

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19074

研究課題名(和文)クロマチン調節因子に着目した胃癌(特にEBV関連胃癌)の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of EBV-associated gastric cancer pathogenesis focused on chromatin remodelers

研究代表者

阿部 浩幸 (Abe, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40708632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌、特にEBV関連胃癌におけるARID1AとEZH2の役割を、in vitro実験及び外科手術材料の形態学的研究の両面から行った。

マイクロアレイでは胃癌細胞株にARID1Aをノックダウンすると細胞増殖やDNA合成を促進する遺伝子発現変化が起きることが分かった。胃癌切除検体の非腫瘍粘膜において多数切片で免疫染色を行うと、ARID1Aが消失した微小な病変が複数見出され、EBV関連胃癌の発生素地となっている可能性が示唆された。EBVに感染した胃癌細胞株でEZH2はSTAT3メチル化を引き起こしていること、EBV関連胃癌でEZH2過剰発現が予後不良因子となることを見出した。

研究成果の概要(英文)：I studied the role of ARID1A and EZH2 in gastric cancer (especially EBV-associated gastric cancer) with in vitro experiments and morphological analyses of surgical specimens. First, microarray analyses disclosed that knockdown of ARID1A in gastric cancer cell line induced expression change of genes related to cell proliferation and DNA synthesis. Second, I found that non-tumor background mucosa in the surgically resected specimen of gastric cancer harbored some small foci with loss of ARID1A expression, which might be a precursor lesion of EBV-associated gastric cancer. Third, in vitro analyses revealed EZH2 induced STAT3 methylation in an EBV-infected gastric cancer cell line. Lastly, clinicopathological analyses revealed overexpression of EZH2 is a poor prognostic factor in EBV-associated gastric carcinoma.

研究分野：人体病理学

キーワード：胃癌 EBV ARID1A EZH2

1. 研究開始当初の背景

AT rich interactive domain 1A (ARID1A)はクロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF の構成因子の一つであり、近年の網羅的がんゲノム解析により各種のがんで高率な遺伝子変異が報告されている。特に胃癌においてはマイクロサテライト不安定性胃癌(MSI-H)及び Epstein-Barr virus (EBV)関連胃癌において高率な遺伝子変異が報告されてきた(Nat Genet 2011;43:1219-23)。ARID1A の変異と免疫組織化学による発現消失とは高い相関を示すことが知られていたため、申請者らは胃癌手術検体を用いた免疫組織学的検討を行った。その結果、MSI-H 胃癌では腫瘍径の大きなものに ARID1A 発現消失の頻度が高いのに対し EBV 関連胃癌では腫瘍径や深達度等とほとんど相関が認められなかった。従って発癌経路により ARID1A 発現消失の持つ臨床病理学的意義が大きく異なり、特に EBV 関連胃癌においては ARID1A 変異・発現消失が発癌の初期に EBV 感染に先行して生じることが示唆された(Virchows Arch 2012;461:367-77)。また EBV 陰性胃癌で ARID1A 変異の高率な遺伝子変異が報告されている MSI-H 胃癌については免疫組織学的に腫瘍内の一部の clone のみに発現消失が見られる clonal loss pattern が高率に認められた(unpublished data)。同様の発現パターンは申請者らの肝細胞癌における検討でも認められ(Abe H et al. Int J Clin Exp Pathol 2015;8:2763-70)、癌種あるいは subtype の違いによる ARID1A 異常の意義の違いも明らかとなった。

一方、SWI/SNF と拮抗的に働くクロマチンリモデリング複合体 polycomb の構成因子 EZH2 の発現を約 150 例の胃癌手術検体で免疫組織学的に調べると EBV 関連胃癌ではその他の胃癌に比べ高発現していることが判明した。細胞株実験でも EBV 感染により EZH2 の発現増加が生じ、EZH2 ノックダウンは EBV 感染細胞で細胞増殖を低下させることが判明した(unpublished data)。これらのデータはクロマチンリモデリング異常の EBV 関連胃癌発生における重要性を示唆している。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、ARID1A だけでなく EZH2 も含めたクロマチンリモデリング異常と胃癌発癌機構を、特に EBV 感染と発癌の関係に重点を置いて解析した。

