

審査の結果の要旨

氏名 山澤 翔

本研究は胃癌において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を目的としている。胃癌連続手術症例における免疫染色の検討を主軸として、下記の結果を得た。

1. 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 386 症例の病理検体から Tissue microarray を作成した。胃癌胎児マーカーの alpha-fetoprotein (AFP), glypican-3 (GPC3)に加えて、胚性幹細胞マーカーとしてよく知られ胚細胞腫瘍マーカーとしても報告されている 5 マーカー (OCT4, NANOG, SALL4, CLDN6, LIN28)の免疫染色を行った。LIN28、OCT4、および NANOG は全症例で陰性だった。AFP、GPC3、SALL4、CLDN6 の 4 マーカーの発現結果を基に Wald 法によって 3 群へクラスタリングした。第一群 (n = 93, 24%)は AFP、GPC3、CLDN6 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かった。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、多変量解析でも無再発率に関して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 の過剰発現があり、EBER-ISH 陽性や MMR 異常は第三群に多い傾向があった。
2. TCGA 公開データベースの胃癌コホート 210 症例について、mRNA 発現量により 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 3 群が再現された。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. 第一群で中心的な 19 症例と AFP 産生胃癌と診断された 9 症例の計 28 症例につ

いて Whole slide の免疫染色を行った。AFP、CLDN6、GPC3、SALL4 の 4 マーカーで 3 群へ分類すると、粘膜内は第三群であったのにも関わらず浸潤部で第三群に変化した症例は 3 症例あった。粘膜内から浸潤部まで第一群であった症例は 21 症例であった。4 症例は粘膜内、或いは浸潤部のどちらかしか含まれなかった。第二群から第三群に変化した症例はなかった。第二群は第一群の前駆病変ではなく独立した病変であることが示唆された。

4. AFP 産生胃癌細胞株 (FU97, GCIY, Takigawa) について癌幹細胞マーカーの検索をした。これまで消化管癌で報告のある癌幹細胞マーカー (CD24, CD44, CD133, ABCG2, EpCAM, LGR5, ALDEFluor) の発現の有無から細胞株を 2 群に分け、Spheroid 形成実験にてそれぞれの癌幹細胞性を比較した。発現陽性群で Spheroid 形成数が多かったマーカーは無く、上記の癌幹細胞マーカーは AFP 産生胃癌においては癌細胞マーカーの積極的な候補にはならないことが示された。
5. 通常の 2 次元 Dish 培養、Spheroid 培養、マウス皮下 Xenograft モデルにおける幼弱なマーカーの発現の変化を microarray と免疫染色により比較した。Xenograft では CLDN6 の発現が Dish と比較して microarray の蛍光強度が 33.3 倍に上昇しており、Spheroid でも若干上昇していた。同様の結果は免疫染色でも確認した。癌幹細胞性に CLDN6 が関連している可能性を示した。

以上、本論文は幼弱なマーカーの発現からクラスタリングにて“胎児形質胃癌”を同定し、TCGA molecular 分類の CIN の内で予後不良な一群であることを明らかにした。CIN は胃癌の半数を占める最大かつ最も不均一な群である。その中で“胎児形質胃癌”によって悪性度の指標となる亜分類の確立をした意義は大きく、更に AFP 産生胃癌の癌幹細胞マーカーについても検討を加えており、学位の授与に値するものと考えられる。