

論 文 要 旨

Expression of Osteopontin in Esophageal Squamous Cell

Carcinoma

〔 食道扁平上皮癌における Osteopontin 蛋白発現の意義 〕

喜多 芳昭

【序論および目的】

オステオポンチン(Osteopontin ; OPN)は、分子量約 34kDa の分泌型リン酸化糖蛋白であり、元来骨基質の主要な構成蛋白として同定され、骨芽細胞・血管内皮細胞・白血球・マクロファージ等で発現が確認されている。また、多彩な機能を有する細胞外マトリックス蛋白でもあり、癌細胞の浸潤・転移・遊走能に関係すると報告されており、乳癌、肺癌、前立腺、胃癌、大腸癌で発現が確認されている。

以前の教室の研究で、laser microdissecton を用いて腫瘍細胞のみの mRNA を抽出後、oligonucleotide microarray を施行した結果、OPN が食道扁平上皮癌で高発現している遺伝子の 1 つとして同定した。さらにその後の microarray を用いた研究で、転移リンパ節内の腫瘍細胞で原発巣の腫瘍細胞より高い OPN mRNA の発現を確認している。しかし食道扁平上皮癌における OPN 蛋白の発現の臨床的意義はいまだ未明である。本研究は、食道扁平上皮癌の OPN 蛋白の発現を調べ、臨床病理学的因子・予後との関連性を検討した。

【材料および方法】

インフォームド・コンセントの得られた 1987 年から 1998 年までに根治切除された食道扁平上皮癌症例 (術前放射線化学療法施行症例は除く) 175 例を対象とした。術後観察期間の中央値は 28 ヶ月(1~175 ヶ月)であった。

腫瘍部における OPN 蛋白の発現は、抗 OPN マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色により評価後、10%以上の癌細胞染色を陽性、10%未満の癌細胞染色を陰性と判断した。対象の 175 例を OPN 発現陽性群と陰性群の 2 群に分類し、TNM 分類の第 6 版に基づき、臨床病理学的因子との関係を検討した。統計学的評価は χ^2 検定で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

生命予後解析は Kaplan-Meier 法を用、生命予後曲線を作成し、統計学的評価は log-rank test で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。予後因子解析においては単変量、多変量解析ともに、Cox 比例ハザードモデルを用いた検定を行った。

【結果】

- 1) 食道扁平上皮癌切除症例 175 例中 84 例 (48%) で OPN 蛋白発現陽性であった。
- 2) OPN 蛋白発現と臨床病理学的因子との検討で、OPN 蛋白発現陰性群より OPN 蛋白発現陽性群において、リンパ節転移 ($p=0.0015$)、臨床病期 ($p=0.0333$)、リンパ管侵襲 ($p=0.0001$) の頻度が有意に高率であった。
- 3) OPN 蛋白発現陰性群と比較して OPN 蛋白発現陽性群は有意に予後不良であった ($p=0.0354$)。
- 4) 本研究の食道扁平上皮癌における独立予後因子は深達度、リンパ節転移、静脈侵襲で、OPN 蛋白の発現は独立予後因子とはならなかった。

【結論及び考察】

本研究では免疫組織学的染色により、食道扁平上皮癌における OPN 蛋白の発現と臨床病理学的因子や生命予後との関係を解析した。食道扁平上皮癌における OPN 蛋白の発現率は腫瘍細胞の 48% であり、他臓器腫瘍の OPN 蛋白発現率が 33.3-70.0% であることを考慮すると、多臓器腫瘍と発現率はほぼ同等と考えられた。本研究では食道扁平上皮癌の OPN 蛋白の発現はリンパ節転移やリンパ管侵襲と有意に相関していた。過去の報告によると、OPN 蛋白の発現は非小細胞肺癌で腫瘍径、リンパ節転移、臨床病期と有意に相関しており、低分化型胃癌ではリンパ行性転移と相関が認められている。また食道扁平上皮癌では血清中の OPN 蛋白がリンパ節転移と相関するという報告がある。これらの結果を考慮すると、各悪性腫瘍における OPN 蛋白の発現は、発癌より腫瘍の転移に深く関与すると推測された。

OPN 蛋白が腫瘍の転移に関与する分子メカニズムは完全には解明されていないが、いくつかの報告がある。OPN 蛋白は様々な細胞の接着を援助し、腫瘍細胞の遊走を促進する。OPN 蛋白はアミノ酸配列中に RGD (arginine-glycine-aspartic acid) 細胞接着ドメインを有しており、RGD 依存性インテグリンと結合することで接着や増殖などの機能を発現する。さらに OPN はいくつかの細胞受容体に結合し、腫瘍形成・細胞接着・細胞遊走・転移を促進する signaling pathway を刺激し、その下流において細胞周期やアポトーシスを妨げ、細胞生存を援助していると推測されている。

