

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461977

研究課題名(和文)食道癌における病理所見“Tumor budding”の機序解明と新規予後因子同定

研究課題名(英文)Elucidation of Mechanism for a pathological finding "Tumor budding" in esophageal cancer and identification of new prognostic factors

研究代表者

小池 聖彦 (KOIKE, Masahiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10378094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌切除症例においてTumor buddingと臨床データを解析し予後との有意な相関を認めた。次に、Tumor buddingと上皮間葉転換(Epithelial to mesenchymal transition; EMT)において、EMT status, タンパクレベルでも予後との有意な相関を認めた。以上より、食道癌におけるTumor buddingの発生機序としてEMTが強く関与していることが示唆された。

一方、L1CAMの発現をmRNAレベル, タンパクレベルで測定し、臨床病理学的因子や予後との相関を解析したが、食道癌ではL1CAMの発現は胃癌ほど重要な予後因子ではないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Pathological finding "Tumor budding" in esophageal cancer has significant correlation to the prognosis of the patients under went esophagectomy. WE focused on EMT (Epithelial to mesenchymal transition). The EMT status and expression of related protein significantly correlate to the status of tumor budding. These findings suggested EMT could have a role in the genesis of Tumor budding. On the other hand, expression of L1CAM using rt-PCR and Western blotting was investigated in the same specimens. However, there was no significant relation between expression of L1CAM and the prognosis of the patients. Unlike in gastric cancer, L1CAM is not a useful prognostic factor for esophageal cancer.

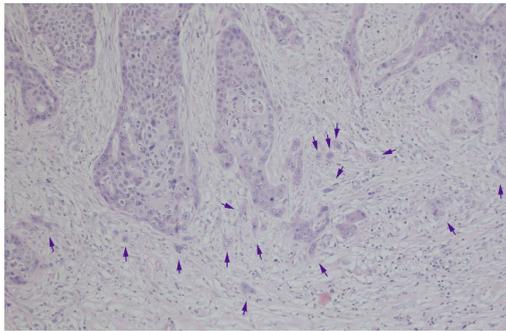
研究分野：消化器外科学

キーワード：budding 食道癌 L1 EMT 予後因子

1. 研究開始当初の背景

近年の食道癌治療では、手術療法のみならず薬物療法・放射線療法を加えた集学的治療によりさらに成績の向上が実現されている。その半面、全般に治療の侵襲が大きく、これまで以上に治療の個別化が必要とされている。個別化のひとつの柱である癌の悪性度の指標として、これまでに様々な分子病理学的因子が提唱されてきたが、臨床応用にいたったものは少ない。

“Tumor budding”は腫瘍先進部において、癌細胞が個々あるいは小胞巣を形成しつつ散在性に間質内に浸潤する組織所見である(下図矢印部分)。本所見は元来本邦の臨床家



に見出され、その意義が認識されるようになったもので、特に大腸癌において予後との相関が多く報告されている。何と云ってもヘマトキシリンエオジン染色 (HE 染色) 後の検鏡のみで観察可能であり、一般的で安定した染色方法で臨床へのフィードバックが容易であることから、学会の主題演題としても取り上げられ、広く検討されるに至っている。しかし、扁平上皮癌についての知見は乏しいことから、研究代表者らは食道扁平上皮癌で検討を進め、“tumor budding”が独立した予後因子であることをつきとめた (Koike et al, Ann Surg Oncol, 2008)。さらに T1 食道癌 (癌の進行が食道壁の粘膜下層までにとどまっている) においても本所見による悪性度判定が可能であることを見出した。

癌の悪性度評価は、接着能、遊走能、浸潤能、増殖能など、転移に必要な細胞特性にかかわる遺伝子の発現異常や変異を見出す見地から幅広く試みられている。個々の細胞が何らかの理由で腫瘍先進部で活性化し“tumor budding”をきたすとすれば、“tumor budding”を規定する遺伝子の検索を通じて転移のメカニズム解明を前に進め、同時に有力な予後因子を拾い上げることができると考える。