具体的には

- (1) ARID1A 発現低下により変動する遺伝子の更なる同定と治療標的の探索
- (2) ARID1A 発現低下が EBV 感染による発がんの素地となるかどうかの検討
- (3) EBV 感染と EZH2 発現亢進の関係の解明
- (4) 胃癌における EZH2 発現亢進の臨床病理学的意義及び ARID1A 発現低下との関連

上記4課題について、細胞株を用いた in vitro の解析及び胃癌の外科切除材料(臨床検体)を用いた解析を組み合わせ、解明することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の「研究の目的」で掲げた 4 つの課題に対し、それぞれ以下のアプローチで検討した。

(1) ARID1A が制御する遺伝子群を明らかにするため、胃癌細胞株に対し siRNA によるノックダウンと microarray による網羅的遺伝子発現解析を行った。

(2) ARID1A と EBV 感染の関係を明らかにするため、ARID1A をノックダウンした胃癌細胞株(MKN74)とノックダウンしない胃癌細胞株とで EBV の感染実験を行い、癌細胞 1 個あたりの EBV コピー数が増加するか否かを、RT-PCR 法で GAPDH と EBNA1 (EBV ゲノムに 1 コピー含まれる遺伝子)の DNA 量を測定することで検討した。

また、ARID1A 発現消失が EBV 感染に有利に働く場合、非腫瘍性胃粘膜にも一定頻度で ARID1A 発現が消失した部分がある(EBV に感染しやすい素地が形成されている)であろうとの仮説の下、77 例の胃癌手術検体の背景粘膜(小弯線の非腫瘍部分の組織切片)において ARID1A の免疫染色を行い、発現が消失した領域が無いか検索を行った。

(3) 近年、Glioblastoma 細胞株で EZH2 が STAT3 をメチル化して活性化させるという報告があった(Cancer Cell. 2013;23:839-52)ため、胃癌細胞株 MKN7 において EBV 感染前後で STAT3 メチル化に変化があるか否か、免疫沈降法による検討を行った。

(4) これまでの検討で EBV 関連胃癌では EZH2 発現頻度が高いことを見出していたが、より多数例での検討を行い臨床病理学的意義や ARID1A 発現消失との関係を解析した。具体的には 2007 年～2008 年の胃癌手術連続症例 276 例に対し EZH2 と ARID1A の免疫染色を行った。また EBV 関連胃癌についてはより広い年代に拡張して 47 症例を集め、同様の解析を行った。

なお本研究における免疫組織学的判定では EZH2 はびまん性(9 割以上の癌細胞)に陽性となるものを過剰発現ありと定義した。

4. 研究成果

(1) ARID1A 発現低下により変動する遺伝子の更なる同定と治療標的の探索

胃癌細胞株 MKN74 及び NUGC3 で ARID1A の siRNA によるノックダウンを行い、24 時間後と 48 時間後に回収した RNA を用いて、microarray により発現の変動する遺伝子を網羅的に探索した。その結果、ノックダウンにより

両細胞株で共通して発現が上昇する遺伝子を24時間後の時点で約15個、48時間後の時点で約200個同定した。24時間後よりも48時間後の方が発現変化した遺伝子数が顕著に増加しており、ARID1A発現低下による細胞の反応には48時間程度の時間が必要であることが示唆された。得られた発現変動遺伝子のリストをGene Ontologyで解析したところ、細胞周期、細胞増殖、DNA複製に関わる経路がenrichされていた。これはARID1Aがクロマチン構造の調節を介して細胞増殖抑制性に働くという報告と良く合致するものであった。

