

論文内容要旨

論文題目

粘膜上皮内食道扁平上皮癌のトランスクリプトーム解析

責任講座：内科学第二（消化器内科学）講座

氏 名： 後藤 裕樹

【内容要旨】（1,200 字以内）

【背景】食道扁平上皮癌（ESCC）は男性に多く飲酒や喫煙が最も重要なリスク因子である。また約 7 割は進行期で発見される。そのため ESCC の遺伝子解析は飲酒喫煙歴のある男性の進行癌が主体であった。しかし飲酒喫煙歴がない ESCC 患者も存在し、この大部分は女性に生じる。当講座では表在型 ESCC と非癌部上皮のゲノム解析を行い非飲酒非喫煙女性の非癌部粘膜に特徴的なゲノム変化を報告した。しかし ESCC のリスク因子別の臨床背景や遺伝子学的特徴は依然として不明な点が多い。そこで粘膜上皮内 ESCC 近傍の非癌部上皮の基底層領域に着目し、リスク因子を加味して、ESCC 形成早期の遺伝子発現を解析した。【方法】内視鏡的粘膜下層剥離術を受けた表在型 ESCC 患者連続 150 例、216 病変の臨床的特徴を解析した。切除した病変の FFPE 切片からの RNA 抽出条件を検討した。その上で、粘膜上皮内 ESCC とその周囲の非癌部、非 ESCC 腫瘍周囲の非腫瘍部（正常部）の FFPE 切片から laser microdissection で基底層領域と上層を切り分け、シークエンス（RNA-Seq）を行った。飲酒喫煙歴のない女性を Female unknown-risk（F-UR）群、飲酒喫煙歴のある女性を Female known-risk（F-KR）群、男性を Male known-risk（M-KR）群とした。男性 ESCC は全例で飲酒喫煙歴があった。各群の遺伝子発現の特徴を比較した。【結果】F-KR と M-KR 群に比し F-UR 群は高齢で、ヨード不染帯が少なく、アルコール脱水素酵素高活性型が多く、重複癌が少なかった。FFPE 切片から抽出した RNA 量と DV200 値はメンブレン法よりビーズ法で高く、HE 染色の影響は少なかった。また 2018 年の切片と比べ 2014 年の FFPE 切片では未染と HE 染色組織で RNA-Seq 結果の相関が低かった。そこで 2016～2022 年に切除した粘膜上皮内 ESCC を対象としたところ F-UR 群は 3 例のみとなった。これに背景を合わせた F-KR 群 3 例と M-KR 群 5 例、正常群 3 例で RNA-Seq を行った。発現遺伝子の階層的クラスタリング解析では癌部の上層と基底層、非癌部と正常部の基底層、非癌部と正常部の上層の 3 群に区分された。正常部基底層に比し非癌部基底層で *S100A7* の発現が高く、癌部基底層でも発現が高かった。F-UR 群の癌部基底層で非癌部粘膜と発現差がある遺伝子は F-UR 群で最も少なく、*SPRR3*、*KRT4*、*CSTA* のみで、これらは他群の癌部基底層でも発現が低下していた。非癌部基底層の発現遺伝子を 3 群間で比較すると、有意に F-UR 群と正常部で *GSTM1* の発現を認め、F-KR と M-KR 群では発現がなかった。癌部基底層や上層、非癌部上層でも同様であった。*GSTM1* 遺伝子のホモ欠失は 1 例のみで、他はヘテロ欠失であり、遺伝子型は発現レベルとは関連しなかった。【結論】粘膜上皮内 ESCC 患者の非癌部基底層で *S100A7* が高発現していた。また F-UR 群の基底層では、非癌部と癌部で発現変動する遺伝子数が少なく、飲酒喫煙群とは異なり *GSTM1* の発現レベルが保たれている特徴を初めて示した。ESCC 患者の非癌部基底層の *S100A7* と *GSTM1* の発現変化は ESCC 発生早期に重要な役割を果たす可能性がある。

2024年 1月 9日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：後藤 裕樹

論文題目：粘膜上皮内食道扁平上皮癌のトランスクリプトーム解析

審査委員：主審査委員 濱本 洋

副審査委員 吉岡 孝志

副審査委員 北中 千史



審査終了日： 2023年 12月 13日

【 論文審査結果要旨 】

食道がんのうち扁平上皮がん(ERCC)は、喫煙や飲酒がリスク因子となり男性に多いが、非飲酒非喫煙の女性も頻度は低いが発症する。その ERCC のがん細胞としての特徴を捉えるため、複数の遺伝子発現の解析が報告されているが、進行がんが主であり初期段階を対象としたものはなかった。本博士論文では、曝露リスク別の初期 ERCC における階層別のトランスクリプトームを初めて解析を試みた。

まず、病理解析用のパラフィン包埋切片(FFPE)からの、RNA 抽出の条件検討を行った。RNA 量と DV200 値の検討により、ビーズ法が RNA 抽出に适当であることが示された。また、保存期間が長い標本は、HE 染色後と未染色においてサンプル間のトランスクリプトームの相関が低く、解析できないことを明らかにした。解析が可能な FFPE 標本について、飲酒喫煙歴のない女性(F-UR)群、同歴のある女性(F-KR)群、及び、同歴のある男性(M-KR)群に分類した。それらの臨床的特徴について解析した結果、F-UR において他の ESCC 患者と比較し、高齢で BMI が低く、ADH1B2/*2 の割合が高く、重複がんが少ない傾向を見出した。また、F-UR 群の病変は他の群と比較しても有意に深達度が低く、粘膜上皮にとどまっていることを明らかにした。次に、レーザーマイクロダイセクションにより各々の FFPE から、がん部と非がん部の基底層領域と上層部に分けて切りだしトランスクリプトーム解析が行われた。階層的クラスタリングでは、予想通りのクラスタに分類され、トランスクリプトーム解析の信頼性が確認できた。それぞれの群と層における解析結果については以下の通りであった。基底層と上層の比較では、がん部、非がん部にかかわらず、各層での分化等に関係する遺伝子群の発現変動が認められた。正常部基底層と非がん部基底層では、複数の遺伝子の発現量に変動が認められたが、非がん部基底層で正常部と比して S100A7 が最も発現量が増加していた。ERCC 進行がんでは他の S100 ファミリーの発現量増加が報告されているが、本研究ではそれらの発現量の変動は認められなかったことから、S100A7 は ERCC の初期発がんマーカーとしての利用が考慮された。さらに、3 群間の非がん部基底層において、F-UR 群に比較して他の群では GSTM1 遺伝子の発現量の低下が認められた。この結果はゲノム解析とも一致せず、遺伝子の機能から、その発現低下はがんの性質によるものと考えられた。

上記のように、本研究ではこれまでに解析されておらず、また、症例数も限られている非リスク女性患者を含む、初期段階の ERCC について、トランスクリプトーム解析からその特徴を初めて捉えた研究となっている。今後の研究により初期腫瘍マーカーの開発や、がんの進行過程の解明に繋がると期待され、博士(医学)の学位授与に値すると判断した。(1, 200字以内)