

学 位 論 文 要 旨

氏 名

河西 奈津子



論 文 題 目

「Gene expression profile of genes related to canceration, invasion or conversion
for metastasis in patients with poorly differentiated gastric adenocarcinoma
treated by gastric endoscopic submucosal dissection」

(内視鏡治療された胃低分化腺癌における、
癌化・浸潤・形質転換に関連する遺伝子プロファイル)

指 導 教 授 承 認 印

小泉 和彦



「Gene expression profile of genes related to canceration, invasion or conversion for metastasis in patients with poorly differentiated gastric adenocarcinoma treated by gastric endoscopic submucosal dissection」
(内視鏡治療された胃低分化腺癌における、癌化・浸潤・形質転換に関連する遺伝子プロファイル)

氏名 河西 奈津子

背景

胃癌は、世界では減少傾向であるものの、日本ではいまだ罹患・死亡数ともに上位の悪性腫瘍であり、診断・治療において重要な疾患である。

早期胃癌に対する内視鏡治療は、偶発症の少なさや根治性の高さから、日本の大半の医療施設において一般的なものとなっている。その適応を決定する深達度や範囲診断も、診断法の確立やデバイスの向上から、精度はある程度担保されてきた。しかし、術前に適応内と考えられたものの中で、術後の病理組織学診断で適応外病変・非治癒切除と診断される症例も一定の割合で存在する。日本の胃癌治療ガイドラインでは、適応から外れた症例については一律でリンパ節郭清を伴った外科手術が推奨されているが、実際の術後のリンパ節転移率は約 15%と決して高くなく、結果として追加切除を行う必要がなかった症例も経験される。現在、治癒あるいは非治癒切除の判断は術後の病理組織学的診断に拠るが、同じ診断でもリンパ節転移を起こすものと起こさないものがあり、腫瘍そのものの性質が違ふ可能性がある。

我々のグループは、進行胃癌において同一の腫瘍内でも、腫瘍の層・転移リンパ節などの部位により組織型や遺伝子発現量に変化があり、それら遺伝子は深達するほど、また転移巣では更に発現量が増加していることを報告してきた。一方、早期胃癌の内視鏡切除検体を用いた分子生物学的な研究は現状多くなく、中でもリンパ節転移率・予後に関して不良とされている低分化腺癌について、早期の段階での遺伝子発現量の変化にフォーカスした研究は少ない。

今回、胃原発の早期低分化腺癌における遺伝子発現量の変化を検討するとともに、同一腫瘍内の部位による発現量の変化に着目し、癌化あるいは浸潤や転移などに関連する遺伝子を解析した。癌の早期の段階での癌関連遺伝子の傾向を検討し、リンパ節転移あるいは予後予測因子になり得る遺伝子の抽出を行うことを目的とした。

方法

本研究は、後ろ向き研究である。検体は、北里大学病院にて早期胃癌と診断され内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)を施行された症例のうち、術後の病理組織学的診断にて低分化腺癌が主組織型と診断された症例を用いた。

ホルマリン固定パラフィン包埋された組織切片を LMD(Laser microdissection) technique にて、①非腫瘍性粘膜(N)、②腫瘍粘膜(M)、③腫瘍粘膜下層部(SM)に切り分けた。採取した検体から total RNA を抽出し、その後 cDNA に変換した。発現レベルを上げるため、予備増幅を行った後、リアルタイム PCR にて遺伝子発現量の測定を行った。

標的遺伝子は、まず既成のプレート 2 枚を用い検索した癌幹細胞関連、上皮間葉転換(EMT)関連の遺伝子計 158 種類とした。その後、それら遺伝子のうち、発現量増加あるいは深達するに従い段階的に増加する傾向のある 12 種類(CALD1, CD44, COL1A2, COL3A1, DKK1, FN1, FZD7, TGFB3, THY1, TIMP1, ZEB1, ZEB2)を絞り込み、更に検索した。全検体の PCR サイクル値は、

△△CT法を用いて計算され、周囲粘膜に対する相対比から、両側 t-test あるいは Mann-Whitney U-test を行い部位ごとに評価した。P<0.05 にて統計的有意性ありとした。

結果

2015 年から 2018 年の間に北里大学病院で施行された内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)症例 1020 例のうち、主たる組織型が低分化腺癌と診断された症例は 25 例(2.5%)であった。そのうち、腫瘍量・深達度を考慮し選択した 14 症例で検討を行った。粘膜内に留まる癌は 6 症例、粘膜下層に浸潤した癌は 8 症例で、うち粘膜下層浅層浸潤癌(SM1：浸潤距離<500μm)が 5 症例、粘膜下層深層浸潤癌(SM2：浸潤距離≥500μm)が 3 症例であった。主な組織型は全て低分化腺癌(Poorly differentiated adenocarcinoma :por)であり、うち por のみが 5 症例、印環細胞癌(signet-ring cell carcinoma :sig)混在が 4 症例、分化型腺癌(Tubular adenocarcinoma :tub)混在が 5 症例であった。

LMD にて採取された検体は、低分化腺癌組織のうち、粘膜部(M)は計 14 ケ所、粘膜下層浸潤癌の粘膜下層部(SM)は 8 ケ所であった。周囲非癌粘膜(N)は全症例からそれぞれ採取され、14 ケ所であった。

