1 で周囲体部腺粘膜よりも有意なシグナル上昇を認めた。

	LMP-2A/C2mE		Gan(Wnt/C2mE)	
非リン酸化型 β-catenin	↑↑	↑↑		↑
P-Akt	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
MTA1	↑↑	↑↑		
P-GSK3β				
EGFR				↑
P-EGFR				↑
P-Stat3	↑↑	↑↑		
P-p70S6K				
P-Erk				

第4章 考察

1. LMP-2A の造腫瘍能 (tumorigenicity) ・腫瘍増殖促進能に関する考察

25 週で解剖したマウスのうち、LMP-2A 単独発現のマウスでは、9 匹中 1 匹 (11.1%) に Dysplasia グレード 2 以上に相当する微小腫瘍性病変が見いだされた。100 週の LMP-2A マウスで 8% (2/25) に胃癌が発生した日比谷[57]の結果と併せ、LMP-2A の造腫瘍能を示唆する結果といえる。

また、PGE2 が発現する C2mE (炎症) マウスと、それに LMP-2A 発現が加わった LMP-2A/C2mE マウスについて検討すると、両者ともに Wnt1 発現が組み込まれていないにも関わらず、Dysplasia グレード 2 以上に相当する腫瘍性病変が発生した。腫瘍発生率は C2mE マウスで 27.8%に対し、LMP-2A/C2mE マウスでは 66.6%と有意に高かった。LMP-2A の機能についてさらに検討をするため、C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔を抽出して比較したところ、Dysplasia グレード 2 以上を示す腫瘍性病変は、C2mE マウスでは 10 匹中全く認められなかったのに対し、LMP-2A/C2mE マウスでは 10 匹中 7 匹の個体に生じた。以上より、LMP-2A は炎症を背景として、腫瘍発生を促進させる働きがあると考えられた。

さらに、胃癌モデルマウスである Wnt/C2mE (Gan) マウスと、それに LMP-2A 発現が加わった LMP-2A/Gan マウスに形成された Dysplasia グレード 2

以上の腫瘍部の大きさを比較したところ（本研究ではそれぞれ 95.2%、100% の腫瘍発生率）、LMP-2A/Gan マウスにおける腫瘍部は Gan マウスの腫瘍部よりも有意に大きいという結果が得られ、LMP-2A には Gan マウスの腫瘍増殖を促進する機能があると考えられた。

2. LMP-2A と背景の隆起性病変との関連についての考察

次に、Dysplasia だけでなく過形成（Hyperplasia）、粘液化生（Mucinous metaplasia）が含まれる隆起性病変部全体について検討した。

C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔同士で、隆起性病変部の大きさを比較すると、LMP-2A/C2mE マウスのほうが C2mE マウスより大きかった。また、Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの同腹仔同士で比較すると LMP-2A/Gan マウスのほうが Gan マウスよりも有意に大きかった。以上より、LMP-2A には腫瘍発生の素地となる背景粘膜の変化を促進する働きがあると考えられる。

隆起性病変部における炎症細胞浸潤についての検討では、C2mE マウスと LMP-2A/C2mE マウスの同腹仔を比較すると、LMP-2A/C2mE マウスのほうが C2mE マウスより炎症細胞浸潤が多かった。一方、Gan マウスと LMP-2A/Gan マウスの同腹仔比較では、炎症細胞浸潤に差がなかった。日比谷に

よる先行研究[57]、本研究ともに、LMP-2A 単独発現のトランスジェニックマウスでは炎症細胞浸潤が目立たなかったことも併せて考えると、LMP-2A 自体が炎症細胞浸潤を促すというよりは、腫瘍発生に伴って腫瘍細胞自身が産生するサイトカインやケモカインなどの誘導により炎症細胞浸潤が促進され、さらに腫瘍増大が促されるのではないかと推測される。

大島らは、SPEM と呼ばれる病変と類似した TFF2 陽性の粘液化生性過形成が、炎症反応を伴って C2mE マウスにみられると報告している。また、C2mE マウスを TNF- α ノックダウンマウスと交配すると、炎症も過形成病変も消失することから、腫瘍に浸潤するマクロファージが産生する TNF- α がその原因である可能性を指摘している[71, 72]。本研究の結果では、TFF2 陽性細胞の面積は C2mE マウスよりも LMP-2A/C2mE マウスの方で広く、LMP-2A による腫瘍発生促進の素地を形成していると考えられる。また、TFF2 陽性面積と Dysplasia グレード2以上の腫瘍部面積には強い正の相関が見られ、SPEM と腫瘍の発生に関連があることが示唆された。

3. LMP-2A の発癌・腫瘍増殖促進のメカニズムに関する考察

次に、LMP-2A がどのようなメカニズムで造腫瘍性・増殖に関与するのか、分子生物学的な手法を用いて検討を加えた。

LMP-2A/C2mE マウスと Wnt/C2mE (Gan) マウスでは、腫瘍発生率や腫瘍の大きさ、隆起病変部の大きさに有意な差は見られず、腫瘍の組織像も質的に異なるものではなかった。このことから、LMP-2A が発現することにより、Wnt1 が発現するのと同様のシグナル伝達、すなわち Wnt/ β catenin 経路の亢進が起きている可能性をまず考えた。

