

14-7 食道がん、胃がんの悪性度を規定する分子情報の把握とそれを応用した生検診断法の確立

主任研究者 神戸大学大学院医学系研究科 横崎 宏

研究成果の要旨

網羅的遺伝子発現解析より得られた分子情報をもとに、新規転移関連フォスファターゼ PRL-3、ポリコーム群転写因子 EZH2、IGF-I 受容体および MMP のプロモーターに結合する Ets ファミリー転写因子 E1AF は胃がんの浸潤・転移に重要な役割を演じ、生検材料からの悪性度診断への応用の可能性を示した。予後不良である胚細胞型形質発現を有する胃がんの新たなマーカーとして MAGE 蛋白の強発現の有用性が判明した。プロテオーム解析から胃がんにおいて発現低下する MAD1 を同定し、胃がん細胞での発現低下および胃腺腫細胞との細胞内局在の違いを確認した。ラット食道多段階発がんモデルを作成し各段階の病変における cDNA マイクロアレイ解析を行ったところ、がんにおいて発現亢進する遺伝子として PCNA、FAK などを認め、cyclinD1 は前がん病変においてすでに発現亢進する傾向を認めた。これまでに確立した胃がん SAGE ライブラリーと生存に必須の 14 臓器のライブラリーの比較により胃がん特異的遺伝子 9 種を同定し、その内、MMP-10 は悪性度の良い指標になるとともに極めて感度の高い血清マーカーとなりうる事が示された。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
横崎 宏	神戸大学大学院医学系研究科 教授	食道がん、胃がんの生検悪性度診断に関する分子病理学的研究の総括
遠藤 泰志 ^{*1}	国立がんセンター東病院 医長	胃および食道がんの悪性形質獲得に関する分子病理学的解析
	^{*2} 燕労災病院 部長	
藤井 誠志 ^{*3}	国立がんセンター東病院臨床開発センター 室長	胃がん産生プロテアーゼの発現解析とがん悪性度に及ぼす影響
森 正樹 ^{*4}	九州大学生体防御医学研究所 教授	食道がんの悪性度を規定する分子情報の解析
田中 文明 ^{*3}	九州大学病院別府先進医療センター 助手	食道がんの悪性度を規定する分子情報の解析
今井 浩三	札幌医科大学 学長	胃がんの浸潤・転移機構の分子病理学的解析と悪性度診断への応用
井藤 久雄	鳥取大学医学部 教授	胃がんの悪性度を規定する分子情報の解析
中山 宏文	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授	胃がんの悪性度に関する分子病理学的解析と診断法の確立
大賀 丈史 ^{*4} (班友)	国立病院機構九州がんセンター 医師	食道がんの増殖活性及び化学放射線療法感受性因子に関する検討

* 1：平成16年4月1日～平成16年10月16日

* 2：平成16年10月17日～平成17年3月31日

* 3：平成17年4月1日～平成18年3月31日

* 4：平成16年4月1日～平成17年3月31日

総合研究報告

1 研究目的

本研究の目的は網羅的遺伝子発現解析を通して食道がん、胃がんの進展・転移を制御する分子情報を把握することにより、それぞれの悪性度を規定する因子を分子病理学的に明らかにし、得られた成果を基礎に生検組織を対象とした食道がん、胃がん悪性度の新しい遺伝子診断系を確立することである。

2 研究方法

1) 転移関連フォスファターゼ PRL-3 の機能解析とシグナルネットワークの解明を試み、胃がん悪性度診断への応用を検討する。2) プロテアーゼの網羅的発現検索を行い、胃がん組織で発現の高いプロテアーゼとそのがん組織の持つ形態学的特徴を解析する。3) 食道がんのマイクロレイ解析を行い、リンパ節転移陽性・陰性群をわける発現プロファイルを解析する。4) マイクロレイ解析で網羅的に EIAF の標的遺伝子を明らかにすることにより、胃がんの悪性度の分子機構を把握する。5) 胃がんを対象としたプロテオーム解析を進め、胃がん細胞の悪性度を規定する新規蛋白を探索する。6) SAGE 法で新規に同定した胃がん特異的発現遺伝子について悪性度との関連を解析するとともに、胃がん解析用カスタムアレイの生検組織における悪性度診断への導入を検討することである。

