

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590308

研究課題名（和文）分子病理学的新分類「STAT 構成的活性化胃癌」の確立

研究課題名（英文）Establishment of the new classification "STAT constitutive activated stomach cancer".

研究代表者

日野るみ (HINO RUMI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60451770

研究成果の概要（和文）：EB ウイルス関連胃癌の研究を通して、STAT3 の構成的活性化が EB ウイルス関連胃癌発癌、進展に重要である可能性を見いだした。また、多くの研究により、STAT3 は発癌過程で極めて重要であるということが証明されてきた。本研究では、炎症と発癌を繋ぐ転写因子 STAT3 に着目した新分類；「STAT3 構成的活性化胃癌」の確立を目指す。この新分類が、基礎と臨床を繋ぐ、病理的な具体的なアプローチのモデルとなると考えられ、また、治療や予防に直結するサブグループとなる可能性もあり、臨床病理学的意義は極めて高い。本研究では、STAT3 構成的活性化胃癌の特徴的な一つの分子的側面を解明したので報告する。

研究成果の概要（英文）：Through a study of the EB virus-related gastric cancer, I found the possibility that constitutive activation of STAT3 was important to EB virus-related gastric cancer carcinogenesis and progress. In addition, in STAT3, it has been proved that it was extremely important in a carcinogenic process by many studies. I aim at the establishment of "the STAT3 constitutive activated stomach cancer", which paid its attention to transcription factor STAT3. It becomes a model of clinical and pathological approach. In addition, it may become the subgroup connected directly to the treatment and prevention. The clinicopathological significance is extremely high. I report that I elucidated one characteristic molecular side of the STAT3 constitutive activated stomach cancer, in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：消化管，胃癌，STAT3

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、先行研究において、STAT3 の構成的活性化が EB ウイルス関連胃癌発癌、進展に重要であることを報告した (Hino et al., 2009)。

STAT3 は IL-6、IL11 などの炎症性サイトカインによって活性化される転写因子で、その構成的活性化が胃、肺、肝、腎、前立腺または白血病、リンパ腫などの血液系などの様々な

癌でkeyとなる分子であることが報告されており、STAT3の oncoprotein としての認識は確立されている (Aizaidisiddiquee, 2008, Flank, 2007, Yu H, 2004)。持続的活性化 STAT3 は形質転換能を有する (Bromberg et al., 2001) ことや、STAT3 構成的活性化マウスでは胃炎と共に高率に胃癌が発生する (Judd et al., 2006) などの報告から、構成的活性化 STAT3 が胃癌に極めて中心的な役割を担うことは着実に解明されてきている。また、WHO より 1 群の definite carcinogen に認定されたピロリ感染をはじめとする EBV 感染、持続的な炎症性サイトカインといった発癌因子は、「STAT3 構成的活性化」という点で共通である (図 1)。この様な炎症と発癌をつなぐ転写因子に注目することは、慢性炎症から胃癌への極めて重要な分子に着目することを意味し、H. pylori を含めた発癌性因子のより包括的な発癌過程の解明につながる可能性が高い。また、DNA 異常メチル化と DNA メチル化酵素 DNMT1 の高発現の相関が報告されているが、STAT3 は DNMT1 のプロモーター領域に結合領域を有し、DNA 異常メチル化にも深く関与している。よって、STAT3 構成的活性化胃癌群は、異常メチル化も考慮にいたしたより包括的な発癌機構を解明できる一群とも言える。一方、大規模な臨床病理学的検索はなく、STAT3 構成的活性化から癌化への詳細かつ包括的な分子機構についての解明は十分になされていない。また、解明されてきた多くの胃癌についての分子生物学的特徴を実際に臨床側へ伝える事が今まで困難であったが、分子病理学的分類を導入することで、病理側から臨床側へより詳細な個々の胃癌の情報を、分子生物学的特徴を含め伝えることが出来るようになる。さらに、臨床応用可能な STAT3 阻害薬が開発されていることから、STAT3 構成的胃癌群は予防や治療に直結するグループとなり、臨床的意義は極めて高い。

