

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 石井 智



論 文 題 目

「The *H19-PEG10/IGF2BP3* axis promotes gastric cancer progression in  
patients with high lymph node ratios

(H19-PEG10 / IGF2BP3 axis は高度リンパ節転移比を持つ患者における胃癌の  
進行を促進する)」

指 導 教 授 承 認 印

渡辺昌彦



The *H19-PEG10/IGF2BP3* axis promotes gastric cancer progression in patients  
with high lymph node ratios  
(H19-PEG10 / IGF2BP3 axis は高度リンパ節転移比を持つ患者における胃癌の進  
行を促進する)

氏名 石井 智

【導入】

胃癌は世界的に男性で第3位、女性で第4位の癌関連死の原因である(2012年)。胃癌において、TNMステージは最も重要な予後因子である。しかしながら、同じステージに分類された患者間でもその臨床経過は様々である。再発リスクの高い患者を予測するためのバイオマーカーの同定が重要である。

我々は、最近、リンパ節転移比(Lymph node ratio; LNR)は病理学的StageIII(pStageIII)胃癌患者において独立した予後因子であると示した。pStageIII胃癌と高LNRをもつ患者は最も予後不良であった。LNRは郭清されたリンパ節に対する転移リンパ節数の比である。多変量解析において、LNRはステージに関わらず、進行胃癌において予後的意義を持ち、Nステージよりもより正確な予後マーカーであると示された。LNRはまた、同じステージ間における予後の差を補正することが出来た。このように、高LNRは進行胃癌患者における不良な予後と相関することが示されてきたが、その分子機序を説明する包括的な研究は報告されていない。以前に、我々は、高LNRは進行胃癌におけるEGFR発現と関連していたことを発見した。しかしながら、我々の研究は第1優先グループにおける遺伝子に注目しただけであった。よって、我々は第2、3、4優先グループにおける遺伝子の発現を調査し、高LNRに関連する遺伝子を同定し、その分子機序を解明することを目的とした。

【対象と方法】

1. 胃癌予後予測因子としてのLNRの検証

最初に胃癌においてLNRと予後との間の関係を検証した。我々の以前の報告において、LNRは根治的胃切除を受け、S-1補助化学療法を受けたpStage II/III胃癌患者における予後(無再発生存; RFS)を予測しえると示した。LNRを基とした予後の層別化はpStage IIIC胃癌患者においてのみ可能であった。よって、2000年から2010年の間で我々の施設で治療されたpStageIIIC胃癌を持つ37患者を対象とし、その予後を更新し、LNRの予後的意義を解析した。加えて、2011年から2015年の間に登録されたpStageIIIC胃癌を持つ15患者を対象とし、LNRの予後的意義を解析した。LNRのカットオフ値は以前の報告と同じ16.7%であった。

2. 高LNR関連候補遺伝子の選別と検証

LNRと関連した分子を同定することを目的として、高LNRと低LNRを持つStageIII胃癌検体を4症例ずつ、コントロールとして非癌胃粘膜検体2例を対象とし、

mRNA 発現マイクロアレイを使用して、非癌胃粘膜で発現していた遺伝子を除外し、高 LNR と低 LNR の遺伝子の発現比と発現頻度で選別した。選別された遺伝子は、それらを発現していた高 LNR 症例数に応じて、優先順位化された。つまり、高 LNR をもつ 4 症例のうち 1 症例に高発現を示す遺伝子を第 1 優先遺伝子、2 症例に高発現を示す遺伝子を第 2 優先遺伝子、3 症例に高発現を示す遺伝子を第 3 優先遺伝子、4 症例すべてで高発現を示す遺伝子を第 4 優先遺伝子とした。同定された第 2, 3, 4 優先グループにおける遺伝子において、我々は 200 を超える生発現値を持つ遺伝子を高 LNR 関連候補遺伝子として選別した。

選別された高 LNR 関連候補遺伝子を検証するために、2008 年から 2011 年の間に、当施設で根治的胃切除術を施行され、S-1 補助化学療法を受けた pStageIII 胃癌をもつ 39 症例の腫瘍組織から mRNA を抽出、cDNA とし、RT-PCR を使用して高 LNR 関連候補遺伝子発現と LNR の関係を検証した。

### 3. 胃癌細胞株を使用した高 LNR 関連遺伝子の機能解析

当研究室が保有する 6 つの胃癌細胞株 (MKN7, MKN74, Kato-III, NUGC4, SH-10-TC, and KE97)における高 LNR 関連遺伝子発現を RT-PCR と定量的 RT-PCR を使用して確認した。