3 研究成果

SAGE (serial analysis of gene expression)法による網羅的遺伝子発現解析から大腸がん転移細胞で原発巣あるいは非腫瘍部大腸粘膜に比較して高発現を示す遺伝子として同定された PRL-3 は、22KD の低分子量チロシンフォスファターゼをコードしている。第 I 期までの研究で、胃がん原発巣における PRL-3 の過剰発現は、腫瘍径、脈管侵襲、壁深達度、リンパ節転移ならびに病期と有意に関連し、生検材料からの悪性度診断に有用な指標となりうることを明らかにした。第 II 期ではまず、高レベルの PRL-3 mRNA 発現を示す胃がん細胞 SH101-P4 に対し PRL-3 特異的 siRNA 発現ベクターを導入し、浸潤、転移における PRL-3 の機能を解析した。増殖能を比較すると、SH101-P4^{APRL-3-1} および SH101-P4^{APRL-3-2} はコントロールに比較して抑制され、また、PRL-3 siRNA 発現ベクター導入クローンは試験管内での著明な浸潤能抑制を示した。さらに、ヌードマウス脾臓注入肝転移モデルを用いた生体内転移

能を検討すると、SH101-P4^{APRL-3-1} では、コントロールに比較して有意な転移抑制が認められた。次に、GFP 融合 PRL-3 発現ベクターを一過性に COS7 細胞へ導入し局在を見ると、間期の細胞では従来の報告通り PRL-3 は主に細胞膜と核周辺に局在したが、M 期においては核内にも PRL-3 の局在が認められた。一方、PRL-3 の C 端プレニル化部位を欠損させた変異体 PRL-3ΔC を作成し COS7 細胞へ導入・発現させると、間期においても核内に局在することが明らかとなった。PRL-3ΔC を HeLa 細胞と COS-7 細胞に一過性導入し増殖能を評価したところ、いずれにおいても GFP-PRL-3ΔC 発現細胞は、GFP や GFP-PRL-3 を発現させた細胞よりも増殖能が高い傾向が認められた。以上より PRL-3 は胃がん細胞の運動/浸潤能に関与し、転移巣の成立に極めて重要な役割を果たすとともに、その核内局在が細胞増殖を促進する可能性が示唆された。

(横崎)

胚細胞型形質を有する胃がんは極めて予後不良であることが知られている。AFP を産生する胃がん 4 例 (絨毛がん 1 例、部分的肝臓がん 1 例、通常型 1 例、肝臓がん培養細胞移植腫瘍 1 例) と AFP 産生を伴わない通常型胃がん 4 例を、Affimetrix 社 Gene Chip を用いて網羅的遺伝子発現解析したところ、MAGE-A3,6,12 の mRNA が極めて特異的に AFP 陽性胃がん群で強発現していた。そこで MAGE 蛋白 A の 1,2,3,4,6,10 および 12 を広く認識する抗 MAGE 抗体 6C1 を用い、55 例の外科切除胃がん (AFP を産生胃がん: 22 例、通常型胃がん 33 例) について MAGE 蛋白発現と、HCG や胎盤型 ALP 等の胎児性蛋白発現、臨床病理学的な関連を検討した。AFP 産生胃がんは AFP 非産生性通常型胃がん に比べ、有意に低分化充実型の組織像を呈する病変が多く、脈管侵襲の程度が高度であった。免疫染色による MAGE 蛋白発現の程度と、Gene Chip の MAGE 遺伝子発現の程度は極めて良く関連していた。胃がん切除材料での検討では、MAGE 蛋白発現と AFP 産生能は極めて強く関連していたが、HCG 発現との関連はみられなかった。MAGE 蛋白は腫瘍拒絶抗原として働くことが知られており、胚細胞型形質を有する胃がんが免疫療法の重要な対象となり得ると同時に、胚細胞型形質を有する胃がんの新たなマーカーとしての有用性が判明した。(遠藤)

