シンポジウム

呼吸器・消化器領域の扁平上皮癌

細胞分子レベルからの解析

遺伝子レベルから
遺伝子異常からみた食道癌の臨床特性

小澤 壮治, 安藤 暢敏, 池田 佳史
篠崎 浩治, 上田 政和, 北島 政樹

The Clinical Implications of Genetic Alterations in Esophageal Cancer

Soji Ozawa, M.D., Nobutoshi Ando, M.D., Yoshifumi Ikeda, M.D.,
Hiroharu Shinozaki, M.D., Masakazu Ueda, M.D.,
and Masaki Kitajima, M.D.

Department of Surgery, Keio University School of Medicine, Tokyo

Genetic alterations were analyzed in esophageal cancer. Amplification of *c-erbB*, which codes the epidermal growth factor receptor, was detected in about one-eighth of our cases. The survival rate for patients with *c-erbB* amplification was significantly lower than the rate for patients without such amplification. There was a significant relation between *c-erbB* amplification and regional lymph node metastasis at surgery. Amplification of cyclinD1, which codes the G1-regulating protein of the eukaryotic cell cycle, was detected in about one-fourth of our cases. The survival rate for patients with cyclinD1 amplification was also significantly lower than the rate for patients without such amplification. There was a significant relation between cyclinD1 amplification and eventual metastasis to distant organs. As these genetic alterations can be determined by an endoscopic biopsy preoperatively, the biological characteristics of each case should be taken into account for an optimum treatment strategy.

Key words : 食道癌, 癌遺伝子, 遺伝子増幅, 転移

I. はじめに

これまでは各診療科単位, いわば縦割りに疾患を扱うことが多かったが, 同一の組織型すなわち横割りに癌細胞の特性を検討することも, 疾患の本質を異なった面から再検討できるという点で有意義である。

消化器領域の扁平上皮癌といえば食道癌が代表的である。厚生省の人口動態統計によれば部

位別にみた人口10万人に対する食道癌による死亡率は男性10.8人, 女性2.1人で, それぞれ第6位, 第10位と頻度は低い¹⁾。しかし教室における切除例の over all 5年生存率が25%であるように, 食道癌は予後不良な癌の1つといえる²⁾。

この食道癌の悪性度に関連する分子生物学的な因子の研究は, 80年代より行われてきた。DNA ploidy, 癌遺伝子異常, 癌抑制遺伝子異常などである。教室では80年代前半より扁平上皮癌という他の消化器癌と異なる組織の癌細胞において, まず上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) およびその受容体 (EGF receptor,

慶應義塾大学医学部外科

別刷請求: 〒160 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部外科 小澤壮治

EGFR)³⁾に注目した。さらにEGFRをコードする *c-erb B* 遺伝子⁴⁾ 異常について検討した。またマウス乳癌とヒト胃癌細胞にそれぞれ関連する *int-2* 遺伝子⁵⁾ と *hst-1* 遺伝子⁶⁾ の解析,さらには同じ染色体上で近傍にマップされる *cyclin D1* 遺伝子⁷⁾ の異常を解析し,臨床像とこれらの遺伝子異常との関連について検討を加えてきた。現在では遺伝子異常の情報を実際の臨床の場で応用しつつある。教室のこれまでの研究成果を中心に遺伝子異常からみた食道扁平上皮癌の臨床特性について述べる。

II. *c-erb B* 遺伝子増幅

1. *c-erb B* とは

EGFR 遺伝子は第7染色体短腕12~13領域にマップされ,全長約110 kb, 26個以上のエクソンからなる。1984年に Ullrich らによってEGFR はトリ赤芽球症ウイルスをもつ発癌遺伝子 *v-erb B* 産物との相同性が示され, *c-erb B* 遺伝子はEGFR 遺伝子と同一と考えられるようになった⁴⁾。

2. EGF/EGFR 系

EGF は分子量6,050のポリペプチドであり,細胞膜上のEGFR に結合することにより,多く

の細胞の分化や増殖を促進する。EGFR は分子量131 k の一本鎖ポリペプチドで,細胞膜を貫いて存在し,細胞外ドメインにEGF を結合させる。するとEGFR が二量体を形成し,細胞内ドメインにあるチロシンキナーゼが活性化し,次いでリン酸化カスケードが活性化して,転写因子による遺伝子転写が制御される⁸⁾。

3. EGF/EGFR 系と扁平上皮癌

外科的に切除された固形腫瘍について, ¹²⁵I-EGF を用いた binding assay を行うと,食道扁平上皮癌,肺扁平上皮癌においてEGFR レベルが高く,胃,大腸,乳腺などの腺癌ではEGFR レベルが低い(図1)。食道癌の中には,細胞1個当たり 3×10^6 個とEGFR を過剰発現する外陰癌由来の扁平上皮癌細胞A431をヌードマウスに移植した腫瘍と同程度にEGFR レベルが高い症例も存在した⁹⁾。EGFR は扁平上皮癌に特異的に過剰発現することが明らかとなった。