高 LNR 関連遺伝子を発現する胃癌細胞株に対して、高 LNR 関連遺伝子の RNA 干渉(RNAi)を行い、高 LNR 関連遺伝子の発現低下を確認した。コントロールとの比較において、proliferation assay, invasion assay, colony formation assay, chemo-sensitivity assay を行った。

### 4. 高 LNR 関連遺伝子の分子メカニズムの検証

同定された高 LNR 関連遺伝子において、これまで報告された分子メカニズムを考察し、RNAi によってそのシグナル伝達経路にある遺伝子発現の変化を RT-PCR を使用して検証した。

### 5. 統計解析

カテゴリー変数は  $\chi^2$  乗検定または Fisher 正確検定を使って解析された。グループ間の連続変数における違いは分散分析(ANOVA)を使用して評価された。累積 5 年 RFS は Kaplan-Meier 法を使用して推定され、統計学的差は log-rank test を使って解析された。RFS は手術日から再発または最終フォローアップ日までで計測された。P<0.05 が統計学的に有意と考えた。単変量解析で p<0.05 を持つ因子は、独立予後因子を同定するために Cox 比例ハザードモデルを使用した多変量解析の対象とした。すべての解析は JMP Ver 11.1(SAS Institute Japan, Tokyo, Japan)を使用し解析された。

## **【結果】**

### 1. pStageIIIC 胃癌における LNR の予後的意義の検証

2000 年から 2010 年の間に当施設で治療された pStageIIIC 胃癌をもつ 37 症例に



における更新された予後と LNR の解析結果は、LNR の有意な予後的意義を証明した(5 年 RFS; 低 LNR, 81.8%, 高 LNR, 17.3%,  $p=0.001$ ). さらに、2011 年から 2015 年の間に当施設で治療された 15 の同様な症例の独立したコホートにおける検証の結果、5 年 RFS は低 LNR で 100%, 高 LNR で 42.2%であった( $p=0.09$ ).

## 2. pStageIII 胃癌症例における高 LNR 関連候補遺伝子の選別

最終的に 5 つの候補遺伝子( PEG10, H19, IGF2BP3, PGA3, CD177)が次の理由で選別された: PEG10 は T1(高 LNR)症例において最も高く発現していた, IGF2BP3 と H19 は T1 症例と T11(高 LNR)症例の両方に高い発現を示した, PGA3 は T1 症例と T3(高 LNR)症例の両方で高い発現を示した, CD177 は T9(高 LNR)症例において最も高い発現を示した. H19 と PGA3 は, T4 症例と T20(低 LNR)症例においてそれぞれ高く発現していた. しかしながら、これらは、高 LNR を持つ患者において高い発現頻度のために選別された(2/4, 50% vs 1/4, 25%).

## 3. 進行胃癌組織における高 LNR 関連候補遺伝子の検証

39 症例の中で、17(43.6%)は高 LNR を持ち、22(56.4%)は低 LNR であった. RT-PCR の結果、H19 と PEG10 発現は低 LNR グループに比し高 LNR グループでより高頻度に発現していた(それぞれ、 $p=0.0041$ ,  $p=0.034$ ). IGF2BP3 と CD177, PGA3 の発現頻度は、高 LNR と低 LNR において、有意な差は観察されなかった(それぞれ、 $p=0.1977$ ,  $p=0.2018$ ,  $p=0.9866$ ). また、高 LNR 群において、H19 と PEG10 の高頻度の共発現が観察された(16/29, 41%). 有意な相互関係は、H19 と PEG10, H19 と IGF2BP3, PEG10 と IGF2BP3 との間で観察された(それぞれ、 $p=0.0003$ ,  $p=0.004$ ,  $p=0.0138$ ). ゆえに、H19 と PEG10 は高 LNR 関連遺伝子として同定された.

## 4. 胃癌細胞株における高 LNR 関連遺伝子の RNAi による機能解析

6 つの胃癌細胞株における高 LNR 関連遺伝子 H19 と PEG10 発現を RT-PCR と定量的 RT-PCR にて確認した結果、H19 を高発現する細胞株は MKN7 と MKN74, PEG10 を高発現する細胞株は MKN7 と KE97 であった. KE97 は非接着培養にて以後の解析に使用しなかった.

siRNA を使用して、MKN7 における内因性 H19 と PEG10 発現を knockdown した. Knockdown は RT-PCR と定量的 RT-PCR の両方を使用して確認された. 興味深いことに、H19 knockdown は PEG10 発現を減少した. 逆に、PEG10 knockdown は H19 発現を減少した、これらのデータは、H19 と PEG10 は互いの発現を調節しているということを提案した.

