

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Molecular and Pathological Investigation of Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma

和訳 : Epstein-Barr ウイルス関連胃癌の分子生物学的・病理学的検討

指導教員 : 深山正久

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 : バルア リタ ラニ

胃癌は日本を含め、アジアでは発生率の高い癌である。胃癌の約 10%に Epstein-Barr ウイルス(EBV)が関連している。感染 EBV はほとんどが単クローンであること、EBV の産生する RNA (EBER)を対象とした *in situ* hybridization 法では感染胃癌では殆どの胃癌細胞に EBV の感染が見られることから、EBV はこれらの胃癌の発癌に密接に関連していると考えられている。EBV 関連胃癌はリンパ球浸潤の多く、低分化ないし中分化腺癌に多いことが知られ、最近では癌関連遺伝子プロ

モータの広汎な DNA メチル化を示すことが報告されており、胃癌としては特異な一群をなしている。本研究の主たる目的は EBV 関連胃癌の形質を免疫組織化学的に検索して EBV 関連胃癌の発生母地を明らかにすることと、サイトカイン多型の検索から胃癌発生の高危険群を明らかにすることである。

最初に、胃型／腸型形質の検索を行った。自治医科大学附属病院で切除された 18 例の EBV 関連胃癌および 56 例の EBV 陰性胃癌のホルマリン固定パラフィン包埋検体を使用した。MUC2/5AC/6 と CD10 の発現を免疫組織化学的に検索した。癌細胞の 25%以上の陽性像をもって、それぞれの陽性群とした。MUC5AC あるいは MUC6 陽性群を「胃型」、MUC2 あるいは CD10 陽性群を「腸型」、両者陰性を「null 型」、両者陽性を「混合型」に分類した。その結果、EBV 関連胃癌では null 型および胃型をそれぞれ 44%(8 例)、39%(7 例)の腫瘍が示し、非 EBV 関連胃癌の 7%(4 例)、30%(17 例)より有意に多かった。つまり、EBV 関連胃癌は null 型、胃型を示すことが有意に多いことがわかった。このことは EBV 関連胃癌が腸上皮化生を経由しない胃粘膜本来の性格を呈することを意味し、EBV 関連胃癌は胃固有の幹細胞により近い細胞が発生母地であることが示唆された。

EBV 関連胃癌は高頻度に DNA のメチル化状態を示すことが知られるため、MUC2 遺伝子および MUC5AC 遺伝子のプロモータ域の DNA メチル化状態をメチル化に感受性を示す制限酵素処理後の PCR 法にて検索した。凍結材料が保存さ

れていた21例の胃癌、うちEBV関連胃癌は3例、と組み替えEBVを感染させた6つの胃癌細胞株(MKN1, MKN7, MKN74, TMK-1, NU-GC-3, AGS)について検索した。抽出したDNAをメチル化DNAに感受性のある制限酵素 *HpaII* で消化後、*MUC2* および *MUC5AC* のプロモータ域に特異的なプライマーを利用して、PCRにて増幅して検索した。その結果、*MUC2* はすべての胃癌症例でメチル化状態であり、EBVの有無による違いは明らかでなかった。*MUC5AC* では18例でメチル化状態、3例で非メチル化状態であったが、EBVの有無による違いはなかった。免疫組織化学的な *MUC2/5AC* の発現とも比較したが、メチル化状態による発現の違いは見られなかった。培養細胞株ではEBVの感染によるメチル化状態の変化が見られた。NU-GC-3ではEBV感染の前後で *MUC2* が非メチル化状態からメチル化に変化した。また、TMK-1, MKN1, NU-GC-3では *MUC5AC* が非メチル化状態からメチル化に変化した。EBVによる宿主側DNAのメチル化亢進の一端と考えられた。しかし、これらのメチル化状態の変化は免疫組織化学的発現の変化は伴わなかった。*MUC2/5AC* の発現には他の部位のDNAメチル化が影響を与えている可能性があり、メチル化状態と発現の関連については、より一層の検索が必要と考える。

次に、ティッシュアレイを用い、東京大学医学部附属病院で切除された260例の胃癌について、転写因子である *sox2*, *cdx2* の免疫組織化学的発現、サイトケラチン