Western blotting にて、GSK3 β によるリン酸化サイト (Ser37/Thr41) の非リン酸化型、すなわち安定化型 β -catenin の発現を調べた結果、Wnt1 発現が組み込まれていない LMP-2A/C2mE マウスの隆起病変部でも、Gan マウスと同様に非リン酸化型 β -catenin の高発現が見られ、Wnt/ β -catenin 経路の亢進により安定化型 β -catenin の細胞内蓄積が起きていると考えられた。

次に、LMP-2A と Wnt/ β -catenin 経路の関連について調べた。Morrison らは、上皮細胞において LMP-2A が PI3K/Akt 経路を活性化し、GSK3 β を不活性化することにより β -catenin の安定化と核内移行をもたらし、核内での転写活性を促進し、発癌あるいは細胞増殖に寄与すると報告している[50]。また、Lin らはそれに加えて PI3K/Akt 経路下流の mTOR (mammalian target of rapamycin) がリン酸化され、翻訳抑制因子である 4 EBP1 (4Ebinding protein) がリン酸化により解除されて、翻訳開始因子である eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) が遊離し、MTA1 の発現が

増大、それにより Wnt1 産生につながり Wnt/ β -catenin 経路が亢進する、というモデルを提唱している[48]。

これらの先行研究で関与が提唱されている Akt、GSK3 β や MTA1 の発現を Western blotting にて検討した結果、LMP-2A/C2mE マウスでは、腫瘍部において周囲体部腺粘膜よりも p-Akt、MTA1 が有意なシグナル亢進を示し、Akt の活性化と MTA1 の産生亢進が起きていると考えられた。MTA1 は胃癌を含む種々の癌で発現がみられ[14, 78-81]、EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) に関与すると考えられている他、Wnt1 の産生を亢進させるとされている[82, 83]。本研究の結果からは、LMP-2A の発現により Akt が活性化し、それに引き続く MTA1 産生亢進が Wnt/ β -catenin 経路を活性化させている可能性が考えられた。

さらに、リン酸化チロシン受容体の抗体アレイの結果、LMP-2A/C2mE マウスにおける EGFR のリン酸化亢進が見られ、それに引き続いて行った Western blotting の結果にて LMP-2A/C2mE マウス腫瘍部では周囲体部腺粘膜に比べ EGFR 自体が亢進する傾向がうかがわれ、EGFR の過剰発現が起きている可能性が示唆された。上咽頭癌において LMP-1 が EGFR の発現とリン酸化亢進をもたらす[84]という報告や、乳癌において、BARF0 が Her2/Her3 シグナル伝達カスケードを介して EB ウイルス感染乳癌細胞の発癌活性をも

たらずという報告[85]があるが、今回の結果からは LMP-2A が EGFR の発現とリン酸化亢進に関与し、その下流にある経路を活性化させているという可能性も考えられる。また、大島らは C2mE マウスにおける *Eebb2*, *Eebb3* の遺伝子発現亢進、リン酸化 EGFR の発現亢進や EGFR リガンドの発現亢進、ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases: EGFR リガンドの細胞外ドメイン切断により EGFR シグナルを) の亢進、およびこれらが PGE2 の働きによるものであると報告している[86, 87]。本研究では Gan マウス腫瘍部における EGFR や P-EGFR シグナルに周囲体部腺粘膜との間で有意差は見られなかったが、代表写真に示したように、EGFR や P-EGFR シグナルが腫瘍部で増加する個体も見られた。Gan マウスにおいても EGFR シグナル活性化が腫瘍化に関与している可能性は否定できない。

EGFR 関連シグナルについての Western blotting による検討では、LMP-2A/C2mE マウスの腫瘍部において周囲体部腺粘膜よりも P-Stat3 が亢進していることが示され、造腫瘍性に関与していると考えられた。当研究室の日野らにより、LMP-2A が IL6 非依存性に Stat3 を活性化する[46]ことが示されており、LMP-2A が EGFR を介して、あるいはその他の経路により Stat3 を活性化させていると考えられる。Stat3 はシグナル伝達性転写因子の一つで、種々の腫瘍に発現が見られ、抗アポトーシス作用や DNA methyltransferase1

(DNMT1) 発現を亢進させる働きがあるとされる[46]。さらに、大腸癌[88]や乳癌[89]では、Stat3 の活性化により β -catenin が亢進するという報告や、本研究で使用したのと同じ Gan マウスを用いた胃癌研究で、クルクミンアナログにより Stat3 と β -catenin が同時に抑制され両者の関連が示唆されるという報告[90]などもあり、Stat3 の活性化が Wnt/ β -catenin 経路亢進に関与している可能性も推測される。一方、Western blotting で統計学的には有意差が得られなかったが、免疫染色の結果からは Gan マウスの腫瘍部でも Stat3 の活性化が起きていると考えられた。上記報告とは逆に、 β -catenin が Stat3 を亢進させるという報告もあり[91-93]、両者の関係にはクロストークがあることも推察される。

