

論文の内容の要旨

論文題目 胎児型形質を有する胃癌についての検討

氏名 山澤 翔

背景と目的

幼若な細胞形質の獲得は様々な腫瘍で予後不良因子として報告されている。胃癌では高悪性度胃癌として知られる alpha-fetoprotein (AFP) 産生胃癌が胎生初期の幼若な細胞分化形質を有し、glypican-3 (GPC3)、SALL4、claudin-6 (CLDN6) といった胎児形質マーカーを高発現していることが分かってきた。AFP 産生胃癌は胃癌の 3% を占めるに過ぎないが、これらの胎児形質マーカー発現は AFP 非産生胃癌でもそれぞれ 10-20% の頻度で認められる。これらの複数の胎児形質マーカー発現を指標として胎児形質を有する胃癌を“胎児形質胃癌”として抽出し、多様な胃癌の中での位置づけ、臨床病理学的意義、そして遺伝子変異や発現異常からその成り立ちを明らかにすることが本研究の目的である。ゲノム異常に関しては、胃癌研究の枠組みとなりつつある TCGA molecular 分類、すなわち EBV 型 (Epstein-Barr ウイルス陽性胃癌)、MSI 型 (マイクロサテライト不安定性胃癌)、CIN 型 (ゲノムコピー数異常が高度な染色体不安定性胃癌)、GS 型 (ゲノム安定性胃癌) の 4 型との関連についても検討した。最後に胎児形質胃癌における癌幹細胞の特徴を明らかにするため、細胞株を用いた癌幹細胞マーカーの同定・解析を実施した。

方法

1. 胎児形質胃癌の抽出と臨床病理学的特徴

2007 年 1 月から 2010 年 12 月までに東京大学医学部附属病院にて外科切除された胃癌連続症例を対象とした。これらの病理検体から Tissue microarray を作成し、胎児形質マーカーの免疫染色 (AFP, GPC3, SALL4, CLDN6, LIN28, OCT4, NANOG)、また molecular 分類の指標となる癌関連因子 (TP53, MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, および EBER-ISH) について染色を実施した。染色された腫瘍細胞数の割合から陰性、部分的陽性、びまん性陽性の 3

段階で評価した。胎児形質マーカーの発現結果を基に Wald 法によるクラスター解析を実施し、各群について臨床病理学的因子の比較や生存解析を行った。

2. TCGA コホートを用いた *in silico* 解析

TCGA molecular 分類との関連を明らかにするため、TCGA 公開データベースの胃癌コホートを用いて同様の解析を実施した。各胎児形質マーカー遺伝子について、mRNA の z-score により、negative ($z < 1.0$) , low level ($1.0 \leq z < 10.0$) , high level ($z \geq 10.0$) の3段階に分けてクラスター解析を実施。それぞれの群について、molecular 分類をはじめ、臨床病理学的特徴や遺伝子変異の特徴を検討した。

3. 癌幹細胞マーカー同定のための *in vitro* 解析

胎児形質胃癌の細胞株 (FU97、GCIY、Takigawa) を用いて、胃癌の癌幹細胞マーカーと報告される分子 (CD24, CD44, CD133, ABCG2, EpCAM) の発現を Flow cytometry で検索した。これらのマーカー発現の有無により磁気ビーズ法または Flow cytometry で細胞を2群に分離し、それぞれの Spheroid 形成能やマウス xenograft モデルでの腫瘍形成能を比較することで、どのマーカーが胎児形質胃癌の癌幹細胞マーカーとして重要なのかを検討した。また、通常の2次元 Dish 培養、Spheroid 培養、Xenograft における mRNA と蛋白発現の変化を microarray と免疫染色により比較した。

