

令和5年度 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

北里大学大学院医療系研究科博士課程

伊東 由夏

1. 研究テーマ

胃癌における Fibrinogen gamma chain 発現検索と機能解析およびその臨床的意義の検証

2. 目的

胃癌は、本邦における罹患率第一位かつ好発年齢が60歳代である点から、超高齢化が進む日本においては今後も罹患者数が増加を辿ることが想定されている。近年、分子標的薬の進化に伴い、胃癌患者の死亡率は減少傾向にあるが、病理組織型の多様性や多発癌の存在など、高悪性度化傾向を示す症例が一定数存在するため、依然として予後不良な癌種として位置づけられている。そのため、胃癌の分子生物学的特性の理解は病態解明と予後改善の観点からも喫緊の課題である。

申請者は上記課題を解決の一端として、最近になり固形腫瘍の進展や遠隔転移の促進に関与すると言われているフィブリノゲン(FIB)に着目した。胃癌において検討したところ、胃癌組織中の炎症シグナルの活性に従い血漿中 FIB が腫瘍細胞に誘導され、細胞の遊走能亢進に影響し、その結果として胃癌の病態悪性化と予後へ寄与することを見出した（論文投稿準備中）。一方、その研究過程において、胃癌細胞内では FIB サブユニットである Fibrinogen gamma chain (FGG) のみが高発現であることを見出した。近年、in vitro 実験系では FGG の発現解析およびその機能が着目され始めており、腫瘍細胞の遊走能および予後と相関性があると報告された¹⁾。胃癌における発現解析については未だ手付かずの状態である。上記より、FGG について着目し、胃癌組織における FGG 発現と機能解析およびその臨床的意義について検討した。

3. 方法

3-1. 胃癌における FGG 発現検索と臨床病理学的因子との相関性

2015 年に北里大学病院にて外科的切除された胃癌患者検体 89 症例を用いて、免疫組織化学染色法(IHC)にて FGG タンパク質発現の検討を行った。上記、解析結果と臨床病理学的因子（臨床病期、腫瘍深達度、リンパ節転移など）や予後（全生存期間及び無増悪生存期間）との相関性を解析した。

3-2. FGG 発現制御機構の解析

先行研究結果から FGG 発現制御機構を炎症シグナル系の観点から解析を行った。上記臨床検体を用いて、腫瘍内炎症細胞浸潤数（Infiltrating cells）を 5 視野（観察倍率：400 倍）の平均値を算出し、FGG-IHC 結果と比較した。炎症性サイトカインである IL-6 を RNA scope システムを用いた高感度 in situ hybridization 法により発現検討した。炎症シグナル系因子である pStat3 を免疫組織化学染色法により評価した。

3-3. 炎症シグナル誘導型 FGG 高発現細胞を用いた解析

FGG を発現している胃癌細胞株(GCIY)を用いて、炎症シグナル試薬 IL-6 及びその阻害試薬 Stattic を添加した際の FGG 及び pStat3 発現を Western blot 法や RT-PCR 法により解析した。

3-4. FGG 発現と各種マーカー発現の相関性

胃癌組織を用いて、上皮間葉転換(EMT)マーカーと癌幹細胞(CSC)マーカーの免疫組織化学染色を行い、FGG 発現との相関を確認した。

4. 結果

4-1. 胃癌組織における FGG 発現検索と臨床病理学的因子との相関性

胃癌組織中の FGG タンパク質発現を免疫組織化学染色法にて解析した結果、腫瘍細胞の細胞質にて陽性所見を認めた。腫瘍部における FGG タンパク質発現と *FGG* mRNA 発現間には相関が見られた(図 1-A)。FGG と臨床病理学因子との相関を検討した結果、性別、リンパ節転移、INF と相関していた(Table1)。免疫染色の結果を用いて Kaplan-Meier 法にて全生存期間における予後を評価したところ、FGG 高発現群と低発現群にて有意な差は得られなかったが(図 1-B)、TCGA 解析の結果では *FGG* mRNA 高発現群にて有意に予後が不良であった(図 1-C)。