本研究の結果では、P-p70S6K は、腫瘍部において有意なシグナル活性化が見られず、また、P-ERK には周囲胃粘膜と隆起性病変部の間に一定の傾向が見られなかったことから、いずれも今回の腫瘍の発生・増殖には関与が薄いと考えられた。

以上の結果より考察した、腫瘍発生・腫瘍増殖に対する LMP2A の関与のメカニズムのモデル図（仮説）を示す（図 47）。LMP-2A は直接、あるいは EGFR を介して PI3K/Akt 経路や Stat3 を活性化させる。Akt の下流での MTA1 の亢進とそれによる Wnt1 シグナルの亢進が起き、Wnt/ β catenin 経路の亢進

が起きる。また、リン酸化により活性化し二量体となって核内に移行した Stat3 は c-myc や cyclinD1 など標的遺伝子の転写促進や DNMT1 発現などに関与するが、同時に β -catenin 経路亢進にも働いている可能性がある[90]。

また、今回 C2mE マウスにおいて一部腫瘍性病変が発生したことについては、Western blotting の結果、周囲体部腺粘膜との間に有意差は見られなかったものの、非リン酸化型 β -catenin やリン酸化 Akt、MTA1、リン酸化 Stat3 などのシグナルが腫瘍部で亢進している傾向が見られたことから、PGE2 の発現を介した Akt 経路や Stat3 の活性化が腫瘍発生に働いたのではないかと考える。また、今回は深く追及できなかったが、抗体アレイの結果からは C2mE

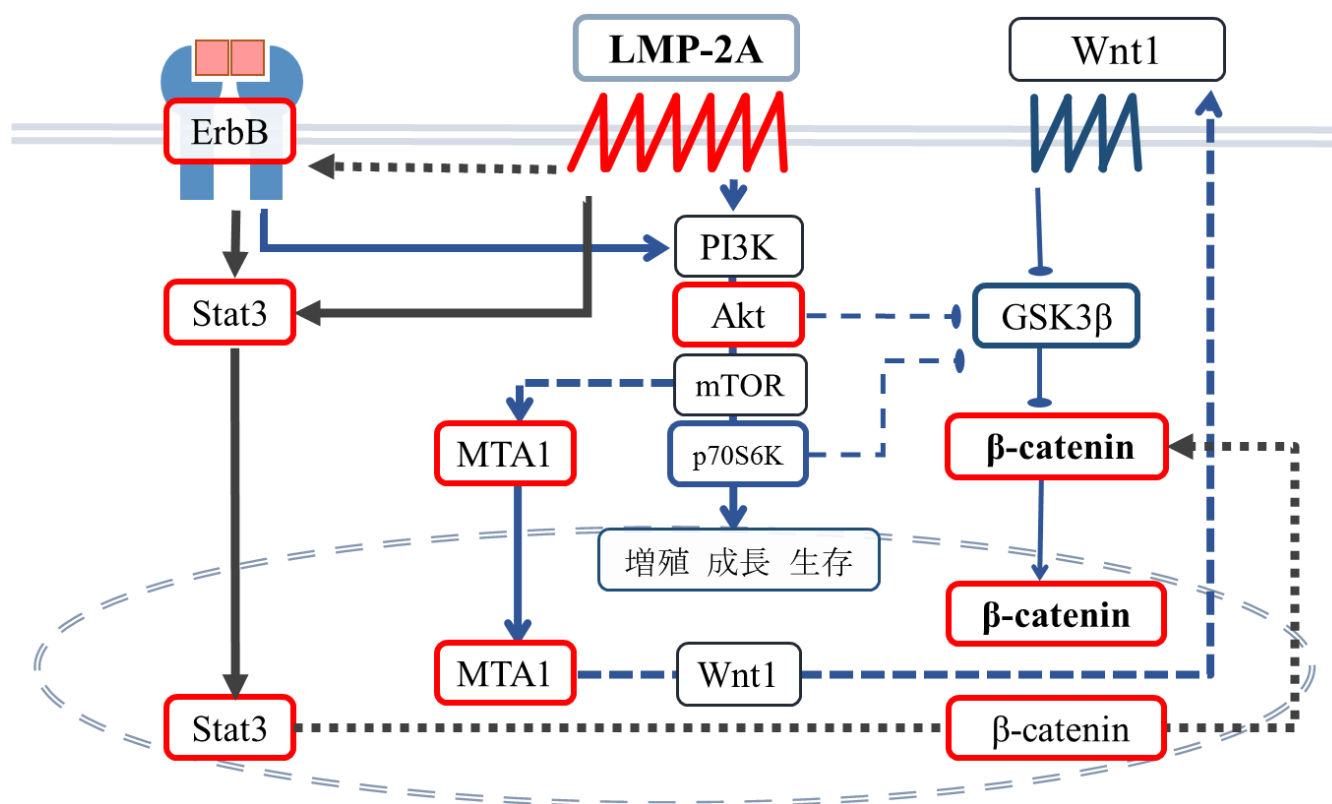


図 47 LMP-2A の腫瘍発生・腫瘍増殖への関与メカニズム (仮説)