(2) ARID1A発現低下がEBV感染による発がんの素地となるかどうかの検討

上記1)の結果を踏まえ、ARID1A発現低下がウイルスDNAの細胞内での複製を促進する可能性を考慮し、ARID1Aノックダウン後にEBVを癌細胞に感染させると、ノックダウンなしの場合に比べ癌細胞中のEBVコピー数が増加するのではないかと考えた。そこでARID1Aノックダウンなし、ありの条件下で胃癌細胞株MKN74にEBVを感染させ、それぞれ5クローンずつ細胞を分離、培養したのちに、EBNA1/GAPDH比のRT-PCR法による測定を試みた。しかしウイルスDNAコピー数(EBNA1コピー数)の増加は認められず(図1)、ARID1A遺伝子変異がEBV胃癌に多い理由は他にありと考えられた。

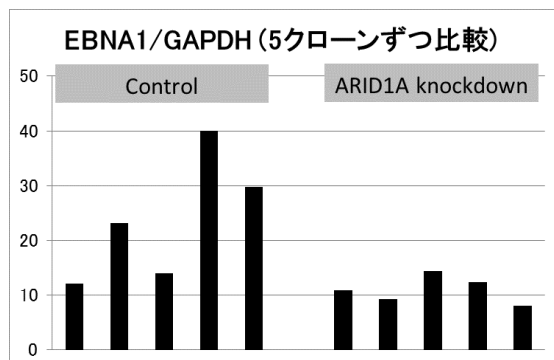


図1. ARID1Aノックダウンの有無によるEBVコピー数の変化。EBV感染前のARID1AノックダウンはEBVコピー数の増加をもたらさなかった。

次に、発癌初期におけるARID1A変異と発現低下がEBV感染とEBV関連胃癌成立の素地となっている可能性があると考え、77例の外科手術症例において非腫瘍性胃粘膜のARID1A発現低下を免疫組織学的に解析した。具体的には77症例の外科的胃切除検体の背景粘膜(小弯)に対し免疫染色を行い、17症例の23か所において形態学的には非腫瘍性だが上皮のARID1A発現が消失している粘膜(1腺管~数mm程度までの微小な病変)を見出した(図2)。また手術例3例について胃を全割してARID1Aの免疫染色を行ったが、やはり複数のARID1A消失病変が認められた。比較のためTP53の免

疫染色も行ったが、ARID1Aより低頻度であるもののTP53過剰発現を示す腺管を見出した。TP53過剰発現を示す腺管はARID1A消失腺管と異なり、微小な病変であっても癌と認識可能な核型不整を示した(図3)。

