

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：17701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2012
 課題番号：21791301
 研究課題名（和文） 生検標本を用いた食道扁平上皮癌のリンパ節転移予測に関する研究
 研究課題名（英文） Prediction of lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma using a biopsy specimen
 研究代表者
 内門 泰斗 (UCHIKADO YASUTO)
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：30464465

研究成果の概要（和文）：

切除標本の免疫染色で、Osteopontin, Cytokeratin14, Statimin の蛋白発現で有意にリンパ節転移とリンパ管侵襲との関連性を認め、生検標本の免疫染色では、有意にリンパ節転移との関連性を認めなかった。切除標本の免疫染色で、Ep-cam, ColA71 の蛋白発現で壁深達度とリンパ節転移との関連性を認めた。しかし、生検標本の免疫染色では、臨床病理学的因子との関連性を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

In resected specimen, the protein's expressions of Osteopontin, or Cytokeratin14, or Statimin proteins were significantly concerned with the lymphatic invasion and lymph node metastasis. Furthermore there was significantly relationship between those protein's expressions and lymph node metastasis in biopsy specimen. Ep-cam, and ColA71 proteins were significantly concerned with the tumor invasion and lymph node metastasis in resected specimen. However, in biopsy specimens, these was no association with clinicopathological factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌, 免疫染色, 蛋白質, マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は難治性消化器癌の一つ

であり、その治療法は主に手術療法に委ねら

れてきた。近年、化学放射線療法との組み合わせによる集学的治療法が確立されつつあるが、いまだ予後不良な疾患である (Mariette C, et al. Cancer, 2003)。食道扁平上皮癌患者の予後に影響を及ぼす最も重要な因子はリンパ節転移である。現在、食道扁平上皮癌症例のリンパ節転移診断は、画像診断により行われているが、最終病理学的診断との間には解離が存在する。この問題を解決する目的で、リンパ節転移に関与する分子生物学的因子の検討がこれまでも試行されてきた (Kadowaki T, et al. Cancer Res, 1994)。しかしながら、これらの研究はリンパ節転移との関連性を持つ分子の報告であり、臨床的な応用を最終目標にした研究ではないのが現状である (Shiraishi T, et al. Int J Cancer, 1998)。申請者らも現在までに、食道扁平上皮癌切除標本や術前内視鏡下生検組織または血液検体などの生体材料を用いて、特定の分子発現によるリンパ節転移との関連性、予後解析、補助療法の感受性に関する検討を精力的に行い、その重要性を報告してきた (Natsugoe S, et al. J Surg Oncol, 2002)。近年、分子生物学的な因子の検討方法において大きな進歩がおとずれた。それは、これまでの手法と違い Microarray を用いた遺伝子発現の検討である。この手法により、同一組織に対し一度に数万種に及ぶ遺伝子発現の検討が食道扁平上皮癌においても可能となった (Lu J, et al. Int J Cancer, 2001)。そこでわれわれは、臨床応用を目標とし、この手法を用いたリンパ節転移の本質にあずかる遺伝子群の検討が急務と考えた。まず、食道扁平上皮癌の切除標本を用いて間質の影響を除いた癌細胞のみに特異的に発現するリンパ節転移関連遺伝子を検索し検討することとした (Uchikado Y, et al. Int J Oncol., 2006)。当教室において根治切除手

術を施行された食道扁平上皮癌 16 症例の凍結標本の癌組織の間質を除く癌細胞のみを Laser Microdissection 法 (LMD 法) を用いて切離・回収し、また、同症例の非癌部扁平上皮からも Total RNA を抽出し、Oligomicroarray を施行した (図 1)。この方法により、非癌部と比較して癌細胞にのみ発現するリンパ節転移関連遺伝子を抽出することができた。その中には、Cell-cycle, 細胞接着, 細胞分裂に関与する遺伝子が存在し、非癌部に比べて +2 SD 以上で高発現している遺伝子を総計 43 種類確認した。また、Apoptosis や、上皮分化に関与する遺伝子は低発現しており、計 138 遺伝子確認された。その中で、高発現遺伝子のうち 5 遺伝子 (SPP-1, CKS2, CCT5, STMN1, NDUFB9)、低発現遺伝子のうち 1 遺伝子 (GJB2) をピックアップし、real-time RT-PCR による組織での発現を検討したところ、Oligomicroarray の結果と関連していた。次に、Microarray を行っていない別の 21 症例の組織を用いて、前述した 6 遺伝子の発現を real-time RT-PCR で検討したところ、リンパ節転移と有意に相関を認めた。さらに、高発現遺伝子 SPP-1 の産物である Osteopontin の蛋白発現を根治切除標本の免疫染色法により検索したところ、有意なリンパ節転移との関連性を確認することができた (Kita Y, et al. Br J Cancer., 2006)。

