

## 論 文 要 旨

### Clinicopathological significance of BMP7 expression in esophageal squamous cell carcinoma

〔 食道扁平上皮癌における BMP7 発現の臨床病理学的意義 〕

惠 浩一

#### 【序論および目的】

骨形成性蛋白である Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7)は TGF- $\beta$  superfamily に属するシグナル伝達分子の1つである。分子量約 35kDa の蛋白質で、30 種類以上の BMP family が同定されている。

人では骨、軟骨形成、胎児期の発達に関与し、特に BMP family の一つである BMP7 は、成人で腎臓の円柱上皮や網膜の細胞に発現がみられる。また BMP7 の発現亢進は様々な悪性腫瘍で報告がみられ、腫瘍細胞の分化、増殖、浸潤、アポトーシスと関連が見られ、大腸癌、胃癌における予後因子としての有用性が報告されている。しかしながら、食道癌での 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、我々は食道癌における BMP-7 の発現を評価し、その臨床的意義について検討した。

#### 【材料および方法】

1991 年から 2004 年に当科で治癒切除が行われた食道癌症例 180 例(男性 ; 163 名、女性 ; 17 名、患者の平均年齢は 65.2 歳)を使用し、食道癌における BMP7 の発現を免疫組織学的に検討した。TMN 分類は国際食道癌取扱い規約により分類した。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) の腫瘍細胞の細胞質における BMP-7 の発現を観察して行った。発現の評価は腫瘍細胞の染色性(強度)と面積で行った。強度を weak, moderate, strong に分類、面積を 0-29%,30-59%,60%以上に分類し、moderate かつ 60%以上と、strong かつ 30%以上を BMP-7 陽性群、その他を BMP-7 陰性群とした。

統計分析は群間比較は  $\chi^2$  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】

- 1) 免疫組織学的検討では、腫瘍細胞の細胞膜および細胞質に BMP-7 の発現が認められた。
- 2) BMP-7 陽性群および陰性群は各々111例 (61.7%)と69例(38.3%)であった。
- 3) BMP-7 陽性群と陰性群の間には、腫瘍の深達度( $p<0.0001$ )、組織学的進行度( $<0.005$ )、静脈侵襲( $<0.001$ )と有意差が認められた。しかし、年齢、性差、組織型、リンパ節転移、遠隔転移とは有意差は認められなかった。
- 4) 多変量解析では、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 ( $p<0.05$ )。
- 5) リンパ節転移陰性症例 (77例) における BMP7 発現と予後との検討においても、BMP7 発現亢進群において予後が有意に不良であった( $p<0.01$ )。

## 【結論及び考察】

本研究では免疫組織学的染色により食道癌における 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 発現は食道癌の深達度、脈管侵襲、局所再発との関連を認めた。これまでの報告では、胃癌や大腸癌の BMP7 発現は腫瘍のリンパ節転移、脈管侵襲、深達度、肝転移などと関連を認められている。本研究においても腫瘍の悪性度と関連がみられ、消化器癌における BMP7 発現と悪性度の関連が強く示唆された。胃癌では BMP7 の発現亢進は分化度と関連するという報告があるが、今回の食道癌では分化度との関連は認められなかった。腺癌と扁平上皮癌の組織的差異が理由として考えられた。また、これまでの報告にみられる胃癌、大腸癌、悪性黒色腫、乳癌などと同様に、食道癌においても BMP-7 の発現陽性群は予後不良因子であった。さらに多変量解析では、BMP-7 の発現亢進は食道癌の独立した予後因子であった。

今回の研究で、リンパ節転移陰性例における BMP7 発現亢進群で5年生存率が陰性群より有意に不良であることが明らかになった。リンパ節転移陰性例においても BMP7 陽性であれば、悪性度が高いことを考慮した術後の補助療法の必要性が示唆された。

今後、更に BMP family の antagonist である、Sclerostin, Noggin, Follistatinなどを研究することで BMP-7 陽性食道癌患者の治療に結びつく可能性があり、さらに研究を進める必要がある。

