

## 【31】

氏 名	さとむらひとし 里村仁志
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第740号
学位授与の日付	平成27年2月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Can expression of CXCL12 and CXCR4 be used to predict survival of gastric cancer patients? (CXCL12とCXCR4の発現は胃癌患者の予後の予測に有用となり得るか)
論文審査委員	(主査) 教授 窪田敬一 (副査) 教授 釜井隆男 教授 安西尚彦

### 論文内容の要旨

#### 【背景】

胃癌は世界で依然として発病率の高い癌腫である。早期の胃癌の予後は良好であり非侵襲的な治療法もいろいろ開発されてきたが、進行癌に対しては様々な治療法が試みられているものの予後は不良で、その治療法はいまだ確立されてはいない。

ヒトのケモカインは分子量8～10 kDaのサイトカインで、ケモカイン受容体はG蛋白結合受容体ファミリーに属する。現在46種類以上のケモカイン（リガンド）と18種類以上のケモカイン受容体が知られており、CXC/CC/C/CX3Cの4群に分類される。ケモカイン/ケモカイン受容体は感染や炎症に対する免疫反応や組織修復を制御し、数種類の免疫細胞の遊走や細胞内輸送にも関連している。

最近になってケモカインの一つであるCXCL12とその受容体のCXCR4が、乳癌、前立腺癌、大腸癌、メラノーマ、神経芽腫、食道癌、腎細胞癌などの癌の発生や進展に重要な役割を果たしていることが報告された。

#### 【目的】

本研究は、胃癌切除標本におけるCXCL12蛋白とCXCR4蛋白の発現状況と胃癌患者の臨床病理学的因子、さらには生命予後との関連について検討を行うことを目的とした。

## 【対象と方法】

2001年から2009年に獨協医科大学病院第一外科で切除した胃癌症例から遠隔転移や腹膜播種が認められた症例を除外し、癌の遺残度がR0～R1切除となった137例を対象とした。全症例から術前に切除検体の研究使用についての同意を得た。

切除胃のホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いてCXCL12蛋白とCXCR4蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。染色はanti-CXCL12 antibody (R&M Systems Inc., Minneapolis, MN, USA ; Catalog #MA350 : dilution 1 : 50)、anti-CXCR4 antibody (Epitomics Inc., Burlingame, CA, USA ; Catalog #3108-1 ; dilution 1 : 200) を用いたABC法で行い、癌細胞の30%以上が染色されている場合を発現陽性、30%未満を発現陰性と判定した。さらに発現陽性群を染色パターンにより、主に核が染色されるnuclear typeと主に細胞質が染色されるcytomembrane typeの2群に分類した。

CXCL12、CXCR4の発現と、分化度、深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲、進行度などの臨床病理学的因子について、 $\chi^2$  testとFisher's exact probability testを用いて統計学的に解析した。生存曲線はKaplan-Meier法を用いて作成し、Log-rank testにより検定を行なった。全ての解析においてP<0.05の場合に統計学的有意と判定した。

## 【結 果】

胃癌137例の内訳は男性102例、女性35例で平均年齢は68.9歳であった。組織型は分化型癌88例、未分化癌49例であった。TNM分類7版でのStageはI期 : 36例、II期 : 30例、III期 : 53例、IV期 : 18例(腹水細胞診陽性によるR1切除症例)であり、観察期間内に45例が胃癌の再発により死亡し、17例が他病死した。

胃の原発巣のCXCL12の発現陽性例は43例(31.4%)であり、染色パターンは全例がcytomembrane typeであった。CXCL12発現陽性例は、分化型(P=0.0143)、T1～T2の浅い壁深達度(P=0.0255)、脈管侵襲陰性(P=0.0022)、リンパ管侵襲陰性(P=0.0173)、Stage I期(P=0.049)で有意に多かった。一方、CXCR4の発現陽性例は82例(59.8%)であり、nuclear typeが40例、cytomembrane typeが42例であった。CXCR4発現陽性例は、T3～T4の深い壁深達度(P=0.005)、Stage II以上(P=0.028)の症例に有意に多かったが、染色パターンによる分類では差を認めなかった。

予後との関連については、術後5年の生存曲線においてCXCL12の発現の有無による差は認められなかったが(P=0.9088)、CXCR4発現陽性例は有意に予後不良であった(P=0.0079)。CXCR4の染色パターンによる比較では生存期間に有意差を認めなかった(P=0.5256)。

## 【考 察】

悪性腫瘍におけるCXCR4の高発現は乳癌組織において最初に報告され、リンパ節、肺、肝、骨髄などの転移部位にそのリガンドであるCXCL12の高発現も同定されたことに始まる。胃癌におけるCXCL12の発現については、壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、腫瘍径、臨床病期、予後不良に相関するとの報告もあるが、本研究では高分化型のリンパ管侵襲や、脈管侵襲の少ない深達度の浅い比較的早期の胃癌でCXCL12の発現が多く認められ、予後との相関も認められなかった。最近の報告でHelicobacter felis感染胃粘膜におけるCXCL12の過剰発現が胃の上皮細胞の増殖、炎症の誘導、

