



Title	DOK2 as a Marker of Poor Prognosis of Patients with Gastric Adenocarcinoma After Curative Resection
Author(s)	宮垣, 博道
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59074
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【97】

氏 名	宮 垣 博 道
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 1 4 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	DOK2 as a Marker of Poor Prognosis of Patients with Gastric Adenocarcinoma After Curative Resection (DOK2 は胃癌治癒切除後の新規予後予測因子である)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 土岐祐一郎 (副査) 教 授 青笹 克之 教 授 猪原 秀典

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

DOK1-3 蛋白は bcr/abl 蛋白の基質として同定された分子で、Philadelphia 染色体を有する慢性骨髄性白血病発症への関与が良く知られている。これら DOK1-3 蛋白は、EGFR や HER2/Neu などの様々な膜型チロシンキナーゼの細胞内結合蛋白で、下流シグナルの負の調整因子として機能していることが報告されている。今まで免疫系細胞における報告は多くみられるが、上皮系細胞や固形癌に関する報告はなかった。しかし、近年、DOK1-3 のノックアウトマウスにおいて肺腺癌の発生が報告され、肺癌臨床検体においても DOK2 遺伝子領域のゲノム数低下を認め、DOK2 遺伝子が肺腺癌の癌抑制遺伝子であることが示唆された。そこで我々は胃癌における DOK2 発現と臨床的意義および DOK2 遺伝子のゲノム数を検討した。

〔 方 法 〕

① 胃癌切除症例 6 例の胃切除標本の非癌部より、レーザーマイクロダイセクション法にて正常胃粘膜細胞を採取し、Total RNA を精製した。また、胃癌細胞株 (T)7 種 (MKN74, MKN45, MKN45p, MKN7, NUGC3, RERFGC1B, AGS) を RPM1640 (10%FBS) にて培養し、それら細胞株より Total RNA を精製した。それぞれの Total RNA サンプルにおいて、DOK1-3 の mRNA 発現を定性的 PCR 法にて評価した。② 大阪大学消化器外科において 2001 年 10 月から 2004 年 3 月に治癒切除施行され病期 I-III と診断された 118 例を対象に、ホルマリン固定された手術切除標本に対する免疫組織染色法により、胃癌原発巣および非癌部の正常胃粘膜組織の DOK2 蛋白発現を評価した。また、その 118 例より漿膜下層 (SS) で深浸潤症例 30 例を無作為に抽出し、凍結切除サンプルより精製した Total RNA を用いて、定量的 PCR 法による DOK2 遺伝子発現と、DOK2 蛋白発現を比較した。さらに、DOK2 発現と臨床病理学的因子との相関および予後を解析した。③ 前述した 30 例において、DOK2 の遺伝子座近傍の D8S560 サテライトマーカーに対して、定性的 PCR 法を施行し、電気泳動により Loss of heterozygosity (LOH) を評価、DOK2 発現との関連性を検討した。

〔 成 績 〕

① 定性的 PCR 法により、DOK1 は、全ての正常粘膜・胃癌細胞株で発現を認めたのに対し、DOK3 はいずれにおいても発現を認めなかった。一方、DOK2 は正常粘膜で発現を認めたが、胃癌細胞株での発現は種類によって異なり、AGS, MKN7 で強発現、MKN74, MKN45, NUGC3 では中等度の発現を認め、MKN45p, RERFGC1B では発現を認めなかった。② DOK2 蛋白発現は、正常粘膜では全例で発現を認めた。胃癌原発巣では 118 例中 59 例 (50%) で DOK2 発現を認め、59 例 (50%) で発現を認めなかった。同一症例の癌巣における不均一性 (Heterogeneity) は認められなかった。DOK 蛋白発現は正常粘膜腺細胞でも癌細胞でも、細胞質に認められた。DOK2 陰性症例は陽性症例と比較し、有意に mRNA 発現の低下を認め、免疫染色法による DOK2 蛋白発現と mRNA は相関性を認めた (fold change 5.34, $p < 0.001$)。臨床病理学的因子との解析では、DOK2 陰性症例は、陽性症例と比較し、高・中分化型症例に有意に多かった ($P = 0.001$)。また、予後解析では、DOK2 陽性症例は全生存期間と無再発生存期間の両方において有意に良好であった (5 年生存率; 76.4% vs. 59.1%, $p = 0.040$, 5 年無再発生存率; 73.0% vs. 58.1%, $p = 0.033$)。単変量・多変量解析により、病理学的 T 因子 および 病理学的 N 因子とともに、DOK2 陰性は独立予後因子であった。 (HR=2.343, 95%CI=1.211-4.727, $P = 0.011$) ③ LOH 解析で、DOK2 陰性 11 症例中 6 例 (54.5%) に LOH を認め、DOK2 陽性 12 例では、認めなかった。同型接合性 (Homozygosity) のため 7 例は、評価不能であった。

〔 総 括 〕

DOK2 は胃癌の再発、予後に関連した生物学的悪性度の指標となる新しいマーカーになることが明らかになった。

さらに、DOK2蛋白発現の低下は、遺伝子のゲノム数の低下と強い関連を認め、haploinsufficientな胃癌抑制遺伝子である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】DOK1-3蛋白はbcr/abl蛋白の基質として同定された分子で、CMLへの関与が良く知られている。DOK1-3蛋白は、EGFRやHER2/Neuなどの様々な膜型チロシンキナーゼ受容体の細胞内結合蛋白で、下流シグナルの負の調整因子として機能。今まで固形癌における報告はなかったが、近年、肺腺癌発生の関与が示唆された。【方法と成績】正常胃粘膜細胞(N)6例と、胃癌細胞株(T)7種で、DOK1-3の遺伝子発現をPCR法で評価、DOK1は、全てのNとTで発現を認め、DOK3は発現を認めなかった。一方、DOK2はNで発現を認めたが、Tでの発現は種類によって異なった。②治癒切除施行された胃癌118例を対象に、臨床病理学的因子との解析では、DOK2陰性症例が、高・中分化型症例に有意に多かった。また、DOK2陽性症例は全生存期間と無再発生存期間の両方において有意に良好であった。単変量・多変量解析により、DOK2陰性は独立予後因子ということが明らかとなった。LOH解析の結果、DOK2陰性の54.5%にLOHを認め、DOK2陽性では、認めなかった。【結語】DOK2は新規予後予測因子となるが明らかになった。さらに、DOK2遺伝子は、haploinsufficientな胃癌抑制遺伝子である可能性が示唆された。

以上の功績は、博士(医学)の学位授与に値する