

論文要旨

Expression of CXCL12 and its Receptor CXCR4 Correlates With Lymph Node Metastasis in Submucosal Esophageal Cancer

〔 CXCL12 とそのレセプターである CXCR4 の発現は
食道粘膜下層癌患者のリンパ節転移と相関する 〕

佐々木 健

【序論および目的】

ケモカインはケモタクティック・サイトカインを意味する 8~10kDa の塩基性蛋白であり、N 末端に保存されている 2 つのシステインの位置から CXC, CC, C, CX3C の 4 つのグループに分類されている。ケモカインレセプターは膜 7 回貫通 G 蛋白結合型受容体に属する。ケモカイン・ケモカインレセプターは感染、炎症、組織修復などのあらゆる免疫反応に関与し、また、免疫細胞の生体内移動や胚形成における様々な細胞の移動を調節している。近年、ケモカインである CXCL12 (SDF-1) およびその受容体である CXCR4 が悪性腫瘍の局所浸潤・転移および血管新生に重要な役割を果たすことが知られている。また、我々はこれまで食道扁平上皮癌におけるリンパ節微小転移 (LMM) と臨床病理学的因子との関係について報告してきた。今回、食道粘膜下層癌における CXCL12 と CXCR4 の蛋白発現を調べ、臨床病理学的因子、とくに LMM を含めたリンパ節転移との関連性を検討した。

【材料および方法】

対象；1985 年から 2002 年までの 17 年間に当科において根治切除が行われた原発性食道扁平上皮癌症例のうち、粘膜下層浸潤癌の 86 例 (男性 79 例、女性 7 例) を対象とした。年齢は 39 歳から 81 歳 (平均 65.8 歳) であった。術前放射線および化学療法が施行された症例は除外した。臨床病期分類は TNM 分類第 5 版により分類した。

免疫組織化学的染色；パラフィン固定標本を用い、抗 CXCL12 抗体および抗 CXCR4 抗体による免疫染色を ABC 法で行った。染色の評価は 200 倍の顕微鏡にて腫瘍浸潤先端部 10 視野、1000 個 (100 個/視野) の癌細胞の発現を観察して行った。CXCL12 の発現は癌細胞の 10%以上が染色されるものを陽性とし、それ未満のものを陰性とした。CXCR4 の発現は染色濃度により 4 段階に分類し、発現の無いものを陰性、軽度から強度発現したものを陽性とした。HE 染色でリンパ節転移陰性と診断された 46 症例のすべてのリンパ節において、LMM の検出目的で上皮特異的抗体である抗 AE1/AE3 抗体を用いて免疫染色を行った。

微小脈管密度 (MVD)；抗 CD34 抗体を用いて微小脈管の検索を行い、染色の評価は 200 倍の顕微鏡にて腫瘍浸潤先端部 6 視野の脈管数を計測しその平均値を MVD とした。MVD の cut off 値は

中央値の 35/mm²とした。

統計分析；群間比較は χ^2 検定及び Wilcoxon 検定により行った。いずれも、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

食道粘膜下層癌における CXCL12 と CXCR4 の発現と MVD : CXCL12 と CXCR4 の染色性はいずれも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。CXCL12 と CXCR4 の発現陽性率はそれぞれ 32.6%、87.2%であった。CD34 の発現は血管上皮とリンパ管上皮のいずれにも認められた。MVD の平均値は 39.1±22.7 であった。

CXCL12 と CXCR4 の発現と MVD を含めた臨床病理学的因子との関係 : CXCL12 発現陽性群では有意にリンパ節転移陽性例が多かった ($P=0.0212$)。一方、CXCR4 発現と臨床病理学的因子との間には相関が認められなかった。CXCL12、CXCR4 の発現と MVD との間に有意な相関は認められなかった。

LMM と CXCL12、CXCR4 の発現と MVD の関係 : HE 染色でリンパ節転移陰性と診断された 46 例のうち、サイトケラチンの免疫染色により 8 例 14 個のリンパ節において LMM が認められた。リンパ節転移陰性群に含まれていた LMM 陽性例をリンパ節転移陽性群とし、CXCL12 の発現との関連を解析すると、さらに強い相関が認められた ($P=0.0112$)。LMM を含むリンパ節転移陽性群では、MVD が有意に高かった ($P=0.0024$)。CXCL12 のレセプターである CXCR4 の発現の有無で、CXCL12 の発現と LMM を含むリンパ節転移との関係をみると、CXCL12 単独より、さらに強い相関が認められた ($P=0.0074$)。HE 染色でリンパ節転移陰性と診断された症例を LMM 陽性群と陰性群に分類した場合、LMM 陽性群で有意に CXCL12 発現陽性率が高く、また、MVD が有意に高かった。

