

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20928

研究課題名(和文) EBV関連胃癌における癌幹細胞の同定および機能解析

研究課題名(英文) Exploring cancer stem cells in EBV-associated gastric carcinoma

研究代表者

牛久 綾(篠崎綾)(Shinozaki-Ushiku, Aya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60581824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EBV関連胃癌における癌幹細胞の同定を目的として、手術により摘出された胃癌組織検体を用いたtissue microarrayを構築し、癌幹細胞のマーカーとなりうる分子の発現を免疫組織化学的に検討した。特に胎児型形質を反映するマーカーの発現に着目して解析した結果、胃癌が3つのグループに分けられることが明らかになった。このうち、胎児マーカーを発現するグループは悪性度の高い腸型の形質を示す一方、EBV関連胃癌においてはこれらの胎児マーカーの発現は低頻度であり、EBV関連胃癌の癌幹細胞性における、胎児形質に関連する分子の関与は限定的であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To explore the cancer stem cells in EBV-associated gastric carcinoma, tissue microarrays were constructed using hundreds of surgically resected gastric cancer tissues. With these microarrays, we investigated the expressions of several stem cell markers, especially markers which reflect primitive/fetal phenotype, by immunohistochemistry. The results identified three different groups based on the expression patterns of these primitive/fetal markers. Among them, a group with frequent expression of primitive/fetal markers was found to behave aggressively, while the expression of these markers were infrequent in EBV-associated gastric carcinoma. These results demonstrated that these primitive/fetal markers were less likely to be associated with cancer stemness in EBV-associated gastric carcinoma.

研究分野：胃癌

キーワード：Epstein-Barr virus 胃癌 癌幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

癌組織中に存在し、自己複製能および多分化能を有する癌幹細胞は治療抵抗性や再発に關与しているとされ、その特異的なマーカーの探索や機能の解明についての研究が種々の臓器由来の癌で行われている。胃癌における癌幹細胞マーカーの候補としては、これまで CD44、CD54、CD90、CD133、EpCAM、ALDH1 などが同定されており、増殖能や浸潤能に關与する種々の pathway を活性化することが実験的に示されてきた。しかし、EBV 関連胃癌における癌幹細胞についてはこれまでほとんど報告がなく、胃癌における EBV の役割を解明するためには、癌幹細胞の同定とその機能を解析することが重要と考えられた。

### 2. 研究の目的

EBV 関連胃癌において癌幹細胞のマーカーとなる分子を同定し、その機能を解析する。さらに EBV 陰性の通常の胃癌との比較を通して、EBV 関連胃癌の特徴を明らかにする。

### 3. 研究の方法

多数の胃癌手術検体を用いた tissue microarray を構築する。これを用いた免疫組織化学的検討により、EBV 関連胃癌における既知あるいは未知の癌幹細胞マーカーの発現を網羅的に検討し、その臨床病理学的・生物学的意義について解析する。

### 4. 研究成果

EBV 関連胃癌における癌幹細胞の同定を目的として、手術により摘出された胃癌組織検体を用いた tissue microarray (TMA) を構築し、癌幹細胞のマーカーとなりうる分子の発現を免疫組織化学的に検討した。対象とした症例は研究代表者の所属する研究室においてすでに構築されていた 250 例に加え、新たに約 800 例を追加し、TMA を構築した。

まず、これらの症例について EBER in situ hybridization 法を用いて EBV 関連胃癌の抽出を行った。次いで、癌幹細胞のマーカーとなる遺伝子 (AFP、GPC3、CLDN6、SALL4、Nanog、LIN28、OCT3/4、CD44v6、CD44v9) や胃癌の発生・進展に重要な遺伝子 (MLH1、PMS2、MSH2、MSHG6、p53、HER2) の発現について、免疫組織化学的に網羅的な検討を行った。

これらの遺伝子の発現と臨床病理学的因子の關連について解析を行ったところ、ある種の分子の発現が胃癌の悪性度に關連することが明らかになった。それらの分子の中でも、特に胎児型形質を反映するマーカー (SALL4、AFP、CLDN6、GPC3) の発現に着目して解析を進めた結果、これらの分子の発現パターンにより、胃癌が3つのグループに分けられることが明らかになった。グループ1は胎児型マーカーの発現が高頻度に見られた群であり、組織学的には腸型に分類される。グループ2では上記の胎児マーカーのうち SALL4 に限り部分的に陽性となった症例が含

