

## 論文の内容の要旨

論文題目 Epstein-Barr Virus 関連胃癌における上皮細胞間接着分子の発現および

microRNA による発現制御機構の解明

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 16 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

篠崎 綾

Epstein-Barr Virus (EBV)関連胃癌は特徴的な臨床病理像を呈する胃癌であり、胃癌全体の 8~11%を占める。EBV 関連胃癌の腫瘍細胞にはモノクローナルな EBV の感染が見られ、EBV はこの胃癌の発癌の過程に深く関与していると考えられる。これまでの研究で、EBV 胃癌において、DNA メチル化に代表されるエピジェネティクス異常による癌抑制遺伝子の発現低下や EBV 潜伏感染遺伝子による細胞内シグナル伝達の異常などが見られることが報告され、EBV 関連胃癌における発癌機構が明らかにされつつある。

上皮細胞間接着装置であるタイトジャンクション、アドヒアレンスジャンクションとそれぞれを構成する分子である Claudin(CLDN) family、E-cadherin の発現の異常は種々の上皮性腫瘍において報告されている。これらの接着分子の発現低下や発現異常は上皮細胞相互の接着性の低下をまねき、癌の発生や浸潤の初期のステップとして重要な現象である。また、上皮細胞の分化、機能維持という点でもこれらの分子は重要な役割を果たす。そこで本研究では EBV 関連胃癌におけるこれらの接着分子の発現について、細胞学的な分化・形質の特徴、および発癌に至る過程とその制御機構という二つの観点から検討した。

EBV 関連胃癌 43 例、EBV 陰性胃癌 68 例について免疫組織化学的に CLDN 1、CLDN3、CLDN4、CLDN7、CLDN18 の発現を検討した。正常の臓器における代表的な CLDN 分子の発現から、CLDN18 が胃型、CLDN3 が腸型の形質を最もよく反映していることがわかり、この 2 つの分子の発現パターンに基づいて、胃癌を胃型(G-CLDN)、腸型(I-CLDN)、混合型(M-CLDN)、未分化型(U-CLDN)4 つの形質に分類した。EBV 陰性胃癌ではすべてのタイプに比較的均等に分類されたのに対し、EBV 関連胃癌の 84%が G-CLDN に分類され、腫瘍細胞の分化という点で均質な群であることが示された。さらに胃型および腸型粘液形質の発現を調べると、EBV 関連胃癌では胃型粘液のみを発現するもの、または粘液形質を全く発現しないものが大部分を占めていた。これは正常胃粘膜の腺頸部増殖帯に存在する胃上皮幹細胞と考えられる未熟な細胞における発現パターンと同じであり、EBV 関連胃癌の腫瘍細胞はこれらの細胞に類似した形質を保持していると考えられた。

さらに EBV 関連胃癌のモデルとなる細胞株として、cell to cell contact method という、組換え EBV を有する Akata 細胞と胃癌細胞株との共培養で得られた EBV 持続感染胃癌細胞株を用いて、CLDN の発現を検討したところ、MKN74 細胞株で EBV 感染により CLDN3、CLDN4、CLDN7 の発現が低下した。さらに EBV 関連胃癌で発現している 4 つの EBV 潜伏感染遺伝子(*BARF0*、*EBERs*、*EBNA1*、*LMP2A*)を導入した MKN74 細胞株での CLDN の発現を検討したところ、*EBERs* を導入したもので CLDN 3、CLDN4、CLDN7 の発現が低下しており、EBV 関連胃癌におけるこれらの分子の発現低下に EBER が関与していることが明らかになった。

次に EBV 関連胃癌における E-cadherin の発現について検討した。EBV 関連胃癌においては、EBV 陰性胃癌に比べ有意に E-cadherin の発現が低下していた。そこで E-cadherin の制御に関わる microRNA(miRNA)として近年報告されている、miR-200 family のうち、miR-200a、miR-200b について発現を検討したところ、EBV 関連胃癌の癌組織において特異的にこれらの miRNA の発現が低下していることが明らかになった。miR-200 family は E-cadherin の転写抑制因子である *ZEB1*、*ZEB2* の mRNA をターゲットとして、これらの翻訳を阻害するこ

とで、E-cadherin の発現を制御していることが分かっている。細胞株を用いた検討では、EBV 持続感染株のうち、4 つの細胞株で EBV 感染に伴って E-cadherin の発現低下が見られた。特に MKN74 の EBV 持続感染株(MKN74-EBV)においては、著明な細胞形態の変化、細胞相互の接着性の低下を伴っていた。この細胞株において、miR-200 family の低下、ZEB1、ZEB2 の亢進がみられており、これらが E-cadherin の発現の低下を来たしていたと考えられた。同様の現象は EBER を導入した MKN74 でも再現され、この現象に EBER が寄与していることが示された。

本研究の結果から、EBV 関連胃癌において EBER が miR-200 family の発現を抑制し、ZEB1、ZEB2 の発現亢進を介して E-cadherin の発現を抑制することにより、細胞相互の接着性の低下を来たすという新たな発癌メカニズムの一端を解明することができた。