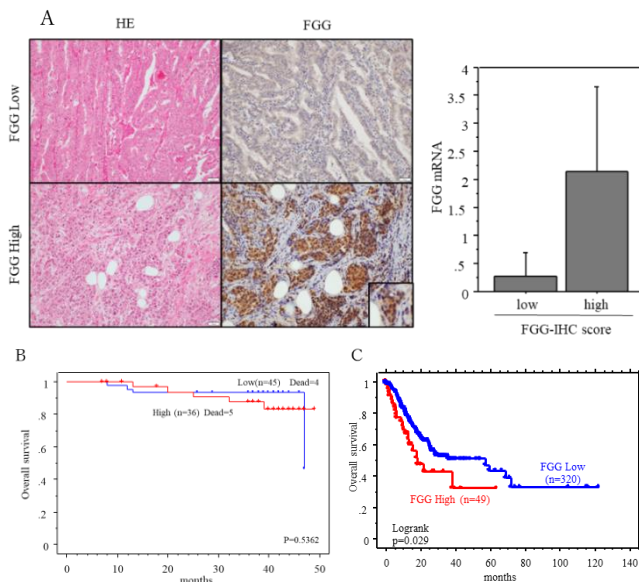


図1.FGG発現と予後解析

Table 1 Correlation between plasma FGG level and clinicopathologic factors in gastric cancer				
		FGG-IHC score		p-value
		Low (<6.5)	High (6.5)	
Age	<60	8 (66.7)	4 (33.3)	0.4196
	≥60	38 (54.3)	32 (45.7)	
Gender	Male	27 (47.4)	30 (52.6)	0.014
	Female	19 (76.0)	6 (24.0)	
Stage	I	31 (66.0)	16 (34.0)	0.0884
	II	8 (38.1)	13 (61.9)	
	III	7 (50.0)	7 (50.0)	
	IV	0 (0.0)	0 (0.0)	
pT	1	29 (67.4)	14 (32.6)	0.0372
	2	3 (33.3)	6 (66.7)	
	3	6 (33.3)	12 (66.7)	
	4	8 (66.7)	4 (33.3)	
N	0	37 (62.7)	22 (37.3)	0.0222
	1	1 (11.1)	8 (88.9)	
	2	5 (71.4)	2 (28.6)	
	3	3 (42.9)	4 (57.1)	
Ly	0	31 (64.6)	17 (35.4)	0.655
	1	15 (44.1)	19 (55.9)	
v	0	25 (64.1)	14 (35.9)	0.2758
	1	21 (48.8)	22 (51.2)	
Histology	differentiated	20 (48.8)	21 (51.2)	0.1396
	undifferentiated	26 (65.0)	14 (35.0)	
INF	a	0 (0.0)	3 (100.0)	0.0327
	b	27 (57.4)	20 (42.6)	
	c	7 (43.6)	9 (56.4)	

4-2. FGG 発現制御機構の解析

FGG 誘導シグナルの検討を行うために、FGG と炎症反応との関連性を解析した結果を示す(図 2)。まず、腫瘍内炎症細胞数を HE 標本にて算出したところ、FGG 高発現の症例では高度な炎症細胞浸潤を認めた。また、炎症関連シグナルである pStat3 のタンパク発現を検討したところ、FGG 高発現群では pStat3 が高発現であった。次に、*IL-6* mRNA 発現を in situ hybridization 法により解析したところ、FGG 高発現群において強い染色性を認めた。

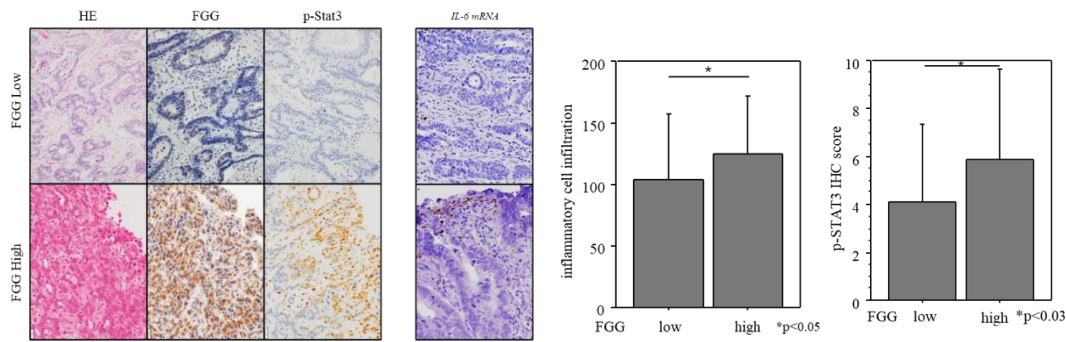


図2. FGG発現と炎症反応の相関

4-3. 炎症シグナル誘導型 FGG 高発現細胞を用いた解析

FGG 発現制御機構の解析のため、JASPAR にて FGG promoter 領域を解析したところ、5 つの Stat3 結合領域が存在することが明らかとなった(図 3)。

