

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 佐藤 勉  
横浜市立大学大学院医学研究科

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	矢尾正祐
副査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	石川義弘
副査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	井上登美夫

## 博士の学位論文審査結果の要旨

Clinical significance of *SPARC* gene expression in patients with gastric cancer.

(胃癌における Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) 遺伝子発現の予後予測因子としての有用性)

## 論文内容の要旨

本邦における胃癌患者罹患数は全癌病変で最多であり、死亡数も肺癌に次いで多い。集学的治療により治療成績は徐々に向上しているが、Stage III の治療成績は未だ不良である。胃癌の予後に関わる因子は非常に多岐に渡っているが、これらの因子を用いた個別化治療により治療成績が向上する可能性があり、中でもバイオマーカーを用いた個別化治療が期待されている。本研究では癌の増殖に重要な役割を果たすと考えられている Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) をバイオマーカーの候補として注目した。SPARC は Matricellular 蛋白質の一つで、細胞とその周辺の微小環境との関係を微調整する蛋白質であり、血管形成の制御、癌転移の制御などを介して、癌の予後と関係することが様々な癌腫で報告されている。今回、胃癌の臨床検体を用いて SPARC 遺伝子の発現を計測し、臨床データとの関係を検討することで、予後予測因子としての有用性について検討した。対象は、2002 年から 2010 年の間に胃癌に対して外科治療を施行した症例で、術前化学療法などの前治療歴がなく、本研究への参加に同意された 227 例である。解析方法は、胃癌組織と近接正常胃粘膜の凍結検体より mRNA を抽出し、さらに cDNA を作成し、*SPARC* mRNA の相対的発現量を real-time PCR を用いて定量的に計測し、臨床病理学的因子および生存率との関係について検討した。まず胃癌組織と近接正常粘膜組織における *SPARC* mRNA の発現量を比較すると、胃癌組織で統計的に有意に高発現であった。次に *SPARC* 遺伝子の発現量の中央値で高発現群と低発現群の 2 群に分類し、臨床病理学的因子 (年齢、性別、腫瘍径、組織型、深達度、腫瘍局在、リンパ管侵襲の有無、脈管侵襲の有無、リンパ節転移の有無、肝転移の有無) との関係を検討したところ、漿膜浸潤との間に有意な関係が認められた。引き続いて予後との関連解析では、単変量解析で、男性、漿膜浸潤有り、リンパ節転移有り、静脈浸潤有り、リンパ管浸潤有り、遠隔転移有り、*SPARC* 高発現群、が有意に不良であり、多変量解析では、遠隔転移とともに *SPARC* 高発現群は独立した予後不良因子であった。5 年生存率は、*SPARC* 低発現群が 70.7%、高発現群が 44.2% と有意に高発現群で予後不良であった。以

上より、胃癌における SPARC 遺伝子発現は、予後予測因子として有用である可能性が示唆された。

#### 論文審査結果の要旨

胃癌はその罹患数、死亡数とも依然として本邦における悪性疾患の上位を占め、より有用な診断法や患者個別の最適治療の開発などが急務と考えられる。本研究は、Matricellular 蛋白質の一つである Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) の mRNA 発現レベルを患者の治療組織において検出し、胃癌組織におけるこの遺伝子の高発現が予後不良因子であることを明らかにし、本分子が新規バイオマーカーとなり得る可能性を示した。

審査に当たり、以上のような論文内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。まず、副査の石川より、1) SPARC の産生部位について、2) mRNA の調整法の詳細について、3) 血中バイオマーカーとしての可能性について、4) 治療法への展開の可能性、また治療の影響の可能性について、5) 遺伝子発現値が特別に高い症例についての解釈、について質問がなされた。