2. 研究の目的

Microarray で得られた遺伝子情報をもとに、切除標本だけでなく生検標本の遺伝子蛋白発現を検討し、画像診断だけでは捉えられない、リンパ節転移予測の診断を行えるかどうかを以下の項目について検討した。①高発現遺伝子群の産物蛋白発現を切除標本内で確認し、発現分布状況およびリンパ節転移との関連性を検討し、臨床応用への候補分子を集

積する。②上記分子の発現を術前生検組織で検討し実際のリンパ節転移との相関を検討する。

3. 研究の方法

術前に生検標本が得られ、根治切除手術症例の切除標本・郭清リンパ節のプレパラートが得ることのできる食道扁平上皮癌で、かつ同意が得られている症例を対象とする。

Microarrayの結果で得られたリンパ節転移関連遺伝子のなかで発現増強していた上位5遺伝子(Osteopontin, Cytokeratin14, Statimin, Ep-cam, ColA71)の蛋白発現を、免疫染色法で、切除標本の蛋白発現を検索した。また、リンパ節転移の有無については、通常の病理検査だけでなく、切除症例の郭清リンパ節の微小転移の有無についてCytokeratin AE1/3抗体による免疫染色法も用いて検索した。

4. 研究成果

1. Osteopontinの蛋白発現を生検標本の免疫染色により検索し、リンパ節転移と関連性を認めた。
2. Cytokeratin 14, Statiminの蛋白発現について切除標本の検索したところ、リンパ管侵襲とリンパ節転移との関連性を認めた。
3. Cytokeratin 14, Statiminの蛋白発現を生検標本の免疫染色によりリンパ節転移との関連性を認めた。
4. Ep-cam, Col17A1の蛋白発現について切除標本の検索したところ、壁深達度とリンパ節転移との関連性を認めた。
5. Ep-cam, Col17A1の蛋白発現について生検標本の免疫染色により、臨床病理学的因子との関連性を認めなかった。
6. 根治切除症例におけるOsteopontin, Cytokeratin14, Statimin, Ep-cam, ColA71の蛋白発現で、とくに3種類以上の蛋白発現を認めている場合には有意に予後不良であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1. Uchikado Yasuto, Okumura H, Ishigami S, Setoyama T, Matsumoto M, Owaki T, Kita Y, Natsugoe S. ; Increased Slug and decreased E-cadherin expression is related to poor prognosis in patients with gastric cancer. Gastric cancer, 14, 41-49, 2011 (査読有)
2. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村 浩, 大脇哲洋, 夏越祥次: 腹部食道癌に対する手術. 日本臨床, 69, 310-315, 2011 (査読なし)
3. Megumi K, Ishigami S, Uchikado Yasuto, Kita Y, Okumura H, Matsumoto M, Uenosono Y, Arigami T, Kijima Y, Kitazono M, Shinchi H, Ueno S, Natsugoe S. : Clinicopathological Significance of BMP7 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol. 19, 2066-2071, 2011(査読有)
4. Aoki M, Ishigami S, Uenosono Y, Arigami T, Uchikado Yasuto, Kita Y, Kurahara H, Matsumoto M, Ueno S, Natsugoe S. : Expression of BMP-7 in human gastric cancer and its clinical significance. Br J Cancer. 104, 714-718, 2011(査読有)
5. 内門泰斗, 奥村浩, 松本正隆, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 夏越祥次: 特集 食道癌手術—困難症例・偶発症対処の秘策— 再建胃管血流不良. 手術, 64, 955-958, 2010 (査読なし)
6. 内門泰斗: 消化器癌の診断・治療 胸部食道癌 治療の実際. 消化器外科, 32, 699-705, 2009 (査読なし)

[学会発表] (計18件)

1. 内門泰斗, 奥村浩, 上之園芳一, 有上貴明, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 佐々木健, 松本正隆, 瀬戸山徹郎, 石神純也, 新地洋之, 上野真一, 夏越祥次: 壁深達度MM/SM1のcN0食道表在癌に対する内視鏡的切除にSentinel node navigationを臨床応用した治療戦略. 第74回日本臨床外科学会総会, 京王プラザホテル, 東京都, 2012年11月30日
2. Yasuto Uchikado, Yoshikazu Uenosono, Hiroshi Okumura, Masataka Matsumoto, Tetsuhiro Owaki, Yoshiaki Kita, Ken Sasaki, Takaki Arigami, Takahiko Hagihara, Daisuke Matsushita, Sumiya Ishigami and Shoji Natsugoe: Endoscopic treatment with

sentinel node dissection for superficial esophageal cancer. 13th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, Venice, Italia, 2012年10月16日

3. 内門泰斗, 奥村浩, 大脇哲洋, 佐々木健, 喜多芳昭, 松本正隆, 尾本至, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次: 当科における頸部食道癌に対する治療. 第67回日本消化器外科学会総会, 富山県民会館, 富山市, 2012年07月19日

4. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村 浩, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 佐々木健, 尾本 至, 橋口照人, 石神純也, 夏越祥次: MM以深のcN0食道表在癌に対するSentinel node navigationを用いた内視鏡治療. 第66回日本食道学会学術集会, 軽井沢プリンスホテルウエスト, 軽井沢, 2012年06月22日

