

## 論文の内容の要旨

論文題目 EBV 関連胃癌におけるケモカインの発現

指導教員 深山正久教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 新谷裕加子

### 1. 序章

Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌は胃癌全体の 5-10%を占めており、EBV が発癌、癌の維持に密接に関与していると考えられている。通常の胃癌と比べて、男性優位が著明で、体上部に多く、比較的予後良好である。組織学的には、リンパ上皮腫類似胃癌を含め、間質のリンパ球浸潤が多いという特徴があり、臨床・病理学的に特異な一群を形成している。

癌周囲の炎症性細胞は Tumor infiltrating cells (TIC)、Tumor infiltrating lymphocytes (TIL)、Tumor associated macrophage などとよばれ、直腸癌などでは予後良好な因子である。TIL/TIC と癌細胞の関係については、大腸癌や甲状腺乳頭癌でケモカインの関与が報告されている。EBV 関連胃癌に見られる TIC の中心となるのは CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞である。EBV 関連胃癌では IL-1 $\beta$  に代表されるサイトカインを高発現しており、これによりケモカインが活性化され、TIC の有無や癌細胞の維持、増殖に関与している可能性が考えられた。本研究では EBV 関連胃癌におけるケモカインの関与を明らかにするために、癌細胞、TIC それぞれにおけるケモカイン発現と臨床病理学的要因とを調べ、網羅的に検討した。

### 2. 外科材料を用いたケモカインの発現検索

外科的切除胃癌症例 278 例について、ケモカインと受容体の発現を免疫組織化学的に検索した。切除標本から Tissue Array を作成し、CC、CXC ケモカインの中から、癌や EBV との関係が報告されている 7 種類のリガンド (CCL2, 5, 18, 20, CXCL1, 8, 10) と、3 種類のレセプター (CCR5, 6, CXCR4) について免疫組織化学的染色を行った。また、癌巣内の TIC や線維化の程度、正常粘膜の腸上皮化生や萎縮の有無についても評価した。ケモカイン、受容体の発現は癌細胞、TIC それぞれについて評価し、EBV の有無と臨床病理学的因子との関係を検討した。

*EBER1 in situ hybridization* 法を行い EBV の有無を確認したところ、EBV 関連胃癌は 278 例中 31 例であった。臨床病理学的因子について EBV 感染の有無で検討した結果、EBV 関連胃癌は非関連胃癌に比べ、若年者に多く見られ、胃体上部の癌が多かった。EBV と進行癌との関連は見られなかったが、EBV 関連胃癌では脈管侵襲、リンパ節転移が少なく、単核球浸潤が高度であった。また、単核球浸潤の高度な例のみで検討した結果、EBV 関連胃癌は男性により多くみられた。これはいずれも既報告と一致していた。

#### 癌細胞におけるケモカイン発現

EBV 関連胃癌では非関連胃癌に比べて CCR6 陽性癌細胞が多くみられ、CCL2, 5, 20, CCR5, CXCL1 陽性癌細胞が少ないことがわかった。EBV 感染に伴う CCR6 の発現が EBNA-1 陽性細胞や EBV 感染 B 細胞で報告されており、胃癌細胞においても EBV 感染が原因となる CCR6 高発現が考えられた。さらに、非関連胃癌の中でケモカイン発現と臨床病理学的因子との関連を見ると、CCL5, 20, CXCL1, 8, CXCR4 と癌の進行度の指標との間に強い正の相関が見られた。CCL20 は、様々な癌での発現が報告されており、大腸癌においては転移への関与も報告もされている。CXCL1 と CXCL8 はいずれも ELR ケモカインで血管新生に促進的に働き悪性化に働くことが知られているが、CXCR4 のリガンドである CXCL12 も ELR ケモカインである。CXCR4 は多くの癌で骨転移との関与も報告されており、胃癌でも悪性化に強く関わっていることが再確認できた。

#### TIC におけるケモカイン発現

EBV 関連胃癌では非関連胃癌に比べて、CCR5, 6, CXCL1, 10 の陽性率が高かった。なかでも、CXCL10 は EBV 関連胃癌で顕著に多くみられた。CXCL10 は Hodgkin 病や鼻咽頭癌でも EBV 感染に伴って腫瘍細胞と周囲のリンパ球の両方で陽性となることが報告されている。CXCL10 や、CCR6 のリガンドである CCL20、CCR5 のリガンドである CCL5 は EBV 関連胃癌で高発現する IL-1 $\beta$  により上昇し、ま

た、腸管などでの炎症に伴い IL-1 $\beta$  とともに CXCL1 が上昇することも報告されている。いずれも、EBV 感染に伴う IL-1 $\beta$  の高発現によって、多様なケモカインを発現する浸潤細胞が集まった可能性が考えられた。また、CCR5, 6, CXCL10 などの Th1 ケモカインの関与は EBV 関連胃癌では非関連胃癌より腫瘍免疫が亢進していることを示す結果と考えられ、EBV 関連胃癌が比較的予後良好であることを示していると考えられた。