胃がん細胞のプロテアーゼ産生を制御することが示唆される哺乳類ポリコム遺伝子群 10 種 (PRC2: EZH2、EED、PRC1: BM11、RING1、CBX7、PHC1、RNF134、RNF18、L3MBTL、CBX4) の mRNA 発現を、胃がん細胞 8 株ならびに切除胃がん 22 症例凍結組織のがん及び非

がん組織について、定量的 RT-PCR 法にて検討した。いずれの胃がん細胞株も、*CBX7* と *RNF18* を除く 8 種類のポリコム遺伝子群の mRNA の発現を示した。その内 *EZH2* は著しく高いレベルで発現され、低分化がん由来株が高分化がん由来株に比較して高い傾向を示した。一方、ヒト胃がん患者 22 症例中 17 例 (77.3%) で、がん組織において対応する非腫瘍性胃粘膜より高い *EZH2* mRNA の発現が認められた。また、*EZH2* mRNA の発現は、高分化管状腺がんでは、腫瘍組織と非腫瘍組織では差異が殆どなかったが、中分化管状腺がんではがん組織でより高い傾向を示し ($P = 0.0576$)、低分化腺がん或いは印環細胞がんではがん組織で有意に高い発現を示した ($P = 0.0022$)。以上から、*EZH2* の発現は胃がんの悪性度に関連する可能性が示唆された。(藤井)

AMN (N-amyln-N-methylnitrosamine) をイニシエーター、TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) をプロモーターとするラット食道がん 2 段階発がんモデルを作製し、正常、乳頭腫、異形成、がん各段階からレーザーマイクロダイセクション (LMD) 法により微小病変を採取し、cDNA アレイを用いて、多段階発がん過程における遺伝子発現変化を包括的に検討した。全遺伝子を用いたクラスター解析の結果、正常上皮、がん、前がん病変がクラスターリングされた。同じクラスにクラスターリングされた乳頭腫と異形成については再現性を持って同様の結果が得られており、ラットではヒトと異なり、乳頭腫は前がん性の性格を持つ可能性が考えられた。*Cyclin D1*、*CDK4* は正常上皮ではその遺伝子発現が低く、前がん病変でやや高く、がんで高発現している傾向を認めた。また、がんの転移に関係する遺伝子 *FAK* は、転移能を持たない前がん病変まではその遺伝子発現が低く、がんにおいてのみ高発現を認めた。以上より、ラット食道がんモデルにおける各段階の病巣特異的な遺伝子発現プロファイルが決定され、多段階発がん過程において重要な働きをすると思われる遺伝子が包括的に同定可能であった。(森)

Epidermal growth factor receptor (EGFR) に対する分子標的治療剤ゲフィチニブ投与の胃がん、大腸がんにおける適応の可能性を検討する目的で、各々 39 例、33 例の臨床検体における EGFR の突然変異を検索した。LMD によりがん細胞のみを選択的に採取、抽出した DNA を PCR で増幅後、EGFR キナーゼ・ドメインであるエクソン 18 から 21 を直接塩基配列決定した。胃がんでは 2 例 (5.1%) で *EGFR* 遺伝子エクソン 20 にグアニンからアデニンへの点変異を認めたが、アミノ酸の変化を伴わなかった。一方、大腸がんでは 4 例 (12%) にアミノ酸置換を伴う

EGFR 遺伝子点変異が確認された。大腸がんでの *EGFR* 変異率は非小細胞性肺がんのそれとほぼ同等であった。従って、胃がんではゲフィチニブ感受性例は極めてまれであるが、大腸がんには奏功する症例が存在する可能性が示唆された。(田中)