マウスでも ErbB2 のリン酸化亢進が見られた。また、大島らは C2mE マウスにおいて、Gan マウスと同様に *Eebb2* の遺伝子発現亢進、リン酸化 EGFR の発現亢進や EGFR リガンド発現亢進、ADAMs の亢進を報告しており [86, 87]、C2mE マウスにおいても EGFR シグナルの活性化を通じて Akt や Stat3 活性化がもたらされている可能性がある。

4. 本研究の意義と今後の課題

本研究では、背景に炎症、すなわち PGE2 の発現がある場合において、LMP-2A により腫瘍の発生あるいは増大が促進されるということを実際に生体の胃において示すことができた。

そのメカニズムとして PI3K/Akt 経路活性化や MTA1 の発現亢進、Stat3 の活性化亢進などに伴う Wnt/ β catenin 経路の亢進が関与している可能性を示し、さらに EGFR などのリン酸化受容体型チロシンキナーゼの発現亢進が関与している可能性も示唆された。

今回 LMP-2A の発現により腫瘍が発生する背景として炎症の存在が重要であることが判明したが、炎症があるとなぜ LMP-2A の造腫瘍能が発揮されるのかについては追及することができなかった。今後炎症細胞や腫瘍自体から産生されるサイトカインとの関連など、分子生物学的な視点を取り入れて検討していく必要がある。

本研究は Gan マウスを用いて LMP-2A の機能について検討した。このマウスに発生する腫瘍は、50 週時点で平滑筋層への浸潤が見られる悪性腫瘍であることが確認されており、Gan マウスは胃癌モデルマウスとして確立された系統である[69, 94]。ただ、扁平上皮胃と円柱上皮胃の境界部というマウスの胃特有の領域に発生することや、組織像として核の異型が弱く、ヒトでいえば腺腫から上皮内癌相当であることなど、ヒトの胃腺癌に相当する病変とするのが妥当かについては議論が残る。本研究で検討したのは 25 週解剖時点での胃粘膜であり、浸潤癌の発生は見るができなかったため、今後、時間経過を追って腫瘍の発生や進展を観察する必要がある。また、本研究では腫瘍の評価において、Dysplasia グレードを定義し、それに従って分析をしたが、これは Gan マウスを用いた研究においては初めての試みであり、Gan マウスにおいてグレード 1 からグレード 2、グレード 3 と非可逆的に進展するのかどうかについては確認ができていないわけではなく、やはり今後縦断的な検討が必要と考えられる。

また、今後はヒト EB ウイルス関連胃癌の細胞や組織を用いて、LMP-2A の発現と、本研究で検討した β catenin、Akt や Stat3、MTA1、EGFR などの発現の関連を調べ、EB ウイルス関連胃癌における LMP-2A の機能について検討していく必要がある。

第5章 結論

本研究では、EB ウイルス潜伏感染遺伝子産物である LMP-2A が EB ウイルス関連胃癌の発生と進展にどのように関わっているのかを、Wnt1 と PGE2 が発現する炎症性胃癌モデルマウス (Gan マウス) と LMP-2A トランスジェニックマウスの交配から得られたマウスを用いて検討した。

その結果、LMP-2A/C2mE マウスでは C2mE マウス (PGE2 を発現する炎症マウス) と比較して腫瘍発生率が上昇し、また LMP-2A/Gan マウスでは Gan マウスに比較して腫瘍の大きさも増大したため、LMP-2A には造腫瘍能および Gan マウスの腫瘍増殖を促進する機能があることが示された。腫瘍の背景には、リンパ球・マクロファージなどの炎症細胞浸潤や過形成・粘液細胞化生が、C2mE マウスよりも高度に認められ、こうした炎症細胞浸潤や粘膜の変化が腫瘍発生に関与していることが示唆された。

これらのマウス胃粘膜を用いた Western blotting から、LMP-2A/C2mE マウスの隆起病変部粘膜では、Wnt/C2mE マウスと同様に非リン酸化型 β catenin が増加しており、さらに Akt、Stat3 の活性化亢進や MTA1 の発現亢進が見られた。また、抗体アレイおよび Western blotting の結果から、LMP-2A/C2mE マウスの腫瘍粘膜において EGFR の発現亢進とそれに伴うリン酸化 EGFR の亢進が起きている可能性が示唆された。

本研究の成果は、LMP-2A が発現する胃粘膜では腫瘍の発生・増殖が促進されること、またその背景として炎症の存在が重要であることを生体内において示した点である。EB ウイルスは LMP-2A による細胞内シグナル分子を活性化することにより発癌に寄与していると考えられているが、本研究の結果からは PI3K/Akt 経路、Wnt/ β catenin 経路の他、MTA1、Stat3、EGFR が腫瘍の発生・増殖に関与する可能性が示された。

本研究は 25 週解剖マウスの胃粘膜と腫瘍に対して検討を行ったが、その肉眼像・組織像にはヒトの胃癌とは異なる点もあり、さらに時間経過を追って腫瘍の進展を観察することや、ヒトの検体を用いた検討が求められる。また、炎症細胞や腫瘍が産生するサイトカインと LMP-2A との相互作用についての検討も必要である。胃粘膜における LMP-2A の機能について更なる知見を積み重ねていくことが、EB ウイルス関連胃癌に対する新たな治療戦略獲得への糸口につながると考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご高配とご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野 深山正久教授に多大なる感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始直接の指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野 国田朱子助教に深く感謝いたします。

本研究に数々の有益なご教示をいただきました、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野 牛久綾特任講師、横浜市立大学附属病院病理診断科・病理部 日比谷孝志助教に厚くお礼申し上げます。

標本作成、実験操作にご協力いただきました、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野 佐久間慶 技術専門職員、竹下貴三子 学術支援職員、山村はるみ 技術補佐員、西本あい子 技術補佐員、荻野瑠美 技術補佐員、入佐智子 技術補佐員に深く感謝いたします。

また、Gan マウスをご提供くださり、実験手技に関しご教示くださった金沢大学がん進展制御研究所 大島正伸教授、大島浩子助教に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Martin, D., and J. S. Gutkind. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 27 Suppl 2:S31-42. 2008.
2. Moore, P. S., and Y. Chang. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* 10:878-889. 2010.
3. Epstein, M. A. A. B., Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet* 7335:702-703. 1964.
4. Imai, S., J. Nishikawa, and K. Takada. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol* 72:4371-4378. 1998.
5. Yoshiyama, H., S. Imai, N. Shimizu, and K. Takada. Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol* 71:5688-5691. 1997.
6. Burke, A. P., T. S. Yen, K. M. Shekitka, and L. H. Sobin. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 3:377-380. 1990.
7. Tokunaga, M., Y. Uemura, T. Tokudome, T. Ishidate, H. Masuda, E. Okazaki, K. Kaneko, S. Naoe, M. Ito, A. Okamura, and et al. Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: a molecular patho-epidemiological study. *Acta Pathol Jpn* 43:574-581. 1993.
8. Fukayama, M., R. Hino, and H. Uozaki. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci* 99:1726-1733. 2008.
9. Camargo, M. C., G. Murphy, C. Koriyama, R. M. Pfeiffer, W. H. Kim, R. Herrera-Goepfert, A. H. Corvalan, E. Carrascal, A. Abdirad, M. Anwar, Z. Hao, J. Kattoor, E. Yoshiwara-Wakabayashi, Y. Eizuru, C. S. Rabkin, and S. Akiba. Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer* 105:38-43. 2011.
10. Fukayama, M., Y. Hayashi, Y. Iwasaki, J. Chong, T. Ooba, T. Takizawa, M. Koike, S. Mizutani, M. Miyaki, and K. Hirai. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest* 71:73-81. 1994.
11. 西園晃. EBV と胃癌. *臨床と微生物* 38:45-50. 2011.
12. Chen, J. N., D. He, F. Tang, and C. K. Shao. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a newly defined entity. *J Clin Gastroenterol* 46:262-271. 2012.

13. Matsunou, H., F. Konishi, H. Hori, T. Ikeda, K. Sasaki, Y. Hirose, and N. Yamamichi. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer* 77:1998-2004. 1996.
14. Tokunaga, M., and C. E. Land. Epstein-Barr virus involvement in gastric cancer: biomarker for lymph node metastasis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:449-450. 1998.
15. van Beek, J., A. zur Hausen, E. Klein Kranenbarg, C. J. van de Velde, J. M. Middeldorp, A. J. van den Brule, C. J. Meijer, and E. Bloemena. EBV-positive gastric adenocarcinomas: a distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement. *J Clin Oncol* 22:664-670. 2004.
16. Lee, J. H., S. H. Kim, S. H. Han, J. S. An, E. S. Lee, and Y. S. Kim. Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 24:354-365. 2009.
17. Yamamoto, N., M. Tokunaga, Y. Uemura, S. Tanaka, H. Shirahama, T. Nakamura, C. E. Land, and E. Sato. Epstein-Barr virus and gastric remnant cancer. *Cancer* 74:805-809. 1994.
18. Kaizaki, Y., S. Sakurai, J. M. Chong, and M. Fukayama. Atrophic gastritis, Epstein-Barr virus infection, and Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2:101-108. 1999.
19. Fukayama, M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int* 60:337-350. 2010.
20. Arikawa, J., M. Tokunaga, E. Satoh, S. Tanaka, and C. E. Land. Morphological characteristics of Epstein-Barr virus-related early gastric carcinoma: a case-control study. *Pathol Int* 47:360-367. 1997.
21. Moritani, S., R. Kushima, H. Sugihara, and T. Hattori. Phenotypic characteristics of Epstein-Barr-virus-associated gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:750-756. 1996.
22. Saiki, Y., H. Ohtani, Y. Naito, M. Miyazawa, and H. Nagura. Immunophenotypic characterization of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: massive infiltration by proliferating CD8+ T-lymphocytes. *Lab Invest* 75:67-76. 1996.
23. Imai, S., S. Koizumi, M. Sugiura, M. Tokunaga, Y. Uemura, N. Yamamoto, S. Tanaka, E. Sato, and T. Osato. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9131-9135. 1994.
24. Nakamura, S., T. Ueki, T. Yao, T. Ueyama, and M. Tsuneyoshi. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. Special reference to its detection by