まれている。EBV 関連胃癌においてはこれらの胎児マーカーの発現は低頻度であり、ミスマッチ修復遺伝子の発現に異常がある症例とともにグループ3に分類されることが示された (図1)。

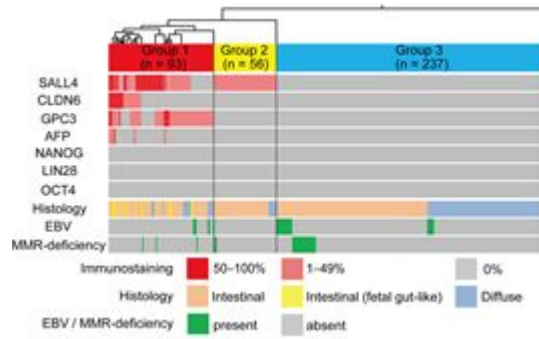


図1 胎児マーカー発現パターンによる胃癌の分類

これらの3つのグループについて、生存解析 (disease-specific および disease-free) の解析を行ったところ、胎児マーカーの発現が高いグループ1において、他の2群より予後が不良であるということが明らかになった (図2)。

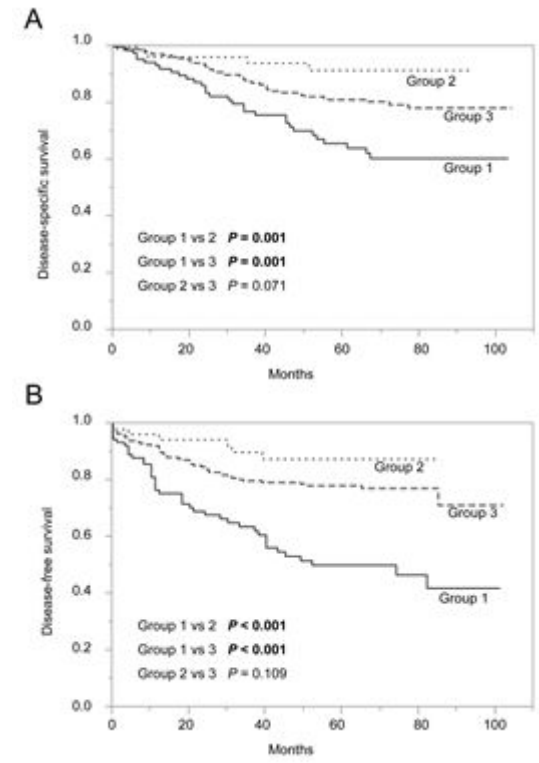


図2 生存曲線

さらにデータベースとして公開されている、胃癌における網羅的遺伝子解析の結果 (The Cancer Genome Atlas Dataset) を用いて解析を行ったところ、本研究の結果と同様の傾向であることが示された (図3)。