第 I 期において食道がんで Insulin-like growth factor (IGF) とその受容体からのシグナル変化は細胞周期に影響し、がん細胞の増殖や浸潤を引き起こし、IGF-I receptor (IGF-Ir) 阻害により、がん化抑制・浸潤抑制・腫瘍退縮等がもたらされること明らかにしてきたが、第 II 期では胃がんについて同様の検索を行った。胃がん組織における免疫組織化学的検討では、IGF-II および IGF-Ir の過剰発現を約半数程度に認め、深達度、リンパ節転移、pTNM 病期との相関が認められるとともに、IGF-II および IGF-Ir の共発現を認めた症例は悪性度が高かった。胃がん培養細胞では、検討した 12 株の内 10 株で IGF-Ir および IGF-II の高発現が確認された。そこで、高発現胃がん細胞株 MKN-45、MKN-74、NUGC4 にドミナントネガティブ IGF-Ir (IGF-Ir/dn) アデノウイルスベクターを導入すると、PI3K/Akt シグナル伝達系を介して *in vitro* での増殖抑制、浸潤能抑制が起こり、種々のストレスによるアポトーシス誘導が増強され、ヌードマウス皮下移植モデル、腹膜播種モデルにおいても腫瘍形成抑制を示した。さらに、IGF-Ir/dn の導入により IGF で胃がん細胞に誘導されるマトリライシン発現が抑制された。従って、IGF-Ir は胃がんの増殖・生存の他に浸潤においても重要であり、生検組織を用いた IGF/IGF-Ir axis ならびにマトリライシンの発現解析は胃がんの悪性度診断に有用となる可能性が示されるとともに、IGF-Ir/dn は胃がんの増殖、浸潤抑制に有用な手段となる可能性が示唆された。(今井)

胃がんの浸潤・転移に深く関与する細胞外基質分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP) 発現亢進メカニズムを明らかにし、悪性度診断への応用をはかる目的で cDNA アレイ解析を行い、多くの MMP プロモーター領域に存在する PEA3 エlement に結合する Ets ファミリー転写因子 E1AF/PEA3 (E1AF) の発現亢進を認めた。100 例の胃がん手術摘出組織のがん部および隣接非がん部、10 例の胃がん肝転移組織について *E1AF*、*ER81*、*ERM*、*Ets-1*、*Ets-2*、*MMP-1*、*MMP-2*、*MMP-3*、マトリライシン (*MMP-7*)、*MMP-9*、*MMP-13*、*MMP-14* の mRNA 発現を半定量的に検討すると、*E1AF* の過剰発現は 100 例中 64 例に見られ、さらに、肝転移組織全例にその発現を認めた。一方、隣接非がん組織における *E1AF* の発現は認めないか、ごく少数例でのみ非常に低レベルの発現を

認めるのみであった。*EIAF* 発現はがんの深達度、リンパ管および脈管浸襲、リンパ節および遠隔転移、病期、再発に相関し、*EIAF* 発現陽性例は陰性例に比べ全生存期間、無再発生存期間ともに有意に短かった。さらに、MKN-45 胃がん細胞株にアンチセンス *EIAF* 遺伝子を導入したところ、2 クローンに著明な *EIAF* 発現低下が認められ、コントロールに比べマトリライシンの発現低下を伴っていた。さらに、これらにおいては試験管内での有意な浸潤能抑制が認められた。以上より、*EIAF* は、主にマトリライシンの発現誘導を介して胃がんの浸潤・転移に深く関与し、その発現検索は胃がんの悪性度診断に有益な情報を与えることが示された。(今井)

