

論文要旨

Expression of BMP-7 in human gastric cancer and its clinical significance

〔 胃癌における BMP-7 の発現とその臨床病理学的重要性の検討 〕

青木 雅也

【序論および目的】

骨形成性蛋白：Bone morphogenetic proteins (BMPs) は TGF-beta superfamily に属し、骨組織だけでなく細胞の恒常性や胎生期の発育にかかわりを持つシグナル伝達分子である。BMPs の一つである BMP-7 は腎臓に強く発現しており、腎臓や眼球の発育・骨格形成に関与していると考えられている。また、最近の研究で BMP-7 は様々な癌で発現し、細胞の分化・増殖・浸潤やアポトーシスとの関連性の報告がある。しかしながら、胃癌での BMP-7 の発現と臨床病理学的因子との関連性を報告した論文はない。今回、我々は胃癌における BMP-7 の発現を観察し、その臨床的意義について検討した。

【材料および方法】

はじめに胃癌細胞株 における BMP-7 mRNA の発現を RT-PCR にて観察した。次いで臨床検体における BMP-7 の発現を免疫組織学的に検討した。

使用した胃癌細胞株は KATO III, NUGC-4, MKN45, MKN74, MKN7 の 5 種類であった。臨床検体は 1995 年から 2004 年までの 10 年間に当科においてリンパ節郭清を伴う根治切除が行われた胃癌症例のうち、粘膜下層以深の浸潤癌 233 例 (男性 161 例、女性 72 例) を対象とした。年齢は 31 歳から 85 歳 (平均 66 歳) であった。臨床病期分類は胃癌取扱い規約により分類した。組織型に関しては高分化型胃癌 (papillary, well- differentiated, moderately differentiated tubular adenocarcinoma) 118 例と低分化型胃癌 (poorly differentiated adenocarcinoma, mucinous adenocarcinoma, signet-ring cell carcinoma) 115 例の 2 群に分類し、検討した。

免疫組織学的染色；パラフィン固定標本を用い、抗 BMP-7 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 (100 個/視野) の癌細胞の細胞質における BMP-7 の発現を観察して行った。癌細胞の 10%以上が染色されるものを BMP-7 陽性群、10%未満のものを BMP-7 陰性群とした。

統計分析；群間比較は χ^2 検定により行った。生存分析には Kaplan-Meier 法を用い、多変量解析には Cox の比例ハザードモデルを用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

胃癌細胞株における BMP-7 mRNA の発現は、肝転移巣由来の細胞株である MKN45 と MKN74 に強い発現がみられた。

免疫組織学的検討では、癌細胞の細胞膜および細胞質に BMP-7 の発現が認められた。BMP-7 陽性群、陰性群は各々 129 例 (55%) と 104 例 (45%) であった。BMP-7 陽性群は陰性群に比べ、大きい腫瘍径、リンパ節転移、リンパ管侵襲や静脈侵襲が陽性に多く (それぞれ $p=0.01$, <0.01 , <0.01 , <0.01)、組織型では高分化型腺癌で有意に高率であった ($p<0.05$)。また、BMP-7 陽性群は陰性群に比べ予後不良であり ($p<0.01$)、多変量解析にて BMP-7 の発現は術後生存に対する独立した予後因子として選択された ($p<0.01$)。さらに、組織型別に予後を解析した結果、高分化型胃癌症例 (118 例) では BMP-7 の発現で予後に有意差を認めなかったが ($p=0.11$)、低分化型胃癌症例 (115 例) では BMP-7 陽性群が陰性群に比べ有意に予後不良であった ($p=0.01$)。

【結論及び考察】

本研究では免疫組織学的染色により胃癌における BMP-7 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。BMP-7 は胃癌の進展に伴って高発現しており、特にリンパ節転移や脈管侵襲は BMP-7 陽性群に多く認められた。このことより、BMP-7 はリンパ節転移の予測因子となり、早期胃癌におけるリンパ節郭清の有無などの術式を決定する際に有用な因子となる可能性が示唆された。

また、これまでの報告にある大腸癌や悪性黒色腫、乳癌などと同様に、胃癌においても BMP-7 陽性群は予後不良因子であった。さらに今回の多変量解析では、BMP-7 の発現は胃癌の独立した予後因子として選択された。したがって BMP-7 の発現は胃癌においてすぐれた予後予測因子であると考えられた。

組織型では BMP-7 は高分化型胃癌により多く発現を認めた。BMP-7 により多能性胎児性癌細胞株の分化が促進されたという報告や、BMPs の一つである BMP-4 が大腸癌幹細胞の分化を誘導したという報告もある。BMPs はその signaling pathway の活性化により細胞の分化を促進していると考えられるが、その signaling pathway は細胞内外の様々な因子により制御されており、さらに TGF-beta signaling pathway などの他の pathway とも関連している。今回の研究で低分化型胃癌において BMP-7 を高発現しているものは予後不良であった。この群は BMP-7 を高発現しているにもかかわらず分化が抑制されている群であり、BMP-7 signaling pathway を抑制する因子が関与していることも考えられた。

今回の研究により胃癌細胞における BMP-7 の自己分泌・傍分泌のループによってその進展が制御されていると考えられた。BMP-7 はリンパ節転移や予後の予測因子として使用することができる可能性がある。BMP-7 の signaling pathway の活性化は細胞内外より制御されており、胃癌におけるその制御のメカニズムをさらに研究する必要がある。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 136 号	学位申請者	青木 雅也	
審査委員	主査	佐藤 雅美	学位	博士 (医学)
	副査	小賤 健一郎	副査	中川 昌之
	副査	武田 泰生	副査	東 美智代

Expression of BMP-7 in human gastric cancer and its clinical significance 胃癌における BMP-7 の発現とその臨床病理学的重要性の検討

Bone morphogenetic proteins -7 (BMP-7) は TGF-beta superfamily に属するシグナル伝達分子である。正常臓器では腎臓に強く発現しており、腎臓や眼球の発育・骨格形成に関与していると考えられている。最近、様々な癌で BMP-7 の発現が報告されており、予後因子として有用との報告もある。しかしながら、胃癌での BMP-7 の発現と臨床病理学的因子との関連性を検討した報告はない。今回、申請者等は胃癌細胞株における *BMP-7*mRNA の発現を観察し、さらに免疫組織学的に胃癌の臨床検体における BMP-7 の発現と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とされた。

- 1) 5つの胃癌細胞株のなかで、MKN45 と MKN74 という肝転移巣由来の細胞株において *BMP-7*mRNA の強発現を確認した。
- 2) 胃癌の臨床検体において BMP-7 が 10%以上の癌細胞に発現しているものを BMP-7 陽性群とし、129例 (55%) に認められた。
- 3) BMP-7 の発現は腫瘍径・リンパ節転移・リンパ管侵襲・脈管侵襲と関連性を認め、胃癌の進展に伴って高発現していた。
- 4) BMP-7 の発現は組織型と関連性を認め、高分化型胃癌により高発現していた。
- 5) BMP-7 の発現は胃癌の予後と関連性を認め、BMP-7 陽性群で予後不良であった。特に低分化型の胃癌でより強い予後因子であった。

以上の結果より、BMP-7 の発現は胃癌の進展に深く関与していると同時に胃癌細胞の分化の促進にも大きな役割を担っていると考えられた。

BMP-7 と関連性のあった臨床病理学的因子より BMP-7 は BMP signaling pathway に関与するその他の signaling pathway を介して血管・リンパ管新生と強く関連していることが示唆された。BMP-7 陽性の低分化型胃癌はこの影響を強く受けているものと推測される。

本研究において BMP-7 はリンパ節転移と関連性を認め、早期胃癌におけるリンパ節郭清や内視鏡手術を含めた術式の決定の際の判断材料となることが期待でき、さらに予後の予測因子であること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136号	学位申請者	青木 雅也
審査委員	主査	佐藤 雅美	学位
	副査	小賤 健一郎	副査
	副査	武田 泰生	副査
博士 (医学)			
中川 昌之			
東 美智代			

