

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590337

研究課題名（和文） 残胃癌・胃上部癌の発癌に関連する形質の特徴抽出と、背景粘膜の特徴の解明

研究課題名（英文） Characterization of the remnant gastric cancer, upper gastric cancer, and their background mucosa

研究代表者

宇於崎 宏 (UOZAKI HIROSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10296246

研究成果の概要（和文）：

胃癌での転写因子や粘液などの形質発現とメチル化の状態の状態を中心に解析した。特に、残胃癌、上部胃癌、EBV 関連胃癌とその他の胃癌との比較を中心に検索を行った。残胃癌では EBV 関連胃癌が多く、進行癌、高齢患者であることが多かった。メチル化状態については、上部胃癌とその他の胃癌で有意な違いは見られなかった。転写因子では EBV 関連胃癌、上部癌で SOX2 の陽性率が高く、HNF4aP1 や CDX2 といった腸型転写因子は陽性率が低かった。SOX2 と同じ SOX family に属する SOX9 では EBV 関連胃癌では陽性率は低く、メチル化率が高かった。培養細胞系での実験で、EBV 感染によって、SOX9 のプロモーターのメチル化が誘導され、mRNA や蛋白の発現が低下することが再現され、SOX9 は EBV 感染と関連した変化であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Transcriptional factor and mucin phenotypes, methylation status, and hMLH1 status in gastric cancer (GC) were investigated. Remnant GC, upper location GC, and Epstein-Barr virus (EBV) associated GC were specially examined. Remnant GC was significantly related to EBV infection, advanced stage, and occurred in elder people than other GCs. Methylation status did not differ between upper location GC and other GCs. Among transcriptional factors, SOX2 was more expressed in EBV-associated GC and upper location GC. Intestinal transcriptional factors, HNF4aP1 and CDX2, was less in those GCs. SOX9, which belongs to SOX family together with SOX2, was less expressed in EBV-associated GC. It shows more methylated SOX9 promoter. The cell line study revealed that SOX9 was methylated and changed into low expression via EBV infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：胃癌、残胃癌、Epstein-Barr ウイルス、メチル化、粘液形質

1. 研究開始当初の背景

残胃癌は、潰瘍や腫瘍による胃部分切除後の胃に発生する癌である。術後 10-30 年などの長期を観察すると、1-3%と有意に高率に発生すると報告されており、Billroth II 再建後の胃上部、男性に多く、十二指腸液の逆流や手術による神経切離が影響すると考えられている。また Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌の発生が有意に高いことが報告されている。

良性潰瘍による胃切除が減少してはいるが、早期癌に対する EMR/ESD 法が発達してきており、今後も残胃の癌は異時性発生癌を含め、問題となる。残胃癌では CIMP (CpG island methylator phenotype; DNA 高メチル化群) や粘液形質などまだ解明すべきことが残されている。

胃癌では下部癌の頻度が低下し、胃上部の癌は漸増傾向にある。残胃癌も元の胃の中では上部に位置することから、胃上部癌との比較が有効と考えられる。残胃癌の 20%までが EBV 関連胃癌であるとされ、残胃癌の研究には、その他の胃上部癌、EBV 関連胃癌との対比と共に研究を進めることが特に有効と考えられる。また、残胃癌が有意に高率に発生する母地、周囲粘膜の研究は、早期発見のために重要な意義を有する。

胃癌全体の研究では、これまでに遺伝子の不安定性の三大形質として、1. 染色体不安定性, 2. MSI (microsatellite instability) 形質, 3. CIMP が想定されている。hMLH1 遺伝子のプロモータメチル化が MSI phenotype に関連することが知られ、phenotype 相互の関連も有り、総合的な解析が必要とされている。

2. 研究の目的

残胃癌とその他の胃上部癌、EBV 関連胃癌、

そして比較対象として胃癌全般について、それぞれの形質マーカーの発現状態、hMLH1 の発現の状態、CIMP、染色体不安定性について、明らかにする。

また背景粘膜についても同様の解析を行うことで、残胃癌や胃上部癌の特性を明らかにする。発生の予防や癌の早期発見に応用できる所見を見出す。

3. 研究の方法

東京大学医学部附属病院での切除材料から、残胃癌 78 例、胃癌全体で 1050 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い、2mm 柱のティッシュアレイを構築して、免疫組織化学的に粘液 (MUC2/5AC/6) や転写因子 (sox2, sox9, HFN4a (Hepatocyte nuclear factor 4a), CDX2) などの胃・腸上皮マーカーを検索した。また hMLH1, p53 など発癌に関連している蛋白分子の発現も検索した。

