

## 論 文 要 旨

**Expression of Receptor for Advanced Glycation  
End Products (RAGE) is Related to Prognosis  
in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma**

〔食道扁平上皮癌患者における RAGE 発現は予後と相関する〕

立 野 太 郎

## 【序論および目的】

Receptor for advanced glycation end products (以後 RAGE と記す) は High mobility group box-1 (以後 HMGB1 と記す) をはじめとするいくつかの侵襲関連因子をリガンドとするマルチリガンドレセプターとして知られており, p38 and p44/42 MAP kinase, NF- $\kappa$ B, cdc42/rac, reactive oxygen species などを活性化し, 腎臓病, 神経疾患, 眼疾患, リウマチ性疾患, 炎症性腸疾患, 敗血症の発症, 進展に関係することが示されてきた. さらに癌細胞においては, 亜急性炎症のメディエーターである HMGB1 と結合し, その浸潤能や転移能の増強に関与することが示されている. 現在, 胃癌, 大腸癌, 前立腺癌などで RAGE 発現と悪性度との関係についての研究が進められている. 以前, 我々の教室では肝組織の RAGE 発現が, 慢性肝炎から肝細胞癌への発癌プロセスに深く関与していることを報告した. 正常肝~慢性肝炎~肝硬変~早期高分化肝細胞癌に進展するに従って RAGE 発現は次第に上昇し, その後肝細胞癌が進展し, 中分化, 低分化となるに従って RAGE 発現は次第に低下した. 今回, 申請者らは食道扁平上皮癌の進展段階における RAGE の役割について研究するために, 同腫瘍切除標本における RAGE 発現と, その臨床病理学的意義について検討を行った.

## 【材料および方法】

1987 年から 1998 年までの 12 年間に, 原発性食道扁平上皮癌に対し根治切除が行われた 216 例について切除標本の免疫組織化学染色を行い, RAGE 発現と予後を含む臨床病理学的因子の検討を行った. 切除標本の使用に関しては本学のガイドラインに従い, インフォームド・コンセントを得た上で行った. 染色は ABC 法で行い, 細胞膜または細胞質の染色が浸潤先端部強拡大 10 視野で 10% 以上の腫瘍細胞に認められるものを RAGE 発現陽性と判定した. 群間比較は  $\chi^2$  検定及び  $t$  検定により行った. 生存分析は Kaplan-Meier 法を用い, 検定は log-rank 検定により行った. 予後因子の検討は, Cox proportional hazard regression model による単変量解析お

よび多変量解析により行った。いずれも、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 【結果】

- 1) RAGE 染色性は細胞膜および細胞質に認められ、核には認められなかった。RAGE 陽性率は 50.0%であった。同一腫瘍内でも食道内腔側では RAGE 発現が見られることが多いのに対して、浸潤先端部では RAGE 発現が低下する傾向がみられた。また、非腫瘍部食道粘膜の検討では、基底膜細胞に RAGE が強く発現していることが観察された。
- 2) RAGE 発現陰性群では腫瘍の壁深達度が有意に深く、静脈侵襲陽性の頻度が有意に増加した（それぞれ  $P=0.008$ ,  $P=0.031$ ）。一方、年齢、性、腫瘍占居部位、リンパ節転移、stage、リンパ管侵襲と RAGE 発現との間には相関が認められなかった。
- 3) 5 年生存率は RAGE 発現陽性群の 52.3%に比べて、RAGE 発現陰性群は 31.8%であり、RAGE 発現陽性群の方が有意に予後良好であった ( $P=0.0003$ )。同様に 3 年無再発生存率においても RAGE 発現陽性群(54.8%)は RAGE 発現陰性群(33.7%)より有意に良好であった。
- 4) 単多変量解析では組織型、深達度、リンパ節転移、stage、リンパ管侵襲、静脈侵襲、RAGE の発現が予後因子であった。多変量解析の結果、深達度、リンパ節転移の有無とともに RAGE 発現の有無は独立した予後因子であることが示された（ハザード比：1.624, 95%信頼区間：1.095-2.414）

#### 【結論及び考察】

今回の研究結果から、RAGE 発現の喪失は腫瘍の深達度、静脈侵襲と相関しており、食道扁平上皮癌の浸潤・増殖と関わっていることが示された。これは非小細胞肺癌や横紋筋肉腫、あるいは L6 筋原細胞における実験結果と一致するが、グリオーマ、胃癌、大腸癌、胆道癌、膵癌の報告とは異なっていた。RAGE はマルチリガンドレセプターであり、結合するリガンドによってシグナリングが異なることが報告されており、各臓器で相反する結果の原因となっている可能性が示唆された。