結果

1. 胎児形質胃癌の臨床病理学的特徴

胃癌 386 症例における各胎児形質マーカーの発現頻度は、AFP : 2.9% (部分的 2.6%、びまん性 0.3%)、GPC3 : 18.6% (部分的 16.3%、びまん性 2.3%)、CLDN6 : 7.4% (部分的 4.1%、びまん性 3.3%)、SALL4 : 32.3% (部分的 23.0%、びまん性 9.3%) であり、LIN28、OCT4、および NANOG は全症例で陰性であった。この結果を基に全症例を3群へクラスタリングすると、第一群 ($n = 93$, 24%) は CLDN6、GPC3、AFP の一つ以上が陽性又は SALL4 びまん性陽性

を示し、多くは複数の胎児形質マーカーの共発現がみられることから、“胎児形質胃癌”とした。第二群 (n = 56, 15%)は SALL4 のみが部分的陽性で、第三群 (n = 237, 61%)は全ての胎児形質マーカー発現を欠いていた。第一群は他の2群と比較して進行癌、脈管侵襲、リンパ節転移の頻度が有意に高く、また生存解析では疾患特異的生存率、無再発率共に不良であり、多変量解析でも有意な予後不良因子であった。第一群と第二群は共に組織型では intestinal が多く、特に胎児消化管類似型の13例は全て第一群に含まれていた。第一群、第二群は p53 の過剰発現が見られ、EBER-ISH 陽性や MMR 異常は第三群に見られやすい傾向があった。

2. TCGA コホートでの再現性と molecular 分類

TCGA データベースで胃癌 210 症例を AFP、CLDN6、GPC3、SALL4 の4マーカーで3群へクラスタリングしたところ免疫染色と同様の結果が再現された。第一群と第二群では TP53 変異及び intestinal type の組織型が集積していた。Molecular 分類では、第一群 (胎児形質胃癌) の大部分 (92%) が CIN 型であり、EBV 型、MSI 型、GS 型は胎児形質マーカー発現との関連は乏しいことが明らかとなった。

3. 癌幹細胞マーカー

AFP 産生胃癌細胞株を用いた in vitro の検討では、3つの細胞株全てで Spheroid の形成が確認された。特に GCIY 細胞株での検討では、CD44 低発現群は CD44 高発現群と比較し、Spheroid 形成能が高まっており、CD44 低発現群に癌幹細胞が含まれる可能性が示唆された。また GCIY 細胞では、二次元培養と比べて Xenograft では CLDN6 の発現が大きく上昇していた。

考察

複数の胎児形質マーカー発現を基にしたクラスター解析により、胎児形質胃癌を抽出し、特徴的な胃癌のサブグループであることが明らかになった。胎児形質胃癌は、intestinal type の組織型を示す高悪性度胃癌であり、p53 異常が高頻度である一方、EB ウイルスやミ

スマッチ修復異常との関連は乏しく、TCGA molecular 分類では CIN 型であることが特徴である。

CIN 型は胃癌の半数を占める最大の群であり、最も不均一な型であると考えられる。実臨床でもこの型の癌では症例ごとに悪性度が大きく異なることが経験され、悪性度の指標となる亜分類の確立が病理学的課題であった。本研究結果から、胎児形質マーカーを指標とした胎児形質胃癌の同定が CIN 型の中での高悪性度群の抽出に有用な可能性が示された。更に胎児形質マーカーは成人組織で発現が無いいため、副作用を抑えた分子標的療法のターゲットとして理想的である。実際に CLDN6 や GPC3 を標的とした抗体薬や免疫療法が開発され、現在臨床試験が進められており、胎児形質胃癌への応用も期待される。

胎児形質胃癌のゲノム異常の解明は今後の課題であるが、現時点では特徴的な遺伝子変異としては *TP53* 変異のみが知られており、この機能不全が成り立ちに重要な因子と考えられる。さらに、既報告や我々の予備検討では cyclin E1、XIAP や GLUT1 の高発現がこのタイプの胃癌で比較的特徴的にみられるため、高悪性度形質に関わっている可能性を考え、検討を進めている。細胞株を用いた検討では、CLDN6 と癌幹細胞の関連性、また CD44 低発現群に癌幹細胞が含まれる可能性が示唆された。後者については CD44 の variant の検索を含め解析中である。