

氏 名	は せ がわ 長 谷 川 傑
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1858 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Genome-wide analysis of gene expression in intestinal-type gastric cancers using a complementary DNA microarray representing 23,040 genes. (cDNA マイクロアレーを用いた分化型胃癌のゲノムワイドな遺伝子発現解析に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 清 水 章 教 授 田 中 紘 一

論 文 内 容 の 要 旨

胃癌は世界の癌死の部位別死因の第2位を占めている。治療法の進歩にもかかわらず、進行胃癌の治療成績は未だに満足できるものではなく、新たな治療法の開発が望まれている。近年の分子生物学の進歩により、分化型胃癌の発癌メカニズムに関して慢性胃炎、腺腫を経て高分化胃癌にいたる多段階発癌モデルが提唱され、*p53*, *APC*, *K-ras*, *CTNNB1*, *c-MET*, *CCNE*などの遺伝子の発現の変化や塩基配列の異常などが明らかにされてきたが、未だに分化型胃癌の発生メカニズムが解明されたとは言いがたく、胃癌の分子標的治療薬の開発にも至っていない。また、リンパ節転移は胃癌の予後を規定する重要な因子である。リンパ節転移に関わると報告されている遺伝子もいくつか同定されているが、転移は複雑なステップからなる現象であり、単一の遺伝子の異常によりそのメカニズムをすべて説明するのは困難である。本研究ではレーザーキャプチャー法 (LCM) と 23040 遺伝子からなる cDNA マイクロアレーを用いて分化型胃癌のゲノムワイドな遺伝子発現解析を行い、非癌部粘膜上皮に比較して発現が変化している遺伝子群ならびに、リンパ節転移に関わると考えられる遺伝子群を同定し、リンパ節転移の予測システムを構築した。

分化型胃癌で胃切除を施行した患者 20 例からインフォームドコンセントを得て、胃癌組織ならびに隣接する正常粘膜組織を得た。2 例が早期癌、18 例が進行癌でその内リンパ節転移陽性例、陰性例を背景因子を揃えて 9 例ずつとした。同一症例の癌組織、非癌部粘膜から癌細胞、粘膜上皮細胞を顕微鏡下に LCM により取得し RNA を抽出、得られた RNA を T7-based RNA 増幅法により増幅した (aRNA)。癌細胞、粘膜上皮由来の aRNA をそれぞれ、Cy5-, Cy3-dCTP にて逆転写反応によりラベルして、cDNA マイクロアレースライド上で競合ハイブリダイゼーションを行った。それぞれの蛍光強度をスキャナーにより数値化して、データの正規化を行い、Cy3/Cy5 比を当該遺伝子の粘膜上皮細胞に対する癌細胞における発現比と定義した。その結果分化型胃癌で共通して発現が亢進している 61 (機能未知 13)、減弱している 63 (機能未知 22) の遺伝子を同定した。発現が亢進している遺伝子にはシグナル伝達、転写因子、代謝、膜輸送、細胞増殖に関わるものなどが含まれていた。一方、発現が減弱する遺伝子としては、脂質、炭水化物、薬物などの代謝に関わるもの、小分子、重金属などの輸送に関わるものなどが含まれ、胃粘膜上皮細胞の癌化に伴う脱分化を反映しているものと考えられた。これらの遺伝子は分化型胃癌の癌化のメカニズムに関わるのみならず、分子標的治療のターゲットとなり得るものと考えられた。

ついでリンパ節転移に関連する遺伝子を抽出するために、リンパ節転移陽性、陰性各々 9 例で統計的に発現に差が認められる 12 の遺伝子を同定した。多変量解析の一種の判別分析を用いたところ、12 のうち 5 つの遺伝子が予測に有意な影響をもっているものとして抽出され、これらの遺伝子群の発現比を用いてリンパ節転移の予測式を作成した。予測式の構築を行った 18 症例と新たな 9 症例の計 27 症例について、この予測式を用いてリンパ節転移の有無に関して全症例を正しく分類することが可能であった。このモデルはリンパ節の切除を行わずに胃癌原発巣の遺伝子発現からリンパ節転移の予測ができるという意味で治療法の選択、術後のサーベイランスなどに大きな意味をもつと考えられる。

論文審査の結果の要旨

胃癌の発生・転移に関連する遺伝子の報告はいくつかあるが、そのメカニズムが解明されたとは言いがたい。本研究では、Laser capture microdissectionにより胃癌細胞と対照となる同一検体の非癌部粘膜上皮細胞を抽出し、cDNA microarrayを用いて23,040遺伝子からなる分化型胃癌20例の癌細胞特異的な発現プロファイルを作成した。分化型胃癌で発現が上昇している遺伝子は61個でシグナル伝達、転写因子、代謝、膜輸送、細胞増殖に関わるものなどを含んでいた。減弱する遺伝子は64個あり、脂質・炭水化物・薬物などの代謝、小分子・重金属などの輸送に関わるものなどを含み、癌化に伴う脱分化を反映したものと考えられた。また、リンパ節陽性、陰性群で発現に有意差が認められる遺伝子を複数同定した。Stepwise discriminant analysisにより、その遺伝子群の発現比を用いてリンパ節転移の予測モデルを構築したところ、新たなサンプルにおいてもリンパ節転移の有無を正確に予測できた。

以上の論文は分化型胃癌の発生ならびに転移の分子機構の解明に貢献し、臨床的側面からも治療法の選択、予後の予測などに寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年2月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。