一方、RAGE が細胞分化に関与するという報告もある。以前、我々は肝細胞癌の細胞が低酸素耐性の形質獲得に RAGE が関わっている可能性を報告した。今回の検討でも、非腫瘍食道上皮では細胞分化が盛んに起こっている基底膜細胞に RAGE 発現が強い傾向が認められ、RAGE が細胞分化に関与している可能性が示唆された。RAGE の発現陰性群では深達度や静脈侵襲と関連がみられた。食道壁と静脈壁はいずれも平滑筋で構成されているため、RAGE の低下は食道癌の平滑筋浸潤を増強させることも示唆された。これらの結果より RAGE は浸潤・増殖に関連があるため、予後との相関も見られたと考えられた。

食道扁平上皮癌の浸潤・増殖に RAGE 発現の低下が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。したがって、RAGE 発現の評価は食道扁平上皮癌患者において予後を含め、腫瘍の悪性度を推測することに有用であり、RAGE は治療標的になる可能性が示唆された。

(Annals of Surgical Oncology 2009 ; 16 : 440-446 掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 69 号	学位申請者	立野 太郎
審査委員	主査	丸山 征郎	学位
	副査	有田 和徳	副査
	副査	橋口 照人	副査
			博士 (医学)
			岸田 昭世
			浅川 明弘

**Expression of Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) is Related to Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma**  
(食道扁平上皮癌患者における RAGE 発現は予後と相関する)

食道扁平上皮癌の多くは、異形成病変を経て発癌するという多段階発癌機序が示唆されている。飲酒と喫煙は食道粘膜における炎症を惹起し、集積したマクロファージや壊死した細胞から内因性の炎症促進物質 High mobility group box-1 (HMGB1) が分泌される。Receptor for advanced glycation end products (RAGE) は HMGB1 のレセプターであり、それと結合することにより Nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B), Mitogen-activated protein kinase (MAPK), Matrix metalloproteinase (MMP) などが活性化される。今回、申請者らは、食道扁平上皮癌 208 症例を対象に、腫瘍組織における RAGE 発現を免疫染色法により評価し、予後を含む臨床病理学的因子との関係について検討した結果、以下の知見を得た。

- 食道扁平上皮癌細胞における RAGE 染色性は細胞膜および細胞質に認められ、RAGE 陽性率は 50.0% であった。食道粘膜側では RAGE 発現陽性が多く、浸潤先端部では RAGE 発現が低下する傾向がみられた。また、非腫瘍部食道粘膜では、基底膜細胞に RAGE が強く発現していることが観察された。
- RAGE 発現陰性群では腫瘍の壁深達度が有意に深く ( $P=0.008$ )、静脈侵襲陽性の頻度が有意に増加した ( $P=0.031$ )。
- 5 年生存率は RAGE 発現陽性群の 52.3% に比べて、RAGE 発現陰性群は 31.8% であり、RAGE 発現陽性群の方が有意に予後良好であった ( $P=0.0003$ )。
- 多変量解析の結果、深達度、リンパ節転移の有無とともに RAGE 発現の有無は独立した予後因子であることが示された (ハザード比: 1.624, 95%信頼区間: 1.095-2.414)。

食道扁平上皮癌は異形成上皮を経て早期癌が発生し、次第に食道壁に深く浸潤する。RAGE 発現の減弱は腫瘍の深達度や静脈侵襲と相関しており、食道癌の浸潤・増殖と関わっていることが示された。これは胃癌、大腸癌の報告とは異なるが、RAGE はマルチリガンドレセプターであることが臓器による差異の原因となっている可能性が示唆された。申請者らは肝細胞癌において、発癌段階では RAGE 発現が増強し、癌の増殖・進展段階では RAGE 発現が減弱していくことを報告しており、食道癌の増殖・進展段階の RAGE 発現はこれに一致していた。

本研究は、RAGE が発癌時の腫瘍マーカーとして臨床応用できる可能性や、早期の食道癌の治療標的となる可能性など、診断や治療へ展開できる可能性を示した点で意義が大きい。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	総研第 69 号		学位申請者	立野 太郎
審査委員	主査	丸山 征郎	学位	博士 (医学)
	副査	有田 和徳	副査	岸田 昭世
	副査	橋口 照人	副査	浅川 明弘

主査および副査の5名は、平成21年6月1日、学位申請者 立野 太郎君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、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) 以前に同一研究グループから報告された肝細胞癌における研究では、腫瘍の組織学的分化度と RAGE 発現の間に相関が見られているが、本研究ではどうであったのか。

(回答) 本研究では腫瘍の病理学的・形態学的分化度と RAGE 発現の間に相関は認められなかったが、腫瘍の深達度や予後との間には相関が認められた。

質問 2) 腫瘍の増殖能・悪性度をみるための指標として MIB-1 index があるが、これは調べなかったか。

(回答) 今回は調べていないが、RAGE と MIB-1 も関連性があると推測され、今後の検討課題であると考えている。

質問 3) RAGE 発現が減弱するに従って浸潤能が高まるという結果だが、浸潤に直接関与する MMP 等の蛋白は調べていないか。また、それらの蛋白と RAGE 発現との関係における文献的報告はどうか。