(Annals of Surgical Oncology 2011 ; 13 September Online First 掲載 )

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 184 号	学位申請者	惠 浩一	
審査委員	主査	米澤 傑	学位	博士 (医学)
	副査	中川 昌之	副査	古川 龍彦
	副査	橋口 照人	副査	武田 泰生

### **Clinicopathological significance of BMP7 expression in esophageal squamous cell carcinoma**

(食道扁平上皮癌における BMP7 発現の臨床病理学的意義)

骨形成性蛋白である Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7)は TGF- $\beta$  superfamily に属するシグナル伝達分子の1つである。ヒトでは骨、軟骨形成、胎児期の発達に関与し、成人で腎臓の円柱上皮や網膜の細胞に発現がみられる。最近、様々な悪性腫瘍で BMP7 の発現がみられることが報告されており、BMP7 の発現を介した腫瘍細胞の分化、増殖、浸潤への関与が示唆されている。また、予後因子としての有用性も報告されている。しかしながら、これまでに食道癌での BMP7 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、申請者らは食道癌で BMP7 の発現を評価し、そ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) 食道癌切除 180 例の臨床検体の BMP7 発現を免疫組織学的染色により検討した。BMP-7 の発現は細胞膜と細胞質に認められた。BMP7 の発現面積と強度により BMP7 の発現を評価した結果、BMP7 陽性は 111 例 (61.7%) であった。
- 2) BMP7 発現と臨床病理学的因子との関連性を検討すると、BMP7 陽性例は腫瘍の深達度 ( $p < 0.001$ )、脈管侵襲 ( $p < 0.002$ )、病期 ( $p < 0.001$ ) および術後の局所再発 ( $p < 0.05$ ) と有意な相関を認めた。
- 3) 局所再発のうち、リンパ節再発と BMP7 は強い関連性を認めた。
- 4) BMP7 陽性群は陰性群と比較して有意に予後不良であった ( $p < 0.01$ )。リンパ節転移陰性症例に限って検討した場合においても、BMP7 の発現は予後と強い相関を認めた ( $p < 0.01$ )。
- 5) 予後に関して BMP7 を含む 6 因子に関する多変量解析の結果、BMP7 の発現は独立した予後因子の一つであった。

