

論文内容の要旨

論文題目 遺伝子発現プロファイリングに基づく胃癌の分子病理学的解析

指導教官 深山正久 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理専攻

氏名 谷口浩和

胃癌は長年の間日本人の癌による死因の上位を占めてきた。近年の分子生物学の発達により、胃癌についても多数の遺伝子変化が明らかになってきているが、胃癌の発生や進展については未だに不明な点が多い。さらに胃癌は組織型や浸潤転移の状況、化学療法への反応など様々な臨床的特徴を備えており、これらの特徴に関連した遺伝子の変化はほとんど知られていない。

本研究では胃癌組織特異的な遺伝子を明らかにするために、多数の遺伝子の発現量を同時に解析できる技術の中でも最近多くの研究に応用されるようになってきたオリゴヌクレオチドアレイ GeneChip™ HuGeneFL (Affymetrix 社) を用い、22 検体の胃癌組織及び 8 検体の非癌部胃粘膜組織について約 6800 遺伝子の発現プロファイリングを行った。得られたデータに対し、2 方向クラスタリング解析を行ったところ、胃癌組織と非癌部胃粘膜組織は別々のクラスターを形成し、胃癌組織と非癌部胃粘膜組織は、遺伝子の発現量のみを指標に区別できることを示した。

次に胃癌組織と非癌部胃粘膜組織それぞれに特徴的な遺伝子を抽出するために、アレイ上の各遺伝子について胃癌組織と非癌部胃粘膜組織での遺伝子発現

量の平均値を比較すると同時に Mann-Whitney's U-test による検定をおこなった。これにより、胃癌組織に高発現している 162 遺伝子、非癌部胃粘膜組織で高発現している 129 遺伝子を抽出した。このリストの再現性を確認するために、78 遺伝子については、GeneChip の実験に用いた RNA をランダムに選んで、4 組の胃癌組織と非癌部胃粘膜組織を用いて半定量的 RT-PCR を行ったところ大部分の遺伝子で良い相関を示した。さらに、この遺伝子を機能別の表にまとめた。胃癌組織では、細胞周期や細胞増殖因子のような胃癌細胞の増殖状態を表している遺伝子群と、細胞外マトリックスやその改築、血管新生に関わる間質細胞の反応を表している遺伝子群で高い発現が認められた。腫瘍に特異的な間質の反応は、化学療法の効果が低い癌に対する治療の標的として最近注目を集めており、多くの知見が集積されつつあるが、本研究で高い発現を示したコラーゲンの多くが血管内皮由来であるという報告もあり、しばしば胃癌で見られる強い線維化に腫瘍近傍の血管新生が関与しているという意味で興味深い。反対に、非癌部胃粘膜で高発現が見られる遺伝子は、消化管に固有の機能に関連しているものが多くを占めた。

次に、リンパ節転移、組織型、 β -catenin および p53 の核内蓄積の有無といった胃癌の臨床的、分子病理学的な特徴を規定する遺伝子の同定を行った。Mann-Whitney's U-test を用いて二群に差がある遺伝子を抽出するとともに二群の平均を比較することで、それぞれの特徴を規定する遺伝子を同定した。

リンパ節転移は胃癌の生命予後に大きな影響を及ぼすが、これらに関する遺伝子はまだまだあまり知られていない。胃癌組織をリンパ節転移の有無で二群に分け、リンパ節転移を起こす胃癌組織に特徴的な遺伝子を同定した。リンパ節転移のある群に高発現の遺伝子には、細胞外マトリックスの再構築に関連する *fibronectin* や細胞の運動能に影響を与える *profilin 2* のような転移との関連を示唆する遺伝子の他に、リンパ球に特異的なイムノグロブリンの転写因子である *Oct2* の発現が認められた。OCT-2 の免疫染色では、リンパ節転移がみられる一部の癌組織のみで浸潤する形質細胞だけでなく、癌細胞が陽性を示した。*Oct2* の発現がリンパ節転移に直接関係するか否かは、更なる検索が必要である。