腫瘍への進展を助長し、Helicobacter pyloriに感染した胃の上皮の細胞株でCXCL12の産生が増加することが示された。胃癌の比較的早期の段階では炎症を有する粘膜上皮の特性としてCXCL12の発現が認められるが、癌が進行するに従ってその特性を喪失していくために、本研究では比較的早期の胃癌においてCXCL12発現例が多かったのではないかと推察された。

CXCR4蛋白の発現に関しては、壁深達度、リンパ節転移、臨床病期、予後不良などとの相関が認められた報告がある。CXCR4は膜貫通蛋白質であるが、細胞膜や細胞質以外に核内にも存在し、nuclear typeの場合には肺非小細胞癌では予後良好であり、大腸癌では予後不良と報告されている。本研究では染色パターンの分類により有意差は認めなかったが、CXCR4発現自体は壁深達度や進行度と相関が認められ、有意に予後が不良であった。本研究ではCXCL12とCXCR4の因果関係を検討するには至らなかったが、胃癌においてCXCL12はautocrineやparacrineの双方のメカニズムでCXCR4蛋白の発現を刺激して腫瘍の浸潤・増殖を促進するとも考えられており、これらのリガンドと受容体の関係を明らかにするためには、さらなる知見の集積が必要と思われる。

#### 【結 論】

胃癌におけるケモカインCXCL12の受容体であるCXCR4の発現は、予後を予測する因子となり得る可能性がある。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

胃癌は依然として罹患率の高い癌腫である。早期の胃癌の予後は良好であり非侵襲的な治療法も開発されてきたが、進行癌に対しては様々な治療法が試みられているものの予後は不良で、その治療法はいまだ確立されてはいない。胃癌の増殖・進展・生命予後に関連するバイオマーカーの存在が明らかになれば治療指針や予後の指標に非常に有用である。ケモカインとその受容体は白血球などの免疫担当細胞の遊走など炎症に関与する一方で、乳癌などの一部の癌種において増殖・転移に関与している可能性が示唆されている。申請論文では137例の胃癌組織におけるケモカインCXCL12とその特異的受容体であるCXCR4の発現を免疫染色法により評価し、臨床病理学的因子・生命予後との関連を解析している。

結果としてリガンドであるCXCL12の発現は分化型癌、浅い深達度、脈管侵襲陰性、stage Iの早期胃癌症例で有意に高率であった。一方、受容体のCXCR4の発現は深い深達度、stage II～IVの進行胃癌症例に有意に高率であり、生存解析でも有意に予後不良であった。CXCR4の染色パターンによりnuclear typeとcytomembrane typeの2群に分類したサブ解析では臨床病理学的因子や予後において有意差が認められなかった。CXCL12は癌の増殖・転移との関係は少なく、文献的知見を考慮しピロリ菌感染による慢性炎症を反映している可能性があると考えられている。CXCL12は予後予測マーカーとならないが、CXCR4の高発現は予後不良を予測し得るマーカーである可能性がある結論づけている。

### 【研究方法の妥当性】

申請論文では、単一施設の胃癌切除症例において、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片とモノクローナル抗体を用いたavidin-biotin complex(ABC)法によりCXCL12、CXCR4の発現を評価している。研究対象の臨床病理学的因子や予後との相関を解析している統計学的手法も適切であり、本研究方法は妥当と判断される。

### 【研究結果の新奇性・独創性】

胃癌におけるCXCL12、CXCR4の発現に関する報告は過去にも認められるが、申請論文では研究対象を進行癌に限定せずに早期も含めたStage I～IVの137例という豊富な症例を解析している。その結果、早期胃癌でCXCL12が高率に発現していることを初めて報告しており、またCXCR4は予後不良を予測するマーカーとなり得ると結論づけている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

### 【結論の妥当性】

申請論文では、多数の胃癌症例を適切な対象設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、胃癌におけるCXCL12、CXCR4の発現と臨床病理学的因子、生命予後との相関を研究している。そこから導き出された結果で、CXCR4が予後不良を予測し得る因子であるという結論は、論理的に矛盾するものではなく、腫瘍学、分子生物学、病理学などの関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。CXCL12が早期胃癌に高率に発現していた理由としては、他の文献の知見から早期癌では慢性胃炎によるCXCL12の発現機序を保有しているが進行癌ではその機序が失われる可能性があると考えられている。

### 【当該分野における位置付け】

申請論文は、胃癌におけるCXCL12、CXCR4発現の意義を検討し、胃癌の増殖・進展や転移の機序との関連を研究している。その結果、CXCL12は分化型の早期胃癌に多く発現するものの予後とは関係なく、一方でCXCR4発現が壁深達度や脈管侵襲に相関し、予後不良であることを明らかにしている。CXCL12がピロリ感染胃炎などの慢性持続炎症を反映し、CXCR4が単独の予後予測因子となり得るかについては、今後さらなる検討が必要であるが、このケモカインと受容体の胃癌における本研究の知見は、胃癌のみならず他の癌の発生や進展の研究の一助となる大変意義深い研究と評価できる。

### 【申請者の研究能力】

申請者は、病理学や分子生物学の理論を学び実践した上で、仮説を立て、実験計画を立案し、適切に本研究を遂行して貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

### 【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Anticancer Research

34 : 4051-4057, 2014