EGFR に対するモノクローナル抗体 (MAb) を用いた免疫染色を行うと,扁平上皮癌組織において癌細胞膜に一致して染色性を認め,また正常重層扁平上皮では基底層・傍基底層の細胞に同様に染色性を認めた。bromodeoxy uridine (BrdU) により細胞増殖能を検討すると,EGFR

図1 各種癌組織におけるEGF結合能

レベルと細胞増殖能に関連性が認められた^{9,10)}。

EGF の腫瘍増殖促進作用を検討するために、EGFR を過剰発現する扁平上皮癌細胞株に対して外因性に EGF を投与すると、*in vitro* 系では EGF は増殖抑制に作用するが、ヌードマウス移植腫瘍モデルを用いた *in vivo* 系では増殖促進に作用した¹¹⁾。したがって EGF/EGFR 系が扁平上皮癌の悪性度に関わることが予想された。

食道癌患者を腫瘍組織中の EGFR レベル高値群と低値群に分けると、EGFR 高値群の予後が低値群に比べて有意に不良であった。しかし進行度、腫瘍占居部位などの背景因子に差を認めなかった¹²⁾。したがって食道癌の EGFR レベルが予後因子として考えられるようになった。

4. *c-erb B* 遺伝子増幅

EGFR をコードする *c-erb B* 遺伝子の DNA, mRNA レベルを Southern blot 法, Northern blot 法により検討すると、遺伝子増幅や mRNA 過剰発現が認められた扁平上皮癌組織では EGFR レベルが高値であった¹³⁾。遺伝子増幅が EGFR の過剰発現を引き起こし、その結果食道癌細胞の増殖進展をさらに促進する可能性が考えられた。

次に食道癌における *c-erb B* 遺伝子増幅の臨床的意義について検討したので詳しく述べる。食道癌切除107症例についてホルマリン固定パラフィン包埋切片より癌部と非癌部を同定後 DNA を抽出し、slot blot 法により *c-erb B* 遺伝子増幅度を調べた。増幅度はバイオイメージアナライザーにて測定し、非癌部に比べて3倍以上の遺伝子増幅を認めた症例を増幅例とした。*c-erb B* 増幅例は測定し得た107例中13例(12%)、非増幅例は94例(88%)で、増幅群の術後生存率は非増幅群に比べて有意に不良であった(表1)。EGFR とともに *c-erb B* 増幅が予後因子となることが明らかとなった。手術時のリンパ節転移と *c-erb B* 増幅とをさらに症例を追加して検討すると、興味深いことにリンパ節転移は増幅20例中20例(100%)、非増幅110例中62例(56%)であった(表2)。腫瘍深達度の浅い粘膜下層癌に限ってみても、測定した36例において手術時のリンパ節転移は増幅4例中

表1 *c-erb B* 増幅と予後

<i>c-erb B</i>	症例数	5 生率
増 幅	13	4%
非増幅	94	34%

($P < 0.001$)

表2 *c-erb B* 増幅とリンパ節転移

<i>c-erb B</i>	n (+)	n (-)	計
増 幅	20	0	20
非増幅	62	48	110
計	82	48	130

($P < 0.001$)

4例(100%)、非増幅32例中10例(31%)であり、*c-erb B* 増幅と手術時のリンパ節転移はよく相関していた。この増幅4例の中で術前に転移陽性と画像診断できたのはわずか1例のみで、他の3例は転移陰性と診断していた。*c-erb B* 増幅がリンパ節転移を起こしやすくする機序は現在のところ明らかではないが、画像診断で検出しえないレベルのリンパ節転移を *c-erb B* 増幅が予測できる点で臨床上有用である。

5. *c-erb B* 遺伝子増幅と新しい診断・治療法の開発

このように *c-erb B* 遺伝子増幅は食道癌の約1/8に認められ、遠隔成績も不良である。悪性度の高い腫瘍こそその特徴を利用した診断・治療が必要となる。こうした考えのもとで、教室では *c-erb B* 遺伝子産物である EGFR に対する MAb を用いて各種の基礎実験を行ってきた。植物性のトキシンである gelonin を MAb に結合させたイムノトキシンを用いて、扁平上皮癌細胞を選択的に治療する試みに *in vitro*, *in vivo* で成功した^{14,15)}。さらに抗癌剤のペプロマイシンを MAb に結合させたイムノコンジュゲートにより扁平上皮癌の選択的殺細胞効果を確認している¹⁶⁾。一方、腫瘍イメージングの手段として MAb を鉄磁性体に結合させ、MRI を用いた扁平上皮癌の選択的画像診断法の開発も進めている。

III. cyclin D1, *int-2* 遺伝子増幅

1. cyclin D1, *int-2* とは

int-2 は1986年に Casey らによって単離された癌遺伝子で⁵⁾, 11q13上にマップされる。一方 cyclin D1 は1991年に Motokura らによって発見された遺伝子で分子量33.7 k の cyclin D1 蛋白をコードし⁷⁾, *int-2* とは150 kb 以上離れて同じ11q13上にマップされる。*int-2* の遺伝子増幅は食道扁平上皮癌や乳癌, 胃癌組織で認められるものの, その発現が確認されていない。しかし, cyclin D1 遺伝子は食道扁平上皮癌組織で遺伝子増幅と発現が認められた^{17,18)}。その産物である cyclin D1 蛋白は細胞周期の G1 期の調節因子として作用することが明らかとなり, 腫瘍増殖と cyclin D1 遺伝子増幅との関連性が示唆されてきた。

