

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	中 嶋 智 之
論文審査担当者	主 査      本 田 孝 行 副 査      中 山 淳・多 田 剛
論 文 題 目  <p style="text-align: center;">Distribution of <i>Lgr5</i>-positive cancer cells in intramucosal gastric signet-ring cell carcinoma</p> <p style="text-align: center;">(胃粘膜内印環細胞癌における <i>Lgr5</i> 陽性癌細胞の分布)</p>	
(論文の内容の要旨)  <p><b>【背景】</b> Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (<i>Lgr5</i>) は腸管上皮における幹細胞マーカーとして報告された。その後、腸管上皮以外にも様々な組織における発現が明らかにされてきた。胃においても幽門腺や腸上皮化生腺管の腺底部での発現が報告されている。さらに大腸癌や肝細胞癌等の癌腫における <i>Lgr5</i> 発現も多数報告されており、<i>Lgr5</i> は癌幹細胞マーカーとして有望であると考えられている。胃癌における <i>Lgr5</i> の発現解析の報告は少なく、組織型と <i>Lgr5</i> の発現との関連は明らかにされていない。そこで我々は胃癌組織亜型の一つである印環細胞癌 (signet-ring cell carcinoma: SRCC) に着目した。粘膜内に限局する SRCC はしばしば類器官分化と呼ばれる非腫瘍胃粘膜構造に類似した層状構造を示すことが知られている。本研究では粘膜内 SRCC における類器官分化に着目して <i>Lgr5</i> 発現細胞の分布や性状を解析した。</p> <p><b>【材料と方法】</b> 信州大学医学部附属病院で切除された胃癌症例で、粘膜固有層内に限局する SRCC 35 症例 (2010 年 1 月から 2014 年 7 月) を対象とした。各症例から腫瘍部粘膜全層を含む 3 mm 組織コアを採取し、組織アレイを作製した。組織アレイを薄切し Hematoxylin &amp; Eosin 染色を実施し、さらに CD10、MUC2、MUC5AC、MUC6、Pepsinogen I、CDX2、および Ki67 を用いて免疫組織化学染色を施行した。<i>Lgr5</i> は高感度 RNA <i>in situ</i> hybridization 法である RNAscope kit を用いて検出した。1 つ以上シグナルドットを持つ細胞を <i>Lgr5</i> 陽性とし、<i>Lgr5</i> の発現程度の評価は <i>Lgr5</i> を発現した腫瘍細胞の割合を 5 段階 (0, no staining; 1, 1-3 dots/cell; 2, 4-10 dots/cell; 3, &gt; 10 dots/cell; 4, &gt; 15 dots/cell with &gt;10% of dots in clusters) に分類し、半定量的数値である H-score [以下計算式: (% of grade 1 cells × 1) + (% of grade 2 cells × 2) + (% of grade 3 cells × 3) + (% of grade 4 cells × 4)] を症例毎に腫瘍部を粘膜固有層内で等間隔に上部、中部、下部の 3 領域に分け算出した。また Ki67 陽性率も <i>Lgr5</i> H-score を算出した上部、中部、下部の 3 領域で算出した。</p> <p>さらに Ki67 陽性細胞が帯状に増殖帯をなして分布する症例を用いて、<i>Lgr5</i> RNA <i>in situ</i> hybridization と Ki67 免疫組織化学の二重染色を実施し、<i>Lgr5</i> 陽性細胞と陰性細胞における Ki67 陽性率を算出した。</p> <p><b>【結果】</b> 全症例において <i>Lgr5</i> 陽性細胞を認めたが、<i>Lgr5</i> H-score と臨床病理学的因子に有意な相関は認めなかった。検討した 35 症例中 20 症例は粘膜固有層の中央部に Ki67 陽性細胞の帯状の分布領域を有しており、これらの症例において高密度の <i>Lgr5</i> 陽性細胞が粘膜固有層の下部領域に帯状に認められた。さらに、これら 20 症例は全例が非腫瘍胃粘膜構造を模倣する類器官分化を呈しており、粘膜固有層の上部には MUC5AC 陽性細胞が、下部には MUC6 陽性細胞が認められた。MUC5AC 陽性細胞と MUC6 陽性細胞との間に Ki67 陽性細胞の帯状分布領域 (増殖帯) が観察され、多くの <i>Lgr5</i> 陽性細胞は下層領域付近の MUC6 陽性領域内に分布していた。また CDX2 陽性であり、Pepsinogen I は全例陰性であった。</p> <p>粘膜固有層の上部、中部、および下部領域における <i>Lgr5</i> H-score の中央値は、各々 17.5 (10.0-32.5)、27.5 (16.3-40.0)、および 47.5 (25.5-86.3) であり、上部、中部領域と比較して、下部領域で有意に高値を示した (<math>P &lt; 0.001</math>)。また中部領域の <i>Lgr5</i> H-score は上部領域より有意に高値を示した (<math>P &lt; 0.001</math>)。一方で、Ki67 陽性率は、上部、中部、下部領域において各々 15.0% (10.0-35%)、47.5% (31.3-60.0%)、12.5% (5.0-23.8%) であり、上部、下部領域と比較して中央領域で有意に高値であった (<math>P &lt; 0.001</math>)。上</p>	

部領域と下部領域で Ki67 陽性率に有意差は認められなかった ( $P=0.410$ )。粘膜固有層において Ki67 陽性細胞の帯状分布領域を示した 20 症例の内、十分な標本材料が利用できた 16 症例において *Lgr5* RNA *in situ* hybridization と Ki67 免疫組織化学の二重染色による解析を行った。*Lgr5* 陽性細胞における Ki67 陽性率は 38.1% (30.5-64.4%) で、*Lgr5* 陰性細胞における Ki67 陽性率 55.5%(38.6-76.1%) と比較して有意に低値を示した ( $P<0.001$ )。

**【考察】**本研究において、粘膜内 SRCC における *Lgr5* 陽性細胞の分布とその性状の特徴について報告した。粘膜内 SRCC における類器官分化は以前から報告されており、胃粘膜を模倣する層構造が認められ、Ki67 陽性細胞の帯状陽性領域を有する増殖帯が存在する。本検討では Ki67 陽性領域とは異なる下層領域に *Lgr5* 陽性細胞の帯状陽性像を認めており、*Lgr5* 陽性細胞の存在部位も胃粘膜を模倣することが判明した。*Lgr5* は癌幹細胞マーカーとしての有望であると報告されている。本研究において *Lgr5* 陽性細胞は低い増殖能を示しており、癌幹細胞の特徴の一つを示しているとも考えられた。我々が同定した粘膜内 SRCC における *Lgr5* 陽性細胞の粘膜深層における分布様式は、SRCC における癌幹細胞ニッチの研究への発展が期待される。今回の報告では *Lgr5* 発現と臨床病理学的因子との間に有意差は得られていないが、進行癌において *Lgr5* 発現と予後など様々な因子との間に相関が報告されており、今後の検討が必要である。また胃底腺領域に *Lgr5* 陽性細胞は存在しないと報告されているが、類器官分化を伴い胃底腺への分化を示す SRCC の探索と、それらの症例における *Lgr5* 陽性細胞の存在の検討なども今後の課題である。*Lgr5* 発現は胃癌、特に SRCC で治療のターゲットとして役立つ可能性がある。これらの課題の解明に向け、今後、胃癌における *Lgr5* 発現について更なる研究が必要である。