

論 文 要 旨

Slug expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma.

〔 食道扁平上皮癌において E-cadherin 発現正常例の癌では, Slug 発現は患者の予後と関連する 〕

内門 泰斗

【背景】

食道扁平上皮癌は、消化管癌の中でも悪性度の高い癌のひとつである。E-cadherin は、正常上皮において、細胞極性の維持や、組織構築に重要な役割を担っている一方、様々な癌においても、重要な役割を担っている。これまで食道扁平上皮癌において、E-cadherin の発現と腫瘍浸潤やリンパ節転移、予後と相関することが報告されてきた。近年、Snail Family のひとつである Slug が、胎生期の神経管形成に必要なタンパクとして同定され、E-cadherin の promoter の上流にある E-box に結合し、その発現を負に制御する転写制御因子として報告された。今回、食道扁平上皮癌において重要な接着因子である E-cadherin と、その制御因子 Slug の発現を調べ、臨床病理学的因子との関連性を検討した。

【対象と方法】

- 1) 対象；1987 年から 1998 年までの当科で施行された食道扁平上皮癌根治切除症例 203 例（男性 181 例，女性 22 例）を対象とし、内視鏡粘膜切除術症例，非根治切除例，術前治療例，同時性・異時性多発癌症例は除外した。年齢は 36 歳から 85 歳（平均 64.2 歳）であった。臨床病期分類は、全例 TNM 分類第 5 版により分類した。退院後、全例外来にて経過観察を行い、術後経過観察期間は 1 ヶ月から 173 ヶ月（中央値 30 ヶ月）であった。
- 2) 方法；203 例のパラフィン固定標本を用い、E-cadherin 及び、Slug 抗体による免疫染色を Streptavidin-biotin peroxidase 法で施行した。染色の評価は 200 倍の顕微鏡にて 10 視野、1000 個（100 個/視野）の癌細胞の発現を観察して行った。E-cadherin の発現は、腫瘍から離れた正常上皮細胞と癌細胞との間での発現を比較して行い、癌細胞が正常細胞と同等に染色されているものを正常例とし、癌細胞が正常細胞より減弱もしくは未染色のものを減弱例と評価した。Slug 発現癌細胞の 10%以上が染色されるものを発現陽性例とし、癌細胞の 10%未満しか染色されないものを発現陰性例と評価した。

【結果】

- 1) **E-cadherin と Slug の発現**: E-cadherin は細胞膜に発現しており、正常例は全体の 43%、88 例であった。Slug は細胞質に発現しており、発現陽性例は全体の 48%、98 例に認められた。
- 2) **E-cadherin, Slug の発現と臨床病理学的因子との関連**: E-cadherin の発現は、壁進達度、所属リンパ節転移、Stage、リンパ管侵襲との間に有意差を認めた ($P < 0.0001$)。Slug の発現は、組織型、壁進達度、所属リンパ節転移、Stage、リンパ管侵襲、血管侵襲との間に有意差を認めた。また、Slug の発現陽性 98 例中、E-cadherin 発現の減弱例が 67 例 68.4%に認められ、有意に多かった。
- 3) **E-cadherin の発現による、Slug の発現と臨床病理学的因子との関連**: 全症例を E-cadherin 発現の正常例グループと減弱例グループの 2 群に分類し、それぞれのグループにおいて Slug の発現と臨床病理学的因子との関連性を検討した。E-cadherin 発現の正常例グループにおいて、Slug の発現は組織型、壁進達度、Stage、血管侵襲と関連性を認めた。E-cadherin 発現の減弱例グループでは、組織型、Stage、リンパ管侵襲と関連性を認めた。