これらのうち、121 例の胃癌材料から DNA を抽出し、MSP 法にて癌関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を検索した。

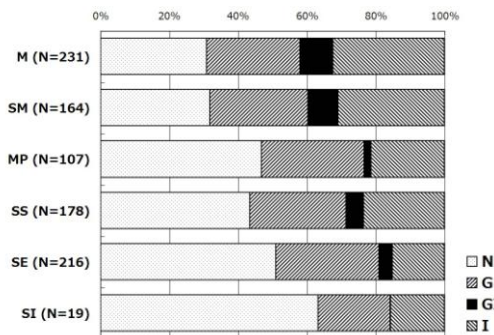
これらの結果、SOX family に注目し、SOX2, SOX9 が胃癌細胞に与える役割を培養細胞系で検索した。6 つの培養細胞株 (MKN1, MKN7, MKN74, TMK1, AGS, and NUGC3) に組み替え EBV を感染させた細胞株を用いた。EBV 感染によるメチル化状態の違い、発現の違い (western blotting およびリアルタイム PCR 法) に加え、SOX9 については siRNA で発現を抑制することも SOX9 の作用を検討した。

4. 研究成果

残胃癌 48 例、すべての胃癌 984 例を in situ ハイブリダイゼーション法で検索することで、残胃癌には 20 例に EBV 感染が見いだされ、全胃癌の 39 例と比較すると有意に高い、EBV 感染率であることが確認された。

そのほかの臨床病理学的因子との比較では、残胃癌では進行癌症例が多く(89%, 通常胃癌 56%)、また患者年齢も有意に高かった(69.3歳, 通常胃癌 64.5歳)。hMLH1の陽性像では残胃癌で10例(20%)、全胃癌で185例(18.9%)と有意な差は無かった。

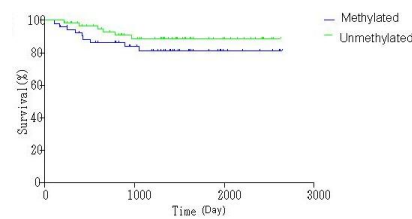
発現形質の一つとして、胃型・腸型の転写因子の発現に関しては、上部癌と全胃癌の比較で、上部癌はSOX2の発現が多く、CDX2, HNF4aの発現が低いことが分かった。EBV感染の有無とこれらの発現を比較しても同様で、EBVによる転写因子の変化か、EBV関連胃癌の胃内での発生場所の偏りによるものかは鑑別が困難であった。これらのうち、SOX2とHNF4aP1によって転写因子からNULL/胃型/腸型/混合型と分類した場合、進達度にもなると、NULL型を示す腫瘍が増え、腸型を示す腫瘍が減った。SOX2は癌の進展に伴って安定して発現するが、HNF4aP1は減少することが明らかとなった(下図)。



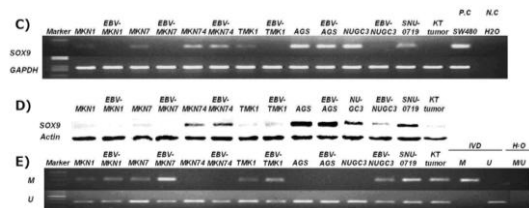
切除標本121例を用いたMSP法でのメチル化解析では、LOX, HRASLS, HAND1, FLNc, THBDをマーカー遺伝子として使い、3個以上の遺伝子のメチル化を持って、CIMP-Hと分類した。上部癌とそのほかの胃癌でCIMP-HではCIMP-Hの割合は35%と27%と若干の違いがあったが、有意な差ではなかった。非癌部のメチル化状態についても、有意な差は見いだせなかった。EBV関連胃癌は5例のみであり、

EBV感染によるメチル化率の違いは本検索では検討しなかった。

上部癌で有意に陽性率が高かったSOX2に関して、同じSOX familyであるSOX9についても384例の胃癌で発現を検索したが、EBV関連胃癌で陽性率が低く(15%, 非EBV胃癌で60%, $P < 0.0001$)、また進行癌よりも早期癌で発現が多く見られた(64%, 進行癌46%, $P = 0.0003$)。またSOX9のメチル化状態と臨床病理学的因子との比較では脈管侵襲、EBV感染との関連が見られた。メチル化の見られた症例では免疫組織化学的な陽性像が少なく(35% vs 58%, $P = 0.014$)、SOX9はプロモーターのメチル化による発現抑制があることが確認された。さらにSOX9が予後に与える影響を調べたが、メチル化群で、予後がやや不良であったが、有意な差では無かった(下図)。