H19 を高発現する MKN7 に対して RNAi による H19 knockdown を行った結果、コントロールと比較し、proliferation, invasion, anchorage independent growth を有意に減少した. 同様に、MKN74 に対する H19 knockdown は、コントロールに対して、proliferation, invasion, anchorage independent growth を有意に減少した.

進行胃癌に対してしばしば使用される微小管障害剤 docetaxel を使って MKN7 と MKN74 の chemo-sensitivity における H19 knockdown の効果を調査した. MKN7

と MKN74 の両方において、H19 knockdown は cell viability を減少させ、chemo-sensitivity を増強した。

MKN7 における PEG10 knockdown を行った結果、コントロールと比較し、proliferation, invasion, anchorage independent growth を有意に減少した。そして、PEG10 knockdown は、docetaxel に対する MKN7 の chemo-sensitivity を増強し、H19 の効果と同様に cell viability を減少した。

#### 5. H19-PEG10 / IGF2BP3 axis は胃癌細胞の悪性表現型を促進する

我々は MKN7 における H19 と PEG10 の間の関係は胃癌細胞において、形質転換に影響を与えうると仮定した。H19 は MKN74 において PEG10 を誘導しなかったが、H19 knockdown は形質転換を抑制した。したがって、我々は MKN74 における H19 knockdown が形質転換を抑制する分子メカニズムを調査した。H19 は IGF2BP3, Zeb1, Snail1 発現の誘導をそれぞれもたらす、let-7, miR-200, miR-34 に対する分子スポンジとして働く。これは、Zeb1 と Snail1 の発現を増加することを介して E-cadherin 発現の減少の結果として上皮間葉系移行 (EMT) の誘導を導く。我々は H19 knockdown は、MKN74 において IGF2BP3, c-Myc, Zeb1, Snail1, E-cadherin の発現を変化させるかどうかを検証した。MKN74 における H19 knockdown は IGF2BP3, c-Myc, Zeb1, Snail1 の発現を減少し、E-cadherin の発現を増加した。IGF2BP3 発現は H19 発現と関連し、原発胃癌における高度 LNR と全般的に関連していた。

#### **【考察】**

本研究において、LNR はステージ間移行を調整し、pStageIIIC 胃癌の予後を予測すると示した。ステージ間移行はしばしば pStageIIIC 胃癌患者に観察される。ゆえに、高 LNR は病勢の高い胃癌の指標である。H19 発現は高 LNR と強固に関連し、加えて、PEG10, IGF2BP3, EGFR の高発現は高 LNR と関連していた。さらに、H19 発現は PEG10 と IGF2BP3 発現と関連していた。

H19 は EMT に関与し、癌細胞増殖や浸潤、転移を調節する。H19 は 2 つの主な機能をもつ：miR-675 のリザーバーとして働き、miRNA に対する分子スポンジとして働く。

MiR-675 は、EGFR の安定性や活性化を調節する。miR-675 と EGFR の間接的な関係は、我々の結果を支持する。ゆえに、EGFR に加えて H19 を標的とすることは進行胃癌と高 LNR を持つ患者の予後を改善するかもしれない。未来の研究は高 LNR を持つ胃癌患者における EGFR と H19 発現を検証するだろう。

H19 は様々な miRNA に拮抗する。その一つに、let-7 を拮抗し、c-Myc や IGF2BP3 を含む転移調節遺伝子の発現を転写後に抑制する。我々は、EGFR と H19-IGF2BP3 と高 LNR の間の関係を観察しただけであるが、H19 の分子スポンジ活性によって介在される let-7-IGF2BP3 feedback loop の存在と EGFR と miR-675 による IGF2BP3

の調節を示した。これらのメカニズムは胃癌細胞のアグレッシブな様式を部分的に説明するかもしれない。また、H19は Zeb1/2-miR200 loop と Snail1-miR-34 loop の両方を抑制することによって、EMT を抑制する。ゆえに、H19は EMT において重要な役割を演じる。

PEG10 は近年、癌の増殖や浸潤、転移における潜在的な役割について注目を集めている。その一つに、PEG10は TGF $\beta$  シグナリングを介して Snail1 発現を調節する。また、PEG10 と H19 は c-Myc との正の feedback loop に関わる。この関係は H19-PEG10 axis 機能を基とするメカニズムの一部であるかもしれない。ゆえに、H19-PEG10 axis は胃癌において潜在的な治療標的として考慮されるべきである。

このように、H19-PEG10/IGF2BP3 axis は原発胃癌のアグレッシブな特徴(例えば、浸潤、転移、化学療法抵抗性)を説明するかもしれない。この axis を標的とする治療法は化学療法の効果を増強しうるだろう。