こうした遺伝子の候補として、我々は接着因子“L1 (L1-CAM)”に着目した。“L1”は神経細胞の遊走を含め脳神経系の発達をコントロールする糖蛋白の1つとして知られるが、近年、卵巣癌、大腸癌を含む様々な腫瘍の予後因子あるいは治療標的となりうる事が報告され、注目を集めている。また、“L1”

は癌化のシグナル伝達経路のひとつである -catenin/TCF の新しい標的遺伝子であり、その発現により、 -catenin と E-cadherin の発現は減弱し、癌細胞の運動能、増殖能が亢進することが大腸癌細胞にて確認されている。さらに大腸癌において“L1”の発現が腫瘍先進部で増強しているとの報告がみられることから、研究代表者らはこの遺伝子が何らかの形で“tumor budding”に関与することを通じて転移能、ひいては悪性度の指標となりうるものと考え、本研究の発想に至った。

2. 研究の目的

以下の順に、食道癌における予後因子としてみられる組織所見“Tumor budding”と、既に大腸癌にて予後因子となりうることを確認されている細胞接着因子“L1”の関係を解明していき、食道癌においても“L1”が重要な予後因子(転移能や悪性度の指標)となり得るかを明らかにする。〔(1)~(4)〕

上記で得られた結果、“L1”の予後因子としての有用性が認められれば、更に L1 発現に関与する遺伝子についても追求し、食道癌における悪性度診断ひいては分子標的治療などの治療の個別化に向けて、より有用な指標となり得る因子を同定する。〔(5)~(7)〕

- (1). 食道癌での外科切除標本において、免疫組織染色、RT-PCR を行い、腫瘍組織内における L1 の発現状況を調査し、食道扁平上皮癌に対する予後因子としての意義を検討する。
- (2). 以前研究代表者が“tumor budding”の予後因子としての検討を行った際の HE 染色した切片を対象として、L1 の免疫組織染色を行い、L1 の局在と budding との関連 (腫瘍先進部や budding における染色性) について検討する。
- (3). 食道癌細胞株における遺伝子レベル、蛋白レベルでの L1 の発現を定量する。細胞株の遊走能、接着能、増殖能、in vivo における造腫瘍能、転移能等を評価し、L1 発現との相関を調査する。
- (4). L1 の発現している食道癌細胞株を用いて、siRNA により L1 を knockdown し、knockdown 前後の造腫瘍能、転移能を比較する。
- (5). Microarray により knockdown 前後の遺伝子発現の変化を網羅的に調査し、L1 のさらに下流における作用点となる遺伝子を追求する。
- (6). (5) で得られた情報を元に、新たな分子の食道癌組織における発現を RT-PCR で確認し、その予後因子としての意義について検討する。
- (7). 以上の検討を通じ、最終的には生検で

得られる微量の検体を元に悪性度の診断(予後の推測)ができる系を構築する。

3. 研究の方法

(1). 食道癌における病理所見 “Tumor budding” と接着因子 “L1” との関連を検討

食道癌患者から採取した検体を用いて、細胞接着因子 “L1” を病理組織学的、分子生物学的それぞれの手法で発現させ、食道癌の予後因子としての病理所見 budding との関連を臨床病理学的因子を含めて検討した。

免疫組織学的な “L1” 発現の検討

我々名古屋大学医学部附属病院・消化器外科学教室では年間 40～50 例の食道切除症例があり、そのデータベースが予後を含めて整っている。研究代表者が以前 HE 染色で “tumor budding” の予後因子としての検討を行った切片を対象として、L1 の免疫組織染色を行い、L1 の発現と予後及び臨床病理学的因子との関係を検討するとともに、L1 の局在と病理所見 budding との関連 (腫瘍先進部や budding における染色性) について検討した。

RT-PCR 法による “L1” 発現の検討

我々名古屋大学医学部附属病院・消化器外科学教室においては過去手術時に採取した凍結標本のストックが存在する。これら標本を用い RT-PCR 法を用いての遺伝子レベルでの L1 発現の検討を行い、臨床病理学的因子との相関をみるとともに、病理所見 “tumor budding” との関連を検討した。