## 2. 研究の目的

申請者らの研究室では、EB ウイルス関連胃癌の研究を通して、STAT3 の構成的活性化が EB ウイルス関連胃癌、進展に重要である可能性を見いだした (Hino et al., Cancer Research 2009)。また、多くの研究により、STAT3 は発癌過程で極めて重要であるということが証明されてきた。本研究では、炎症と発癌を繋ぐ転写因子 STAT3 に着目し、臨床胃癌検体 1000 例以上を用いた臨床病理学的検討に分子生物学的特性を加味した分子病理学的新分類「STAT3 構成的活性化胃癌」の確立を目指す。この新分類が、基礎と臨床を繋ぐ、病理的な具体的なアプローチのモデルとなると考えられ、また、治療や予防に直結するサブグループとなる可能性もあり、臨

床病理学的意義は極めて高い。

## 3. 研究の方法

概要：臨床胃癌検体 1000 例以上を用いた大規模な検討による分子病理学的新分類

「STAT3 構成的活性化胃癌」の確立と臨床病理学的特徴の検証、炎症から発癌へのメカニズムの解明を目指し、病理診断・予防・治療へ応用する。

詳細：1) 「STAT3 構成的活性化胃癌」の臨床病理学的特徴の検証として A) Tissue Micro Array (TMA) の構築、B) STAT3、リン酸化 STAT3 の免疫組織化学的検討、C) 「STAT3 構成的活性化胃癌」特異的病理組織像 (HE 像) の検索、D) 「STAT3 構成的活性化胃癌」群における炎症性因子の検索、E) 「STAT3 構成的活性化胃癌」群のメチル化酵素の発現状態と異常メチル化の検索。

## 4. 研究成果

報告者は、EB ウイルス関連胃癌の研究を通して、STAT3 (signal transducer and activator of transcription factor 3) 構成的活性化が EB ウイルス関連胃癌、進展に重要である可能性を見いだした (Hino et al., Cancer Research 2008)。EB ウイルス (EBV) 関連胃癌は、癌抑制遺伝子あるいは癌関連遺伝子のプロモーター領域に特異的な DNA メチル化異常が高頻度に見られ、胃癌の中でも特徴的な一群をなしているが、報告者らは、EBV の膜蛋白である LMP2A (Latent membrane protein 2A) が STAT3 の活性化を介し DNMT1 の発現を上昇させ、DNA メチル化異常に関与する事を報告した (Hino et al., Cancer Research 2009)。今回報告者は、STAT3 の構成的活性化が EB ウイルス関連胃癌、進展に重要である事の研究を遂行する中で、STAT3 の活性化を抑制的に制御する分子である SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) が、STAT3 構成的活性化胃癌の代表である EB ウイルス関連胃癌で有意に発現が低下している事を見出した。外科的に切除された検体において、SOCS3 の発現低下を免疫組織学的に検討したところ、EB ウイルス関連胃癌で約 83% の症例で発現低下が見られた。EB ウイルス非関連胃癌では約 40.9% であり、EB ウイルス関連胃癌の方が有意に SOCS3 の発現低下が見られた ( $P=0.006$ )。また、SOCS3 の発現低下は、STAT3 の活性化と有意に相関していた。すなわち、STAT3 活性化胃癌に有意に SOCS3 発現の低下が生じている事が明らかとなった。また、興味深い事に、SOCS3 発現低下症例は、DNMT1 の発現が亢進している事が分かった。SOCS3 発現低下症例の多い EB ウイルス関連胃癌では、DNMT1 の発現亢進が約 83.3% に認められ、一方 EB ウイルス非関連胃癌では約 50.0% と、SOCS3 低下症例で DNMT1 の更新が有

意に見られた(P=0.027).

SOCS3の発現低下の機序については、SOCS3のプロモーター領域のメチル化が関与している事が予想されたので、MSP(Methylation specific PCR)法を用いてSOCS3のプロモーター領域のメチル化について調べた。その結果、SOCS3発現低下が高頻度にみられるEBウイルス関連胃癌で約40%、非関連胃癌で約15%にプロモーター領域のメチル化が認められた。さらに、SOCS3発現低下群は非低下群に比べて有意にSOCS3のプロモーター領域のメチル化が認められた。すなわち、SOCS3の発現低下の主な要因はSOCS3のプロモーター領域のメチル化であることが分かった。

次に、胃癌の細胞株やSCID(Severe Combined Immunodeficiency)マウスへの移植株を用いて、SOCS3、STAT3、DNMT1について検討した。外科的に切除された胃癌症例と同様に、SOCS3発現低下を示す細胞株において、SOCS3のプロモーター領域のメチル化が認められた。加えてSTAT3やDNMT1の発現亢進も確認された。

