

## 論文の内容の要旨

論文題目 Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌における、Met の発現と活性化について

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 井上揚子

### 序論

Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌は胃癌全体の 5 から 18%を占め、世界中に広く分布している。本邦での発生件数は、年間 5,000 例以上、全世界では年間 80,000 例を超えると推測されている。EBV 関連胃癌は、胃癌の中で、臨床的・病理学的に特異な一群を形成していることから、その発癌機構、癌維持機構、悪性化に独自のものがあることが予想される。

*c-met* 遺伝子は、胃癌において代表的な癌遺伝子である。その遺伝子にコードされた蛋白質である Met は、HGF (hepatocyte growth factor) をリガンドとするチロシンキナーゼ型レセプターである。Met は HGF と特異的に結合することで、HGF の作用である上皮性細胞の増殖、遊走、形態形成に関与する。特に、癌細胞においては、その浸潤・転移に関与する scatter factor として注目されており、癌細胞の分離や分散に関与している。Met の過剰発現は多くの悪性腫瘍で予後不良因子と考えられ、胃癌においても悪性度に関与する。

### 目的

EBV 関連胃癌における癌遺伝子 *c-met* の意義を明らかにするために、胃癌組織における Met の発現を免疫組織化学的に検索し、臨床病理学的因子との相関を比較検討した。さらに、現在、EBV 関連胃癌から細胞株化された唯一の細胞株である SNU-719 細胞を用いた検討を加えた。

## 材料と方法

症例は、1990年から2007年までに東京大学医学部附属病院で外科的に切除された胃癌905例を用いた。外科切除例の使用およびTMA (Tissue micro array) の構築については、東京大学医学部倫理委員会の承認を得た。

EBV関連胃癌細胞株 SNU-719 細胞と、ヒト胃癌細胞株 MKN-1 細胞と、NU-GC-3 細胞の EBV 持続感染胃癌細胞を用いた。

Western blotting で、Met 蛋白の発現、および、活性化 (リン酸化) Met 蛋白の発現解析を行い、Met のリガンドである HGF 添加、scatter assay、Met の mutation の検討、EBV 関連蛋白発現細胞株での検索、RNA 干渉による Met 蛋白の抑制などを行った。

## 結果、考察

**胃癌腫瘍組織における Met 発現:** 胃癌手術検体を用いた免疫組織化学的検討で、Met 強陽性例を、905 病変中 495 病変 (54.7%) に認めた。Met 強陽性例は、男性 ( $p=0.002$ )、65 歳以上の症例 ( $p<0.0001$ )、進行癌 ( $p=0.005$ )、リンパ管侵襲陽性例 ( $p=0.01$ )、静脈侵襲陽性例 ( $p<0.0001$ )、リンパ節転移陽性例 ( $p=0.025$ ) などの予後不良因子との有意な相関を認めた。EBV 関連胃癌 56 症例中の Met 強陽性例は 39 例 (69.6%) で、Met 強陽性例と、EBV 関連胃癌との間に有意な相関が認められた ( $p=0.02$ )。

**EBV 関連胃癌細胞株 SNU-719 を用いた検討:** SNU-719 細胞は、現在、EBV 関連胃癌から細胞株化した唯一の細胞株である。SNU-719 細胞では、Western blotting において、Met 蛋白および、それに対応した活性化 (リン酸化) Met 蛋白の強い発現が認められ、構成的に Met が活性化していた。EBV 関連胃癌における、Met の構成的な活性化の意義を検討するため、Met のリガンドである HGF を添加し、さらに刺激を行った。HGF 添加後の Western blotting において、Met 蛋白のリン酸化 (p-Met 蛋白) にやや増強がみられたが、細胞に形態変化は認められなかった。そして、HGF の添加により、増殖率の増加も認められなかった。これらのことから、SNU-719 細胞においては、定常状態で既に十分な Met の活性化が起きていると考えた。