これに対してそれぞれ、1) 非癌部と比較して癌組織で高発現しており、癌組織の中では主に癌組織の間質細胞で作られていることが先行研究で報告されている、今回サンプルの免染は施行していないこと、2) サンプルは OCT コンパウンドされた凍結組織をクライオスタットで薄切し、その後 mRNA を抽出した。同時に解析検体が癌組織であることを H. E. 染色で確認したこと、3) 悪性黒色腫では、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法で SPARC を計測した報告例がなされている。胃癌では、tissue microarray を用いたタンパクレベルでの検討は行っており、さらに血中の SPARC タンパク測定を検討中であること、4) 膵癌や頭頸部癌領域でナブパクリタキセルが SPARC 高発現群で奏功するという報告があるが、胃癌においてはまだ確認されていない。もし同様の傾向が見いだせれば術後補助化学療法や再発時の抗がん剤選択などの指標に用いることが可能性として考えられる。今回の解析症例では、Stage II/III 症例については術後補助化学療法が、Stage IV については集学的治療として化学療法が施行されていたが、これらと SPARC 発現レベルとの特別な関連は見いだせていないこと、5) 発現異常高値例は、いわゆる測定の外れ値と考えており、臨床検体を用いた検討の限界と考えている。また正常組織で高発現の症例は癌組織でも高発現であるなどの傾向もみられなかった、との返

答がなされた。

次に主査の矢尾より、1) リアルタイム PCR の実験の再現性の検討はどうか、2) 予後の層別解析の検討はどうか、3) SPARC の癌細胞からの発現の可能性はどうか、との質問がなされた。

これに対してはそれぞれ、1) 本研究では予備検討として、400 検体を使用して 3 回  $\beta$ -アクトチンの遺伝子量を計測し、ほぼ同一の値が得られたため、1 サンプルでの検討が可能と判断した。尚 PCR 標準曲線の精度は 0.991 以上、傾きは 90-105%以内と設定し解析したこと、2) 術後補助療法の適応となる pStage II、III、132 例でのサブ解析を施行し、単変量解析では有意差を認めたが、多変量解析では p 値が 0.055 とわずかに優位差を検出できなかった。今後症例数を増やし再検討は必要であること、3) 免疫染色による先行研究で、その分布が癌組織の間質細胞で多く発現されると報告されている。ただしその発現機構の詳細はまだ不明であり、癌細胞での SPARC 発現の可能性も含め今後検討を行っていききたい、との返答があった。

さらに副査の井上より、1) Stage と SPARC 発現との関係、特に早期例ではどうだったか、2) 予後予測因子として SPARC が働くのは主にどの作用と関連していると考えられるか、3) 他の癌腫での SPARC の解析結果との比較、また重複がんでの検討はどうか、との質問がなされた。

これに対してはそれぞれ、1) SPARC 発現を TNM 分類の Stage 別で検討したが、発現量には差がなかったこと、また Stage I 症例 (30 例) のみの検討も行ったが、症例数が少なくかついづれも治療成績も良いためか差はみられていなかった、2) SPARC の作用のうち、癌組織周囲の血管内への浸潤・血管内への遊走、血管新生作用などが主として予後と関連していると推測されること、3) 現在までの様々な悪性腫瘍の検討では、SPARC 高発現が予後不良という癌腫が多いが、その逆の関連も一部癌腫で報告されている。SPARC は癌細胞の増殖や接着の他に、周辺の微少環境の調整や腫瘍血管の制御などが複雑に絡み合っているため、状況において SPARC の役割が変わるものと考えられる。また同時性重複癌症例や他癌で治療中の症例は全体の 5%前後と思われるが、今回の検討からは除外した。SPARC 発現は癌腫によっても異なることから、胃癌で高発現でも同じ個人に発生した他の癌で高発現であるとは必ずしも言えないと考えられるが、今回はその検討は行っていないことが返答された。

他にもいくつか質問がされたが、いずれも的確な返答がなされた。

以上より、本研究は、患者胃癌の実組織における SPARC 発現値を測定し、その臨床病理

学的意義および予後との関係を明らかにしたもので、博士（医学）の学位に値するものと判定された。