これまでの結果をまとめると、STAT3構成的活性化胃癌では、SOCS3発現低下の頻度が高く、それらの症例でDNMT1の発現亢進、SOCS3のプロモーター領域のメチル化が見られた。このことは、外科的に切除された症例のみならず、細胞株や移植株でも再現性が得られた。STAT3構成的活性化群では、DNMT1の発現亢進が見られる事から、プロモーター領域の異常メチル化が蓄積し、SOCS3の発現低下を来すことが示唆された。SOCS3はSTAT3の発現を抑制する因子である事から、SOCS3の抑制は、さらにSTAT3の構成的活性化を促進する可能性が示唆された。これらの結果は、STAT3構成的活性化胃癌の特徴的な一つの分子的側面を解明した事を意味し、将来的にはSTAT3構成的活性化胃癌の治療や予防に応用できる可能性が示唆された。

#### 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11件)

①Morikawa T, Hino R, Uozaki H, Maeda D, Ushiku T, Shinozaki A, Sakatani T, Fukayama M. Expression of ribonucleotide reductase M2 subunit in gastric cancer and effects of RRM2 inhibition in vitro.

Hum Pathol. 2010 Dec; 41(12):1742-1748. (査読有)

②Shinozaki A, Sakatani T, Ushiku T, Hino

R, Isogai M, Ishikawa S, Uozaki H, Takada K, Fukayama M.

Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma.

Cancer Res. 2010 Jun 1;70(11):4719-4127. (査読有)

③ Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. Pathol Int. 2010 May; 60(5):337-50. Review. (査読有)

④Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus positive gastric cancers by definition of DNA methylation Epigenotypes. Cancer Res. 2011; 71: 7187-97. (査読有)

⑤Fukayama M and Ushiku T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. Pathol Res Pract. 2011 Sep 15; 207(9): 529-37. (査読有)

⑥Ushiku T, Matsusaka K, Iwasaki Y, Tateishi Y, Funata N, Seto Y, Fukayama M. Gastric carcinoma with invasive micropapillary pattern and its association with lymph node metastasis. Histopathology. 2011 Dec; 59(6): 1081-9. (査読有)

⑦ Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. Cancer Res. 2012 Jul 15; 72(14):3445-50. (査読有)

⑧Abe H, Maeda D, Hino R, Otake Y, Isogai M, Ushiku AS, Matsusaka K, Kunita A, Ushiku T, Uozaki H, Tateishi Y, Hishima T, Iwasaki Y, Ishikawa S, Fukayama M. ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without

Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability. Virchows Arch. 2012 461(4):367-77. (査読有)

⑨Sun M, Uozaki H, Hino R, Fukayama M. et. al. SOX9 expression and its methylation status in gastric cancer. Virchows Arch. 2012 460(3):271-9. (査読有)

⑩Abe H, Hino R, Fukayama M. Platelet-derived growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C contribute to the development of pulmonary tumor thrombotic microangiopathy in gastric cancer. Virchows Arch. 2013 May;462(5):523-31. (査読有)

⑪日野るみ, 深山正久. 【病理診断に役立つ分子生物学】 (第2部)病理診断医になじみのある疾患関連分子 EBER (EBV-encoded small RNA)・EBNA (EBV-determined nuclear antigen) 解説編. 病理と臨床 (0287-3745)29 巻臨増 p217-221, 2011. (査読なし)

⑫日野るみ, 深山正久. 【病理診断に役立つ分子生物学】 (第2部)病理診断医になじみのある疾患関連分子 EBER (EBV-encoded small RNA)・EBNA (EBV-determined nuclear antigen) 診断編. 病理と臨床 (0287-3745)29 巻臨増 p222-224, 2011. (査読なし)

[学会発表] (計 18 件)

①日野るみ EB ウイルス陽性胃癌 - 高頻度 DNAメチル化異常について - 平成 22 年度 遺伝子病制御研究所研究集会「感染, 炎症, 発癌」2010.12.20-21, 北海道大学 (北海道)

②深山正久 「感染症と癌 - EB ウイルス関連胃癌」第 27 回関東臨床免疫懇話会 2010.10.30. (東京)