5. 内門泰斗, 奥村 浩, 松本正隆, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 尾本 至, 佐々木 健, 瀬戸山徹郎, 有上貴明, 上之園芳一, 石神純也, 新地洋之, 上野真一, 夏越祥次: 食道癌と同時性重複癌の治療についての検討. 第112回日本外科学会定期学術集会, 幕張メッセ, 千葉市, 2012年04月12日

6. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村 浩, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 瀬戸山徹郎, 尾本 至, 佐々木 健, 桜井俊秀, 有上貴明, 上之園芳一, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次: 食道癌と他臓器の同時性重複癌の検討. 第49回日本癌治療学会学術集会, 名古屋国際会議場 愛知県, 2011年10月28日

7. Yasuto Uchikado, Hiroshi Okumura, Sumiya Ishigami, Masataka Matsumoto, Tetsuro Setoyama, Tetsuhiro Owaki, Yoshiaki Kita, Itaru Omoto, Takaaki Arigami, Yoshikazu Uenosono, Shinichi Ueno and Shoji Natsugoe: Increased Slug and Decreased E-cadherin Expression Is Related to Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer.

8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Osaka International Convention Center 大阪府, September 21, 2011

8. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村 浩, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 瀬戸山徹郎, 尾本 至, 有上貴明, 上之園芳一, 石神純也, 新地洋之, 上野真一, 橋口照人, 夏越祥次: 上部消化管癌患者の血清中N型糖鎖による新規腫瘍マーカーの可能性. 第66回日本消化器外科学会総会, 名古屋国際会議場 愛知県, 2011年7月14日

9. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村 浩, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 瀬戸山徹郎, 尾本 至, 有上貴明, 上之園芳一, 石神純也, 新地洋之, 上野真一, 夏越祥次: 食道癌の新規腫瘍マーカーとしての血清中N型糖鎖プロファイリング. 第111回日本外科学会定期学術集会, 紙上発表, 2011

10. 内門泰斗, 松本正隆, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 原口尚士, 奥村浩, 瀬戸山徹郎, 尾本至, 桜井俊英, 佐々木健, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次: 化学放射線療法後の食道狭窄に対する食道バイパス術の一工夫. 第72回日本臨床外科学会総会, 神奈川県横浜市, 2010年11月23日

11. 内門泰斗, 柳 正和, 大塚剛志, 松本正隆, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 奥村 浩, 瀬戸山徹郎, 尾本 至, 佐々木健, 桜井俊秀, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次: 当科における進行・再発食道癌の気道狭窄に対する治療. 第62回日本気管食道科学会総会, 大分県別府市, 2010年11月5日

12. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村浩, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 瀬戸山徹郎, 佐々木健, 尾本至, 桜井俊秀, 石神純也, 新地洋之, 上野真一, 夏越祥次: 食道癌術中, 頸胸境界部の気管膜様部損傷に対して胸鎖乳突筋弁被覆を行った一例. 第48回日本癌治療学会学術集会, 京都府京都市, 2010年10月30日

13. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村浩, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 瀬戸山徹郎, 佐々木健, 尾本至, 櫻井俊秀, 石神純也, 新地洋之, 上野真一, 夏越祥次: 透析未導入の慢性腎不全食道癌患者に対するLow dose Docetaxel/5FUによる根治的化学放射線療法の検討. 第8回日本消化器外科学会大会(JDDW2010), 神奈川県横浜市, 2010年10月15日

14. Yasuto Uchikado, Masataka Matsumoto, Hiroshi Okumura, Tetsuro Setoyama, Yoshiaki Kita, Ken Sasaki, Toshihide Sakurai, Itaru Omoto, Tetsuhiro Owaki, Sumiya Ishigami, Shinichi Ueno, and Shoji Natsugoe: A relationship between the Snail and Slug expression and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. ISDE 2010, Kagoshima city, 2010年9月3日

15. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村浩, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 瀬戸山徹郎, 佐々木健, 尾本至, 石神純也, 夏越祥次: 頸部食道癌に対する治療戦略 —当科における治療成績から—. 第64回日本食道学会学術集会, 福岡県久留米市, 2010年8月31日

16. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村浩, 瀬戸山徹郎, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 石神純也, 上野真一, 夏越祥次: 当科における食道切除後の胃管再建法の工夫による縫合不全の改善. 第65回日本消化器外科学会総会, 山口県下関市, 2010年7月14日

17. 内門泰斗: 乳癌切除後放射線照射後の誘発食道癌切除症例の検討. 第47回日本癌治療学会学術集会, 横浜市, 2009年10月22日

18. 内門泰斗: 進行食道癌の術前補助療法とリンパ節微小転移. 第64回日本消化器外科学会総会, 大阪国際会議場, 2009年7月16日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内門 泰斗 (UCHIKADO YASUTO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
助教
研究者番号: 30464465

(2) 研究分担者
該当者なし

(3) 連携研究者
該当者なし