主査および副査の5名は、平成23年8月23日、学位申請者 青木 雅也君に面接し、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) BMP-7の発現様式はどのようになっているか。

(回答) BMP-7の発現様式は自己分泌 autocrine と傍分泌 paracrine である。

質問2) 低分化型の胃癌で BMP-7 高発現が予後不良という結果はどのように考えるか。

(回答) 仮説として低分化型かつ BMP-7 陽性群は BMP signaling pathway に関連する因子やその他の pathway に強く影響されているのではないかと考えている。今後は血管・リンパ管新生との関連に着目して実験を進めたい。

質問3) BMP signaling pathway のレセプター等の下流の分子については検討を行ったか。

(回答) 臨床検体における BMP のレセプター発現についての検討は行っていないが BMP-7 に親和性の高い Act-1A (Alk2) というレセプターの mRNA は5つの胃癌細胞株全てで発現を確認することができた。

質問4) メカニズムに関して分化に関する BMP-4 の過去の報告を用いて推察しているが、BMP-4 と BMP-7 とのホモロジーはそこまで高くないようでもあり、特に分化実験では一般に他のファミリー分子の結果を外挿することは不可能であるがその点はどうか。

(回答) BMP-4 は受容体も異なり、結果をそのまま BMP-7 にあてはめることはできない。現段階では一つのメカニズムの候補としての推察であり、今後具体的に BMP-7 で検討していきたい。

質問5) BMP-7 の癌細胞内における局在はどのようになっているか。

(回答) 今回の免疫染色で BMP-7 は胃癌細胞の細胞膜と細胞質に発現を認めた。細胞膜にあるものはレセプターと結合した状態である。また、BMP は分泌蛋白なので、細胞質内の染色性は BMP-7 の産生・分泌過程の蛋白を検出していると考えられるが、受容体を介して取り込まれた BMP-7 蛋白も検出している可能性も考えられる。

質問6) これまでの細胞実験で BMP-7 によって癌細胞が悪性転化したという報告はあるか。胃癌に関してはどうか。

(回答) 乳癌・前立腺癌などの細胞株で BMP-7 により悪性度が増したという報告がある。胃癌に関しては BMP-7 siRNA を用いた胃癌細胞株の proliferation 実験を行ったが有用な結果が得られなかった。浸潤や血管新生などの実験と合わせて、今後の研究課題としたい。

質問7) 臨床検体での BMP-7 mRNA の発現や細胞株での BMP-7 蛋白の発現の検討は行っていないか。

(回答) Western blot 法で胃癌細胞株の BMP-7 蛋白発現を観察したがうまく結果が出せなかった。今後の課題としたい。

質問8) BMP-7 の発現は深達度と関連していなかったが、BMP-7 は腫瘍の浸潤と関係ないと考えて良いか。

(回答) 今回の研究結果より、BMP-7 は胃癌においては浸潤と関係はないものと考えられる。

質問9) 免疫染色で今回は癌細胞数で評価しているが染色濃度で評価するとどうか。

(回答) 胃癌の標本では陽性細胞数が多いほど染色濃度も高く、同じような結果が出たのではないかと考える。

質問10) BMP-7 は腫瘍マーカーとして使用できるか。

(回答) BMP の発現様式は自己分泌と傍分泌であるため、BMP-7 の血清値をマーカーとして使うのは適当ではないと思われる。

質問11) 今回の研究で BMP-7 の陽性群と陰性群は 10% を cut off 値とした理由は何か。

最終試験の結果の要旨

(回答) BMP-7 の免疫染色における評価法は一定しておらず、腫瘍細胞の比率・染色濃度・その二つを合わせたものなど様々である。今回の研究において BMP-7 陽性細胞の平均値は 14%であり、陽性群と陰性群の数を勘案して、10%を cut off 値として検討した。

質問 1 2) BMP-7 陽性の癌細胞は胃癌サンプルのどのような位置に多く見られたか。

(回答) BMP-7 陽性癌細胞の詳しい局在に関する解析は行っていないが、印象としては腫瘍の *invasive front* に多く陽性細胞を認めた。

質問 1 3) BMP-7 の悪性度の高さは様々な臨床病理学的因子との関連性と連動していると考えて良いか。

(回答) BMP-7 は独立した予後因子であった。しかし、腫瘍径やリンパ管・脈管侵襲などと関連性を認めており、癌が細胞増殖や血管新生などにより進展していくことを考えると連動性はあると考えられる。

質問 1 4) BMP-7 の転移巣における発現はどうか。

(回答) 大腸癌では肝転移巣において BMP-7 が高発現していたことを免疫染色で示した報告がある。

質問 1 5) 腎臓における BMP-7 の発現で遠位尿細管の染色性はどうか。

(回答) (正常成人)腎臓においては糸球体以外の近位及び遠位尿細管で BMP-7 は細胞全体に強く染まっていた。

質問 1 6) BMP-7 と stage との関連性はどうか。

(回答) Stage I + II と III + IV との BMP-7 の発現を比較したところ $p=0.086$ と有意差までは認めなかったが、stage が高い方が BMP-7 を高発現している傾向は認められた。

質問 1 7) Mucinous adenocarcinoma における BMP-7 の染色性はどうか。

(回答) 印環細胞癌主体の mucinous adenocarcinoma より管状腺癌主体のものの方が染色性は良かったという印象ではあるが mucinous adenocarcinoma 自体の症例数が 7 例と少数であるということもあり、統計的な検討はできていない。

質問 1 8) 高分化型胃癌では予後に有意な差はないが症例数が増えれば有意差が出て、BMP-7 は組織型を超えた予後因子といえるのではないか。

(回答) 胃癌全体での予後・低分化型胃癌での予後と同様に高分化型の予後曲線も BMP-7 陽性群が悪く、この傾向をみると症例数を増やすことで有意差が出る可能性はある。

質問 1 9) 今回の免疫染色の結果と術後の再発とは関連性があったか。

(回答) 術後の再発・転移は確認できただけで 233 例中 77 例であった。77 例中 53 例(68%)が BMP-7 陽性症例であった。再発・転移臓器のなかで肝転移は 19 例中 17 例(89%)が BMP-7 陽性症例であった。また、リンパ節転移は 26 例中 21 例(81%)が BMP-7 陽性症例であった。そのほかの再発・転移臓器には BMP-7 の発現で大きな差は認めなかった。なお、再発・転移症例の病理組織検体は得られていないものが多かった。

質問 2 0) 再発した症例で再発前が BMP-7 陰性で、再発後に BMP-7 陽性となった症例はあったか。

(回答) 今回の研究では再発症例は対象外であり検討していないが、興味深いテーマであり今後の課題としたい。

質問 2 1) 正常な胃における BMP-7 の発現細胞とその役割は何か。

(回答) 正常な胃における BMP-7 の役割等は現在明らかとなっていない。今後、BMP-7 knockout mouse における胃の phenotype の観察等の実験で検討したい。

質問 2 2) BMP signaling pathway の下流の分子である Smad4 や p-Smad1/5/8 の発現についてはどうか。

(回答) p-Smad1/5/8 に関しては胃癌核内での発現を検討したが臨床病理学的因子で関連性を認めたのは分化型のみであり、BMP-7 と同様に高分化のもので高発現していた。すなわち BMP signaling pathway の活性化は胃癌の分化促進のみに関連していると考えられた。臨床検体における Smad4 の発現は検討していないが、胃癌細胞株においては BMP-7 mRNA を高発現している MKN45 では Smad4 mRNA の発現は認められなかった。MKN45 は低分化腺癌であり BMP-7 を高発現しているが Smad4 の欠如のため分化が抑制されているのではないかと考えられた。

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。