【結論及び考察】

本研究では免疫組織学的染色により、食道粘膜下層癌におけるケモカイン CXCL12 とケモカインレセプター CXCR4 の蛋白発現を調べ、臨床病理学的因子、とくに LMM を含めたリンパ節転移との関連性を検討した。CXCL12 の発現、とくに、CXCR4 の存在下における CXCL12 の発現が、LMM を含めたリンパ節転移に強く関与していたことより、ケモカインとケモカインレセプター同時の発現が腫瘍の悪性度を決めるうえで重要である可能性が示唆された。CXCL12/CXCR4 経路と血管新生の関与についていくつかの報告が認められるが、今回の検討では CXCL12、CXCR4 の発現と MVD との間に相関は認められず、食道粘膜下層癌における CXCL12/CXCR4 経路と血管新生の関与については否定的であった。CXCL12/CXCR4 経路と血管新生の関与についてはさらなる検討が必要である。以上のような結果より、食道粘膜下層癌において CXCL12 と CXCR4 の発現は腫瘍細胞のリンパ節への進展・遊走に重要な関わりを持つことが示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 82 号	学位申請者	佐々木 健
審査委員	主査	中川 昌之	学位 博士 (医学)
	副査	谷本 昭英	副査 黒野 祐一
	副査	橋口 照人	副査 武田 泰生

Expression of CXCL12 and its Receptor CXCR4 Correlates With Lymph Node Metastasis in Submucosal Esophageal Cancer

〔 CXCL12 とそのレセプターである CXCR4 の発現は
食道粘膜下層癌のリンパ節転移と相関する 〕

近年、ケモカインである CXCL12 およびその受容体である CXCR4 が悪性腫瘍の局所浸潤・転移および血管新生に重要な役割を果たすことが報告されている。これまで申請者らは、食道扁平上皮癌切除症例 214 例を対象とした腫瘍組織の CXCL12, CXCR4 の発現の意義を検討して、CXCL12 の発現とリンパ節転移に有意な相関があることを報告した。また、食道扁平上皮癌のリンパ節微小転移 (LMM) と臨床病理学的因子との関係についても報告してきた。今回、申請者らは、リンパ節転移の初期段階のケモカインの関与について検討するために、食道粘膜下層癌 86 例を対象に腫瘍組織における CXCL12 と CXCR4 の蛋白発現を免疫染色により評価し、微小脈管密度 (MVD)、臨床病理学的因子、とくに LMM を含めたリンパ節転移との関連性を検討し、以下の知見を明らかにした。

- 1) 食道粘膜下層癌切除 86 例の CXCL12, CXCR4 の発現は各々 28 例 (32.6%), 75 例 (87.2%) に認められた。全例での MVD の平均値は $39.1 \pm 22.7/\text{mm}^2$ であった。
- 2) CXCL12 発現陽性群では有意にリンパ節転移陽性例が多かった ($P=0.0212$)。一方、CXCR4 の発現と臨床病理学的因子との間に相関は認められなかった。CXCL12, CXCR4 の発現と MVD との間に有意な相関はみられなかった。
- 3) HE 染色でリンパ節転移陰性と診断された 46 症例のうち、サイトケラチンの免疫染色により 8 例 14 個のリンパ節に LMM が認められた。リンパ節転移陰性群に含まれていた LMM 陽性例もリンパ節転移陽性群とし、CXCL12 の発現との関連を解析した結果、さらに強い相関が認められた ($P=0.0112$)。LMM を含むリンパ節転移陽性群では、MVD が有意に高かった ($P=0.0024$)。CXCR4 の発現の有無で、CXCL12 の発現と LMM を含むリンパ節転移との関係を検討すると、CXCL12 単独の発現に比べ、さらに強い相関が認められた ($P=0.0074$)。