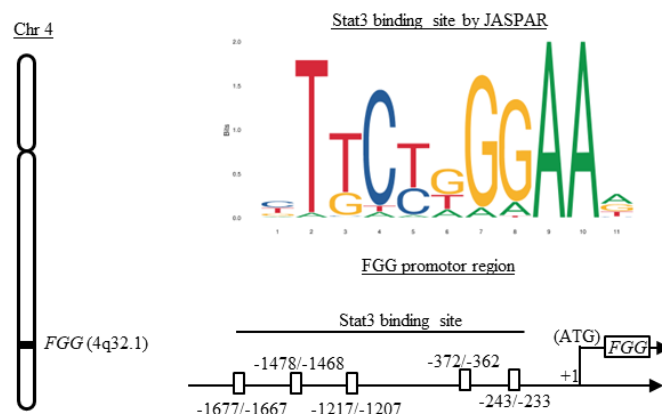


図3. FGG プロモーター領域におけるStat3結合部位の検索

次に FGG 発現培養細胞を検索したところ、胃癌細胞株 4 株 (GCIY、KE39、MKN7、MKN74) 中、GCIY でのみ FGG が高発現であった(図 4-A)。次に、GCIY に対し IL-6 刺激を加えたところ、IL-6 濃度依存的に *FGG* mRNA の発現量が増加するという結果を得た。また、Western Blot 法により、pStat3 の亢進とともに FGG タンパク質発現が増加していた(図 4-B)。一方で、pStat3 阻害剤 (Stattic) を添加したところ、FGG 発現が顕著に低下していた(図 4-C.D)。

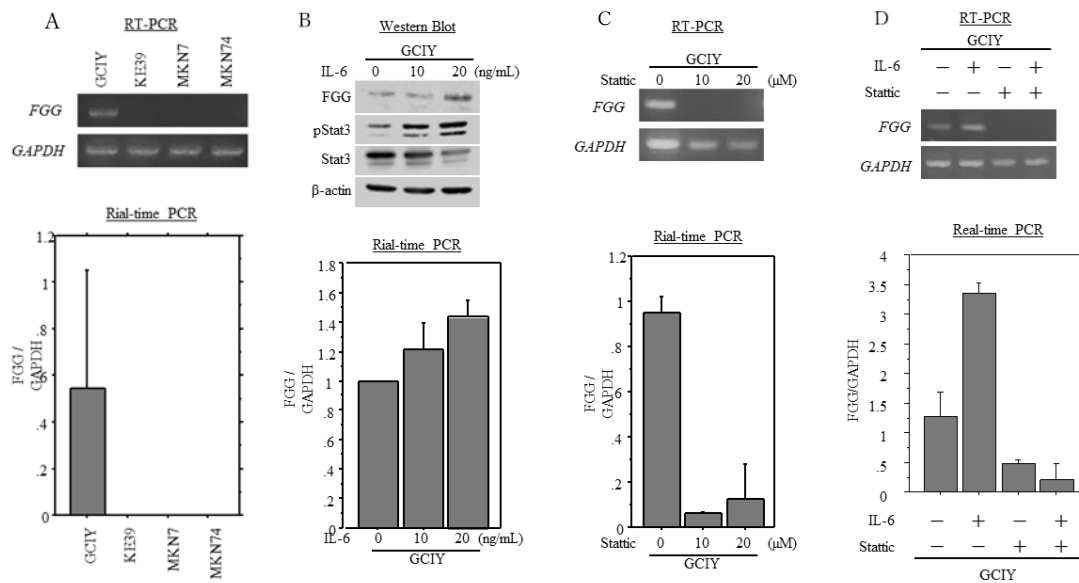


図4. 胃癌細胞株を用いたFGG誘導機構の検討

4-4. FGG 発現と各種マーカー発現の相関性

胃癌における FGG の機能解析を行うために、胃癌組織を用いて EMT マーカーと CSC マーカーの免疫組織化学染色を行った結果を示す(図 5)。FGG 発現は ALDH1 と Sox2 と発現が相関しており、FGG と CSC が関連している可能性が示された。