プロテオミクス解析から同定された胃がん抑制遺伝子候補 *MAD1* の発現を検索したところ、胃がんでは、早期がんと比較し進行がん、組織型では低分化型に比較し高分化型で有意に低値であった。一方、胃腺腫では主として核上部に局在し腫瘍腺管の内腔に一致していたが、がんでは細胞質に点状・複数個観察され、発現および局在の変化が示された。次に、GFP 融合ヒト *MAD1* 発現ベクターを胃がん細胞株 MKN-1 に導入するとコントロールに比較して有意に増殖抑制がもたらされた。導入 *MAD1* 蛋白は核あるいは核周囲で点状に1個ないしは複数個局在し、γチューブリンと共局在することが確認され、*MAD1* 蛋白の局在の乱れは、中心体の局在の異常を反映していることが推察された。従って、*MAD1* 蛋白はヒト胃においてがん抑制遺伝子として機能している可能性が示唆され、その発現低下が胃における腫瘍化とその進展に関連していること、加えて、*MAD1* 蛋白の一部は中心体と複合体を形成し、その局在の異常はヒト胃上皮細胞のがん化を示すマーカーとしての可能性を示唆していると考えられた。(井藤)

第 I 期までに完成した世界最大の胃がん SAGE ライブラリー (GEO accession no. GSE545) と生存に必須の 14 臓器 (心臓、肺、肝臓、脳など) のライブラリーの比較および実際の組織試料における定量的 RT-PCR 法により、*APIN*、*TRAG3*、*CYP2W1*、*MIA*、*MMP-10*、*DKK4*、*GW112*、*REGIV*、*HORMAD1* の 9 遺伝子が胃がんの特異的に発現することを見出した。メラノーマ細胞から分泌される蛋白として同定された *MIA* の胃がんについての定量的 RT-PCR では、stage I/II に比較して stage III/IV で有意に発現レベルが高く、免疫染色でも stage III/IV で陽性症例が有意に多かった。さらに、*MIA* 陽性例は陰性例に比較して有意に予後不良であった。ELISA にて測定した *MIA* 値は、stage IV の胃がん症例の血清および腹膜播種症例

の腹腔洗浄液で高値であった。次に、GW112 は骨髄芽球からクローニングされた遺伝子で、最近アポトーシスの抑制作用を有すること、強制発現により腫瘍増殖に関与することが明らかにされた。定量的 RT-PCR による検討で、正常の小腸、大腸、膵臓などで極めて低いレベルで発現しているのみであり、胃がんでは 58% において過剰発現していた。さらに、stage I/II に比較して stage III/IV で有意に発現レベルが高かった。*REGIV* は炎症性腸疾患で発現が亢進し、粘膜防御、細胞増殖に関与する可能性が想定されており、分泌蛋白であることを確認した。免疫組織化学的に胃がん (29%)、大腸がん (36%)、膵がん (22%)、消化管カルチノイド (93%) に発現していたが、肺がん、乳がんには発現は全く認められなかった。胃がんにおける *REGIV* の発現は、腸型粘液形質および神経内分泌分化と有意に相関していた。悪性度との関連では、大腸がんではステージの進行と相関していたが、胃がんではそのような傾向はなかった。一方、*REGIV* 蛋白は ELISA によって血清中で捉えられ、胃がん患者では 36% に対し、非がん対照者では 1% のみが陽性であり、ステージ I から陽性になることから腫瘍マーカーとして有用とみなされた。細胞外基質分解酵素 *MMP-10* は、mRNA レベルで胃がんの 52% において過剰発現していた。免疫染色では胃がんの 45% が陽性であり、非がん部胃粘膜はほぼ陰性であった。胃がんにおける *MMP-10* 陽性は、がんの深達度と有意な相関を示し、58 例の進行がん症例における検討では、*MMP-10* 陽性例は陰性例に比較して有意に予後不良であり、悪性度のよい指標になるとみなされた。尚、ELISA による血清値測定では、200pg/ml を cut off とすると、胃がん症例の陽性率は 94%、非がん対照者における偽陽性は 15% であり、極めて感度の高い血清マーカーともなり得るものとみなされた。(中山)

班友の大賀は食道癌の術前温熱化学療法、化学放射線療法症例における著効例の選別のため、術前生検検体に対する p53 および p21 免疫組織化学を施行し、p53(-)p21(+)症例全例が術前温熱化学放射線療法の治療感受性 grade 3 を示すことを明らかにした。

4 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、文部科学省、厚生労働省、経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。遺伝子発現解析においても、指針の趣旨を踏まえた対応を行う。