以上の結果より、食道粘膜下層癌において CXCL12 と CXCR4 の発現は腫瘍細胞のリンパ節への進展・遊走に重要な役割を持つことが示唆された。

本研究は、食道粘膜下層癌における CXCL12 と CXCR4 の発現と臨床病理学的因子の関連を検討したものであり、その結果、CXCL12 と CXCR4 の発現は、LMM を含めたリンパ節転移に有意に相関すること、脈管新生には関与しないことを明らかにした。CXCL12 と CXCR4 蛋白が LMM を含めたリンパ節転移予測、さらには予後予測のマーカーとして使用できる可能性を示した点が非常に興味深い。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	総研第 82 号		学位申請者	佐々木 健
審査委員	主査	中川 昌之	学位	博士 (医学)
	副査	谷本 昭英	副査	黒野 祐一
	副査	橋口 照人	副査	武田 泰生

主査および副査の5名は、平成21年11月16日、学位申請者 佐々木 健 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) CXCL12の産生細胞は癌細胞か。他に、産生する細胞はあるのか。

(回答) 食道癌細胞のほか、様々な悪性腫瘍でCXCL12産生の報告がある。CXCL12は心臓、肝臓、腎臓、脳、骨格筋、リンパ組織に、血液中では白血球に発現している。血管内皮細胞、間質の線維芽細胞、骨芽細胞にも発現している。

質問2) 免疫染色でCXCL12陽性細胞はCXCL12を産生していると考えてよいのか。

(回答) 染色陽性細胞はCXCL12を産生していると考ええる。

質問3) CXCL12が食道癌細胞ではなく他部位で産生されCXCR4に結合している可能性はないのか。

(回答) 完全には否定できない。但し、染色陽性細胞では主に細胞質に染色性が認められるため、食道癌細胞そのものがCXCL12を産生していると考えた。CXCR4は膜貫通型レセプターであるため、もし、他部位で産生されたCXCL12がCXCR4に結合していると仮定した場合、主に細胞膜が染色されるのではないかと考える。

質問4) リンパ節転移巣でのCXCL12とCXCR4の発現はどうであったか。

(回答) 今回は検討していない。リンパ節でのCXCL12発現がCXCR4陽性癌細胞を原発巣からリンパ節へ遊走する可能性があるため、リンパ節転移巣でのCXCL12とCXCR4の発現の評価は重要であると考ええる。

質問5) CXCL12/CXCR4シグナル経路が癌細胞のリンパ節転移を引き起こす機序は何か。

(回答) 明らかにされていないが、主にERK/MAPK経路(細胞増殖シグナル)、PI3K/Akt経路(生存シグナル)、JAK/STAT経路などに関与することにより、腫瘍細胞の浸潤・増殖能亢進・生存期間延長をもたらすと考えられている。

質問6) CXCL12はマーカーとして有用であるか。

(回答) 原発巣でのCXCL12の発現はリンパ節転移予測のマーカーとして有用であると考ええる。しかし、CXCL12は多くの正常組織で発現するため、採血による測定値が早期発見のマーカーとして有用である可能性は少ないと考える。

質問7) CXCL12, CXCR4の発現は組織分化度と関係が認められるか。

(回答) レセプターであるCXCR4の発現群において、CXCL12発現の有無と組織型とに有意な相関関係が認められた。

質問8) CXCL12, CXCR4の染色強度により、悪性度に差異が認められるか。

(回答) 今回は検討していないが、染色強度の強いものほど臨床的悪性度の高い症例が多い印象であった。

質問9) CXCL12発現の評価を染色割合10%で分けているのはなぜか。

(回答) 様々な割合で検討してみた結果、最も判定がわかりやすく強い相関関係が認められたcut offが10%であった。

質問10) CXCL12, CXCR4の発現と予後との相関を検討しているが死因は何か。

(回答) リンパ節転移再発が予後を左右する最も重要な因子である。次に、血行性転移再発が重要である。

質問11) 免疫染色の方法が発表スライドではABC法、論文ではLSAB法となっているが、どちらが正しいのか。

(回答) 論文に記載したLinked Streptavidin-Biotin (LSAB)法が、実際に行った方法である。

質問12) CXCL12とCXCR4の正常食道上皮での発現はどうであったか。

(回答) CXCL12, CXCR4のいずれも食道基底細胞に発現が認められた。

最終試験の結果の要旨

質問 13) CXCL12 と CXCR4 の発現細胞は一致していたか、CXCL12 と CXCR4 の二重染色は行わなかったか。

(回答) CXCL12 と CXCR4 の発現細胞は必ずしも一致しなかった。CXCL12 と CXCR4 の二重染色は行っていない。

質問 14) パラフィン切片組織で CXCL12 の m-RNA の発現解析は行ったか。

(回答) 今回は検討していない。

質問 15) 食道粘膜下層癌の予後因子は何か。

(回答) 当教室における食道粘膜下層癌の予後因子の検討で、単変量解析では深達度の亜分類 (sm1, 2, 3), リンパ節転移の有無が予後因子であり、さらに多変量解析を行うと、リンパ節転移の有無のみが独立した予後因子となった。