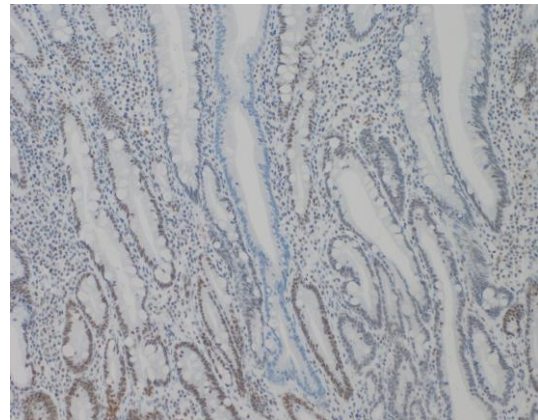


図2. 胃癌背景粘膜におけるARID1A消失微小病変。形態学的には非腫瘍性だがARID1A発現が消失した病変が認められる。

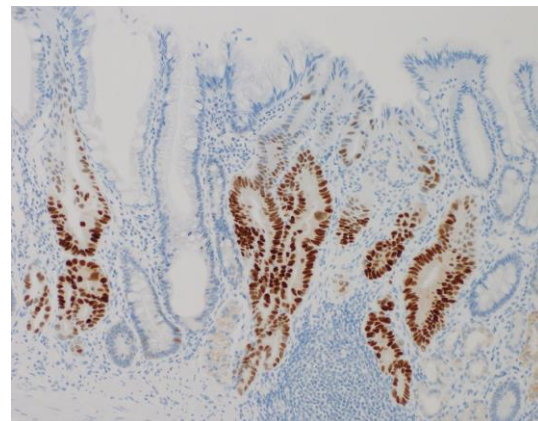


図3. 胃癌背景粘膜に見出されたTP53過剰発現を示す微小病変。病変のサイズは微小(1mm未満)だが、核は腫大し異型を示す。

これらの結果はゲノムシーケンス研究で非腫瘍性の背景胃粘膜から低頻度でTP53やARID1A遺伝子変異を検出したという他施設からの報告(Shimizu T et al. Gastroenterology 2014)を形態学的側面から裏付けるものであり、重要な知見と考えられた。肉眼的には腫瘍を指摘し難い背景粘膜にも免疫組織学的にARID1A消失腺管やTP53過剰発現腺管が散見されたことは、胃癌患者の胃粘膜において遺伝子変異レベルでfield cancerizationが起きており、発癌の素地を形成していることを示唆している。

なお胃癌で得られた上記の知見を進展させ、近年日本でも増加傾向のあるバレット食道及び食道腺癌についてもARID1A発現消失の有無を

調べるべく、症例豊富なドイツへ赴き免疫組織学的検討を行った。その結果、粘膜内癌のみならず low-grade dysplasia にも一定頻度で ARID1A 発現消失腺管が認められ、また稀ではあるが dysplasia の無いバレット粘膜にも ARID1A 発現消失が認められた(図 4)。バレット食道においても胃粘膜と同様、形態学的な異型に乏しい段階から ARID1A 遺伝子変異が入っていることを確認できた。

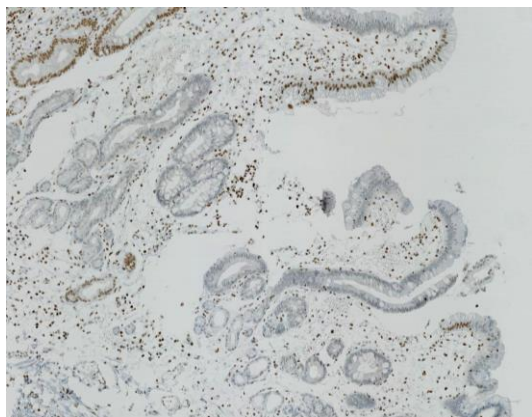


図 4. 形態学的な dysplasia のないバレット食道における ARID1A 発現消失。

(3) EBV 感染と EZH2 発現亢進の関係の解明

EBV 感染株で EZH2 発現が細胞増殖を亢進させている原因の一つとして STAT3 メチル化の亢進が起きているのではないかと仮説の下、胃癌細胞株 MKN7 を用いて、EZH2 と STAT3 が結合しているか否か、また EBV を感染させた際に STAT3 のメチル化亢進が起きるか否か、免疫沈降法による検討を行った。その結果、EBV を感染させた胃癌細胞株において EZH2 と STAT3 が結合していること、及び STAT3 のメチル化が EBV 感染株で非感染株に比べ亢進していることが確認された(図 5)。

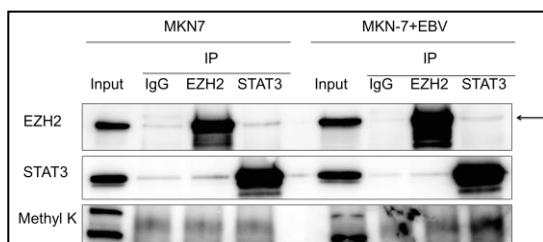


図 5. EZH2 及び STAT3 による免疫沈降。胃癌細胞株 MKN7 及びその EBV 感染株では STAT3 と EZH2 の結合が確認され、また EBV 感染株では STAT3 のメチル化が亢進していることが確認された。

(4) 胃癌における EZH2 発現亢進の臨床病理学的意義及び ARID1A 発現低下との関連

胃癌 276 例の免疫組織学的解析では EZH2 過剰発現は 24 例(9%)に認められた。EZH2 過剰

発現例では静脈侵襲の頻度が高かった ($P=0.027$)が、他の因子には有意な相関は見られず、予後との相関もなかった。ARID1A 発現消失と EZH2 の相関も見られなかった。

