

論文の内容の要旨

論文題目 胃癌における炎症・免疫関連分子の機能解析

氏名 西東 瑠璃

胃癌は世界における主要な死因のひとつで、特に東アジアで多い傾向にある。本邦では、診断・治療技術の向上に伴い、罹患率・死亡率ともに減少してきているものの、依然として患者数・死亡数の多い疾患である。胃癌には多くの組織型があり、それぞれ異なった生物学的特徴を示すことが知られている。近年では、マイクロアレイや次世代シーケンサーなどの技術の進歩によって、分子生物学的解析が盛んに行われるようになった。胃癌においても、網羅的ゲノム解析が報告されており、the Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA)から、胃癌は分子生物学的に、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 型に分類されることが報告された。

TCGA の報告では、4 型のひとつである EBV 関連胃癌の約 15%に PD-L1 を含む領域が増幅されていることも明らかにされた。PD-L1 は炎症・免疫関連分子のひとつで、腫瘍細胞や間質の免疫細胞に発現し、細胞傷害性 T 細胞の PD-1 と相互作用することで腫瘍免疫抑制に働いている。様々な悪性腫瘍において PD-L1 の発現が認められ、予後不良との関連が示唆されたため、特に悪性黒色腫と非小細胞性肺癌で治療標的として注目されている。いくつかの研究では、胃癌においても PD-L1 の発現が予後に関わることが示されているが、EBV 関連胃癌での PD-L1 発現の意義は十分には明らかにされていない。

癌の発生や進展に間質の炎症性免疫反応が関与している可能性があることは、150 年以上前に Rudolph Virchow によって指摘され、1990 年以降になって研究が報告されるようになった。胃癌においては H.pylori 感染に伴う炎症が癌の発生に関与していることがよく知られている。また、胃癌の進展に NF-kappa B や STAT3 といった転写因子が関与するとの報告もある。炎症を制御する分子機構の一つに inflammasome がある。inflammasome は細胞質内タンパク質複合体で、シグナル認識に関わる分子(NLRP3, NLRP1, NLRC4, AIM2)、アダプタータンパク質(ASC)、caspase-1 で構成されている。特に NLRP3 は inflammasome の活性化に際して重要な役割を担っている。しかし NLRP3 と癌の関連が論じられている報告は少ない。

そこで、本研究では炎症・免疫関連分子のうち、特に PD-L1 と NLRP3 に着目して、胃癌の分子生物学的サブタイプごとに発現を比較・検討し、両分子の発現意義の解明に向け研究を行った。

胃癌における PD-L1 発現の臨床病理学的意義を検討し、特に EBV 関連胃癌での PD-L1 の発現の意義を解明するために以下の研究を行った。まず公開データベースから TCGA の胃癌の PD-L1

mRNA データを引用して解析して分子生物学的サブタイプごとの PD-L1 mRNA の発現を検討したところ、EBV 関連胃癌は他の 3 型よりも PD-L1 mRNA の発現が高かった。次に東大病院の胃癌手術検体 232 例を用いて PD-L1 の免疫組織化学的検討を行った。その結果、EBV 関連胃癌では腫瘍細胞及び間質免疫細胞の PD-L1 発現が高率であること、そしていずれの発現も深部浸潤傾向と相関することが明らかになった。さらに EBV 関連胃癌の腫瘍細胞の PD-L1 発現は予後不良と有意に相関しており、EBV 関連胃癌において PD-L1 が治療標的となり得ることが示唆された。EBV 関連胃癌での PD-L1 の発現と遺伝子増幅の関係について検討するために、PD-L1 遺伝子の Fluorescence in situ hybridization (FISH)を行い、免疫組織化学的検討の結果と併せて検討した。EBV 関連胃癌 PD-L1 発現例のうち、免疫組織化学的検討で強陽性像を示した領域のみで遺伝子増幅が認められた。これより、PD-L1 遺伝子の増幅は癌の進展の後期段階で一部のクローンで起こり、タンパクの過剰発現を伴うことがわかった。遺伝子増幅以外の PD-L1 発現機序は解明されていないが、ウイルス感染に伴う感染腫瘍細胞内の変化や腫瘍浸潤部の微小環境における腫瘍細胞と間質免疫細胞の相互作用の影響などが関与している可能性が考えられる。EBV 関連胃癌において、PD-L1 は治療標的として有望な分子であり、さらなる PD-L1 発現機序の解明は特異的で効果の高い治療法の確立に寄与すると考えられる。

続いて胃癌における NLRP3 発現の臨床病理学的意義を解明することを目的に、胃癌手術検体 212 例を用いて NLRP3 の免疫組織化学的検討を行ったところ、びまん型胃癌 NLRP3 発現は腫瘍径、進行度、静脈侵襲、リンパ管侵襲、リンパ節転移と有意に相関し、予後不良因子であった。そこで NLRP3 発現が癌の進展に及ぼす影響を検討するため、胃癌培養細胞株に NLRP3 に対する siRNA、NLRP3 発現 vector を導入して実験(transwell assay, scratch assay)を行い、遊走能を評価した。その結果、transwell assay、scratch assay 両者において細胞遊走促進作用が明らかになった。また NLRP3 siRNA の導入による遺伝子発現変化を解析するため、マイクロアレイによる mRNA 発現解析も行った。マイクロアレイの結果から NLRP3 が遊走を制御する過程に S100A8 の関与が示唆され、S100A8 発現抑制下では NLRP3 過剰発現により S100A8 の増加を伴った遊走能の回復がみられた。以上のことから、NLRP3 は S100A8 の制御を介して細胞遊走能を高めることが示された。さらに臨床病理学的解析と併せ NLRP3 は遊走能の亢進によりびまん型胃癌の進展を促進していると考えられ、びまん型胃癌の治療標的の一つになり得ると考えられた。

以上の研究を通して、免疫・炎症関連分子である PD-L1 と NLRP3 がそれぞれ EBV 関連胃癌とびまん型胃癌において癌の進展に重要な役割を果たしていることが明らかになった。免疫・炎症関連分子も胃癌の分子生物学的サブタイプごとにその発現意義が異なる可能性が示唆され、分子生物学的サブタイプ別に研究を進める必要があると考えられる。