質問 16) 食道癌細胞がリンパ管内皮に CXCR4 を発現させ、リンパ行性転移を促進するという機序が存在するか。

(回答) リンパ管や血管内皮に CXCR4 が発現しているのでリンパ行性転移を促進する機序がある可能性がある。しかし、食道癌細胞がリンパ管や血管内皮に CXCR4 を積極的に発現させているかどうかは不明である。

質問 17) 食道癌発生に関連する遺伝子多型の報告はあるか。

(回答) アルコール脱水素酵素 (ADH) のうち、ADH2 の遺伝子多型と食道癌との関連が報告されている。現在、他施設と共同研究中であり、食道癌患者 1500~2400 例を目標に食道癌発生に関連する遺伝子多型の解析を行っている。現段階 (約 800 例の解析) では、CXCL12/CXCR4 は食道癌発生に関連する遺伝子多型として同定されていない。

質問 18) CXCL12/CXCR4 と食道癌骨髄転移との関連は検討したか。

(回答) 今回は検討していない。食道癌組織における CXCR4 発現が骨髄微小転移に相関するという報告がある。

質問 19) CXCL12/CXCR4 と癌幹細胞との関係はどうか。

(回答) CXCL12/CXCR4 が癌幹細胞の誘導・増殖などに関与するとの報告がある。

質問 20) スライド発表の中で、102 例の食道癌患者において CXCR4 の発現と臨床病理学的因子・予後との相関なし (BMC Cancer 2006;6:290) という内容があったが、本学位論文の結果との乖離の原因は何か。

(回答) 本研究では CXCR4 の発現と臨床病理学的因子・予後に相関は認められなかった。リガンドである CXCL12 とレセプターである CXCR4 の両方の発現を評価することで有意な相関関係が認められた。

質問 21) CXCL12/CXCR4 が転移を誘導する詳細なメカニズムはわかっていないのか。

(回答) すべてが明らかな訳ではないが、VEGF や HIF-1 などの産生を促進させ転移を誘導することは知られている。

質問 22) CXCL12/CXCR4 が関与するシグナル伝達経路の中で最も重要と考えられる経路は何か。

(回答) ERK1/2, Akt/PKB 経路が重要であるという報告がある。抗 CXCR4 抗体の腫瘍抑制効果が腫瘍の種類によって異なるという報告があることから、CXCL12/CXCR4 は臓器・組織型の違いにより様々なシグナル経路に関与することで、腫瘍細胞の浸潤・増殖能亢進・生存期間延長をもたらすと考えられる。

質問 23) 分子標的治療薬としての応用は考えられるか。

(回答) 米国では、2008 年 12 月に抗 CXCR4 抗体 (一般名: Plerixafor) が承認されている。

質問 24) CXCL12 発現とリンパ節転移に相関があるのに、CXCR4 発現とは相関がないのはなぜか。

(回答) CXCL12 と CXCR4 の両方の発現が重要であるためと考える。CXCL12 発現陽性 28 例のうち CXCR4 発現陰性は 3 例のみであり、25 例は両方発現していたことになる。さらに、CXCR4 発現陽性例群で CXCL12 の発現の有無とリンパ節転移の相関が強くなるのは両方の存在が重要であることを示唆している。

質問 25) CXCL12/CXCR4 の発現様式が癌の悪性度とどのように関与しているか。

(回答) 検索した範囲内で CXCL12/CXCR4 の発現様式と悪性度との関係は明らかになっていない。

質問 26) リンパ管内皮と血管内皮にそれぞれ特異的な抗体にはどのようなものがあるか。

(回答) リンパ管内皮には抗 LYVE-1 抗体・抗 D2-40 抗体が、血管内皮には抗 CD31 抗体が特異的である。

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。