(2). 食道癌における “Tumor budding” の機序解明と新規予後因子の同定

食道癌手術にて採取された新たな検体を用いて食道癌細胞株を作成し、接着能、分解能、増殖能、遊走能等と “L1” の発現との相関を *in vivo*, *in vitro* の実験において検討した。更に、L1 発現細胞株を対象に siRNA を用いて knockdown させ、その前後の造腫瘍能、転移能を比較し、食道癌における悪性度と “L1” の発現の因果関係を調べた。次に、Microarray による knockdown 前後の “L1” に関する遺伝子発現の変化を調べ、RT-PCR で食道癌組織における発現を確認し、“L1” の下流において作用する遺伝子の予後因子としての意義を検討した。

食道癌手術にて得られた新たな検体を用いて食道癌細胞株を作成し、“L1” の発現を調べ、“L1” 発現の有無による造腫瘍能、転移能などへの影響を検討

食道癌細胞株における遺伝子レベル、

蛋白レベルでの L1 の発現を定量し、食道癌細胞株の遊走能、接着能、増殖能、*in vivo* における造腫瘍能、転移能等を評価し、L1 発現との相関を調査、また、*in vitro* での増殖速度や遊走能などについても比較検討した。

L1 knockdown 細胞株の確立と “L1” 発現の有無による細胞動態の変化の検討

L1 発現させた食道癌細胞株を対象に siRNA を用いて L1 を knockdown する。knockdown 前後の細胞株の造腫瘍能、転移能を比較することで、食道癌の悪性度と L1 発現の因果関係を調べた。

(3). (1), (2) により、食道癌における “Tumor budding” と “L1” の関係を検討した。

上記の結果、“L1” の発現が食道癌における予後因子になり得ると考えられれば、

- Microarray による L1 関連遺伝子の検索
- “L1” 関連遺伝子と腫瘍悪性度の検討

についての研究を進める予定であったが、食道癌において “L1” の発現は胃癌ほどの相関が見られなかったため、“L1” との関わりが深いとされる “上皮間葉転換” (Epithelial to mesenchymal transition; EMT) に着目し、以下の方法にて検討した。

(4). 食道癌における “Tumor budding” と “EMT” の相関について検討

癌の浸潤や転移で認められる EMT を形態学的に示しているのが腫瘍先進部における “tumor budding” と仮定した。

食道癌細胞株において “EMT” の代表的上皮マーカーである E-cadherin と間葉系マーカーの Vimentin について、定量 PCR 法と Western blotting 法で mRNA および蛋白の発現を測定し、われわれの提唱する EMT status (Epithelial type と Mesenchymal type) の確認を行った。

当教室での食道癌切除検体の腫瘍中心部に対して前述同様の定量 PCR 法と上皮マーカーによる免疫染色を行い EMT status を決定した。

我々はこれまでに “tumor budding” が食道癌術後患者の予後と相関することを示してきたが、本検討に用いた 78 検体でも同様に相関していることを確認した。

臨床検体の EMT status と予後および “tumor budding” との相関を検討した結果、相関が認められたため、現在、予後に影響すると思われる臨床病理学的因子を含めて多変量解析を行い、独立した予後因子を同定しているところである。

4. 研究成果

まず、“Tumor budding”と細胞接着因子“L1”との関係について、我々がこれまでに胃癌において研究を進めてきたL1CAMの発現を、食道癌の細胞株、切除検体において検討した。