以上の結果より、食道癌における腫瘍 BMP7 発現は腫瘍の進展、脈管侵襲と強い関連性を認め、BMP7 の発現は腫瘍の浸潤能の獲得に関与していることが示唆された。また、BMP7 の発現は食道癌の独立した予後因子の一つであることが示された。特にリンパ節転移陰性例においても、BMP7 発現が予後の予測因子として活用でき、内視鏡的粘膜切除の際の再発高危険群の選別など、BMP7 の発現の有無が有益な情報をもたらすことが期待される。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 184 号		学位申請者	恵 浩一
審査委員	主査	米澤 傑	学位	博士 (医学)
	副査	中川 昌之	副査	古川 龍彦
	副査	橋口 照人	副査	武田 泰生
<p>主査および副査の5名は、平成24年2月17日、学位申請者恵 浩一君に面接し、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) 本研究で食道癌における BMP7 の発現を検討した理由は何か？          (回答) 2008 年の <i>Annals of surgical oncology</i> に大腸癌において BMP7 に関する研究が掲載され、大腸癌では深達度、肝転移と関係し、予後因子となるという報告を参考にして、食道癌で BMP7 発現を調べる着想に至った。</p> <p>質問2) 食道の正常上皮細胞に BMP7 は発現しているのか。          (回答) 今回の我々の研究では食道の正常上皮でも BMP7 の発現を認めた。BMP7 の働きを調べた研究はないが、BMP6 は上皮の角化と関連しているという報告があり、BMP7 も角化と関連している可能性がある。</p> <p>質問3) 食道癌細胞の BMP7 の発現を抑制したり、あるいは亢進させた研究はあるのか。          (回答) 検索した範囲ではみられなかった。</p> <p>質問4) BMP7 は食道癌細胞外に分泌されるのか。          (回答) 現在考えられている BMP family の分泌形式は autocrine と paracrine の両方である。腎臓の糸球体に存在する podocyte は BMP7 を分泌することで腎障害を回避する。BMP2 が胃癌細胞で autocrine の働きがある。以上より食道癌細胞から BMP7 が分泌されている可能性は高いと考えられる。</p> <p>質問5) 血中濃度の測定は可能か、また細胞の培養液で濃度を測定したことはあるか。          (回答) 血中濃度の測定は可能であるが、今回は行っていない。培養上清中の BMP7 の濃度を ELISA を用いて今後測定してみたいと考える。</p> <p>質問6) 術後の局所再発とはリンパ節再発のことか。また、局所再発が 20 例記載されているが、リンパ節郭清範囲外の再発なのか。          (回答) リンパ節再発がほとんどである。郭清したリンパ節周囲の再発とリンパ節郭清範囲外の両方がみられた。</p> <p>質問7) 論文の Fig 2.においてリンパ節転移陰性であるにも関わらず BMP7 発現陽性群で予後不良の死亡原因は何か。          (回答) リンパ節転移陰性例であってもリンパ節再発や遠隔転移再発はみられる。リンパ節転移陰性群では、BMP7 陽性例において、再発を多く認めたため予後不良の原因になったと考えられる。</p> <p>質問8) 腫瘍周囲の間質の細胞から BMP7 は分泌されているのか。          (回答) BMP7 は間質細胞にも染色されているためおそらく分泌されていると考える。腫瘍関連マクロファージなどを染色していないので、今後の課題としたい。</p> <p>質問9) 免疫染色の濃度評価に関して、moderate と strong の評価は難しくなかったか。          (回答) positive control に対し、同等に染まるものを moderate それより強いものを strong としたので、評価は比較的容易であった。</p> <p>質問10) BMP7 の発現陽性率は胃癌 40%、乳癌 40%であるが、今回の食道癌では 60%と高い結果であるが、その原因はどのように考えるか。腫瘍細胞の染まり方は均一なのか。          (回答) 食道癌で陽性率が高い原因の解析は行っていないが、臓器間の差異があると思われる。腫瘍細胞の染色パターンは不均一であったため、評価は濃度と面積で行った。</p> <p>質問11) Noggin との関係であるが、浸潤の契機となるのは BMP7 の発現と考えてよいか。また転移リンパ節での BMP7 の発現はどうか。          (回答) Noggin 陽性腫瘍細胞も最深部に強いので、浸潤の契機となるのは BMP7 発現と考えられる。転移先のリンパ節での BMP7 の発現は今後調べてみたい。</p> <p>質問12) 現在知られている BMP7 の target gene は PTEN のみか。          (回答) 調べた範囲では PTEN のみであった。</p> <p>質問13) BMP7 が EMT と関連していると推測されるならば、E-cadherin などの発現は調べたのか。          (回答) 腫瘍の種類によっては BMP7 が EMT と関連しているという報告もあるので E-cadherin や vimentin などを調べ</p>				

ることは今後のテーマにしたい。

質問 1 4) BMP7 を発現、誘導する因子はわかっているのか。

(回答) 重要な指摘であるが、現時点では不明である。TGF $\beta$ ファミリーに属しているため TGF $\beta$  との関連を調べる必要があると思われる。

質問 1 5) 染色の不均一性について腫瘍細胞の局在に差はあるか。

(回答) 腫瘍の先進部で BMP7 がより強く発現していた。

質問 1 6) BMP7 発現の目的は何か。

最近注目されている微小環境という立場からみると、BMP7 は血管新生に関与している可能性が考えられている。

質問 1 7) BMP7 は通常 TGF $\beta$  による EMT に抑制的に作用するといわれている。本研究では逆に EMT に促進的に働いているように思えるが、整合性はとれるのか。