- 4) **E-cadherin, Slug** の発現と予後との関連：術後合併症で 30 日以内に死亡した 6 例を除く 197 例で検討した。E-cadherin 発現の正常例は 5 年生存率が 35.2%，減弱例は 20.9%と、有意に減弱例において予後不良であった。Slug の発現陽性例は 5 年生存率が 21.4%，発現陰性例は 32.4%と、有意に発現陽性例が予後不良であった。
- 5) **E-cadherin** の発現による，**Slug** の発現と予後との関連：E-cadherin 発現の正常例グループにおいて，Slug 発現陰性例は 5 年生存率が 40.4%，Slug 発現陽性例は 25.8%であり，有意に Slug 発現陽性例において，予後不良であった。E-cadherin 発現の減弱例グループでは，Slug の発現と予後に有意差を認めなかった。
- 6) 予後因子の解析：Cox 比例ハザードモデルによる解析では，壁進達度，所属リンパ節転移が独立予後因子であったが，E-cadherin の発現，Slug の発現，E-cadherin と Slug の発現の組み合わせは独立予後因子とはならなかった。

【考察】

本研究において，食道扁平上皮癌の 57%（115 例）に E-cadherin 発現の減弱を認めた。壁進達度，所属リンパ節転移，Stage，リンパ管侵襲，予後と関連しており，これまでの報告と一致していた。E-cadherin の機能を制御する分子生物学的因子を調べるために，E-cadherin の転写制御因子である Slug に注目し検討したところ，Slug の陽性発現が E-cadherin の発現減弱と関連性を認め，壁進達度や予後とも関連を認めた。

特に E-cadherin 発現の正常例グループでは，Slug の発現陽性例は陰性例と比較して，有意に腫瘍の浸潤が強く予後不良であった。このことは，Slug の機能に E-cadherin の機能抑制だけでなく，腫瘍浸潤や予後と関連する機能を有するものと考えられた。Slug は，白血病細胞において抗アポトーシス作用を有するという報告や，Desmoplakin, Muc-1, Cytokeratin-18 といった上皮マーカーを抑制する作用を有するという報告があり，抗アポトーシス作用や他の上皮マーカーの抑制作用により，E-cadherin 発現の正常例グループにおける Slug の発現陽性例の予後を悪化させたものと考えられた。一方，E-cadherin 発現の減弱例グループにおいては，Slug の発現は予後に影響しなかった。E-cadherin の発現正常かつ Slug の発現陽性例は，独立予後因子とはならなかったが，Slug 発現は E-cadherin 発現の正常例グループにおいて，重要な役割を担っているものと考えられた。

今回，E-cadherin, Slug の発現は，壁進達度，所属リンパ節転移，予後を含む，腫瘍の特性と関連していた。独立予後因子とはならなかったが，E-cadherin の発現と E-cadherin と Slug の両発現を検討することは，食道扁平上皮癌の悪性度診断の一助となりうると思われた。

(Clinical Cancer Research, 2005 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 604 号	氏名	内門 泰斗
審査委員	主査	栄鶴 義人	
	副査	丸山 征郎	米澤 傑

**Slug expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis
in patients with esophageal squamous cell carcinoma**

Clinical Cancer Research, Vol. 11, 1174-1180, February 1, 2005.

〔食道扁平上皮癌において E-cadherin 発現正常例の癌では
Slug 発現は患者の予後と関連する〕

食道扁平上皮癌では、E-cadherin の発現の程度と腫瘍浸潤、リンパ節転移、予後と関連することが報告されてきた。近年、Snail family の一つである Slug が E-cadherin のプロモーター上流の E-box に結合し、E-cadherin の発現を負に制御する転写制御因子であることが報告された。学位申請者は、食道扁平上皮癌の重要な接着因子である E-cadherin の発現と、制御因子である Slug の発現を免疫組織染色で検索し、臨床病理学的因子との関連性を検討した。

1987年から1998年までに根治切除した203例(男性181例、女性22例)を対象として検索し、E-cadherin は、同一標本で癌部と正常部の発現を比較し、両者で同等に発現しているものを正常例、癌部の染色が弱い、あるいは、染色されない例を減弱例とした。また、Slug では、10%以上の癌細胞が染色されたものを陽性とした。その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

