

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 山田貴允
横浜市立大学大学院医学研究科医科学専攻外科治療学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	遠藤 格
副査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	大橋健一
副査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	市川靖史

博士の学位論文審査結果の要旨

2017/5/16

Impact of Overexpression of Sushi Repeat-Containing Protein X-linked 2 Gene on Outcomes of Gastric Cancer

SRPX2 is considered to promote cellular migration, adhesion, and angiogenesis in cancers. Objective of this study was to evaluate the expression of the *SRPX2* gene and to determine whether such expression correlates with outcomes in patients with gastric cancer. Surgical specimens of cancer tissue and adjacent normal mucosa obtained from 227 patients with previously untreated gastric cancer were examined. *SRPX2* expression was higher in cancer tissue than in adjacent normal mucosa ($P < 0.001$). Overall survival was significantly lower in patients whose tumors had high *SRPX2* expression than in those who had low expression ($P = 0.003$). Multivariate analysis showed that high *SRPX2* expression was an independent predictor of survival.

まず大橋健一教授より以下の質問がなされた。

腫瘍における *SRPX2* の mRNA は正常粘膜の何倍くらいの発現しているのか。

先行研究として、DNA マイクロアレイを用いたバイオマーカースクリーニングを行っている。その結果、腫瘍における *SRPX2* 遺伝子発現は正常粘膜に比較して 7.99 倍の発現を認めた。

その先行研究において、*SRPX2* の発現は他の遺伝子よりその倍率が上位の方だったのか。

順位から言うと、1位や2位といったわけではない。先行研究でバイオマーカー候補となった遺伝子の中で *SRPX2* 遺伝子を選択した理由は、以下の通りである。近年行われた胃癌に対する血管新生阻害薬の試験の結果、一昨年からラムシルマブという抗 VEGFR2 抗体薬が市場に出るようになった。しかしながら、それに対するバイオマーカーなどは未だ同定されていない。そこで先ほどの先行研究の中から血管新生に関連する遺伝子として *SRPX2* に注目した。

今回の研究での正常粘膜と腫瘍組織での発現は何倍程度あったのか。

今回の研究では正常粘膜での発現の多くがゼロであり、具体的に発現倍率を計算することはできていない。

正常組織にも幅広く *SRPX2* は発現がみられるとのことだが、どういった理由なのか。

SRPX2 遺伝子の機能を考えると、血管新生や細胞遊走に関わっている遺伝子なので、全身の組織の細胞で発現する可能性はあると思われる。例えば正常胃粘膜では胃潰瘍や胃炎などの炎症によって発現している可能性がある。

SRPX2 遺伝子の低発現例と高発現例というのは、正常粘膜に比べて低発現あるいは高発現なのか。

本研究では腫瘍組織における相対発現量を中央値で分け、中央値以上のものを高発現群、中央値未満のものを低発現群とした。カットオフ値の設定には ROC 曲線などを使用して行う方法もあるが、今回の場合は中央値で分けた。ただし今回のデータセットでは、生存や再発をアウトカムとして ROC 曲線を用いてカットオフ値を設定したとしても、数例の違いはあるが、ほぼ中央値と同じ値がカットオフ値となった。

この *SRPX2* が間質浸潤に関わる、あるいは EMT に関わるとすると、癌の先進部でこの遺伝子の発現が高まっていると推察されるが、免疫染色などで進行がんの先進部分と粘膜内部分での発現の違いといったことは確認しているか。

現状では確認していない。大腸癌のように多段階的に癌化プロセスがあるものであれば、先進部で *SRPX2* の発現が高度である可能性がある。胃癌では分化型胃癌であれば同様の所見を得られる可能性はある。一方、印環細胞癌のようにびまん浸潤の進展様式を取るような胃癌では同様な所見は得られない可能性が高い。

次ぎに市川靖史教授より以下の質問がなされた。

Figure 2 (正常胃粘膜と胃癌組織の *SRPX2* の mRNA の相対発現量の箱ひげ図) の星印は外れ値か。

その通りである。

そうすると正常胃粘膜でも遺伝子発現量高値を示すものがあるようだが、この点についての考察はしたのか。

推定の域を出ないが *SRPX2* の機能から考えると、慢性胃炎での血管新生や免疫細胞の遊走の際にこの遺伝子が関与して高発現となっている可能性がある。

胃癌ではヘリコバクターピロリ感染の有無が重要だと思うが、ヘリコバクターピロリが背景として存在するか否かという事との関連性については、検討したか？

今回の検討ではピロリ感染の有無についてのデータがないので、検討していない。た

しかにピロリ感染による慢性炎症が SRPX2 発現と関連する可能性はあるので今後検討課題としたい。

SRPX2 遺伝子高発現群と低発現群の症例数が 113 と 114 となっているが、どのような基準で両群を分けたのか。

腫瘍組織における相対発現量を中央値で分け、中央値以上のものを高発現群、中央値未満のものを低発現群とした。カットオフ値の設定には ROC 曲線などを使用して行う方法もあるが、今回の場合は中央値で分けた方法を用いた。ただし、生存や再発をアウトカムとして ROC 曲線を用いてカットオフ値を設定したとしても、今回のデータセットでは数例の違いはありますが、ほぼ中央値と同じ値がカットオフ値となった。