③日野るみ EB ウイルス関連胃癌におけるエピジェネティクス異常 第 100 回日本病理学会総会ワークショップ, 2011.4.27-29. (神奈川)

④阿部浩幸, 日野るみ, 深山正久 胃癌剖検例における Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy の病理組織学的検討 第 100 回病理学会総会 2011.4.27-29. (神奈川)

⑤孫敏華, 宇於崎宏, 日野るみ, 篠崎綾, 日比谷孝志, 牛久哲男, 深山正久: 胃癌における SOX2 と SOX9 蛋白質の消失 進行ステージと EBV 感染との関連 (Loss of SOX2 and SOX9 protein in gastric cancers: correlation with the stages and EBV infection). 第 100 回病理学会総会 2011.4.27-29. (神奈川)

⑥日比谷孝志, 坂谷貴司, 篠崎綾, 孫敏華, 日野るみ, 牛久哲男, 磯貝まや, 石川俊平, 宇於崎宏, 深山正久 EB ウイルス関連胃癌における microRNA-21 と Programmed cell death 4 発現の検討 第 100 回病理学会総会 2011.4.27-29. (神奈川)

⑦六反啓文, 牛久哲男, 日野るみ, 篠崎綾, 深山正久: 粘膜内印環細胞癌からスキルス胃癌への進展様式. 第 100 回病理学会総会 2011.4.27-29. (神奈川)

⑧深山正久 感染・炎症と胃癌 EB ウイルス関連胃癌の場合. 第 100 回病理学会総会 2011.4.27-29. (神奈川)

⑨日野るみ, 宇於崎宏, 深山正久 EBV 関連胃癌の DNAメチル化機構における SOCS-3, STAT3/ DNMT1 経路の関与 第 70 回日本癌学会学術総会 2011.10.3-5 (名古屋)

⑩日比谷孝志, 坂谷貴司, 篠崎綾, 孫敏華, 日野るみ, 牛久哲男, 磯貝まや, 石川俊平, 宇於崎宏, 深山正久

EB ウイルス関連胃癌における microRNA-141 の発現と, 発現制御機構としてのメチル化の関係 第 8 回 EB ウイルス研究会 2011.7.8 (大阪)

⑪Sun M, Uozaki H, Kunita A, Hino R, Ushiku T, Hibiya T, Fukayama M et al.; Transcription Factor SOX9 in Gastric Cancer 東京大学グローバル COE 疾患のケミカルバイオロジー教育研究拠点 第 4 回リトリートおよび国際シンポジウム 2012.2.4-5. (神奈川)

⑫阿部浩幸, 日野るみ, 石川俊平, 深山正久 胃癌剖検例における Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy の病理組織学的検討 平成 23 年度がん若手研究者ワークショップ 2011.8.31-9.3 (蓼科)

⑬Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. Seoul Pathology Forum, Seoul National University Hospital (Seoul), Dec. 16-17, 2011. Korea.

⑭Fkayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. China-Japan Cancer Conference, 折円田 lRiverside Hotel (Shanghai), Dec. 21-22, 2011. China.

⑮深山正久, 胃癌の病理, EB ウイルス関連胃癌の研究を通して, 第 43 回藤田学園医学会, 藤田保健衛生大学, 2011. 10. 7. (愛知)

⑯日野るみ EBV 関連胃癌の DNA メチル化機構における SOCS3, STAT3/ DNMT1 第 101 回日本病理学会総会, 2012. 4. 26-28. (東京)

⑰阿部浩幸, 前田大地, 日野るみ, 深山正久 Epstein-Barr virus 関連胃癌及び非関連胃癌における ARID1A 発現消失の臨床病理学的検討 第 101 回日本病理学会総会, 2012. 4. 26-28. (東京)

⑱阿部浩幸, 前田大地, 日野るみ, 深山正久 Epstein-Barr virus 関連胃癌及び非関連胃癌における ARID1A 発現消失の臨床病理学的検討第 9 回 EB ウイルス研究会 2012. 7. 6(鳥取)

[図書] (計 1 件)

① Fukayama M, Shinozaki A, Hino R. Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Advances in Surgical Pathology: Gastric Cancer, 2010: p p 38-50.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日野 るみ (HINO RUMI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 60451770

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

深山 正久 (FUKAYAMA MASASHI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70281293