1. E-cadherin は細胞膜に発現し、正常例は 43%(88 例)であり、Slug は細胞質に発現し、陽性例は 48%(98 例)であった。
2. E-cadherin の発現減弱は、壁進達度、リンパ節転移、Stage、リンパ管侵襲と有意に相関していた ($p<0.001$)。また、Slug の発現陽性は、組織型、壁進達度、リンパ節転移、Stage、リンパ管侵襲、血管侵襲と有意に相関していた。また、Slug 発現陽性 98 例中、E-cadherin の発現は 67 例(68.4%)で有意に減弱していた ($p=0.0011$)。
3. E-cadherin 発現正常群では、Slug 陽性発現は組織型、壁進達度、Stage、血管侵襲と関連を認め、E-cadherin 発現減弱群では、Slug 陽性発現は組織型、Stage、リンパ管侵襲と関連を認めた。
4. E-cadherin 発現正常群の 5 年生存率は 35.2%で、発現減弱群では 20.9%であり、減弱群で有意に予後不良であった ($p=0.005$)。また、Slug 発現陽性群の 5 年生存率は 21.4%で、陰性群は 32.4%であり、発現陽性群で有意に予後不良であった ($p=0.014$)。
5. E-cadherin 発現正常群で、Slug 発現陽性例の 5 年生存率は 25.8%、発現陰性例では 40.4%であり、Slug 発現陽性例で有意に予後不良であった ($p=0.035$)。E-cadherin 減弱群では、Slug 発現と予後に有意差を認めなかった。
6. Cox 比例ハザードモデル解析では、壁進達度、所属リンパ節転移は独立予後因子であったが、E-cadherin の発現、Slug の発現、E-cadherin と Slug の発現の組み合わせは独立予後因子とはならなかった。

本研究は、E-cadherin の発現とその制御因子である Slug の発現を同一標本で検索し、E-cadherin 発現正常群でも Slug 発現により有意に予後不良となることを示し、Slug の働きが E-box を介する E-cadherin 発現抑制のみでなく、発現している E-cadherin の機能にも影響することを示唆したもので非常に興味深い。よって本研究は、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 604 号	氏名	内門 泰斗
審査委員	主査	栄鶴義人	
	副査	丸山征郎	米澤 傑

主査及び副査の3名は、平成17年11月1日、学位申請者 内門 泰斗 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めるとともに、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 過去に abnormal E-cadherin によって cadherin-catenin signal が入りにくいという報告があるが、今回はどうだったか？

回答 E-cadherin が発現しているも、機能として作用しなくなっている可能性は考えたが、今回は検討していない。今後の研究課題と考える。

質問2) 食道癌の細胞株で、E-cadherin と Slug の各々の発現型に振り分けて、それぞれの細胞株の機能解析を行ったか？

回答 今回は、それぞれの細胞株における発現を調べたのみで、機能解析までは行っていない。今後行なっていきたいと考える。

質問3) 接着因子が抑制されて細胞が detach する場合、細胞は anoikis に陥ると予想されるが、Slug は、anoikis を抑制すると考えてよいのか？

回答 細胞株に Slug を導入して、経時的に細胞形態や anoikis を見る実験は行なってはいないため、わからないが、今後の研究課題と考える。

質問4) E-cadherin 減弱弱もしくは Slug 陽性例が予後不良というのは、臨床病理学的因子の悪性度が集積した結果と考えるとよいのか？

回答 overall での関連性の検討を行ったため、そう考えてよい。T 因子や N 因子など臨床病理学的因子を matching させて行なってはいない。

質問5) 連続切片で、E-cadherin と Slug の染色の評価を個々の症例で行ったか？

回答 連続切片で、それぞれの症例の染色に比較検討は行っていない。E-cadherin と Slug の染色を見た場合、E-cadherin の減弱部と Slug の陽性部が必ずしも対応しているとはいえなかった。同一腫瘍内でも、両者の染色性に heterogeneity が認められた。