- the polymerase chain reaction and in situ hybridization in 99 tumors, including a morphologic analysis. *Cancer* 73:2239-2249. 1994.
25. Oda, K., J. Tamaru, T. Takenouchi, A. Mikata, M. Nunomura, N. Saitoh, H. Sarashina, and N. Nakajima. Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Am J Pathol* 143:1063-1071. 1993.
 26. Shibata, D., M. Tokunaga, Y. Uemura, E. Sato, S. Tanaka, and L. M. Weiss. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am J Pathol* 139:469-474. 1991.
 27. Yanai, H., T. Murakami, H. Yoshiyama, H. Takeuchi, J. Nishikawa, H. Nakamura, K. Okita, O. Miura, N. Shimizu, and K. Takada. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis. *J Clin Gastroenterol* 29:39-43. 1999.
 28. Tokunaga, M., C. E. Land, Y. Uemura, T. Tokudome, S. Tanaka, and E. Sato. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 143:1250-1254. 1993.
 29. Uozaki, H., and M. Fukayama. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma--viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. *Int J Clin Exp Pathol* 1:198-216. 2008.
 30. Han, J., J. N. Chen, Z. G. Zhang, H. G. Li, Y. G. Ding, H. Du, and C. K. Shao. Sequence variations of latent membrane protein 2A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas from Guangzhou, southern China. *PLoS One* 7:e34276. 2012.
 31. Luo, B., Y. Wang, X. F. Wang, H. Liang, L. P. Yan, B. H. Huang, and P. Zhao. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 11:629-633. 2005.
 32. Sugiura, M., S. Imai, M. Tokunaga, S. Koizumi, M. Uchizawa, K. Okamoto, and T. Osato. Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. *Br J Cancer* 74:625-631. 1996.
 33. Zhang, Y. W., X. X. Zhao, C. Tan, Z. G. Zhang, Y. Jiang, J. N. Chen, H. B. Wei, L. Xue, H. G. Li, H. Du, and C. K. Shao. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A suppresses the expression of HER2 via a pathway involving TWIST and YB-1 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Oncotarget* 6:207-220. 2015.
 34. zur Hausen, A., A. A. Brink, M. E. Craanen, J. M. Middeldorp, C. J. Meijer, and A. J. van den Brule. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF1 gene. *Cancer Res* 60:2745-2748. 2000.

35. Nishikawa, J., S. Imai, T. Oda, T. Kojima, K. Okita, and K. Takada. Epstein-Barr virus promotes epithelial cell growth in the absence of EBNA2 and LMP1 expression. *J Virol* 73:1286-1292. 1999.
36. Chang, M. S., H. Uozaki, J. M. Chong, T. Ushiku, K. Sakuma, S. Ishikawa, R. Hino, R. R. Barua, Y. Iwasaki, K. Arai, H. Fujii, H. Nagai, and M. Fukayama. CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clin Cancer Res* 12:2995-3002. 2006.
37. Matsusaka, K., S. Funata, M. Fukayama, and A. Kaneda. DNA methylation in gastric cancer, related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *World J Gastroenterol* 20:3916-3926. 2014.
38. Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513:202-209. 2014.
39. Abe, H., D. Maeda, R. Hino, Y. Otake, M. Isogai, A. S. Ushiku, K. Matsusaka, A. Kunita, T. Ushiku, H. Uozaki, Y. Tateishi, T. Hishima, Y. Iwasaki, S. Ishikawa, and M. Fukayama. ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability. *Virchows Arch* 461:367-377. 2012.
40. Wang, K., J. Kan, S. T. Yuen, S. T. Shi, K. M. Chu, S. Law, T. L. Chan, Z. Kan, A. S. Chan, W. Y. Tsui, S. P. Lee, S. L. Ho, A. K. Chan, G. H. Cheng, P. C. Roberts, P. A. Rejto, N. W. Gibson, D. J. Pocalyko, M. Mao, J. Xu, and S. Y. Leung. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet* 43:1219-1223. 2011.
41. Shinozaki, A., T. Sakatani, T. Ushiku, R. Hino, M. Isogai, S. Ishikawa, H. Uozaki, K. Takada, and M. Fukayama. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res* 70:4719-4727. 2010.
42. Lo, A. K., C. W. Dawson, D. Y. Jin, and K. W. Lo. The pathological roles of BART miRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 227:392-403. 2012.
43. Chen, J. Roles of the PI3K/Akt pathway in Epstein-Barr virus-induced cancers and therapeutic implications. *World J Virol* 1:154-161. 2012.
44. Fukuda, M., and R. Longnecker. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway. *J Virol* 81:9299-9306. 2007.
45. Hino, R., H. Uozaki, Y. Inoue, Y. Shintani, T. Ushiku, T. Sakatani, K. Takada, and M. Fukayama. Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A. *Cancer Res* 68:1427-1435. 2008.
46. Hino, R., H. Uozaki, N. Murakami, T. Ushiku, A. Shinozaki, S. Ishikawa, T.