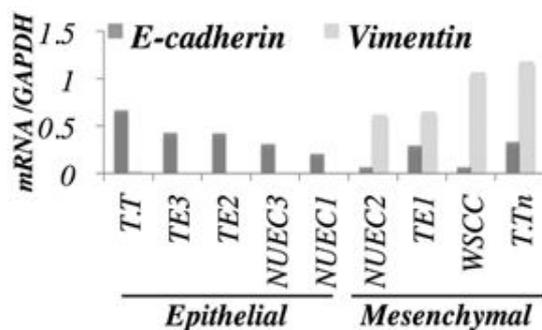
食道癌細胞株と当教室における食道癌切除検体を用い、腫瘍部におけるL1CAMのmRNA発現を定量PCR法にて測定した。胃癌においては、L1CAMのmRNAレベルにおける発現は術後生存成績と強く相関しており、また、siRNAを用いた細胞株における機能解析においては、胃癌細胞の増殖能や浸潤能に深く関与していたが、食道癌においてL1CAMの発現をmRNAレベル、蛋白レベルにおいて測定し、臨床病理学的因子や予後との相関を解析した結果、胃癌と食道癌では組織型の相違もあり、L1CAMの発現は胃癌ほど重要な予後因子ではないことが判明した。

以上のことより、当初の目的であった“L1”の検討は、食道癌においてはさほど重要ではないと結論づけ、L1との関わりが深いとされる“上皮間葉転換”(Epithelial to mesenchymal transition; EMT)に着目し検討を続けた。

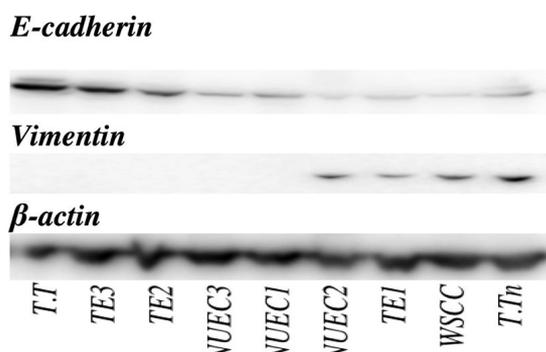
当教室で切除した食道癌症例において、腫瘍部からmRNAを抽出し、定量PCR法により“EMT”の代表的マーカーであるE-cadherin及びVimentinの発現を測定した(Fig. 1)。

Fig. 1.

A: 食道癌細胞株におけるE-cadherinおよびVimentinのmRNA発現を定量的RT-PCRにて検討

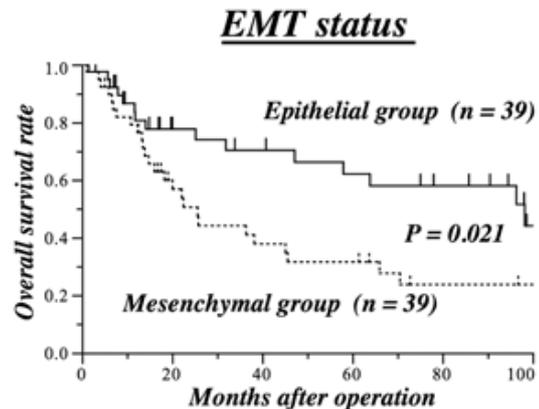


B: Western blotting法によるE-cadherinおよびVimentinのタンパク発現の検討



次に、E-cadherinとvimentinの発現比により“EMT status”(EMT s)を決定し、臨床データとの解析を行ったところ、予後と有意に相関していることが判明した(Fig. 2)。

Fig. 2. EMT status (Epithelial Group v.s. Mesenchymal Group)による全生存率



Mesenchymal GroupはEpithelial Groupに比べて有意に全生存率が低かった。

EMT statusの定義

- Epithelial Group: V/E ratio* <0.85 (median)
- Mesenchymal Group: V/E ratio* ≤0.85 (median)

(*V/E ratio: vimentin mRNA expression divided by E-cadherin mRNA expression in cancerous tissues)