胃癌の組織型には大きく分けて腸型とびまん型があり、各々について特徴的な遺伝子の異常が知られている。この二つの組織型の各々に特徴的に発現する遺伝子の同定を試みた。腸型で高発現している遺伝子は、正常の腸で発現しているものが多く、これは腸上皮への分化と考えることができる。また、*LI*

cadherin は腸型胃癌に高発現であったが、これは最近の免疫組織化学を用いた報告とも一致する。さらに *E-cadherin* は、腸型胃癌の前癌病変と考えられている腸上皮化生の段階で発現しており、その転写制御因子は、腸型胃癌の多段階発現に重要な役割を果たしている可能性もある。

p53 は最もよく知られた癌抑制遺伝子で、その異常は多くの癌にみられ、胃癌でも 6 割に異常があることが知られている。本研究では免疫染色により p53 の核内異常蓄積を評価し、p53 の異常に関連して発現する 5 遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子のうち Matrix metalloproteinase 9 は胃癌の浸潤や転移との関連が報告されているが、p53 の関連は報告されていない。Matrix metalloproteinase 9 のプロモーター領域には p53 により負の制御を受ける c-jun が結合する AP-1 サイトがあり、その直接的関連の可能性が示唆された。

β -catenin は wnt シグナルを構成する分子で、wnt の異常により核内に移行して TCF4 と結合し、下流遺伝子である *myc* や *cyclinD1* などの発現を上昇させることが、大腸癌の研究で明らかになっている。本研究では免疫染色により β -catenin の核内異常蓄積を評価し、関連して発現する 5 遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子のうち、Transcription factor 7 は TCF4 の下流の遺伝子であることが報告されている。また、Protein phosphatase 2, regulatory subunit B(B56), delta isoform や GRO1 など、増殖に関連する遺伝子が抽出されており、 β -catenin が胃癌の発癌やその進展への関連が示唆された。

さらに胃癌で発現の上昇する新規の遺伝子を検索するため、主に EST クロオンが配列してあるオリゴヌクレオチドアレイ GeneChip™ Hu35K(Affymetrix 社) を用い、一組の胃癌組織及び非癌部胃粘膜組織について、約 35000EST クロオンの遺伝子発現プロファイリングを行った。胃癌組織で高発現しているクロオンのうち、2001 年 1 月の時点で全長の配列が決定されていないものについて、4 組の癌組織と非癌部胃粘膜組織の半定量的 RT-PCR によって 3 組以上の検体で癌組織に高発現している 3 クロオンを抽出した。そのうち 2 クロオンは、2001 年 6 月の時点ですでに全長が GeneBank に登録されていたが、1 つについては依然として EST であった。GeneBank に登録されているものは、Notch シグナルにより転写が亢進する HEY ファミリーの遺伝子 Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like (HEYL) と Soinc Hedgehog シグナル伝達系の転写因子 GLI のファミリー遺伝子 Kruppel-like zinc finger protein GLIS2 (GLIS2) であった。Notch の機能には、側方抑制、分化誘導、および幹細胞の状態を維持

するのに重要な役割を果たしていることが知られている。また、白血病や前立腺癌との関係が報告されている。Sonic Hedgehog は、分化に重要な役割を果たしており、Basal cell carcinoma との関係では、浸潤に関連することが知られている。

ESTであったクローンについては、Web database のホモロジー検索により、マウスの Carboxypaptidase X2 に高いホモロジーを持つことがわかり、Human Genome の配列やホモロジーサーチを組み合わせることにより、全長に相当する配列を得た。その配列の RT-PCR を行い Sequence を行い全長の配列を決定した。この遺伝子 (CPX-2) は、14 の Exon からなる全長が約 3300bp、コーディング領域は 1941bp、647 アミノ酸からなる。

これら 2 つの新規遺伝子を含む 3 遺伝子についての詳細な解析は今後の課題である。

<まとめ> オリゴヌクレオチドアレイを用いて胃癌の遺伝子発現解析を行った。胃癌組織と非癌部胃粘膜の各々に特徴的な遺伝子セットを行った。また、リンパ節転移、組織型、p53 の核内異常蓄積、 β -catenin の核内異常蓄積に関係する遺伝子セットの同定を試みた。また、胃癌関連新規遺伝子の検索を行い、癌と関係が深いと思われる 2 つの転写因子と、1 つの新規遺伝子を同定した。