

論文の内容の要旨

論文題目 EBV 関連胃癌におけるクロマチンリモデリング因子 ARID1A
及びウイルス由来 microRNA の検討
氏名 阿部 浩幸

第一章 序文

胃癌は約 10%に Epstein-Barr Virus (EBV)のモノクローナルな感染が認められ、EBV 関連胃癌と呼ばれる。EBV 関連胃癌は、低分化腺癌に豊富なリンパ球浸潤やリンパ濾胞形成を伴う lymphoepithelioma-like carcinoma と呼ばれる組織像と、高齢者・男性に多く残胃癌や多重癌が多いといった臨床病理学的特徴を有し、独立した疾患単位を形成する。近年の研究により、EBV 関連胃癌では LMP2A 等の潜伏感染遺伝子が発現し、また宿主細胞のゲノムに広範な DNA メチル化が生じるなど、他の胃癌とは異なる分子生物学的特徴が明らかにされてきた。

本研究では EBV 関連胃癌について、クロマチンリモデリング因子 ARID1A とウイルス由来 microRNA (miRNA)という二つの観点から検討した。

第二章 クロマチンリモデリング因子 ARID1A と EBV 関連胃癌

1. 背景・目的

クロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF はクロマチンの構造を変えることにより多くの遺伝子の発現を制御している。最近になって胃癌のゲノムワイドな whole exome sequence の研究により、EBV 関連胃癌とマイクロサテライト不安定性胃癌で、SWI/SNF のサブユニットの一つである ARID1A の遺伝子変異・発現消失が高率に生じると報告された。しかし ARID1A 発現消失の臨床病理学的意義や、EBV 関連胃癌に遺伝子変異が多い理由は不明である。そこで胃癌手術検体の免疫組織化学による、ARID1A 発現消失の臨床病理学的検討を行った。

2. 材料と方法

まず、胃癌手術検体 857 例の tissue microarray を用いた免疫組織化学的検討により、ARID1A 発現消失は EBV 関連胃癌(23/67; 34%)と MLH1 陰性(マイクロサテライト不安定性の指標)胃癌(40/136; 29%)に、その他の胃癌(以降、EBV(-)MLH1(+))胃癌と表記(32/657; 5%)と比べ有意に高率に認められた。ARID1A 発現消失群は噴門側に多く、最大径が大きく、進行癌が多く、リンパ管侵襲・静脈侵襲が高頻度であった。さらに症例を EBV 関連胃癌、MLH1 陰性胃癌、EBV(-)MLH1(+))胃癌の 3 群に層別化して解析したところ、EBV(-)MLH1(+))胃癌では

ARID1A 発現消失群で進行癌が多く高頻度なリンパ管侵襲・静脈侵襲・リンパ節転移を伴い、独立した予後不良因子となった。しかし、EBV 関連胃癌や MLH1 陰性胃癌ではこれらの相関を認めなかった。

EBV 関連胃癌では ARID1A 発現消失は進行癌・早期癌ともに同頻度で認められ、また whole section を用いた検討では腫瘍全体に均一に発現消失を認めた。また EBV 陽性の微小な異型上皮でも ARID1A 発現消失を認める症例があった。しかし、EBV 陽性の他の悪性腫瘍(鼻咽頭癌 8 例及び悪性リンパ腫 15 例)では ARID1A 発現は保たれており、また胃癌細胞に実験的に EBV を感染させても ARID1A 発現は変化しなかった。

3. 考察

ARID1A は卵巣明細胞癌等の特定の癌種で高率な遺伝子変異・発現消失が報告されており、また実験的な検討では細胞増殖を抑制する働きが示されているため、癌抑制遺伝子に類似した役割を果たすと考えられている。しかしながら、ARID1A 発現消失が予後不良因子となるかどうかについては意見が分かれている。本研究では EBV(-)MLH1(+)胃癌において ARID1A 発現消失が独立した予後不良因子となったが、EBV 関連胃癌や MLH1 陰性胃癌では相関を認めず、発癌経路によりその臨床病理学的意義が異なると考えられた。さらに本研究により、EBV 関連胃癌では ARID1A の変異・発現消失は発癌早期の変化であるが、EBV 感染自体が ARID1A の発現消失を引き起こすわけではないと考えられた。EBV 関連胃癌において EBV 感染は発癌早期の変化とされていることから、ARID1A の遺伝子変異・発現消失は発癌の早期に、EBV 感染に先行して生じると推察される。ARID1A の発現消失は、EBV の感染効率を高めたり、EBV 感染によって生じる細胞内の異常(DNA メチル化等)を促進したりするのかもしれない。

第三章 EB ウイルス由来 microRNA の発現と細胞外分泌

1. 背景・目的

miRNA は 20 塩基前後から成る non-coding RNA の一種で、mRNA に結合して転写後翻訳抑制を行うことで癌の病態に深く関わるということが知られてきた。また miRNA の一部は、細胞外に脂質二重膜から成る小胞(exosome)に含まれる形で分泌されて癌周囲微小環境に作用していることが分かってきた。EBV はヒト細胞には無いウイルス独自の miRNA を持つため、本研究ではウイルス由来 miRNA の産生・分泌を細胞株を用いた実験により解析し、EBV 関連胃癌の発癌と進展における役割を検討した。

2. 方法と結果

Real time PCR 法を用いた検討により、EBV 関連胃癌由来の細胞株である KT と SNU719 ではウイルス由来 miRNA のうち BART7 の産生量が最も多いことが判明した。KT の xenograft を接種された SCID マウスの血清や、SNU719 の培養液上清から得た exosome でも BART7 が最も

