

## 論文の内容の要旨

論文題目 胃癌における細胞間接着因子の発現異常と癌化能との関連

氏名 高橋 悠

胃癌は古典的には Lauren 分類により intestinal type と diffuse type に分類されるが、その他 WHO 分類、日本胃癌学会分類、五関分類、Ming 分類などが知られており、我が国においては日本胃癌学会分類が汎用されている。日本胃癌学会分類においては特殊型を除くと胃癌は pap, tub1, tub2, por, sig, muc に分類され、Lauren 分類と比較すると intestinal type に pap, tub1, tub2 が、diffuse type に por, sig, muc が分類される。一般的には Lauren 分類の diffuse type のものでは intestinal type に比べて予後が悪いことが知られているが、この diffuse type の胃癌においては細胞接着因子の一つである E-cadherin の発現異常が頻繁に認められる。E-cadherin に代表される細胞接着因子は細胞極性の形成にも重要であり、発現の低下が癌の転移と関連することも知られている。E-cadherin やそれと結合する beta-catenin と胃癌との関連については報告されているもののその他の細胞接着因子との関連については現在までに報告が乏しい。近年では tight junction を構成する細胞接着因子である claudin と胃癌の関連については胃で特異的に発現する claudin18.2 を中心に報告されてきているが、E-cadherin とともに adherens junction を形成する nectin や afadin と胃癌の関連についてはほとんど報告がない。そこで本研究においては nectin family と胃癌の関連の有無に着目して研究を行うこととした。

まず胃癌由来細胞株(MKN45, NUGC4, AGS, MKN1, KE39, GCIY)から RNA を抽出して *nectin1*, *nectin2*, *nectin3*, *nectin4*, *necl5*(*nectin-like molecule 5*), *afadin*, *claudin18.2*(*CLDN18.2*)の RT-PCR を行い、これらの胃癌由来細胞株における発現解析を行った。*nectin1*, *nectin2*, *afadin*, *necl5* においては 6 種類全てで発現が確認された。一方で *nectin3* は MKN45 で発現が認められず、KE39 でも発現は減弱傾向であった。*nectin4* は MKN1, GCIY では発現が低下しており、*CLDN18.2* は MKN45, NUGC4 でのみ発現が認められた。更にこれらの遺伝子がコードするタンパクに対する抗体を購入してこれらについて臨床検体での発現解析を試みた。しかし、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから作成した臨床検体での免疫染色での評価に耐えうる染色性を示したものは anti-nectin1 抗体と anti-claudin18 抗体のみであった。Claudin18 の発現と胃癌の関連については

既報もあることから、nectin1 と胃癌の関連に絞り解析を進めることとした。

胃癌切除検体を用いて nectin1 の細胞膜における発現評価を行った。まずは非癌部における nectin1 の発現の評価を行った。胃腺窩上皮では nectin1 は細胞接着部位の最も管腔側に限局して発現していた一方で、胃腸上皮化生部位では管腔面に一様に発現を認めた。腺窩上皮、腸上皮化生どちらにおいても基底膜側での発現は認めなかった。次に胃癌切除検体を HE 染色により pap, tub1, tub2, por, sig, muc の組織型に分類し、各組織型の nectin1 の細胞膜発現について評価を行った。外科切除検体においては pap, tub1, tub2 のような腺管形成がある部位では腸上皮化生の場合と同様に管腔面での一様な発現が認められる傾向があったが、por, sig, muc などでは腺管構造が乏しいため管腔面での発現は評価できないが、細胞膜いずれの部位でも発現が認めない傾向であった。各組織型の発現を評価すると、pap: 4/10, tub1: 6/10, tub2:14/22, por:4/38, sig:0/6, muc:1/3 で nectin1 の細胞膜発現が陽性となった。これらを Lauren 分類と対比して pap, tub1, tub2 を“intestinal type”、por, sig, muc を“diffuse type”に分類して解析を行うと nectin1 陽性は intestinal type: 24/42, diffuse type: 5/47 であった。非癌部胃粘膜と比べ、intestinal type, diffuse type いずれも nectin1 発現が低下しており、intestinal type, diffuse type を比較すると有意差を持って intestinal type での nectin1 の細胞膜発現が diffuse type に比べて多かった (Fisher's exact test:  $P < 0.0001$ )。同様に内視鏡切除検体についても評価を行うと、pap:5/7, tub1:42/52, tub2:5/15, por:0/0, sig:0/7, muc:0/0 で nectin1 の細胞膜発現が陽性となった。内視鏡切除検体においても癌部では nectin1 の細胞膜発現が低下することが判明した。これら外科切除検体と内視鏡切除検体を合わせた全 170 症例についてまとめると、pap:9/17, tub1:48/62, tub2:19/37, por:4/38, sig:0/13, muc:1/3 となり、“intestinal type”では 76/116、“diffuse type”では 5/54 で陽性となり、外科治療検体と同様に intestinal type で nectin1 の細胞膜発現が有意に多い結果であった (Fisher's exact test:  $P < 0.0001$ )。