胃癌では EBV 感染に伴って、癌細胞でも TIC でも CCR6 が高発現していた。CCR6 のリガンドである CCL20 は EBV 関連胃癌で高発現する IL-1 $\beta$  により誘導されるため、CCL20/CCR6 が EBV 関連胃癌の維持や増殖と癌周囲における腫瘍免疫の亢進との両方に関与している可能性が考えられた。

### 3. 胃癌細胞株での発現、増殖刺激の検討

外科材料でのケモカイン発現の結果から、非関連胃癌と比べ EBV 関連胃癌において、癌細胞と TIC の両方で高発現していた CCR6 に着目した。CCR6 のリガンドである CCL20 は癌の悪性化と関係するが、EBV 関連胃癌で高発現する IL-1 $\beta$  により、癌細胞やリンパ球だけでなく線維芽細胞、好中球などからも一過性に高発現することが知られている。線維芽細胞、間質からの CCL20 の発現や、その変動は今回の免疫組織化学的染色からは捕らえにくいと考え、第三章では、胃癌細胞株を用いて EBV 感染と CCL20/CCR6 発現の関係や CCL20 による EBV 関連胃癌の増殖刺激への影響を検討した。

ヒト胃癌細胞株 6 種 (MKN-1, MKN-7, MKN-74, NU-GC-3, TMK1, AGS) とその EBV 持続感染株、EBV 関連胃癌から細胞株化された SNU-719 について、CCL20/CCR6 の発現量を調べた。western blotting の結果、EBV 感染に伴う CCR6 発現は MKN-1, MKN-74, AGS では著明な増加、NU-GC-3 では軽度増加を認めた。MKN-7 では EBV 感染前後で CCR6 発現量に変化がなく、TMK1 では EBV 感染により低下していた。一方、CCL20 は NU-GC-3 と SNU-719 で多く発現していたが、この他の細胞株での発現量は少なく、EBV 感染に伴い NU-GC-3 では低下、MKN-7 では増加していたものの、他の細胞株では EBV 感染前後で有意な変化を認めなかった。

SNU-719 の他に、EBV 感染に伴い CCR6 が増加していた MKN-1, NU-GC-3, EBV 感染前後で CCR6 発現に変化のなかった MKN-7 について、CCL20 添加による増殖能、アポトーシス率について検討した。

増殖能については、CCR6 を高発現していた SNU-719 と MKN-1、NU-GC-3 の EBV 持続感染株では CCL20 により増殖率が、1.35 倍、1.5 倍、1.2 倍になった。しかし、EBV 感染前後で CCR6 発現量に差のなかった MKN-7 では変化を認めず、EBV 感染による CCR6 の発現誘導と CCR6 発現量に依存した CCL20 の増殖刺激効果が示された。

アポトーシス率については、EBV 持続感染株である SNU-719 で CCL20 の添加によりアポトーシス率が減少したが、MKN-1、NU-GC-3、MKN-7 では EBV の有無によらずアポトーシス率に変化はなかった。SNU-719 においても、増殖率の変化に比べるとアポトーシス率の低下はわずかであり、アポトーシス以外の機序による増殖率の変化が主体と考えられた。

#### 4. まとめ

EBV 関連胃癌では EBV が発癌、癌の維持に密接に関与していると考えられる。EBV 関連胃癌では IL-1 $\beta$  に代表されるサイトカインが高発現しており、癌と周囲に浸潤する炎症性細胞(TIC)の間にケモカインが関与している可能性がある。本研究では、免疫組織化学的手法を用いて、ケモカインの発現を癌細胞、TIC 両者において詳細に検討した。

癌細胞におけるケモカイン発現に関しては、EBV 関連胃癌で非関連胃癌に比べて CCR6 陽性癌細胞が有意に多く認められた。引き続き胃癌培養細胞株による検討では、EBV 感染による CCR6 発現誘導と、さらに CCR6 高発現に伴う CCL20 の増殖刺激効果が確認された。

TIC におけるケモカイン発現に関しては、EBV 関連胃癌で CCR5、6、CXCL1、10 の陽性率が高く、EBV 関連胃癌が産生する IL-1 $\beta$  に関連した腫瘍随伴現象である可能性が考えられた。

非関連胃癌での癌細胞におけるケモカイン発現に関しては、CCL5、20、CXCL1、8、CXCR4 発現と癌の進行度の指標との間に強い正の相関が見られた。

非関連胃癌での TIC におけるケモカイン発現に関しては、CCL18、CXCL1 発現と癌の進行度に強い正の相関がみられた。

本研究によって、胃癌におけるケモカインは、EBV 関連、非関連胃癌、それぞれに特徴的な意義を持っていることが確認され、とくに EBV 関連胃癌では CCR6/CCL20 が積極的に腫瘍増殖に関わっていることが明らかになった。