の発現を検索した。消化管では *sox2* と *cdx2* はそれぞれ胃と腸に特異的に発現していることが知られている。260 例中、EBV 関連胃癌は 32 例であった。EBV 関連胃癌では *sox2* の陽性率が有意に高く(75%、非関連胃癌では 28%)、*cdx2* の陽性率は低かった(13%、非関連胃癌では 57%)。粘液形質に関する研究と同様、EBV 関連胃癌は胃本来の特徴を保っていると考えられ、胃固有の幹細胞が発生母地であると考えられる結果であった。

最後にサイトカインに関して、胃癌の高危険群を明らかにするため、*interleukin 10* (*IL10*), *tumor necrosis factor alpha* (*TNF $\alpha$* )のプロモータ域の遺伝子多型を検索した。*IL10* は抗炎症作用をしめすサイトカインで、-1082, -819 ほかに多型があり、*IL10* の発現に影響を与えている。*TNF $\alpha$*  は proinflammatory サイトカインの一つで-308, -238 の多型は自己免疫性疾患や臓器移植での炎症反応に関連していると報告されている。*IL10*, *TNF $\alpha$*  ともに胃癌を含め、癌での発現も検索が進められている。自治医科大学附属病院で切除された 130 症例の胃癌の胃粘膜と 103 人の健常なボランティアの血液を使用した。胃癌 130 例中、EBV 関連胃癌は 22 例であった。PCR-RFLP 法で *IL10*-1082, *IL10*-819, *TNF $\alpha$* -308, *TNF $\alpha$* -238 の4箇所を検索した。その結果、健康者では *IL10*-1082 は AA/GA/GG の allele をそれぞれ 96/3/0 例が示した。*IL10*-819 では CC/CT/TT 14/37/48, *TNF $\alpha$* -308 GG/GA/AA 101/2/0, *TNF $\alpha$* -238 GG/GA/AA 101/2/0 であった。これらは日本人あるいは東アジアでの他の研究報告とほぼ似た

結果であった。日本では欧米と比べると *IL10*-1082\*G と *TNFa*-308\*A が少なく、*IL10*-819\*T が多い。胃癌患者では *IL10*-1082 AA/GA/GG 124/3/0, *IL10*-819 CC/CT/TT 12/62/49, *TNFa*-308 GG/GA/AA 120/2/5, *TNFa*-238 GG/GA/AA 123/2/2 の分布を得た。他の東アジアでの報告と似た結果であった。これらの結果を元に EBV 関連胃癌、非関連胃癌、体部発生、下部発生、*Helicobacter pylori* の有無との関連を検索した。*H. pylori* は PCR 法で検出を試み、130 例中 98 例で陽性であった。*TNFa*-308\*A が EBV 非関連下部発生胃癌で有意に多く、一方、*TNFa*-238\*G は胃癌の中で *H. pylori* 感染との関連があった。*TNFa*-308\*A, -238\*G はともに *TNFa* の高産生群とする報告があり、これらはより高レベルの炎症と関連している。これら 2 つの多型を有する人は *H. pylori* が感染した場合、慢性炎症が強く、より遷延することが予想され、*H. pylori* や慢性炎症と関連した胃癌発生と関連している可能性が考えられた。*IL10* の多型については EBV の有無を含め、臨床病理学的因子との関連は明かでなかった。

本研究では、EBV 関連胃癌は粘液形質では null 型あるいは胃型の形質を示すことが多く、胃固有の幹細胞に近い細胞を発生母地としていることが分かった。胃および腸に特異的な転写因子 *sox2*, *cdx2* の検索でも同様の結果を得た。また、サイトカイン *IL10*, *TNFa* の遺伝子多型の検索では、日本人は *TNFa*-308\*A, -238\*G の多型が *H. pylori* による慢性炎症を介した下部胃癌の発癌に関連していることが明ら

かになった。

私の母国バングラデシュでも胃癌は多いが、進行癌で見つかることが多い。病理組織学的、分子生物学的、あるいは疫学的手法を用いて、母国でも胃癌研究を行い、人種差・地域差を含め、胃癌の発癌の解明を進めたい。