

博士(医学) 瀬戸口 智彦

論文題目

Microarray analysis identifies Versican and CD9 as potent prognostic makers in gastric gastrointestinal stromal tumors

(マイクロアレイ解析によって同定された胃原発消化管間質腫瘍の有用な予後因子 Versican と CD9)

論文の内容の要旨

[はじめに]

消化管間質腫瘍 (GIST) は、消化管間葉系腫瘍のなかで最も頻度が高く、カハールの介在細胞由来で、*c-kit* 遺伝子の機能獲得性変異が原因といわれている。以前は 10 万人に 1~2 人の頻度で発生する疾患と考えられていたが、最近では疾患概念の理解が広がったこと、腹腔鏡技術が進歩したことなどから無症状で診断される GIST が増加してきたため、比較的高頻度に発生する疾患であることが解ってきた。これら無徴候性 GIST の大部分にも *c-kit* 遺伝子変異が見つかったことなどから、GIST の悪性化には *c-kit* 遺伝子変異以外にも遺伝的な変化が必要であると考えられるようになってきた。一方、GIST は原発臓器、大きさ、核分裂像をもとに再発転移のリスク分類が定義され予後を反映する有用な指標として臨床で用いられてきたが、必ずしも悪性化のメカニズムを反映したものではない。外科学第二講座では、以前から *c-kit* 遺伝子領域の Loss of heterozygosity が GIST 悪性化に関与することを報告してきた。また、網羅的な解析である Comparative genomic hybridization を用いた解析では、様々な染色体部位の機能の増幅や消失が悪性化に関与していることが報告されているが、それらの原因遺伝子についてほとんど解明されていない。以上から本研究の目的は、GIST 悪性化に関連する遺伝的なメカニズムを探求することである。

[患者ならびに方法]

術前化学療法が施行されていない胃原発 GIST 3 例と胃 GIST 肝転移 4 例を対象としてマイクロアレイ解析を施行した。原発巣と肝転移巣で発現の異なる遺伝子群の中から、他の悪性腫瘍で悪性化の進展、転移と関連がある遺伝子群を GIST 悪性化候補遺伝子として、RT-PCR 解析を施行した。さらに 153 症例のパラフィン検体を用いて免疫組織染色を施行して、臨床病理学的因子と蛋白発現の関連を検討し予後を解析した。パラフィン検体は浜松医科大学医学部附属病院、県西部浜松医療センター、磐田市立病院、静岡市立清水病院、大阪警察病院、大阪大学医学部附属病院、新城市民病院から収集した。この研究は各病院の倫理委員会で承認され、検体採取にあたり患者本人からインフォームドコンセントを得たものである。

[結果]

マイクロアレイ解析の結果、原発巣と比較し肝転移巣では 165 遺伝子の発現が増幅、146

遺伝子の発現が低下していた。遺伝子機能解析では、蛋白結合、細胞周期、細胞分裂、細胞間基質に関連する遺伝子の発現に違いを認めた。これら遺伝子機能および遺伝子座から 11 遺伝子を悪性化候補遺伝子として RT-PCR 解析を施行したところ、肝転移巣では *Protocadherin10* (*PCDH10*)、*CD9*、*Neuronal cell adhesion molecule* (*NRCAM*)、*Cadherin8* (*CDH8*) の 4 遺伝子の発現が低下、*Inhibitor of DNA binding2*、*Interleukin-1 receptor type1*、*Low-density lipoprotein receptor*、*Versican*、*Aurora kinase A* の 5 遺伝子の発現が増加していた。これらの中から最も有意差を認めた *Versican* と *CD9* の免疫組織染色を施行した。*Versican* 発現を原発巣と転移巣で比較すると、転移巣で有意に発現が増加していた。また、原発巣ではリスクが増えるに従って *Versican* 発現が増加、逆に *CD9* 発現は低下していた。原発巣切除後の再発予後因子を原発臓器別に検討すると、今まで報告されてきた大きさ、核分裂像にくわえて、胃原発 GIST では *Versican* 発現が増加 ($P=0.0078$)、*CD9* 発現が低下 ($P=0.0018$) した腫瘍で有意に無病再発期間の短縮を認めた。一方、小腸原発 GIST では *Versican* 発現が増加することで無病再発期間の短縮 ($P=0.0375$) を認めたが、*CD9* 発現の有無で無病再発期間に有意差は認めなかった。