(回答) BMP7 は腫瘍の初期段階では癌抑制因子として働くが、増殖段階に入ると腫瘍増殖に働くのではないかと考える。これは TGF $\beta$  の働きに類似していると考えられる。

質問 1 8) Noggin の単独での発現の有無で予後に差を認められたか。

(回答) Noggin 発現陽性群で予後が悪い傾向がみられたが、有意差はなかった。

質問 1 9) Table2 の吻合部再発例において炎症の関与は考えられるか。

(回答) 炎症と腫瘍の関係は密接であり、各種サイトカインが腫瘍に悪影響を及ぼすことが知られている。術後に吻合部縫合不全などが起きた症例で再発をきたしている可能性はあると思われる。

質問 2 0) BMP7 発現陽性と炎症 (CRP) との関連はどうか。

食道癌と CRP との関連は以前より指摘されており、BMP7 においても何らかの関連はあると思われる。

質問 2 1) 腫瘍の刺激応答系に関して、増殖、浸潤、転移、アポトーシスなどがあるが、BMP7 はどの刺激応答系と関連が深いのか。

(回答) 免疫染色の結果から腫瘍の増殖、浸潤と関連があるといえる。

質問 2 2) Table1 で BMP7 陽性であるにも関わらず腫瘍の悪性度が低い、逆に BMP7 陰性であるにも関わらず腫瘍の悪性度が高い症例に特徴はあったのか。

(回答) 今回の研究ではそのような観点から検討していない。今後の検討課題としたい。

質問 2 3) 炎症と BMP7 の発現、転写の関係はどうか。

(回答) 今回の研究では各種サイトカインなどとの関連性は調べていない。IL8 などとの関連を今後調べていきたい。

質問 2 4) Invasion assay などの実験あるいは報告はあるのか。

(回答) 食道癌ではないが、乳癌では BMP7 を抑えることで腫瘍の浸潤能、肺転移を抑制したという報告がある。

質問 2 5) BMP7 陽性、陰性の cut off 値は何を基準としたのか。

(回答) 臨床的な差異が最も顕著な値を cut off とした。

質問 2 6) 食道癌では BMP7 陽性の頻度が他の癌腫と比べると高いが、他の臓器での評価法はどうであったか。

(回答) 大腸癌、乳癌、胃癌についての論文では腫瘍細胞の染色面積で評価していた。しかし BMP6 について食道癌で調べた論文での評価は今回の方法と同様に腫瘍細胞の染色強度と面積で評価していた。

質問 2 7) 標本は最大剖面で評価したと思われるが、表層～深部まで全体を評価したのか。

(回答) 表層から深部まで全体を観察して評価した。

質問 2 8) 今後の臨床応用という観点から、粘膜下層剥離術 (ESD) を施行した標本で表層の腫瘍細胞の BMP7 の発現はどのように考えられるか。

(回答) 深部に比べると表層部では BMP7 の発現は弱いですが、染色性は安定しており評価可能と思われる。

質問 2 9) リンパ管侵襲について D2-40 などで染色したか。

(回答) 今回の研究では行っていない。

質問 3 0) 正常組織の発現は腎と網膜だけか。

(回答) 腎や網膜のほか脳や膀胱にも発現が認められている。

質問 3 1) 食道癌の BMP7 陽性群と比較して、腎細胞癌で予後が良い理由は何か。

(回答) 腎臓には本来 BMP7 が発現しており、臓器特異性があるのではないかと考える。

質問 3 2) BMP7 は他の BMP と比べて発現は高いのか。

(回答) 今回、その他の BMP の発現については検討していないので、今後の課題にしたい。

質問 3 3) BMP7 の発現のみを調べるのではなくリン酸化 smad、smad4、各種レセプターも調べる必要があるのではないか。

(回答) ご指摘の通り、今後それぞれについて検討する必要がある。

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。