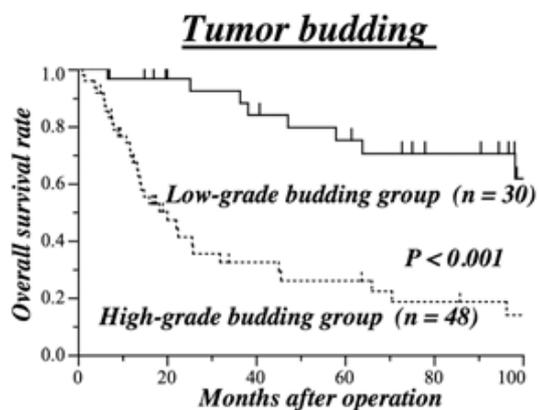
Mesenchymal GroupはEpithelial Groupに比べて有意に全生存率が低かった。

(31.5% vs. 62.0%, HR=2.01; 95% CI, 1.11-4.04; P=0.021)

更に、EMTを制御する転写因子としてZeb-1などの発現状況も確認した。その結果、食道癌切除例においては、EMTと予後との間に有意な相関を見出すことができた。

続いて、同症例におけるHE標本を用い、“tumor budding”の状況を観察した。臨床データとの解析においては、“tumor budding”も予後との有意な相関を認めていた(Fig 3)。

Fig. 3. buddingの発現頻度による全生存率



High-grade budding group (≥ 3 tumor buds) はLow-grade budding group (< 3 tumor buds) に比べて有意に全生存率が低かった。
(25.9% vs. 75.1%, HR=5.33; 95% CI, 2.55-12.5; $P < 0.001$)

先の EMT status と “ tumor budding ” との相関について解析すると、両者には有意な相関を見出すことができた (Table I, II)。

Table I : EMT status と臨床病理学的因子

Variables	Epithelial group	Mesenchymal group	P-value
No. of patients	39	39	
Age (≥ 65 vs. ≤ 64)	14/25	24/15	0.022
Gender (male vs. female)	32/7	31/8	0.774
Tumor location (Ut, Mt vs. Lt)	19/20	19/20	1.000
Histopathological grading (G1, G2 vs. G3, G4)	35/4	34/5	0.723
Pathological T category (T1, T2 vs. T3, T4)	12/27	14/25	0.631
Pathological N category (N0, N1 vs. N2, N3)	25/14	22/17	0.488
Venous invasion ((+) vs. (-))	19/20	14/25	0.292
Lymphatic invasion ((+) vs. (-))	30/9	29/10	0.792
Pathological stage (IA, IB, IIA, IIB vs. IIIA, IIIB, IIIC, IV)	19/20	15/24	0.361

Ut, upper thoracic esophagus; Mt, mid-thoracic esophagus; Lt, lower thoracic esophagus.

Mesenchymal Group は年齢と有意な相関を認めた。

Table II : “ Tumor budding ” と臨床病理学的因子

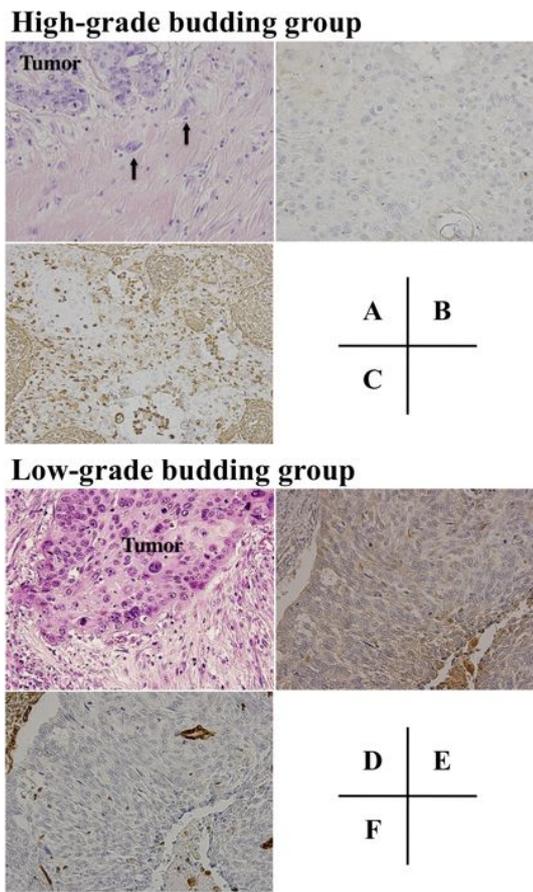
Variables	Low-grade budding	High-grade budding	P-value
No. of patients	30	48	
Age (≥ 65 vs. ≤ 64)	11/19	27/21	0.108
Gender (male vs. female)	21/9	42/6	0.078
Tumor location (Ut, Mt vs. Lt)	16/14	26/22	0.642
Histopathological grading (G1, G2 vs. G3, G4)	28/2	41/7	0.470
Pathological T category (T1, T2 vs. T3, T4)	14/16	12/36	0.048
Pathological N category (N0, N1 vs. N2, N3)	22/8	25/23	0.062
Venous invasion ((+) vs. (-))	11/19	23/25	0.381
Lymphatic invasion ((+) vs. (-))	19/11	41/7	0.028
Pathological stage (IA, IB, IIA, IIB vs. IIIA, IIIB, IIIC, IV)	18/12	16/32	0.021
EMT status (mesenchymal vs. epithelial)	9/21	29/19	0.009