OPN 蛋白の発現は単変量解析においては予後因子であったが、多変量解析においては、腫瘍深達度、リンパ節転移、静脈侵襲と同等の独立予後因子にはならなかった。しかし、本研究の知見から、食道扁平上皮癌における OPN 蛋白の高発現はリンパ節転移を介した生命予後と関連し、リンパ管への腫瘍進展、遊走に重要な働きを持つと考えられた。

以上より、食道扁平上皮癌における OPN 蛋白の発現は、診断や予後予測のマーカーとしての可能性が示唆された。 (British Journal of Cancer, 95 (5):634-8, 2006 年掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 39 号	学位申請者	喜多 芳昭
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位 博士 (医学)
	副査	黒野 祐一	副査 小賤 健一郎
	副査	橋口 照人	副査 西山 賢龍

Expression of Osteopontin in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

〔 食道扁平上皮癌における Osteopontin 蛋白発現の意義 〕

オステオポンチン (Osteopontin; OPN) は、分子量約 34kDa の分泌型リン酸化糖蛋白で、骨基質の主要な構成蛋白として同定され、骨芽細胞、血管内皮細胞、白血球、マクロファージ等で発現している。また、多彩な機能を有する細胞外マトリックス蛋白でもあり、癌細胞の浸潤・転移・遊走能に関係するとされ、各種の癌での発現が確認されている。これまでに食道扁平上皮癌より Laser microdissection した腫瘍細胞から抽出した mRNA を用いた microarray により、腫瘍細胞で高発現する多数の遺伝子を同定している。これらの遺伝子のなかで、OPN 遺伝子 mRNA は食道扁平上皮癌で最も高発現しており、更に原発巣よりリンパ節転移腫瘍細胞でこの発現量が高いことが判明している。そこで申請者は、175 例の食道扁平上皮癌切除症例で OPN 蛋白の発現を免疫組織学的に調べ、OPN 蛋白の発現と臨床病理学的因子・予後との関連性を検討し、以下の知見を明らかにした。

- 1) 食道扁平上皮癌切除症例 175 例中 84 例 (48%) で OPN 蛋白の発現が陽性であった。
- 2) OPN 発現陽性群では、リンパ節転移 ($p=0.0015$)、臨床病期 ($p=0.0333$)、リンパ管侵襲 ($p=0.0375$) の頻度が有意に高率であった。
- 3) OPN 蛋白発現陽性群では、5 年生存率が有意に低く ($p=0.0354$)、予後不良であった。
- 4) 本研究における食道扁平上皮癌の独立予後因子は深達度とリンパ節転移であり、OPN 蛋白発現は独立予後因子とはならなかった。

以上の結果より、OPN 蛋白発現は腫瘍の転移に深く関与し、リンパ節転移を介した生命予後と関連すると結論している。

この論文は、食道扁平上皮癌で高発現する遺伝子群の中で最も発現程度の高い OPN 遺伝子蛋白の発現を検討し、OPN 蛋白発現は発癌ではなく、癌の転移に関連すること、また、OPN 蛋白発現陽性群では 5 年生存率が悪いことを明らかにし、OPN 蛋白を転移や予後診断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 39 号	学位申請者	喜多 芳昭
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位 博士 (医学)
	副査	黒野 祐一	副査 小賤 健一郎
	副査	橋口 照人	副査 西山 賢龍
<p>主査および副査の5名は、平成20年2月14日、学位申請者 喜多 芳昭 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。</p> <p>質問1) 免疫染色の Positive control は何を用いたか？ (回答) 市販の抗体を用いており、data sheet および文献に positive control として胆嚢を用いることが示されていたので胆嚢組織を使用した。</p> <p>質問2) 免疫染色の判定は難しいと考えるが、臨床病理学的因子の判定はブラインドで行ったか？ (回答) 判定はブラインドで行った。</p> <p>質問3) Osteopontin 発現について高発現と低発現、陽性と陰性という様々な表現をしているが、どのように使い分けしているのか？ (回答) 高発現と陽性、低発現と陰性は同義である。</p> <p>質問4) 染色の10%で陽性、陰性を分けて検討しているが、それ以外の分類でも検討を行ったか？ (回答) 0, 0%; 1+, 0-10%; 2+, 10-90%; 3+, 90-100%の4群で分けると5年生存率は、それぞれ55.4%, 59.2%, 36.2%, 46.2%, 0, 0-10%; 1+, 10-90%; 2+, 90-100%の3群に分けると5年生存率は、それぞれ56.0%, 37.5%, 46.2%, いずれも傾向はあったが統計学的有意差は認めなかった(p=0.1127, p=0.1008)。以上より最も判定がわかりやすく説得力のある結果が示された cut off が10%であった。</p> <p>質問5) Osteopontin を強く発現している症例に何か臨床的特徴はあったか？ (回答) 特に組織型や転移など特徴は認められなかった。</p> <p>質問6) 死亡の原因が遠隔転移によるものかリンパ節転移によるのかの検討を行っているか？ (回答) 食道癌の場合はほとんどの症例でリンパ節転移が起こり、その後に血行性再発やリンパ節再発が起こる。したがって、リンパ節転移は予後を判定する最も重要な因子と考えられる。</p> <p>質問7) 咽頭では部位別でリンパ節転移陽性率や転移様式が異なるが食道癌ではどうか？ (回答) 今回検討した胸部食道癌においては、上・中・下部食道癌で転移形式に差はあるが、リンパ節転移個数、予後等には差はなかった。</p> <p>質問8) Microarray で Osteopontin 以外のリンパ節転移関連遺伝子ではどのようなものがあったか？ ケモカインレセプター、TGF-β signaling に関連する遺伝子、Epithelial-mesenchymal transition に関係する遺伝子等が含まれていた。また全く機能が不明な遺伝子も8つ含まれていた。</p> <p>質問9) Osteopontin の転移に関するメカニズムはどのようなことが考えられるか？ インテグリンレセプターとCD44レセプターを介した signaling によるものが最も関連があると考えられている。</p> <p>質問10) Osteopontin は治療のターゲットとなりうるか？ (回答) Osteopontin 蛋白は悪性腫瘍で高発現が報告されているが、正常組織でも発現しており、副作用が問題となる。Osteopontin 発現細胞の標的治療よりリンパ節転移の予測や予後の推測に有用なマーカーになると考えられる。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 11) 動物実験レベルで治療ターゲットとしての報告はあるか？

(回答) ノックアウトマウスで腫瘍細胞の増殖がより遅くなり骨・肺転移が抑制されたという報告はあるが、実際に治療のターゲットとしたという報告は見当たらない。

質問 12) Laser microdissection と Microarray を行った症例で Osteopontin mRNA の発現確認を行ったのか？

(回答) RT-PCR を行い、m-RNA の発現は確認した。

質問 13) Osteopontin は様々な発現様式があるが、本研究では何を認識しているか？

(回答) 蛋白リン酸化の程度によって Osteopontin-1, 2a, 2b が存在する。Microarray では最もリン酸化が強い Osteopontin-1 を示しており、Osteopontin-1 を認識していると予想される。

質問 14) Osteopontin が高発現する上で増強刺激に関与しているものは何か？

(回答) Osteopontin プロモーター領域に結合する転写因子としては Myc, TGF- β / SMad-3, TGF- β / SMad-9, Runx2, TP53 などが様々な細胞株で関与していると報告されている。

質問 15) 腫瘍周囲の微小環境との関係はあったか？

(回答) 今回は腫瘍の発現のみに着眼したので、微小環境との関係は不明である。

質問 16) 腫瘍細胞が転移する際、細胞周期は止まった状態 (G0 期) であるのか？

(回答) 転移する癌細胞は G0 ではないと考えられる。最近、提唱されている癌幹細胞と転移の関係の解明が待たれるところである。

質問 17) Osteopontin は細胞外マトリックス蛋白であるが、分泌されたものは染色されていたのか？

(回答) 癌細胞質内の Osteopontin は染色されているが、細胞外に分泌されたと思われる Osteopontin の染色は認めなかった。癌細胞の周囲にも存在することは示唆されるが、今回の検討では確認できなかった。

質問 18) Osteopontin は NF- κ B, MMP2 と関連するという報告があるが、microarray の結果ではどうだったのか？

(回答) MMP は高発現遺伝子の一つであったが、NF- κ B に関連する遺伝子は多数存在するので不明である。

質問 19) 生検組織で Osteopontin の発現を確認してリンパ節郭清の指標となりえるのか？

(回答) 今後はリンパ節転移診断に関して、画像診断と生検を用いた分子生物診断を総合的に考えていく必要がある。

質問 20) リンパ節転移の個数での検討を行ったか？

(回答) 個数での検討は行っていない。N1 から N4 の分類では有意差は無かった。しかし統計学的検定を行う上で各グループの症例数が少なくなるのが問題と考えている。

質問 21) 今回は Osteopontin のみだが、高発現している遺伝子を合わせるとどうか？

(回答) 今回は一遺伝子だけの検討であるが、今後は Osteopontin や他の因子を含めて解析する必要がある。

質問 22) 術前放射線化学療法を施行した症例を除いているのは何故か？

(回答) 放射線や抗癌剤に癌細胞がさらされると本来の遺伝子の発現が大きく変化するので除外した。

質問 23) 同じ標本で違うブロックを使って比較したか？

(回答) 今回検討していないが、heterogeneity はあると考えている。

質問 24) リンパ節転移個数の多少で 5 年生存率に差があるが、Osteopontin 発現にも差があったのか？

(回答) 以前の microarray の検討で、転移個数 3 個以上の症例で Osteopontin が良く発現していた。

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。