胃癌切除検体を用いた免疫染色では nectin1 の細胞膜発現は低下傾向であった一方で 6 種類の胃癌由来細胞株を用いた RT-PCR の結果では全て nectin1 が発現していた。そのため nectin1 発現陰性細胞を探索する目的で RT-PCR により胃癌由来細胞株を広くスクリーニングしたが今回検証した 17 種類の胃癌由来細胞株では全て nectin1 発現陽性であり、胃癌切除検体で胃癌部での nectin1 発現が低下していたという結果と乖離が認められた。一方正常組織由来の RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、多くの組織で nectin1 の発現が認められたが、肝臓・骨格筋では発現が低下していることが判明した。

胃癌由来細胞株の mRNA 発現と胃癌切除検体のタンパク発現の乖離について検証する目的で、胃癌由来細胞株から cell block を作成し、臨床検体と同様に免疫染色を行ったところ、細胞膜での発現ははっきりしない一方で核が染色されていた。nectin1 は細胞膜に発現する膜貫通タンパクとして知られているが、nectin1 が核に発現するという報告はなかったため、この核に染まる現象が非特異的な染色でないかどうかについて検証することとした。

胃癌由来細胞株を用いて、「細胞全体」と「核を単離」したものからそれぞれタンパクを抽出して nectin1 の発現について western blotting で評価を行ったところ、核を単離したものでは細胞全

体のものと比べて *nectin1* の強い発現を認めた。これは上記の胃癌由来細胞株での免疫染色で核が染まることの裏付ける結果となり、胃癌由来細胞株において *nectin1* は核に優位に発現することが判明した。核に *nectin1* が存在するということが臨床検体でも確認できるかについて、胃癌切除検体における *nectin1* の核発現について評価を行った。結果としては核に染まる症例は全 170 症例中、28 症例で認められたが組織型による発現の違いは認められなかった。現時点では *nectin1* が核に発現することの意義は不明であるが、正常で機能すべき部位に発現していないことに病的意義がある可能性が示唆される。

次に、*nectin1* を導入した際の効果を調べる目的で、*nectin1 isoform1* を導入するレトロウイルスベクターを作成し、胃癌由来細胞株に感染させ、薬剤選択を行うことにより外来 *nectin1 isoform1* を恒常的に発現する胃癌由来細胞株を作成した。この外来 *nectin1* を恒常的に発現する胃癌由来細胞株を蛍光免疫染色で解析すると、内在性 *nectin1* では認められなかった細胞膜で *nectin1* が明瞭に発現することが確認された。レトロウイルスベクターを用いて導入した cDNA タイプの *nectin1 isoform1* と核で検出された内在性の *nectin1* の挙動が異なることについてはスプライシング・翻訳後修飾・タンパク輸送などに異常が存在する可能性が示唆された。

さらに臨床検体における検討から非癌部や *intestinal type* の胃癌においては細胞膜で *nectin1* が発現していたことから、*nectin1* が細胞膜に発現することに抗癌活性がある可能性が示唆されたため、これについて検討することとした。上記のように *nectin1 isoform1* を導入するレトロウイルスベクターを胃癌由来細胞株へと感染させ、*nectin1* を導入しないコントロールとともに軟寒天培地上のコロニー形成法により癌化能を測定することとした。MKN45, NUGC4, AGS, MKN1, KE39, GCIY の 6 種類で試みたところ全てで標準誤差範囲内という結果であったが、KE39 を低密度培養した場合には *nectin1 isoform1* を導入しなかったものでは導入したものに比較して、コロニー形成が 3 倍以上の差が認められ、*nectin1* の細胞膜発現に癌抑制的な機能があることが示唆された。

以上まとめると、*nectin1* の細胞膜発現は 1)非癌部粘膜と比べ癌部では低下すること、2)胃癌の組織型の間に関連があることを発見した。胃癌由来細胞株では *nectin1* が細胞膜よりも核で優位に発現し、実際の胃癌臨床検体においても *nectin1* が核に発現する症例が数多く存在することを発見した。また cDNA タイプの *nectin1* を胃癌由来細胞株に導入すると *nectin1* は細胞膜に発現することを発見されたが、一部の細胞株では *nectin1* の細胞膜発現により軟寒天培地上のコロニー形成能が低下することが判明し、*nectin1* の細胞膜発現には抗癌活性があることが示唆された。胃癌において本来細胞膜に発現する *nectin1* が核で発現していることの意義については不明であるが、*nectin1* が核へ移行するメカニズム・核での機能について今後解明していきたい。また本研究では anti-*nectin1* 抗体 1 種類を使用しての検討のため抗体の非特異的反応のため本来とは異なるタンパク質を検出しているところに限界が存在する。特に増感法を使用しての免疫染色における核染色については非特異的反応が起こりやすいこともあり、今後信頼性の高い他の抗体が入手できれば、他の *nectin family* と合わせて解析し、*nectin family* と胃癌の関連についての全容を解明したいと考えている。