周囲非癌粘膜(N)に対し、粘膜部(M)では、標的遺伝子 12 個のうち、9 個の遺伝子(CALD1, CD44, COL1A2, COL3A1, FN1, THY1, TIMP1, ZEB1, ZEB2)で有意に発現量が増加していた。また、周囲非癌粘膜(N)に対し、粘膜下層部(SM)では、DKK1 を除く 11 個全ての遺伝子で有意に発現量が増加していた。M に対し SM で有意に発現量が増加していたものは 8 個(COL1A2, COL3A1, FN1, FZD7, TGFB3, THY1, TIMP1, ZEB2)で、周囲非癌組織、粘膜部、粘膜下層部と深達するに従い発現量が増加していたものは 6 個(COL1A2, COL3A1, FN1, THY1, TIMP1, ZEB2)であった。

討論

胃癌は、内視鏡治療後であっても、リンパ節転移を来し再発すれば予後不良な疾患である。

早期胃癌におけるリンパ節転移率は決して高くないものの転移する症例は存在し、転移リスクの高い症例をそれ以上選び出す基準がないことから、内視鏡治療にて適応外とされた症例は一律で追加外科治療が推奨されている。現状、リンパ節転移リスクの根拠となっているものはいくつか存在するが、いずれも病理組織学的診断のみであり、生物学的な考察を加えた予測因子は存在しない。

今回、癌幹細胞と EMT に関連する遺伝子発現量を計測可能な既成のプレートを使用して 158 個の遺伝子を検索し、明らかな発現上昇や一定の傾向が見られた遺伝子 12 個(CALD1, CD44, COL1A2, COL3A1, DKK1, FN1, FZD7, TGFB3, THY1, TIMP1, ZEB1, ZEB2)を選び出した。うち、DKK1 は PCR 値が感度以下の検体が多くみられたため解析より除外したが、他 11 の遺伝子はすべて、周囲非癌粘膜に対し、いずれかの癌部で有意に発現量の増加がみられた。

粘膜部の時点で周囲非癌粘膜に対し遺伝子発現量が上昇していたのは、CALD1, CD44, COL1A2, COL3A1, FN1, THY1, TIMP1, ZEB1, ZEB2 の 9 遺伝子であった。

COL1A2, COL3A1, FN1, THY1, TIMP1, ZEB2 は、非癌粘膜よりも粘膜部、更に粘膜部に対して粘膜下層部、と腫瘍の進展とともに遺伝子発現量が増加した(N<M<SM)。いずれも、進行期を含めた胃腺癌の報告では発現が上昇するとされている遺伝子であった。中でも、COL1A2 と FN1 は胃癌において発現量と予後が関連するという報告もあり、深達し悪性度が高くなるにつれ発現量が増加していることに矛盾はない。TIMP1 も特にスキルス胃癌で増加しているとの報告もある。いずれも、増殖や転移しやすいと考えられる更に深い部位や、転移巣ではより発現量も増

加することが予測され、活動性・悪性度を反映する腫瘍進展のマーカーとして有用となる可能性がある。

CALD1、CD44、ZEB1では、Nに対しMで有意に発現量が増加したものの、SMではMに対して有意な増加がみられなかった($N < M = SM$)。CD44は代表的な癌幹細胞マーカーであり、胃での発現も報告されている。増加するものは粘膜内で既に粘膜下層内と同レベルまで発現量が増加しており、またSM浸潤のないM癌でも同等の発現レベルであったことから、粘膜内にある比較的早期の段階で高値になり、それらを保ったまま深達する可能性が示唆された。また、ZEB1はCD44の幹細胞活性に必須とされることから、両者には相関があると考えられる。それらは、粘膜内に存在する時期で既に有意に発現量が増加し、深達の際には変化が少ないことから、深達に関わるというよりは腫瘍そのものの性格を示している可能性がある。

TGFB3とFZD7では、粘膜内では有意な発現量の増加はなかったものの、粘膜下層では有意に発現量が増加した($N = M < SM$)。TGFB3(TGF β 3)はTGF β のサブタイプであるが、TGF β は初期の癌では抑制的に働くが、進行癌では腫瘍転移に対する促進作用があり、癌の進展に対して二面性を持つとされる。今回は、粘膜に留まる初期の段階では、周囲粘膜に対し発現量の変化はほとんど見られないか、むしろ減少傾向のものが多かったが、粘膜下層浸潤部では発現量が増加し、その傾向を支持する結果となった。

今回は、内視鏡治療適応となり得る早期胃癌を対象としたため、リンパ節転移症例の原発巣やその転移巣の腫瘍部の遺伝子発現量を計測することは出来なかった。今後は、更に深部あるいは転移巣での発現量を検索していく必要があると考える。

結論

胃原発の低分化腺癌では、内視鏡治療の適応となり得る早期の段階で、発現量の変化する癌関連遺伝子が複数認められた。腫瘍の進展・深達に従い段階的に発現量が増加するものも見出され、腫瘍の悪性度や活動性と相関する可能性がある。今後、更に深層、あるいは転移巣の遺伝子発現量を解析することにより、従来の組織診断等と組み合わせ、個々の転移リスクの層別化に繋がることが期待される。