質問6) EMT (epithelial-mesenchymal transition) と関連して、Slug が低分化型に発現しやすいと考えるとよいのか？

回答 今回の結果では、Slug の発現陽性例に高分化型が多い結果となり、予測に反した結果となった。腫瘍内での heterogeneity が関与しているのではないかと考えた。これは、今後の研究課題である。

質問7) 術前に生検標本を採取して、染色評価するといった臨床応用についてはどう考えるか？

回答 臨床応用については、検討中である。生検標本となる癌表層部と先進部との癌細胞の性格は異なるため、腫瘍内での heterogeneity の問題を解決しなければならぬ。生検標本と切除標本の対応した染色と評価については、今後の課題である。

質問8) 癌部の表層部と先進部との間での E-cadherin と Slug の染色性の違いはあったか？

回答 今回は検討していないが、先進部において E-cadherin が減弱し、Slug が陽性になっている印象であった。

質問9) リンパ管転移では、E-cadherin と Slug の発現はどうだったか？

回答 まだ検討していない、今後行なう予定である。

質問10) 食道癌において、ごく早期の癌と角化の強い進行癌との間で、E-cadherin と Slug の染色性の違いはみられたか？

回答 早期癌においては、E-cadherin が正常に発現し、Slug は陰性で、進行癌では E-cadherin は減弱し、Slug 陽性の傾向にあった。

質問11) Snail family を構成しているものには、どういったものがあるか？

回答 Snail、Slug、Smad などがある。

質問12) いずれも抑制する機能を持っているのか？

回答 いずれも上皮系に分化するのを抑制する働きがある。

質問13) 正常では、どこに、どのような場合に発現するのか？

回答 Snail、Slug では、胎生期の神経管形成時に発現する。文献上では、Snail、Slug の mutation が起こると、神経管形成がおこらないという報告がある。

質問14) 成人してからは、発現しないのか？

回答 今回の染色では、正常上皮には、発現していなかった。成人してから、どの部位に発現するかについては、不明である。

質問15) 腫瘍マーカーの SCC とは、具体的にどういったマーカーか？

回答 扁平上皮由来の癌で上昇してくる腫瘍マーカーである。

質問16) SCC の上昇してくる癌は、食道扁平上皮癌のほか、どういった癌があるか？

回答 肺癌の扁平上皮癌や皮膚の扁平上皮癌などがある。

質問17) その測定方法は ELISA で行なうのか？

回答 ELISA 法を用いた測定方法で行なっている。

質問18) Figure 4a に関して、E-box を介さずに Slug が直接 E-cadherin を抑制するという意味なのか？

回答 E-cadherin が発現しているにもかかわらず、Slug が転写を制御するのではなく、E-cadherin の機能を抑制するのではないかと意味である。

質問19) E-cadherin が染色されていて E-cadherin 自体は存在しているにもかかわらず、機能的に異常があるということか？

回答 基礎的実験を含め、今後の研究課題であると考えます。

質問20) Muc-1 が発現すると悪性度が高いというこれまでの報告であったが、Figure 4a では、Muc-1 が Slug によって抑制されるにもかかわらず、悪性度が高いということは、これまでの報告とは逆ではないかと考えるが、どうか？

回答 確かに Muc-1 だけでみれば、発現することが悪性度に関与するという報告があるが、Muc-1 だけではなく、そのほかの上皮系マーカーを含めた総合的抑制という意味で記載した。

質問21) Figure4 に関して、リンパ管侵襲と血管侵襲に関与すると記載しているが、これは、どういったメカニズムによるのか？

回答 データ上、リンパ管侵襲と血管侵襲と関連するということで記載した。メカニズムについては、今後の検討課題と考える。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。