(回答) 文献的には C6 glioma において、RAGE の活性化が MMP の活性化に関与している可能性が報告されている。

質問 4) RAGE 発現陽性の細胞はクラスターを形成し、RAGE 発現陰性の細胞はばらける傾向があるということだが、これはどう解釈しているか。

(回答) 本研究の対象症例 208 症例全てではないが、一部の症例において細胞接着因子の一つである E-cadherin の発現と RAGE 発現の関係を調べたところ、相関する傾向が認められた。この結果も踏まえ、RAGE 発現が何らかの細胞接着因子の発現に関与している可能性が示唆される。

質問 5) 癌の種類により、癌の悪性度と RAGE 発現との関係は様々ということの原因としてリガンドの違いにより、また臓器の違いにより RAGE のシグナリングが異なるという説明をしているが、RAGE の中に何らかのサブタイプは存在するのか。

(回答) 実験的に細胞レベルで RAGE の構造を改変したものはあるが、生体内でこのような現象があるかは不明である。しかし、サブタイプの存在が RAGE シグナルの多様性を説明する主要なファクターであるとは考えていない。

質問 6) 正常組織において RAGE は発現しているのか。食道の正常組織においてはどうか。

(回答) 多くの臓器において、正常組織にも弱いながら RAGE は発現している。特に肺においては強い RAGE 発現があると報告されている。正常食道組織においては、基底膜細胞に RAGE が比較的強く発現していることが観察され、炎症が起こるとこの発現が強くなる。

## 最終試験の結果の要旨

質問 7) 正常組織における RAGE の発現を upregulate する factor はあるのか。

(回答) 炎症が起こり、亜急性炎症のメディエーターである HMGB1 が RAGE を刺激すると RAGE の発現が upregulate されて、炎症を増幅すると考えられている。

質問 8) RAGE 発現が強いと予後が良いということだが、それは周りの炎症が強いから予後が良いということではないのか。

(回答) RAGE 発現が強いことが予後良好であることにどのようなメカニズムでつながるのかについては現段階ではわからない。炎症とリンパ球浸潤と予後との関連を今後解明していく必要があると思われる。

質問 9) RAGE 発現が発癌段階で上昇し、癌の進行段階で低下するという相反する結果だが、この癌に放射線治療や化学療法が行われた場合には RAGE 発現はどうかと考えているか。

(回答) 放射線治療を行うと炎症が惹起され、核の崩壊により HMGB1 が大量に放出されてくるという理由から RAGE 発現は強くなると推測している。おそらく化学療法を行った場合については転写などの抑制を介して RAGE 発現の減少が起こることが予想される。

質問 10) リンパ節転移と独立して RAGE 発現が予後因子となっているが、リンパ節転移の転移巣における RAGE 発現は調べていないか。

(回答) 今回は検討していないが、リンパ節転移巣の RAGE 発現をみることは、転移の機序の面から重要と考えられる。大腸癌などにおける肝転移巣の RAGE 発現をみることなど含めて、今後検討しなければならない課題と思われる。

質問 11) 血管内皮は RAGE を発現しているが、腫瘍内血管と正常組織内の血管とで RAGE 発現に違いがあるか。

(回答) 今回は血管に関しては検討していないが、RAGE の血管浸潤、臓器転移の観点から重要と思われる。

質問 12) 腫瘍の中には壊死している部分もあり、HMGB1 が放出されていると思われるが、そうした壊死巣の周囲で RAGE 発現が up regulate しているといった現象はあるか。

(回答) 壊死組織からは RAGE のリガンドである HMGB1 が放出されるので、この点に関して詳細に観察したが、壊死巣の周囲で RAGE 発現が増加している現象は認められなかった。

質問 13) RAGE に splicing variant があり、可溶性 RAGE が放出されることがあるという報告がなされているが、このような可溶性 RAGE をみている可能性は無いか。

(回答) 本研究の実験結果からはどちらとも言えない。ただ、胃癌や大腸癌と RAGE の関係について報告している研究グループと我々は同じ抗体を用いて実験を行っており、観察している RAGE に違いはないものと思われる。

質問 14) E-cadherin と RAGE 発現が相関する傾向が有るとのことだったが、E-cadherin の転写抑制因子である、Slug などとの関係は調べていないか。

(回答) Slug, Snail, Twist については RAGE とは別に、食道癌における発現と予後の関係について教室から報告している。RAGE との相関については E-cadherin が相関する傾向があるが、有意差は認められなかった。Slug, Snail, Twist と RAGE の相関に関しては今後解析したい。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。