これらSOX9の胃癌の発癌初期での発現亢進、EBVとの関連が興味深く、培養細胞系での検索を引き続き行った。胃癌細胞株でも6つの細胞での検索で、SOX9のメチル化と発現抑制の傾向が見られた。EBVを感染させることで、6株中4株でメチル化の亢進とそれと並行した発現の低下がみられ、SOX9の発現低下はEBVがメチル化を引き起こすことによって引き起こされると考えられた。(下図、順にC)MSP, D)western blotting, E)RT-PCR)



SOX9 の減少による培養細胞への影響については、引き続き、検討を行っている。SOX9 が発癌の初期に発現が亢進し、EBV および癌の進行にともなって抑制されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Uozaki H, Barua RR, Minhua S, et al. (計8名) Transcriptional factor typing with SOX2, HNF4aP1, and CDX2 closely relates to tumor invasion and Epstein-Barr virus status in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 査読有. 2011;4(3):230-240.
2. Morikawa T, Hino R, Uozaki H, et al. (計8名) Expression of ribonucleotide reductase M2 subunit in gastric cancer and effects of RRM2 inhibition in vitro. *Hum Pathol*. 査読有. 2010;41(12):1742-1748.
3. Shinozaki A, Sakatani T, Ushiku T, et al. (7番目、計9名) Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res*. 査読有. 2010;70(11):4719-4727.
4. 宇於崎宏. 【病理形態学キーワード】胃 Lymphoid stroma. *病理と臨床*、査読無、28巻臨増 122-123. 2010.
5. Maeda E, Akahane M, Kiryu S, et al. (9番目、計11名) Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Jpn J Radiol*. 査読有. 2009;27(1):4-19.
6. Hino R, Uozaki H, Murakami N, et al. (計11名) Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res*. 査読有. 2009;69(7):2766-2774.
7. 宇於崎宏, 深山正久. 【エビジェネティクスと病理】 Epstein-Barr ウイルス関連胃癌における DNA メチル化異常 病理と臨床、査読無、27巻7号 631-636. 2009.
8. Ushiku T, Uozaki H, Shinozaki A, et al. (計10名) Glypican 3-expressing gastric carcinoma: distinct subgroup unifying hepatoid, clear-cell, and alpha-fetoprotein-producing gastric carcinomas. *Cancer Sci*. 査読有. 2009;100(4):626-632.

〔学会発表〕(計8件)

1. 孫敏華ほか(6名中2番目), Loss of SOX2 and SOX9 protein in gastric cancers: correlation with the stages and EBV infection. 第100回日本病理学会総会、2011年4月28日、パシフィコ横浜(神奈川県)
2. 六反啓文ほか(6名中3番目), 粘膜内印鑑細胞癌からスキルス胃癌への進展形式. 第100回日本病理学会総会、2011年4月28日、パシフィコ横浜(神奈川県)
3. 松坂恵介ほか(6名中4番目), 胃癌における DNA メチル化の網羅的解析 (Comprehensive DNA methylation analysis in gastric carcinoma). 第68回日本癌学会総会、2009年10月1日、パシフィコ横浜(神奈川県)
4. 仲矢丈雄ほか(10名中5番目), Oncogenic mechanisms based on the analysis of genome copy number abnormality patterns of colorectal and gastric cancers. 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日、大阪国際会議場(大阪府)
5. 孫敏華ほか(6名中2番目), 胃癌における SOX9 の発現と臨床病理学的因子との比較検討. 第99回日本病理学会総会、2010年4月28日、京王プラザホテル(東京都)
6. 篠崎綾ほか(6名中5番目), Epstein-Barr virus 関連胃癌における claudin の発現. 第99回日本病理学会総会、2010年4月27日、京王プラザホテル(東京都)
7. 牛久哲男ほか(6名中2番目), Epstein-Barr ウイルス関連早期胃癌の特徴と内視鏡治療適応の検討. 第98回日本病理学会総会、2009年5月2日、国立京都国際会館(京都府)
8. 大嶽雄也ほか(7名中3番目), 非腫瘍性胃粘膜における Epstein-Barr ウイルス感染の検索. 第98回日本病理学会総会、2009年5月1日、国立京都国際会館(京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇於崎 宏 (UOZAKI HIROSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 10296246

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし