

論 文 要 旨

Clinical implications of N-cadherin expression in gastric cancer

胃癌における N-cadherin 発現の臨床的意義

上木原 貴仁

【序論および目的】

上皮間葉移行 (Epithelial to Mesenchymal Transition 以下, EMT) は細胞変化の重要な過程で, 上皮細胞が制約された構造から脱出し, 間葉系形態への変化は細胞胚の発達と正常組織の構築維持に重要な過程としてよく知られている. E-cadherin が減退し, N-cadherin の発現が見られる cadherin スイッチは EMT の過程の一部である. N-cadherin は cadherin superfamily 属する古典的な cadherin のひとつである. 癌細胞における N-cadherin の新たな発現は, EMT を介して腫瘍の進展に重要な過程のひとつと考えられるが, 胃癌における N-cadherin の発現と臨床病理学的因子に関する詳細な報告はない. 今回申請者らは retrospective に, 胃癌切除症例における N-cadherin と E-cadherin の発現を免疫組織学的に評価し, N-cadherin 発現の臨床病理学的意義について検討した.

【材料および方法】

1990 年の 1 月から 1998 年の 12 月の間に鹿児島大学病院で根治的に胃切除術を行った 146 例の胃癌患者を対象とした. 男性 99 例, 女性 47 例で, 年齢の中央値は 63 歳であった. 臨床病理学的なデータは胃癌取扱い規約に基づいて評価した. 組織型の分類は, 高分化と中分化腺癌を '腸型', 低分化腺癌, 印環細胞癌, 粘液癌を 'びまん型' として検討した.

パラフィン固定標本を用い, 抗 N-cadherin および E-cadherin 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部 10 視野, 1000 個の癌細胞における E-cadherin および N-cadherin の発現を観察して行った. E-cadherin では腫瘍細胞の 50% 以上の陽性の場合を E-cadherin 保存, 50% 以下の場合を E-cadherin 減弱の 2 群に分類した. N-cadherin では, 癌細胞で 5% 以上の陽性細胞を認めるものを陽性, 5% 未満のものを陰性と定義した. N-cadherin および E-cadherin の発現と術後生存を含めた臨床病理学的因子との関連性, および両者の相関を分析した. N-cadherin と E-cadherin 発現の相関の統計分析はピアソン試験にて評価した. N-cadherin, E-cadherin 発現と臨床病理学的因子との相関は χ^2 テストにて評価した. cadherin 陽性または陰性群の生存曲線は Kaplan-Meier 法にて算出し, 統計学的有意差は log-rank 検定にて評価した. 生存のための独立した予後因子の多変量解析は一般化回帰モデルで行った.

【結 果】

1) 免疫組織学的に E-cadherin の発現は胃癌細胞膜に認められた. 近傍の胃粘膜上皮や間質の浸潤細胞にも観察された. N-cadherin の発現は腫瘍の細胞膜と細胞質で同定され, 近傍の神経組織で

認められた。

- 2) E-cadherin 保存は 62 例 (42.5%) , N-cadherin 陽性は 31 例 (21.2%) に同定された. E-cadherin 保存群は E-cadherin 減弱群よりリンパ管侵襲, 静脈侵襲が有意に少なかった ($P<0.05$) . 一方, N-cadherin 陽性群は N-cadherin 陰性群より血行性転移が有意に多くみられた ($P<0.01$) .
- 3) 腫瘍の E-cadherin と N-cadherin 発現の間に有意な相関は認められなかった.
- 4) E-cadherin 保存群と減弱群の 5 年生存率は各々 80% と 68% であり, E-cadherin 保存群が予後良好な傾向にあったが, 統計学的有意差は認められなかった. N-cadherin 陽性群と陰性群の 5 年生存率は各々 58% と 78% であり, N-cadherin 陽性群は陰性群より有意に不良であった ($P<0.05$) .
- 5) E-cadherin 保存群に限定して, N-cadherin 発現別生存率を解析すると, 生存率の有意差はさらに顕著となった ($P<0.01$) . 多変量解析の結果, 深達度とリンパ節転移が独立した予後因子であり, E-cadherin と N-cadherin 発現は独立予後因子とはならなかった.

【考察とまとめ】

本研究では免疫組織学的染色により胃癌における E-cadherin と N-cadherin の蛋白発現を調べ、臨床病理学的因子との関連性を検討した. 胃癌における N-cadherin 陽性発現は 21.2% であったが、その他の癌の報告 (乳癌の 45%, 大腸癌の 44%) と比べて低率であった. N-cadherin と組織学的分化度の相関が予測されたが、本研究では認められなかった. 胃癌では高分化型腺癌が間質に浸潤する際に EMT が関与されるという報告がある. また、胃癌は組織多様性を有することも E-cadherin と N-cadherin 発現の間に有意の関連性が見られないことの一因であると考えられた. N-cadherin 発現は血行性転移や脈管侵襲と有意の関連性を認められた. N-cadherin 発現は前立腺癌ではリンパ節転移、膀胱癌では神経浸潤との関連が報告され、臓器による特徴があると推測された. N-cadherin 陽性胃癌の術後生存率は有意に不良であり、これは E-cadherin 保存群に限定するとさらに有意となり、EMT を介した腫瘍の進展、分子生物学的悪性度の関連性を示唆する事象と異なっていた. 腫瘍表面上の E-cadherin は発現していても機能していないことが報告されており、単純に免疫組織学的な手法だけで説明できず、機能を検討する必要があると考えられた. 今回の検討から、N-cadherin 発現は胃癌の予後と関連があり、悪性度を類推する新しい予後マーカーとして有用であることが示唆された.

論文審査の要旨

報告番号	総研第209号	学位申請者	上木原 貴仁	
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学)
	副査	米澤 傑	副査	佐藤 雅美
	副査	有田 和徳	副査	橋口 照人

Clinical implications of N-cadherin expression in gastric cancer

胃癌における N-cadherin 発現の臨床的意義

上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition 以下 EMT) は、上皮細胞が制約された構造から脱出する細胞変化の重要な過程である。間葉系形態への変化は細胞胚の発達と正常組織の構築維持に重要であることがよく知られている。E-cadherin が減弱し、N-cadherin の発現がみられる cadherin switching は EMT の過程の一部である。N-cadherin は cadherin superfamily に属する classic cadherin の一つである。癌細胞の N-cadherin の新たな発現は、EMT を介した腫瘍進展に重要と考えられるが、胃癌における N-cadherin の発現と臨床病理学的因子に関する詳細な報告はない。今回、申請者らは胃癌切除 146 例で N-cadherin と E-cadherin の発現を免疫組織学的に評価し、N-cadherin 発現の臨床病理学的意義について検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかになった。

- 1) 免疫組織学的に、E-cadherin の発現は胃癌細胞膜に認められ、近傍の胃粘膜上皮や間質の浸潤細胞にも観察された。N-cadherin の発現は腫瘍の細胞膜と細胞質で同定され、近傍の神経組織にも認めた。
- 2) 146 例中 E-cadherin 保存は 62 例 (42.5%)、N-cadherin 陽性は 31 例 (21.2%) に同定された。E-cadherin 保存群は E-cadherin 減弱群よりリンパ管侵襲、静脈侵襲が有意に少なかった ($p < 0.05$)。一方、N-cadherin 陽性群は N-cadherin 陰性群に比べ、血行性転移が有意に多く認められた ($p < 0.01$)。
- 3) 腫瘍の E-cadherin と N-cadherin 発現の間に有意な相関は認められなかった。
- 4) E-cadherin 保存群と減弱群の 5 年生存率は各々 80% と 68% であり、E-cadherin 保存群が予後良好な傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった。N-cadherin 陽性群と陰性群の 5 年生存率は各々 58% と 78% であり、N-cadherin 陽性群は陰性群より有意に予後不良であった ($p < 0.05$)。
- 5) E-cadherin 保存群の症例に限定して、N-cadherin 発現別に生存率を解析すると、生存率の有意差はさらに顕著で、N-cadherin 陽性群は不良であった ($p < 0.01$)。

以上の結果より、胃癌における N-cadherin の発現は血行性転移と強い関連性を認め、胃癌の悪性度評価に関して有用性が示唆された。また、N-cadherin の発現を評価する際に、E-cadherin の発現を加味することで、より正確に予後を評価することができた。

本研究により新たな N-cadherin 発現は胃癌の予後を含めた悪性度を評価するマーカーとして有用であることが明らかにされた。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209号		学位申請者	上木原 貴仁
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学)
	副査	米澤 傑	副査	佐藤 雅美
	副査	有田 和徳	副査	橋口 照人
<p>主査および副査の5名は、平成24年8月29日、学位申請者 上木原 貴仁君に面接し、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) 胃癌における N-cadherin 陽性発現率が、乳癌や大腸癌における N-cadherin 陽性発現率より低い理由はどのように推察されるか。</p> <p>(回答) 正常組織でも N-cadherin 陽性発現率はさまざまであり、胃粘膜の N-cadherin の発現は乳腺組織と比較して低く、臓器による差がみられる。癌においても臓器間で差があると考えられ、発現率の差につながったと考えられる。また、胃癌は組織学的に多様性が高率に見られることも差が生じた一因と考えられる。</p> <p>質問2) MMP と N-cadherin 陽性発現、さらに遊走能や浸潤能との関連はどうか。</p> <p>(回答) matrix metalloprotease (MMP) の中でも細胞膜貫通型 MMP (MT-MMP)、特に MT1-MMP はゼラチナーゼ A の活性化により腫瘍の遊走能を獲得することが知られているが、N-cadherin 発現との関連性は不明である。一方で、腫瘍間質から産生される1型コラーゲンが N-cadherin の m-RNA 量を増加させ、遊走能を高めるとの報告があり、MMP も関係している可能性も考えられる。</p> <p>質問3) N-cadherin の過剰発現と MMP 発現の関係はどうか。</p> <p>(回答) N-cadherin が発現した癌組織から単離した癌細胞で、MMP-9 発現が上昇していたとの報告がある。</p> <p>質問4) E-cadherin と N-cadherin の発現に関連性が見られないのは胃癌に限った現象なのか。他癌でもそうか。</p> <p>(回答) E-cadherin と N-cadherin の発現を検討した文献は少なく、他癌での関連性は不明である。</p> <p>質問5) E-cadherin と N-cadherin の細胞内局在の差と機能はどうか。</p> <p>(回答) 今回の検討で膜と細胞質に分けて cadherin 発現を検討していないので不明であるが、cadherin は膜貫通型レセプターであり、おそらく細胞膜に発現している cadherin が本来の働きを示していると考えられる。</p> <p>質問6) N-cadherin 陽性群で5年生存率が有意に不良であるが、E-cadherin 保存群に限定すると更に不良となるのは何故か。</p> <p>(回答) E-cadherin 減弱群はそれだけで悪性度が高いと言われており、N-cadherin の発現による予後の差異を認めなかったのではないかと考える。一方、E-cadherin 保存群においては、N-cadherin の発現が直接、浸潤転移能の高い細胞群の評価につながり、生存率での差を認めたと考えられる。</p> <p>質問7) N-cadherin のみでなく、更に E-cadherin を設定し、2群に分ける意義は何か。</p> <p>(回答) E-cadherin を発現していても機能していない場合もある。したがって、E-cadherin を保存群と減弱群の2群に分類して、N-cadherin の発現状態を評価することでより詳細に臨床病理学的意義を明らかにできると考えた。</p> <p>質問8) 全て5年以上経過した症例か。</p> <p>(回答) 全て5年以上経過し、転帰について追跡評価できている症例である。</p> <p>質問9) 免疫組織染色の際、常温で30分間とあるが、その日の実験条件によって差はなかったのか、4°Covernight などとしなかったのはなぜか。</p> <p>(回答) 参考文献に従って反応条件を常温で30分間とした。Positive control の染色性もいずれの実験において差を認めず、均一に評価できていると思われる。</p> <p>質問10) Cadherin switching は E-cadherin と N-cadherin 以外は考えなくてよいのか。</p> <p>(回答) 肝細胞癌で E-cadherin から T-cadherin、膵癌や胃癌で E-cadherin から P-cadherin、前立腺癌や乳癌で E-cadherin から cadherin11 といった報告がある。</p> <p>質問11) N-cadherin のメチル化についてはどうか。</p> <p>(回答) 今回の研究だけではメチル化の評価はできないが、N-cadherin は E-cadherin と同様、classic cadherin であり、発現調節プロモーター領域のメチル化は存在し、不活化が起こっている可能性がある。</p> <p>質問12) N-cadherin の陽性、陰性を5%で分けた根拠は何か。</p> <p>(回答) 臨床的な差異が最も顕著な値を cut off とした。</p>				

質問 13) EMT がごく一部で起こっていても、意義があるのか。全体にないと意義がないのか。

(回答) EMT はごく一部で起こっていても、これら陽性細胞群が転移や浸潤にかかわると考えられる。したがって、一部の陽性細胞を評価することは意義があると思われる。

質問 14) N-cadherin 陽性細胞の割合はどうか。陽性、陰性を 50%で設定した場合、どの位で陽性となるか。

(回答) N-cadherin 陽性率は 21.2%であり、cut off を 50%で設定すると、N-cadherin 陽性となるのは 5%以下と偏りを生じた。

質問 15) Twist の胃癌細胞での局在はどうか。

(回答) 細胞質内に局在を認めた。

質問 16) 免疫組織染色以外では検討していないのか。

(回答) Western blot 法で胃癌凍結標本の N-cadherin 発現を観察したが、今回は良い結果が得られなかった。

質問 17) 同じ症例でパラフィン切片と凍結標本で N-cadherin の発現は一致しなかったか。

(回答) 凍結標本について N-cadherin の発現の検討は行っていない。

質問 18) Twist、E-cadherin、N-cadherin の局在は一致したか。

(回答) 全例で局在を詳細に検討していないが、おおむね Twist と N-cadherin が類似した局在を示した。

質問 19) E-cadherin 保存群では細胞膜はきれいに染まったか。また、細胞質は染まらなかったか。

(回答) ほとんどの症例で細胞膜が染色されたが、細胞質の一部が染色される症例もあった。

質問 20) E-cadherin 保存群で、N-cadherin 発現の有無で予後の差が生じるのは何故か。

(回答) N-cadherin の発現は EMT を起こしていると考えられ、癌細胞の浸潤性が高まり、悪性度が増している可能性がある。

質問 21) non functional な E-cadherin とは具体的にどの様な分子か。

(回答) β カテニン結合部分を欠いた E-cadherin の欠失変異体は、カテニン分子群と複合体を形成できず、接着活性を示さないことから、この変異体を機能不全型 E-cadherin (nonfunctional E-cadherin) と呼んでいる。

質問 22) Fig. 5 で E-cadherin の発現の有無で予後に差がなかったが、Table 1 では E-cadherin の有無でリンパ管侵襲、静脈侵襲に有意差を認めていることをどのように説明するのか。

(回答) EMT を起こした細胞がより高率に脈管内へ浸潤したことが考えられるが、臨床的な意義が生存率の差異につながるほど大きくないと推察される。

質問 23) EMT の現象は HE 染色では分からないのか。

(回答) EMT の現象を HE 染色で示した論文を見つけることは出来なかった。

質問 24) Vimentin は検討しなかったのか。

(回答) 間葉系マーカーである Vimentin については、今回は検討しなかった。

質問 25) RESULTS の最初のパラグラフにおいて、「Positive E-cadherin expression was observed at the cellular membrane in not only gastric cancer cells, but also in normal gastric mucosa and infiltrating tumor cells (Fig. 1)」と記載されているが、Figure 1 の legend には「Expression of N-cadherin in gastric cancer.」と記載されている。どちらが正しいのか。

(回答) 「Expression of N-cadherin in gastric cancer.」が正しい。

質問 26) 「N-cadherin expression was identified in the cellular membrane and cytoplasm of gastric cancer cells (Fig. 2)」と記載されているが、Figure 2 の legend には「E-cadherin positivity in adjacent tissues of primary tumor.」と記載されている。どちらが正しいのか。

(回答) 「E-cadherin positivity in adjacent tissues of primary tumor.」が正しい。

質問 27) Table 1 の N-cadherin の Hematogenous recurrence の P-value の項目に「N.S.」と「 $P < 0.01$ 」の双方が書かれているが、「 $P < 0.01$ 」の方が正しいということが良いか。

(回答) 「 $P < 0.01$ 」の方が正しい。

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。