Ut, upper thoracic esophagus; Mt, mid-thoracic esophagus; Lt, lower thoracic esophagus.

High-grade budding group では、EMT status, 病理学的進行度, リンパ管浸潤および壁深達度と有意に相関していた。

また、E-cadherin と Vimentin の免疫染色を行うと、蛋白レベルにおいても “ tumor budding ” との相関を認めていた (Fig. 4)。

Fig. 4. “ Tumor budding ” の HE 染色及び E-cadherin と Vimentin 免疫組織染色



High-grade budding group

- A: Tumor budding (矢印) ($\times 400$).
- B: E-cadherin の免疫組織染色。E-cadherin の発現は弱い。
- C: Vimentin の免疫組織染色。Vimentin の強発現を認める。

Low-grade budding group

- D: Low-grade budding ($\times 400$)。腫瘍先進部に budding 包巣を認めない。
- E: E-cadherin の免疫組織染色。腫瘍細胞に E-cadherin の発現を認める。
- F: Vimentin の免疫組織染色。Vimentin の発現は認められなかった。

以上より、食道癌における “ Tumor budding ” の発生機序として、EMT が強く関与していることが示唆された。本研究期間内では、独立した予後因子を同定しきれなかったが、今後も引き続き検討していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Yukiko Niwa, Suguru Yamada, Masahiko Koike, Mitsuro Kanda, Tsutomu Fujii, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. Epithelial to Mesenchymal

Transition Correlates With Tumor Budding and Predicts Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Journal of Surgical Oncology. 査読有. Vol.110 No.6 P764-769, 2014. doi: 10.1002/jso.23694.

Takeshi Ito, Suguru Yamada, Chie Tanaka, Sachiko Ito, Toshifumi Murai, Daisuke Kobayashi, Tsutomu Fujii, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. Overexpression of L1CAM is Associated with Tumor Progression and Prognosis via ERK Signaling in Gastric Cancer. Annals of Surgical Oncology. 査読有. Vol.21 No.2 P560-568, 2014. doi: 10.1245/s10434-013-3246-5.

[学会発表](計 2 件)

Yukiko Niwa, Suguru Yamada, Masahiko Koike, Mitsuro Kanda, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Goro Nakayama, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. Clinical correlation between EMT and tumor budding in esophageal squamous cell carcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013.10.5. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

Takeshi Ito, Suguru Yamada, Toshifumi Murai, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Syuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. Overexpression of L1CAM is associated with poor prognosis via ERK signaling in gastric cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013.10.5. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

小池 聖彦 (KOIKE, Masahiko)
名古屋大学・医学系研究科・講師
研究者番号：10378094

(2)研究分担者

山田 豪 (YAMADA, Suguru)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：30467287

藤井 努 (FUJII, Tsutomu)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：60566967
(平成 27 年度)

小寺 泰弘 (KODERA, Yasuhiro)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10345879