

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	佐藤 聡史
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第718号
学位授与の日付	平成29年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Epstein-Barr virus 関連胃癌における粘液形質と hepatocyte nuclear factor-4 α の発現及び初期病変に関する研究.
論文審査委員	主査 教授 味岡 洋一 副査 准教授 渡邊 玄 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

【背景】 Epstein-Barr virus (以下 EBV) 関連胃癌は胃癌全体の約 8.7% (7.5%–10.0%) を占めるとされ、一般の胃癌に比べ、特徴的な臨床病理学的性質を有する。その一つに EBV 関連胃癌の粘液形質は、腸型への分化能を有さない Null type 及び Gastric type が多数を占めるとの報告がある。一方、Hepatocyte nuclear factor-4 α (以下 HNF4 α) は核内受容体 superfamily の一つであり、主に内胚葉の発生、糖代謝、脂質代謝などの転写調節を担っている。HNF4 α はプロモーター領域の違いにより P1-HNF4 α と P2-HNF4 α の 2 種のアイソフォームが存在する。正常胃粘膜においては腺窩上皮、噴門腺、胃底腺、幽門腺は P1-HNF4 α を発現しないが P2-HNF4 α を発現し、腸上皮化生粘膜、正常な小腸、大腸粘膜は P1-HNF4 α 、P2-HNF4 α をともに発現する。近年 HNF4 α アイソフォームの発現パターンが非癌胃粘膜における腸上皮化生の有無や分化型早期胃癌における粘液形質と関連し、分化型早期胃癌の Gastric type は P1-HNF4 α は陰性で、Intestinal type と Mixed type では陽性であると報告されている。しかし EBV 関連胃癌における HNF4 α の発現についての検討は極めて少なく、P1 と P2 アイソフォームの両者を比較検討した研究はない。

【目的】 申請者は抗ヒト HNF4 α 抗体を用いて、EBV 関連胃癌、EBV 非関連胃癌における HNF4 α の発現及び粘液形質と HNF4 α との関係性を明らかにするため、病理学的検討を行った。さらに EBER1-in situ hybridization (以下 EBER1-ISH) で核全体に染まる像と異なり、核内に dot 状に陽性となる胃粘膜内癌 (以下 dGC) を見出したので EB ウィルス遺伝子産物の発現を検索した。

【方法】 胃癌症例 252 症例 265 病変 (早期胃癌 189 病変、進行胃癌 76 病変) を EBER1-ISH で検索し、EBV 関連胃癌 20 病変 (7.55%) を検出して臨床病理学的に検討した。EBV 関連胃癌 20 病変と性・年齢、病理像に大差のない対照群の EBV 非関連胃癌 45 病変について、抗ヒト P1 及び P2-HNF4 α 抗体、Human Gastric Mucin、M-GGMC-1、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10 に対する各抗体を用いて免疫組織学的染色を行った。またヒト胃癌細胞株である AGS 及びネオマイシン耐性リコンビナント EBV 感染 AGS (以下 AGS-EBV) における HNF4 α 蛋白の発現を Western blot 法、免疫染色で確認した。さらに EBER1-ISH で核の一部に dot 状に染色された dGC2 病変に対し BamHIW、LMP2、EBNA1 による PCR 法を行った。統計解析には、Student's t 検定、x² 検定、Fisher の直接確率計算法を用い、p<0.05 を有意差ありとした。

【結果】EBV 関連胃癌の年齢 (65.9±8.6 歳) は EBV 非関連胃癌 (71.0±9.7 歳) と有意差はなく、男女比は EBV 関連胃癌 (男 17 例/女 2 例)、EBV 非関連胃癌 (男 159 例/女 74 例) と、EBV 関連胃癌は男性により多かった。発生部位は EBV 関連胃癌が上部、次いで中部に多く、残胃癌は EBV 関連胃癌 10.0% (2/20)、EBV 非関連胃癌 3.3% (8/245) と、EBV 関連胃癌に多かった。その他、腫瘍径と深達度、脈管侵襲は両者に有意差を認めなかった。組織型を見ると、EBV 関連胃癌では中分化管状腺癌 (tub2)、充実型低分化腺癌 (por1) が多かった。EBV 関連胃癌では EBV 非関連胃癌より P1-HNF4 α の発現頻度が低下しており、粘液形質では Null type と Gastric type が有意に多かった。AGS、AGS-EBV における HNF4 α 蛋白の発現は Western blot 法、免疫染色ともに両細胞株で P1-HNF4 α は陰性、P2-HNF4 α は陽性であった。dGC2 病変における BamHIW、LMP2、EBNA1 の PCR 法では、BamHIW、LMP2、EBNA1 の発現を認め、EBV 感染を確認したが、dGC は核全体に染色される胃癌に比べ、BamHIW と LMP2 の発現量が低下していた。