[考察]

Versican は細胞外マトリックスであるプロテオグリカンの一種で、骨肉腫、乳癌、結腸癌などで発現の増加が報告されている。また、Lewis lung cell carcinoma 細胞株を用いた実験では、骨髄由来単核細胞をリクルートして腫瘍内微小環境が変化することにより、転移を促進することが報告されている。*CD9* は様々な増殖因子やインテグリンと作用することで、細胞の増殖や接着、遊走に関与し、乳癌、結腸癌では発現の低下と転移の関係が報告されている。一方、子宮頸癌など癌種によっては発現が増加することにより浸潤能が増加するという報告もある。今回胃 GIST では *CD9* 発現の低下と悪性度の増加に逆相関を認めたが、小腸 GIST では認めなかったことから、*CD9* は原発臓器により機能が異なる事が示唆される。今回確認はできなかったが *NRCAM*、*CDH8*、*PCDH10* はいずれも細胞間接着因子であり、発現の低下と転移の関連が報告されていて、GIST においても細胞間接着の減少により転移が促進されることが示唆された。

[結論]

GIST 悪性化には、腫瘍微小環境の変化や細胞間接着因子の低下が関与していることが示唆された。さらに、マイクロアレイによって同定された *Versican* と *CD9* は胃原発 GIST の有用な予後予測因子となることが示された。

論文審査の結果の要旨

消化管間質腫瘍 (GIST) はカハールの介在細胞由来で、*c-kit* 遺伝子の機能獲得性変異が原因とされる。近年多く見いだされる無症状 GIST にも *c-kit* 遺伝子変異が認められること

から、悪性化には *c-kit* 遺伝子変異以外の要因も想定されている。申請者は、GIST 悪性化機構の解明を目的とし本研究を実施した。術前化学療法未施行の胃原発 GIST 3 例と胃 GIST 肝転移 4 例を対象とマイクロアレイ解析を施行し、肝転移巣で 165 遺伝子の発現増幅、146 遺伝子の発現低下を確認した。遺伝子機能および遺伝子座から 11 遺伝子を GIST 悪性化候補遺伝子とし、RT-PCR 解析で定量化した結果、肝転移巣では *Protocadherin10 (PCDH10)*、*CD9*、*Neuronal cell adhesion molecule (NRCAM)*、*Cadherin8 (CDH8)* の発現低下、*Inhibitor of DNA binding2*、*Interleukin-1 receptor type1*、*Low-density lipoprotein receptor*、*Versican*、*Aurora kinase A* の発現増加を認めた。最も強い有意差を認めた *Versican* と *CD9* の蛋白量半定量（パラフィン検体 153 症例免疫組織染色）の結果、*Versican* の転移巣での有意な発現増強、原発巣での臨床的リスク増大に伴う増強、*CD9* の転移巣での発現低下を認めた。胃原発 GIST では *Versican* 発現増加、*CD9* 発現低下例で有意な無病再発期間短縮を認めた。小腸原発 GIST では *Versican* 発現増加例で短縮を認めた。これより申請者は、GIST 悪性化に腫瘍微小環境の変化や細胞間接着因子の低下が関与するとし、これらに関連する *Versican* と *CD9* は胃原発 GIST の有用な予後予測因子となると結論づけた。

遺伝子発現の網羅的解析結果を基盤に個々の症例を検討し、GIST 悪性化に *Versican* と *CD9* の発現変化が関わる可能性を初めて明らかにした点を審査員一同高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 浦野 哲盟
副査 峯田 周幸 副査 杉原 一廣