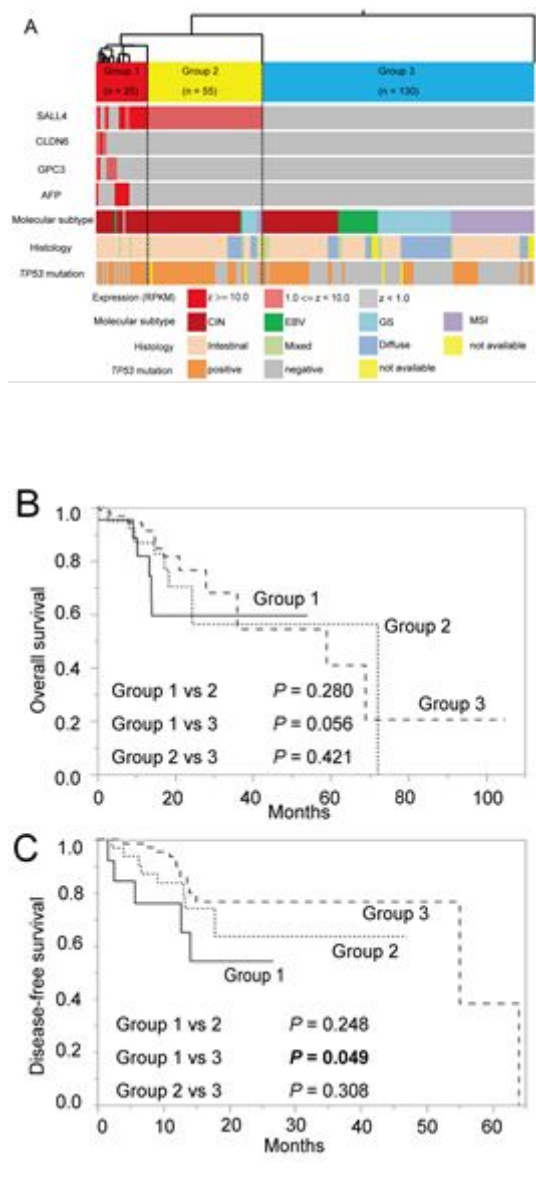


図3 TCGA dataset を用いた解析結果

本研究で検索した分子の中では、EBV 関連胃癌に特異的である癌幹細胞マーカーを特定するには至らなかったが、少なくとも、EBV 関連胃癌の癌幹細胞性においては、胎児形質に関連する分子の関与は限定的であることが示唆された。これまでの研究報告から、EBV 関連胃癌は通常の胃癌に比較してリンパ節転移の頻度が少なく、比較的予後が良好であるということが知られていたが、本研究で明らかになった、EBV 関連胃癌における胎児マーカーの発現が低頻度であるという事象が、予後が比較的良好であることの一つの要因性ある可能性が推察される。

一方、本研究では、胃癌のある一群で胎児マーカーの発現が高頻度に見られることが明らかとなった。このうち CLDN6 は上皮間細胞接着機構の一つである tight junction を構成する分子であり、細胞膜に局在するため、細胞外からのアクセスが容易である。さらに CLDN6 は成人の正常の組織においてはほとん

ど発現が見られないことから、CLDN6 を標的とした分子標的治療のよい適応になると考えられ、今後、臨床応用可能な治療薬の開発が期待される。

胃癌における胎児マーカーの発現が悪性度に関連することが明らかになったが、その具体的な機序については、まだ明らかにされていないことが多い。今回検討を行った胎児マーカーの一つである SALL4 は、他の臓器の悪性腫瘍においても高発現を示すものが報告されており、それを説明するメカニズムとして、メチル化状態の変化の可能性が指摘されている。胃癌においても同様の機序により、SALL4 の発現が亢進しているかどうかについては今後の検討課題である。

### 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4件)

Yamazawa S, Ushiku T, Shinozaki-Ushiku A, Hayashi A, Iwasaki A, Abe H, Tagashira A, Yamashita H, Seto Y, Aburatani H, Fukayama M. Gastric cancer with primitive enterocyte phenotype: an aggressive subgroup of intestinal-type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2017. 掲載確定(査読あり)

牛久綾, 牛久哲男, EB ウイルス関連胃癌, 消化器・肝臓内科. 2017. 掲載確定(査読なし)

Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). *Int J Oncol*. 2015 Apr;46(4):1421-34. (査読あり)

Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Isogai M, Hibiya T, Ushiku T, Takada K, Fukayama M. Profiling of Virus-Encoded MicroRNAs in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Their Roles in Gastric Carcinogenesis. *J Virol*. 2015 May;89(10):5581-91. (査読あり)

[学会発表](計4件)

Aya Shinozaki-Ushiku, Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma - The Roles of Cellular and Viral MicroRNAs in its Carcinogenesis. Belfast Pathology 2017, 2017年6月20日~23日, Belfast (UK)

山澤翔, 牛久哲男, 岩崎晶子, 牛久綾, 瀬戸泰之, 深山正久. 胎児型形質を有する胃癌の臨床病理学的検討, 第106回日本病理学会総会, 2017年4月27日~4月29日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

牛久綾, Epstein-Barr virus 関連胃癌における発癌 - 宿主・病原体マイクロ RNA による癌化機序, 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年 5 月 12 日~5 月 14 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)

牛久綾, EBV 関連胃癌, 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 2 件)

牛久綾, 他, 文光堂, 「ピロリ菌陰性時代の上部消化管内視鏡-これだけはおさえない腫瘍性疾患の診かた」「EB ウイルス関連胃癌」, 2016, p153-156.

牛久綾, 他, 文光堂, 腫瘍病理鑑別診断アトラス「胃癌」「リンパ球浸潤癌」, 2015 年, p110-116.

〔その他〕

ホームページ等  
東京大学医学部 人体病理学・病理診断学  
<http://pathol.umin.ac.jp/index.shtml>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牛久(篠崎)綾 (SHINOZAKI-USHIKU, Aya)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 60581824