豊富に含まれており、ウイルス由来 miRNA が細胞外に分泌されていることが分かった。

EBV 関連胃癌の患者血清から BART7 を検出することができれば、腫瘍マーカーとして役立つ可能性がある。そこで EBV 関連胃癌患者 5 名の血清から RNA を抽出し、BART7 の検出を試みたが、検出できなかった。

続いて、EBV 陰性胃癌細胞株である MKN74、NUGC3、MKN7 と、これらに EBV を持続感染させた株とで exosome の合成を比較した。その結果、exosome の合成は EBV 感染株の方が非感染株より多く認められた。また細胞外への分泌も EBV 感染により促進されることが明らかとなった。EBV 関連胃癌において発現している EBV 潜伏感染遺伝子 4 種(LMP2A、EBNA1、EBERs、BARF0)を各々単独で導入した株を用いて検討したが、exosome の増加は単独遺伝子の導入では認められなかった。

分泌された exosome が他の細胞に取り込まれるかどうかを検討するため、SNU719 の培養上清から超遠心により濃縮した exosome を蛍光色素 PKH67 で標識し、T リンパ球細胞株 Jurkat に加えて共焦点顕微鏡で観察した。その結果、Jurkat の細胞質内に exosome の取り込みを確認できた。また Jurkat 細胞から BART7 miRNA が検出でき、ウイルス由来 miRNA が exosome を介して胃癌細胞からリンパ球へと伝達されることが分かった。さらに、Jurkat に BART7 を導入すると細胞増殖能が抑制されることが分かり、BART7 はリンパ球の増殖を抑制して腫瘍免疫を制御する方向に働くことが示唆された。

BART7 の機能を検討するため、Jurkat への BART7 導入時の遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。54675 個のマイクロアレイのプロープのうち BART7 導入により発現が低下した遺伝子 324 個と、miRNA 標的遺伝子予測プログラム RepTar により BART7 の標的として予測された遺伝子 846 個とを比較することで、16 個の共通する遺伝子を抽出できた。

3. 考察

ウイルス由来 miRNA の検討では、細胞内及び細胞外(血清ないし細胞培養液)の両方で、BART7 が最も多く検出された。鼻咽頭癌における過去の報告でも BART7 が多い点は同様の結果であったが、胃癌では少なかった他の miRNA で多く検出されているものがあり、鼻咽頭癌と胃癌ではウイルス由来 miRNA の発現プロファイルが異なると考えられた。BART7 の血清診断マーカーとしての有用性を検討するため、EBV 関連胃癌の患者血清で BART7 の検出を試みたが、検出することはできなかった。腫瘍を接種した SCID マウスに比べ、体重に比した腫瘍重量が極めて小さかったこと、胃癌では鼻咽頭癌と比べウイルス由来 miRNA の産生量が少ないこと、等が原因かもしれない。

細胞外へ exosome を介して分泌されたタンパクや miRNA が、腫瘍細胞以外の細胞に取り込まれて腫瘍周囲微小環境の制御に働くことが、様々な悪性腫瘍で報告されている。本研究では EBV 関連胃癌細胞株から細胞外に分泌された exosome 及びその中に含まれる BART7 が、T リン

パルチ細胞株 Jurkat に取り込まれることを示した。BART7 を Jurkat に導入すると細胞増殖が抑制されることも判明した。BART7 の機能及び標的遺伝子はまだ明らかにされていないが、EBV 関連胃癌では腫瘍細胞周囲に豊富なリンパ球浸潤を伴うことを合わせて考えると、exosome 及びウイルス由来 miRNA が EBV 関連胃癌でも周囲微小環境制御に作用することが示唆される。

さらに本研究では、BART7 導入による遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析し、*in silico* の標的予測プログラムと併用することで、標的遺伝子の候補を絞り込むことができた。今後は各候補のタンパクレベルでの発現変化やその機能の検討が課題となる。

第四章 結語

胃癌におけるクロマチンリモデリング因子 ARID1A の発現消失は、EBV 陰性かつ MLH1 発現の保たれた胃癌では独立した予後不良因子であるのに対し、EBV 関連胃癌や MLH1 陰性胃癌では予後等の臨床病理学的因子と相関せず、ARID1A の臨床病理学的意義は発癌経路により異なることが判明した。さらに EBV 関連胃癌では、ARID1A 発現消失は発癌過程の早期に EBV 感染に先行して起こることが示唆された。

EBV 関連胃癌では BART7 をはじめとした様々なウイルス由来 miRNA の発現を認めた。また EBV 関連胃癌では exosome の合成・分泌が亢進し、exosome に含まれる形でウイルス由来 miRNA も細胞外に分泌されていた。分泌された exosome 及び miRNA は他の細胞株(T リンパ球)にも取り込まれることが分かり、癌細胞と周囲細胞との情報伝達に関わっていると考えられた。

現代のがん研究では、DNA 塩基配列変化以外のメカニズムによる遺伝子発現調節や細胞表現型の変化(広義のエピジェネティクス)が注目を集めている。EBV 関連胃癌におけるエピジェネティクス変化としてプロモーター領域の DNA メチル化が良く知られているが、今回はクロマチンリモデリングと microRNA の二つに着目して研究を行った。BART7 をはじめとしたウイルス由来 microRNA とクロマチンリモデリング因子 ARID1A の EBV 関連胃癌における意義について、解明すべき課題は多く、今後の更なる研究が必要である。

(3945 字)