一方、EBV 関連胃癌 47 例に絞った解析では、EZH2 過剰発現は 27 例(57%)と高頻度であり、進行癌 ($P=0.036$)が多く、リンパ管侵襲 ($P=0.025$)、静脈侵襲($P=0.008$)、リンパ節転移 ($P=0.044$)の頻度が高かった。さらに EZH2 過剰発現は有意な予後不良因子であった(図 6)。なお EBV 関連胃癌においても EZH2 過剰発現と ARID1A 発現消失に相関は見られなかった。

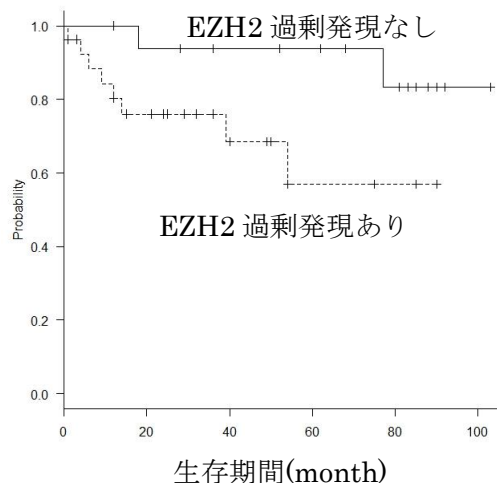


図 6. EBV 関連胃癌(N=47)における EZH2 過剰発現の臨床病理学的意義

上記の結果から、EBV 関連胃癌において EZH2 過剰発現は高頻度で認められること、EBV 関連胃癌では EZH2 過剰発現は予後不良因子となることが分かった。EZH2 発現が EBV 関連胃癌の進行に重要で、治療標的となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

① Saito R, Abe H, Kunita A, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. Overexpression and gene amplification of PD-L1 in cancer cells and PD-L1+ immune cells in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: the prognostic implications. *Mod Pathol* 2017;30(3):427-439. (査読有)
DOI: 10.1038/modpathol.2016.202.

② Abe H, Saito R, Ichimura T, Iwasaki A, Yamazawa S, Shinozaki-Ushiku A, Morikawa T, Ushiku T, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. CD47 expression in Epstein-Barr virus-associated gastric

carcinoma: coexistence with tumor
immunity lowering the ratio of
CD8+/Foxp3+ T cells. Virchows Arch.
2018;472(4):643-651. (Epub 2018 Mar 13).
(査読有)

DOI: 10.1007/s00428-018-2332-2.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 阿部浩幸、国田朱子、牛久綾、深山正久
EBV 関連胃癌における EZH2 高発現とその
意義 第 105 回日本病理学会総会 仙台
2016 年 5 月
- ② 中山敦仁、阿部浩幸、国田朱子、深山正久
EBV 関連胃癌における画像解析を用いた腫
瘍細胞内ウイルスコピー数の定量的検討とそ
の臨床病理学的意義 第 105 回日本病理学
会総会 仙台 2016 年 5 月
- ③ 西東瑠璃、阿部浩幸、国田朱子、深山正久
EBV 関連胃癌における PD-L1 の高率な発
現と予後への影響 第 105 回日本病理学会
総会 仙台 2016 年 5 月
- ④ 阿部浩幸、西東瑠璃、山澤翔、牛久綾、山
下裕玄、瀬戸泰之、深山正久 胃癌における
CD47 発現の臨床病理学的特徴及び EBV
感染や T リンパ球浸潤との関連 第 106 回日
本病理学会総会 東京 2017 年 4 月
- ⑤ Abe H. PD-L1 expression and
amplification in EBV-associated gastric
carcinomas. The 11th Korea-Japan
Gastrointestinal Pathology Seminar.
Busan, Korea. March 2018.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 浩幸 (ABE, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40708632