一般的に、Met の活性化は、リガンドである HGF との結合により 2 量体化することで起きるが、その他、*c-met* 遺伝子の tyrosine kinase domain の point mutation にるもの、そして、*c-met* 遺伝子の遺伝子増幅による overexpression により、一本鎖の Met 受容体が近接して二量体化することで、リガンド非依存性に Met の活性化が起きる。

まず、リガンドである HGF を自己分泌していることについて検討した。胃癌細胞株 (SNU-484) は、Met のリガンドである HGF を自己分泌し、その癌細胞が発現している Met 受容体に作用している。しかし、今回、MDCK 細胞を用いた scatter assay の結果からは、SNU-719 細胞において、autocrine 的な機序は否定的であった。次に、*c-met* 遺伝子の tyrosine kinase domain の point mutation により、Met が構成的に活性化することを検討した。胃癌症例において、*c-met* 遺伝子の tyrosine kinase domain の point mutation は、

1%以下と低頻度である。今回検討した、SNU-719 細胞にも *c-met* 遺伝子の tyrosine kinase domain の point mutation は認められなかった。

最後に、Met の発現亢進の機序として、*c-met* 遺伝子の遺伝子増幅による overexpression により、一本鎖の Met 受容体が近接して二量体化することで、リガンド非依存性に Met の活性化がおきている可能性を検討した。EBV 関連胃癌から細胞株化した SNU-719 細胞においては、*c-met* 遺伝子の遺伝子増幅は認められなかった。

以上のことから、SNU-719 細胞においては、Met の発現亢進を介して、構成的な活性化が起こっているものと考えた。そして、その SNU-719 細胞における Met 発現亢進の機序として、EBV 感染が関与している可能性が挙げられる。

そこで、Met 蛋白の発現が弱く、リン酸化 Met 蛋白の発現が認められなかった、胃癌細胞株 MKN-1 細胞に、EBV の I 型潜伏感染で発現している遺伝子 (BARF0、EBER、EBNA1、LMP2A) を個々に発現させ、リン酸化亢進に寄与しているウイルス遺伝子産物の同定を試みた。その結果、MKN-1 細胞に、EBER を強制発現させた状態で、Met 蛋白の活性化 (リン酸化) 亢進が認められた。すなわち、EBV 関連蛋白の EBER が、Met の構成的活性化に寄与している可能性が示唆された。

さらに、Met が構成的に活性化している SNU-719 において、siRNA を用いて、Met 蛋白の抑制をした。Met 蛋白が抑制され、同時に、その活性化 (リン酸化) 蛋白も抑制された。Met に対する siRNA を導入した細胞の増殖率は、siRNA negative control を導入した細胞と比較して、有意な低下を示した ( $p < 0.01$ )。この結果は、Met 阻害剤が、EBV 関連胃癌に対しても有効な治療手段となる可能性を示しており、これからの Met を分子標的とした治療においても重要になると考えた。

## まとめ

EBV 関連胃癌の発癌、進展過程を解明するため、Met の発現、活性化に着目した。

胃癌組織マイクロアレイを用いた免疫組織化学的検索では、Met の発現は EBV 関連胃癌に有意に多く認められた。

EBV 関連胃癌において、Met が発現亢進、構成的活性化をきたしており、Met の構成的活性化に EBV の EBER が関与していることが示唆された。

Met が、EBV 関連胃癌の腫瘍組織における細胞増殖能に関与している可能性がある。

EBV 関連胃癌は、胃癌の中で、原因が特定できる癌であり、その発癌、進展機構の解明は、他の胃癌の研究や、ウイルス関連腫瘍にも重要な知見をもたらすものとする。

Met の過剰発現は、胃癌をはじめ、膵臓癌、肺癌、腎癌など、多くの悪性腫瘍において浸潤や転移に関与する予後不良因子と考えられ、その活性化の解明は、これからの分子標的治療においても重要になるであろう。そして、Met を阻害する分子標的薬は、アメリカでは臨床試験 phase II の段階まで進んでおり、日本でも臨床試験 phase I が開始された。

EBV 関連胃癌にも、これらの治療法が応用できる可能性がある。