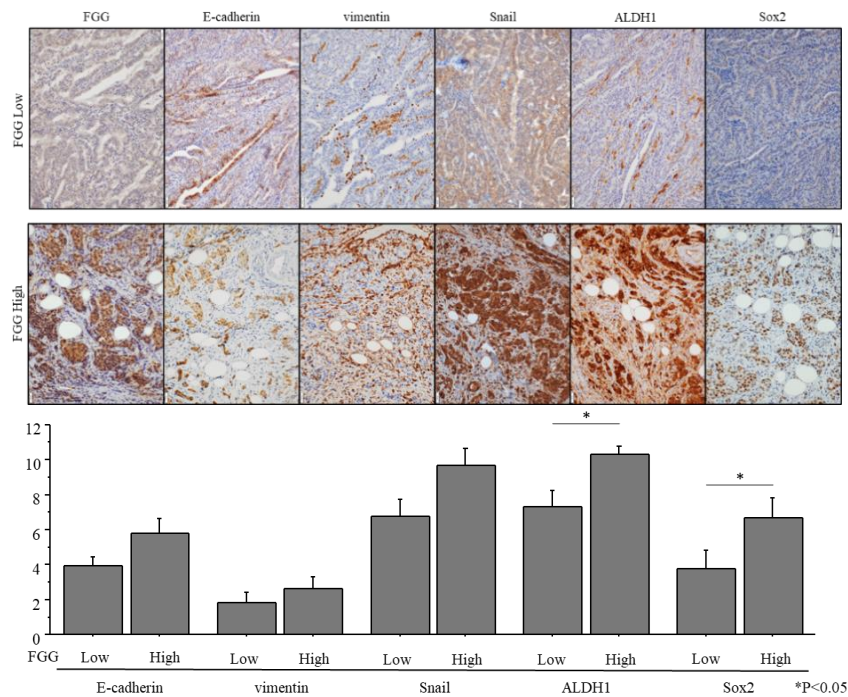


図5. FGG発現と各種マーカーの染色結果

5. 総括と今後の展望

本研究では、胃癌において FGG が腫瘍部特異的に発現し、胃癌細胞の CSC 化と患者予後に寄与している可能性が示された。

研究結果より FGG が IL-6/Stat3 シグナルにより発現誘導されていることが示唆された。pStat3 は Jak/Stat シグナル伝達経路において重要な因子であり、炎症反応が活性化状態であることを示唆している。つまり、炎症シグナルが亢進することにより FGG が腫瘍細胞内に発現する可能性が考えられた。さらに DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現検索を行った論文では、胃癌組織において FGG 遺伝子が予後不良因子として有用であるという結果が示された²⁾。肝細胞癌 SK-HEP-1 細胞においては、FGG の過剰発現が EMT シグナル伝達経路を介した移動能と浸潤能の促進に関与する可能性があるとして報告されている³⁾。以上より、胃癌組織中 FGG の発現亢進は、腫瘍の悪性化および予後に直接関与している可能性が考えられた。今回、相関性を認めた CSC マーカーに関しては報告している論文が見受けられなかったため、今後はより詳細なメカニズムの検討を行い、in vitro 解析を中心にその発現意義を検証する必要がある。

6. 参考文献

1. Liu YL, Yan ZX, Xia Y, Xie XY, Zhou K, et al. Ligustrazine reverts anthracycline chemotherapy resistance of human breast cancer by inhibiting JAK2/STAT3 signaling and decreasing fibrinogen gamma chain (FGG) expression. *Am J Cancer Res.* 2020 Mar 1;10(3):939-952.
2. Shijie Duan Baocheng Gong Pengliang Wang Hanwei Huang Lei Luo Funan Liu. Novel prognostic biomarkers of gastric cancer based on gene expression microarray: COL12A1, GSTA3, FGA and FGG. *Mol Med Rep.* 2018; 18: 3727-3736.
3. Xiang Zhang, Fei Wang, Yanbing Huang, Kun Ke, Bixing Zhao, Lihong Chen, et al. FGG promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells through activating epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Manag Res.* 2019; 11:1653-1665.