【考察】本研究で検討した EBV 関連胃癌の年齢、男女比、発生部位は既報告例と近似し、残胃癌に多いことも相似していた。EBV 関連胃癌の組織型もこれまでの報告とほぼ一致し、EBV 関連胃癌は臨床病理学的に地域格差が少ないことが示唆された。HNF4 α の発現では、EBV 関連胃癌は EBV 非関連胃癌よりも有意に P1-HNF4 α の発現が低かった。EBV 関連胃癌の粘液形質は Gastric type と Null type が大半を占めており、これらはほとんど P1-HNF4 α 陰性であった。Null type、Gastric type は MUC2、CD10 の腸型マーカーを発現しておらず非腸型とも言うことができ、P1-HNF4 α の発現は腸型への分化と密接な関係にある。すなわち胃において HNF4 α アイソフォームの発現から、Gastric type は P1-HNF4 α (-) / P2-HNF4 α (+)、Intestinal type は P1-HNF4 α (+) / P2-HNF4 α (+) と読み替える事が可能であり、EBV 関連胃癌は HNF4 α アイソフォームの発現からも胃型が多いと考えられた。EBV 感染が胃癌細胞の P1-HNF4 α 発現を抑制するかどうかを EBV 感染胃癌細胞株と非感染細胞株を用いて検討したが、用いた細胞株はもともと P1-HNF4 α を発現していなかったため確認できなかった。また dGC は本研究の EBER1-ISH 陽性例のうち最も小さな 2 病変 (腫瘍径 2mm、15mm) であった。PCR による EBV 遺伝子産物の検索では dGC は 2 病変ともに陽性コントロールと比較して BamHIW と LMP2 の発現量の低下が見られ、dGC は EBV 潜伏感染初期のウィルス増殖状態を反映している可能性が考慮された。また dGC は 2 病変ともに P1-HNF4 α 陽性、粘液形質は Mixed type であり、腸型の性質が混在するものであった。これまで EBV 感染の標的は正常胃粘膜の中で Null type の粘液形質を呈する腺頸部の胃上皮幹細胞であると考えられてきたが、微小な 2 病変において P1-HNF4 α 陽性、Mixed type の粘液形質を呈した事から、EBV が胃底腺のみならず腸上皮化生粘膜をも標的にしている可能性が示唆された。

【結論】EBV 関連胃癌 20 病変と EBV 非関連胃癌 245 病変の検討によって既報告例と近似した臨床病理学的特徴を認めた。EBV 関連胃癌では EBV 非関連胃癌に比べて Null type と Gastric type が有意に多く、P1-HNF4 α 陰性を呈する傾向が認められ、EBV 関連胃癌が腸型の性質を示しにくいことが示された。また EBER1-ISH で核の一部にのみ dot 状に染色される特異な胃癌を見出し、この染色像は EBV 関連胃癌の初期像に相当する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

EBV (Epstein-Barr virus) 関連胃癌は一般の胃癌に比べ特徴的な臨床病理学的性質を有すると同時に、粘液形質は腸型への分化能を有さない null type および gastric type が多数を占めるとされる。核内受容体である HNF4 α には P1 と P2 の 2 つのアイソフォームが存在するが、消化管では、胃上皮は P2 のみを発現し、腸上皮は P1 と P2 の両者を発現する。本研究では、EBV 関連胃癌の粘液形質と HNF4 α (P1, P2) 発現

との関係を検討した。胃癌症例 265 病変を EBER1-ISH で検索し、20 病変の EBV 関連胃癌を検出した。EBV 関連胃癌は非関連胃癌に比べ P1 の発現が低下し、粘液形質は null type と gastric type が有意に多かった。HNF4 α アイソフォーム発現の観点から、gastric type は P1 (-)/P2 (+)、intestinal type は P1 (+)/P2 (+) と読み替えることが可能であり、P1 発現は腸型への分化と密接な関係があった。EBER1-ISH では、EBV 関連胃癌の中で最も小さな 2 病変に核内に dot 状に陽性となるシグナル (dGC) が観察された。dGC は EBV 潜伏感染初期のウイルス増殖を反映している可能性が考慮された。

以上のことから、本研究は、EBV 関連胃癌では P1-HNF4 α 陰性を呈する傾向があること、従来の粘液形質と HNF4 α のアイソフォーム発現には相関があり、粘液形質による胃癌の分類は、HNF4 α のアイソフォーム分類で読み替えができること、EBV 関連胃癌の初期像と思われる EBER1-ISH 像を示したこと、から学位論文としての価値を認める。