- Morikawa, T. Nakaya, T. Sakatani, K. Takada, and M. Fukayama. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res* 69:2766-2774. 2009.
47. Iwakiri, D., T. Minamitani, and M. Samanta. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A contributes to anoikis resistance through ERK activation. *J Virol* 87:8227-8234. 2013.
 48. Lin, Z., X. Wan, R. Jiang, L. Deng, Y. Gao, J. Tang, Y. Yang, W. Zhao, X. Yan, K. Yao, B. Sun, and Y. Chen. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A promotes the epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma via metastatic tumor antigen 1 and mechanistic target of rapamycin signaling induction. *J Virol* 88:11872-11885. 2014.
 49. Moody, C. A., R. S. Scott, N. Amirghahari, C. O. Nathan, L. S. Young, C. W. Dawson, and J. W. Sixbey. Modulation of the cell growth regulator mTOR by Epstein-Barr virus-encoded LMP2A. *J Virol* 79:5499-5506. 2005.
 50. Morrison, J. A., A. J. Klingelutz, and N. Raab-Traub. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Activates β -Catenin Signaling in Epithelial Cells. *Journal of Virology* 77:12276-12284. 2003.
 51. Scholle, F., K. M. Bendt, and N. Raab-Traub. Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol* 74:10681-10689. 2000.
 52. 安居輝人. ウイルスの構造と遺伝子 3) LMP. 診断と治療社, 東京. 2008.
 53. Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson, and R. Longnecker. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9:405-411. 1998.
 54. Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314:997-1001. 2006.
 55. Anderson, L. J., and R. Longnecker. EBV LMP2A provides a surrogate pre-B cell receptor signal through constitutive activation of the ERK/MAPK pathway. *J Gen Virol* 89:1563-1568. 2008.
 56. Bechtel, D., J. Kurth, C. Unkel, and R. Kuppers. Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* 106:4345-4350. 2005.
 57. 日比谷孝志. EBウイルス胃癌における発癌機構～LMP2Aに着目して～ 東京大学大学院医学系研究科博士学位論文. 2012.

58. Kuper, H., H. O. Adami, and D. Trichopoulos. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 248:171-183. 2000.
59. Parkin, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118:3030-3044. 2006.
60. Thun, M. J., E. J. Jacobs, and C. Patrono. The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol* 9:259-267. 2012.
61. Thun, M. J., M. M. Namboodiri, E. E. Calle, W. D. Flanders, and C. W. Heath, Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 53:1322-1327. 1993.
62. Thun, M. J., M. M. Namboodiri, and C. W. Heath, Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 325:1593-1596. 1991.
63. Forones, N. M., K. Y. Kawamura, H. R. Segreto, R. Artigiani Neto, G. R. Focchi, and C. T. Oshima. Expression of COX-2 in stomach carcinogenesis. *J Gastrointest Cancer* 39:4-10. 2008.
64. Wang, D., and R. N. Dubois. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* 10:181-193. 2010.
65. Fukase, K., M. Kato, S. Kikuchi, K. Inoue, N. Uemura, S. Okamoto, S. Terao, K. Amagai, S. Hayashi, M. Asaka, and G. Japan Gast Study. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 372:392-397. 2008.
66. Matsuo, T., M. Ito, S. Takata, S. Tanaka, M. Yoshihara, and K. Chayama. Low prevalence of *Helicobacter pylori*-negative gastric cancer among Japanese. *Helicobacter* 16:415-419. 2011.
67. Uemura, N., and S. Okamoto. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer in Japan. *Gastroenterol Clin North Am* 29:819-827. 2000.
68. Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, and R. J. Schlemper. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345:784-789. 2001.
69. Oshima, H., A. Matsunaga, T. Fujimura, T. Tsukamoto, M. M. Taketo, and M. Oshima. Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E2 pathway. *Gastroenterology* 131:1086-1095. 2006.
70. Oshima, H., M. Oshima, K. Inaba, and M. M. Taketo. Hyperplastic gastric tumors induced by activated macrophages in COX-2/mPGES-1 transgenic mice. *EMBO J* 23:1669-1678. 2004.
71. Oguma, K., H. Oshima, M. Aoki, R. Uchio, K. Naka, S. Nakamura, A. Hirao, H. Saya, M. M. Taketo, and M. Oshima. Activated macrophages promote Wnt

- signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *EMBO J* 27:1671-1681. 2008.
72. Oshima, M., H. Oshima, A. Matsunaga, and M. M. Taketo. Hyperplastic gastric tumors with spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia caused by tumor necrosis factor-alpha-dependent inflammation in cyclooxygenase-2/microsomal prostaglandin E synthase-1 transgenic mice. *Cancer Res* 65:9147-9151. 2005.
 73. Weis, V. G., and J. R. Goldenring. Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process. *Gastric Cancer* 12:189-197. 2009.
 74. Nomura, S., T. Baxter, H. Yamaguchi, C. Leys, A. B. Vartapetian, J. G. Fox, J. R. Lee, T. C. Wang, and J. R. Goldenring. Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia to preneoplasia in *H. felis*-infected mice. *Gastroenterology* 127:582-594. 2004.
 75. Houghton, J. M. *Helicobacter species methods and protocols*. Introduction. *Methods Mol Biol* 921:1-5. 2012.
 76. Rogers, A. B. Histologic scoring of gastritis and gastric cancer in mouse models. *Methods Mol Biol* 921:189-203. 2012.
 77. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48:452-458. 2013.
 78. Toh, Y., and G. L. Nicolson. Properties and clinical relevance of MTA1 protein in human cancer. *Cancer Metastasis Rev* 33:891-900. 2014.
 79. Deng, X., L. Du, C. Wang, Y. Yang, J. Li, H. Liu, J. Zhang, L. Wang, X. Zhang, W. Li, X. Zhang, S. Wang, and Z. Dong. Close association of metastasis-associated protein 1 overexpression with increased angiogenesis and poor survival in patients with histologically node-negative gastric cancer. *World J Surg* 37:792-798. 2013.
 80. Toh, Y., E. Oki, S. Oda, E. Tokunaga, S. Ohno, Y. Maehara, G. L. Nicolson, and K. Sugimachi. Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis. *Int J Cancer* 74:459-463. 1997.
 81. Yuan, T., H. Zhang, B. Liu, Q. Zhang, Y. Liang, R. Zheng, J. Deng, and X. Zhang. Expression of MTA1 in nasopharyngeal carcinoma and its correlation with prognosis. *Med Oncol* 31:330. 2014.
 82. Kumar, R., S. Balasenthil, S. B. Pakala, S. K. Rayala, A. A. Sahin, and K. Ohshiro. Metastasis-associated protein 1 short form stimulates Wnt1 pathway in mammary epithelial and cancer cells. *Cancer Res* 70:6598-6608. 2010.
 83. Sen, N., B. Gui, and R. Kumar. Role of MTA1 in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 33:879-889. 2014.
 84. Miller, W. E., H. S. Earp, and N. Raab-Traub. The Epstein-Barr virus latent

- membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol* 69:4390-4398. 1995.
85. Lin, J. H., C. H. Tsai, J. S. Chu, J. Y. Chen, K. Takada, and J. Y. Shew. Dysregulation of HER2/HER3 signaling axis in Epstein-Barr virus-infected breast carcinoma cells. *J Virol* 81:5705-5713. 2007.
 86. Oshima, H., K. Hioki, B. K. Popivanova, K. Oguma, N. Van Rooijen, T. O. Ishikawa, and M. Oshima. Prostaglandin E(2) signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. *Gastroenterology* 140:596-607 e597. 2011.
 87. Oshima, H., and M. Oshima. The role of PGE2-associated inflammatory responses in gastric cancer development. *Semin Immunopathol* 35:139-150. 2013.
 88. Kawada, M., H. Seno, Y. Uenoyama, T. Sawabu, N. Kanda, H. Fukui, Y. Shimahara, and T. Chiba. Signal transducers and activators of transcription 3 activation is involved in nuclear accumulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Cancer Res* 66:2913-2917. 2006.
 89. Armanious, H., P. Gelebart, J. Mackey, Y. Ma, and R. Lai. STAT3 upregulates the protein expression and transcriptional activity of beta-catenin in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 3:654-664. 2010.
 90. Uehara, Y., M. Inoue, K. Fukuda, H. Yamakoshi, Y. Hosoi, H. Kanda, M. Oshima, Y. Iwabuchi, and H. Shibata. Inhibition of beta-catenin and STAT3 with a curcumin analog suppresses gastric carcinogenesis in vivo. *Gastric Cancer* 18:774-783. 2015.
 91. Anand, M., R. Lai, and P. Gelebart. beta-catenin is constitutively active and increases STAT3 expression/activation in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica* 96:253-261. 2011.
 92. Fragoso, M. A., A. K. Patel, R. E. Nakamura, H. Yi, K. Surapaneni, and A. S. Hackam. The Wnt/beta-catenin pathway cross-talks with STAT3 signaling to regulate survival of retinal pigment epithelium cells. *PLoS One* 7:e46892. 2012.
 93. Yan, S., C. Zhou, W. Zhang, G. Zhang, X. Zhao, S. Yang, Y. Wang, N. Lu, H. Zhu, and N. Xu. beta-Catenin/TCF pathway upregulates STAT3 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 271:85-97. 2008.
 94. Oshima, H., and M. Oshima. Mouse models of gastric tumors: Wnt activation and PGE2 induction. *Pathol Int* 60:599-607. 2010.