5 年生存率を見るとおおよそ高発現群では 50%、低発現群では 70%となっているが、これをどのように考察したのか。

この生存曲線は様々なステージが混ざっているため、一概にこの値を評価することは困難である。このため、ステージ毎にサブセット解析を行った。

Stage II の場合の 5 年生存率はおおよそ 80%程度で両群に明らかな差はなく、(ACTS-GC 研究などで報告されている)一般的な本邦での成績と差がみられなかった。Stage III の場合は、高発現群/低発現群でかなりの差がある。低発現群の 5 年生存率が約 80%で (ACTS-GC 研究などで報告されている)一般的な本邦での成績より良好で、高発現群の 5 年生存率は約 40%で (ACTS-GC 研究などで報告されている)一般的な本邦での成績よりかなり不良である。このため、Stage III 症例においては SRPX2 遺伝子の発現量が何らかの治療選択の基準となりうると考えられます。

最後に遠藤主査より以下の質問がなされた。

先生が提示した 3 つのメカニズム、①細胞外マトリックスの分解に関与し浸潤能を高めている、②EMT を促進している、③血管新生、それぞれについて SRPX2 との関連をデータとして示すべきではないか。

それぞれの機能と遺伝子発現との関係性は今回検討していないが、SRPX2 の腫瘍学的な機能を明らかにするうえで非常に重要な実験かと思うので、今後の研究課題としたい。

SRPX2 を in vitro でノックアウトするなどして抑制するとどうなるか、あるいは SRPX2 陰性の胃癌細胞に強制的に発現させた場合にどうなるのかなどといったことについては計画しているか。

今後、SRPX2 をトランスフェクションさせる、あるいはノックアウトさせるなどして、

人為的に SRPX2 発現を操作した胃癌細胞株を用いて、MMT アッセイや invasion assay で増殖能や浸潤能を評価するという実験を今後の課題としたいと考えている。

(大橋副査からの他の腫瘍では同様の実験研究報告はないか、という質問に対して) グリオブラストーマにおいては SRPX2 遺伝子のトランスフェクション、ノックダウンによって、その機能を確認したという実験報告がある。胃癌においては SRPX2 タンパクを胃癌細胞株に付与すると移動能が高まるとする報告はあるが、遺伝子レベルでトランスフェクションあるいはノックダウンしてその機能の評価したというような報告はまだない。

研究報告書における Stage II および III のサブセット解析の生存曲線を見ると、術後 1, 2 年は重なっていて、3 年目以降に SRPX2 の発現量によって差がつくように見える。このことから SRPX2 は抗がん剤に対する感受性に影響する可能性がうかがわれるが、他の癌などを含めた考察は、

まず、グリオブラストーマにおいてテモゾロミド (アルキル化剤) の治療抵抗性に寄与しているとする報告は一つみられる。その他の癌種での抗がん剤の感受性の関連を示した報告は未だない。

今回の検討したデータセットは胃癌補助化学療法で S1 が標準的に行われるようになる前後のものなので、Stage II, III を対象に術後補助化学療法の有無で比較をしている。結果は SRPX2 発現量による生存の差は、S1 補助化学療法がある場合でもない場合でもほぼ変わりなかった。また SRPX2 高発現の場合でも低発現量の場合でも、S1 補助化学療法の効果に明確な差は得られなかった。

なお、Stage IV のサブセットでは SRPX2 発現量による差はみられていない。一方で Stage III では差があることを鑑みると、SRPX2 は転移成立前後でその役割が大きいと推測される。その役割の可能性の一つとして転移先での血管新生に SRPX2 が大きく関与していると考えられる。

本研究のどの部分を申請者が行い、どの部分を共同研究者が行ったのか。

患者さんへの説明および同意の取得、手術検体の採取保存は、全症例ではないが自分自身が携わった。また臨床データ、病理データのデータベース構築にも携わった。今回の免疫染色は私自身が行った。PCR は実験助手が行った。統計解析は全て私が行った。論文作成は、私が行い、主任研究員や指導教官をはじめとする共著者に校閲作業を依頼した。

以上のように各質問に対して適切な回答が行われた。審査員による協議の結果、本研究は博士号(医学)の授与に値するものと判定された。