

# 学位論文要旨

氏名 成毛 哲



論文題目

「Comparison of depth-specific gene expression levels in primary tumors  
in advanced gastric cancer」

(進行胃癌における原発巣内での遺伝子発現の比較)

指導教授承認印

小泉 和三郎



## Comparison of depth-specific gene expression levels in primary tumors in advanced gastric cancer

(進行胃癌における原発巣内での遺伝子発現の比較)

氏 名 成毛 哲

### 背景

胃癌は世界的にも一般的な悪性腫瘍であり、現在でも主要な死因の一つとしてあげられる。

また、多くの悪性腫瘍内で細胞異質性が存在することは広く認められ、腫瘍が進展していく過程で、分化型癌から未分化型癌に組織型が変化する“脱分化”という現象を胃癌の中にも認めることがあるが、この脱分化した腫瘍細胞は遺伝子にも広範囲に変化をきたしていることが明らかになってきている。しかしながら、同一腫瘍内の組織型の変化があるにもかかわらず、腫瘍内の部位間での遺伝子発現の変化についてはいまだに検討が少ない。

本研究は、前治療のないステージII-IIIの進行胃癌の手術検体を用い、原発巣内における部位毎の遺伝子発現の差異を明らかにすることを目的に行われた。

本研究では、特定の部位から細胞を採取するため、laser-captured microdissection (LCM)を用いた。LCMは可視下中の組織から特定の細胞を選択的、かつ汚染なく簡易に採取することが可能であり、本研究には適したものと考えた。

また、本邦では、StageII-III (T1症例やT3(SS)N0症例を除く)進行胃癌症例の標準的治療は胃切除+D2リンパ節郭清後、術語補助化学療法として、5-Fluorouracil (FU)系の経口抗癌剤であるS-1(大鵬薬品, 東京, 日本)の内服加療となっている。昨今では、腫瘍内でのフルオロピリミジン代謝関連遺伝子発現レベルが胃癌患者の臨床効果予測因子となる可能性が示唆され、さらに上皮増殖因子受容体(EGFR), 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), 低酸素誘導因子-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ )の腫瘍内遺伝子発現も胃癌患者の臨床効果予測因子となりうることが示唆されている。そこで、本研究では、フルオロピリミジン代謝関連遺伝子として、チミジレートシンターゼ(TS), チミジンホスホリラーゼ(TP), デヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(DPD)、血管新生因子として、上皮増殖因子受容体(EGFR), 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), 低酸素誘導因子-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ )、以上の6種類を標的遺伝子として選択した。

### 方法

本研究はretrospectiveである。症例は、2001年1月から2004年3月までに北里大学東病院にて診断加療された連続的な29例で、全例がACTS-GC trialに登録されており、さらに全例から文書による検体組織の実験的使用の同意書は得られている。全例が病理学的にStageII-III (T1症例は除く)の進行胃癌症例であり、R0の胃切除+D2リンパ節郭清を施行されている。また、臨床評価項目は胃癌取り扱い規約第13版(日本胃癌学会)に基づいて評価された。

ホルマリン固定パラフィン切片の手術検体から、LCMを用いて以下の3箇所より組織を採取した：①正常粘膜部、②原発巣表層部(原発巣の粘膜層)、③原発巣先進部(原発巣筋層以深で腫瘍の最も先進した部分)。採取した組織からmRNAを抽出し、cDNAを作成。gDNAなどのコンタミネー

ションを除去後、標的遺伝子を増幅した試料から、定量的リアルタイムPCRにて遺伝子発現を測定した。 $\beta$ -アクチンをリファレンスとして用い、検量線から濃度比を算出し標準化する方法を用いた。

## 結果

症例数は29例。男性18例、女性11例であった。平均年齢は60.0歳。原発巣表層部の病理組織型は分化型腺癌が9例、未分化型腺癌が20例であった。肉眼型では、IIc類似進行胃癌が2例、type1が1例、type2が6例、type3が12例、type4が2例、type5が6例であった。T因子に関しては、T2症例が9例、T3症例が19例、T4症例が1例であった。N因子では、N0症例が4例、N1症例が16例、N2症例が9例であった。Stageは、StageIIが11例、StageIIIAが12例、StageIIIBが6例であった。

同一原発巣内で組織型の変化があったものは4例、全て原発巣表層部は分化型腺癌であり、腫瘍が先進するにつれ未分化型腺癌に変化していた。これらは原発巣表層部が分化型癌であった症例の44.4%であった(4/9例)。リンパ節転移巣で原発巣表層部の組織型が変化していたのは4例で、全て原発巣表層部は分化型腺癌であったものが、リンパ節転移巣では未分化型腺癌に変化していた。これは原発巣表層部が分化型癌であった症例の44.4%であった(4/9例)。

標的遺伝子に関しては、原発巣先進部のTP, EGFR, HIF1 $\alpha$ の発現は、原発巣表層部と比べ、有意に高くなっていた(TP:  $p=0.041$ , EGFR:  $p=0.043$ , HIF1 $\alpha$ :  $p=0.005$ )。また、全ての標的遺伝子において、遺伝子発現は採取部位が深くなるほど高発現し、これらに正の相関を認めた(TS:  $r=0.309$ ;  $p=0.007$ , TP:  $r=0.464$ ;  $p<0.001$ , DPD:  $r=0.313$ ;  $p=0.007$ , EGFR:  $r=0.306$ ;  $p=0.008$ , VEGF:  $r=0.316$ ;  $p=0.006$ , HIF1 $\alpha$ :  $r=0.426$ ;  $p<0.001$ )。また、今回の検討では、脱分化の有無と遺伝子発現の差異との検討も行ったが、統計学的有意差は認められなかった。

## 結論

胃癌において、腫瘍の進展やリンパ節転移に伴って、分化型癌が未分化型癌に変化する脱分化を認めることがある。我々の研究でも、4例で原発巣表層部が分化型癌であったものが腫瘍の先進部では未分化型癌に変化していた。これは、原発巣表層部が分化型癌であった症例の44.4%に当たる。また、原発巣表層部が分化型癌であったものがリンパ節転移巣で未分化型癌に変化していた症例も4例認められた。

粘膜下における未分化型癌への変化はリンパ管侵襲やリンパ節転移などの危険性を上昇させるといわれている。今回、脱分化と遺伝子発現の関係は明らかにできなかったが、遺伝子の変化は脱分化のような組織型の変化に先立つものである。

本研究では、腫瘍内のTP, EGFR, HIF1 $\alpha$ の遺伝子発現は原発巣表層部よりも原発巣先進部において有意に高くなっており、標的遺伝子全てにおいて、遺伝子発現は採取部位が深くなるほど高発現する、正の相関があることを明らかにできた。

TPとHIF1 $\alpha$ が同時に上昇しているのは、近年明らかになりつつある血管新生のパスウェイに矛盾しない。

TPは低酸素で誘導されるアポトーシスに対し細胞を耐性にし、胃癌において、腫瘍浸潤や血管新生、転移能獲得にも関与していると考えられており、また、HIF1 $\alpha$ は、低酸素状態になると高発現し、血管新生因子を含む様々な増殖因子の転写を誘導し、胃癌においても、血管新生や腫瘍浸潤、転移にも関与しているといわれている。しかし、近年、HIF1 $\alpha$ の発現は低酸素以外にも、

他の何らかの分子による転写レベルでの制御を受けている可能性が指摘されている。

TPは腫瘍先進部で高発現し、病理学的検討でもTPやHIF1 $\alpha$ は分化型胃癌と比べ、低分化型胃癌でより高発現しているとの報告もある。

これまでの報告と今回の結果からは、腫瘍細胞が低酸素を含めた環境変化に対する適応の過程で起こったものと推測できる。

今回の実験結果を説明できるようなpathwayの存在は証明されておらず、遺伝子発現の変化と血管新生などとの関連性は更なる研究が必要であるが、腫瘍細胞内のいくつかの遺伝子はその位置する部位により発現が変化し、その発現は深度が深くなるほど高くなることが示された。これは、腫瘍細胞が先進するにつれて、悪性度などの活動性が増加する可能性を示唆しているのかもしれない。

今後も症例数や採取部位を増やしさらに詳細に、腫瘍細胞の部位による遺伝子変化を明らかにしたい。