2. cyclin D1 遺伝子増幅

食道癌における cyclin D1 遺伝子増幅の臨床的意義について検討したので詳しく述べる。教室で切除された食道癌122例を対象として cyclin D1 遺伝子増幅を調べた。*c-erb B* の検査法と同様に slot blot 法により解析した。cyclin D1 増幅例は28例 (23%), 非増幅例は94例 (77%) であり, 増幅群の術後生存率は非増幅群に比べて有意に不良であった (表3)。さらに肺・肝・骨などへの遠隔臓器再発は増幅28例中18例 (64%), 非増幅94例中13例 (14%) と臓器再発と cyclin D1 増幅との間に有意な関連を認めた。このように cyclin D1 遺伝子増幅は遠隔臓器転移と関係があり, 根治術後の予後因子となることが判明した。

また cyclin D1 増幅と *int-2* 増幅との関連を検討すると, 両者は高度に相関していた。cyclin D1 は *int-2* を含む増幅単位を形成し, この領域の増幅が臓器転移に強く関わっていることにな

る。この領域の遺伝子増幅と臓器転移の詳しい機序については今後の研究を待たなければならないが, 発現を認めない *int-2* よりも G1 期細胞周期調節蛋白をコードする cyclin D1 の方が癌細胞の生物学的特徴をとらえ, 治療法を検討するのにふさわしいと考えられる。この11q13領域の増幅は食道癌に限ったことなく, 乳癌や胃癌でも認められ¹⁹⁾, 遠隔臓器転移を予測するマーカーと考えられている。

IV. 癌遺伝子情報の臨床への応用

治療前にこれらの遺伝子増幅を知り得れば, 臨床的特徴に即した治療法の選択が可能となる (図2)。術前の内視鏡生検材料と切除材料との遺伝子増幅程度を比較検討すると, *c-erb B* 増幅は感度・特異度とも100%一致し, また11q13領域の増幅 (*int-2* 増幅) は感度81%, 特異度93%であり, 内視鏡生検検査で遺伝子異常が判定しうると考えられた。

c-erb B 増幅例に対しては, 画像診断上リンパ節転移が認められなくても, リンパ節転移危険症例としてリンパ節郭清の徹底化や縦隔を中心とした放射線照射などの治療が必要となる。

cyclin D1 増幅例では遠隔臓器転移傾向が強いため, local disease ではなく, systemic disease として病態をとらえる必要がある。標準的な食道癌手術は, 開胸開腹による食道切除と頸胸腹の広範なリンパ節郭清を行うため, 患者に対して過大侵襲となる。そこで腫瘍免疫と臓器転移の観点から, cyclin D1 増幅例のうち食道病変の臨床病理学的所見から臓器転移危険群と判定された症例に対しては, 縮小手術として非開

表3 Cyclin D1 増幅と予後

Cyclin D1	症例数	5 生率
増 幅	28	12%
非増幅	94	55%

($P < 0.001$)

図2 癌遺伝子情報と治療戦略

胸食道抜去術を行い宿主の免疫能を温存し、術後早期に補助化学療法を開始するのが妥当であると考えている。その方針に沿って、現在までに4例治療を行い、そのうち2例は臓器転移を来さず2年以上生存中である。この考え方は遠隔臓器転移危険群に対する治療戦略として有望である。また、縮小手術を行わなくとも、cyclin D1増幅例に対しては術後補助化学療法の必要性がある。

V. 他の遺伝子異常

食道癌における *c-erb B* や cyclin D1/*int-2* 以外の遺伝子異常について最近の報告を紹介すると、11q13上の *hst-1* 遺伝子は *int-2* 遺伝子と同時に増幅してともに優れた予後因子であり²⁰⁾、また *c-myc* の増幅は14%²¹⁾、P53異常は36%²²⁾、RB-LOH は54%²³⁾、APC/MCC-LOH は80%²⁴⁾ の食道癌症例に認められるとされている。またP53がマップされる17p染色体に欠失が高率(45%)に認められるとも報告されている²⁵⁾。

頭頸部癌では *c-erb B* 増幅は10%、*c-myc* 増幅は9%認められ²⁶⁾、これらの頻度は食道癌とほぼ同等である。喉頭癌では cyclin D1 増幅が37%認められ、局所浸潤、リンパ節転移との関連性が報告されている²⁷⁾。cyclin D1 増幅が食道癌では遠隔臓器転移と関連するのと異なり、同じ扁平上皮癌でも臓器の違いにより遺伝子異常と臨床的特徴との関係が異なるのは興味深い。これは解剖学的違いがリンパ行性あるいは血行性転移の形式に影響するためであろう。

VI. おわりに

扁平上皮癌に特徴的な遺伝子異常はといえば *c-erb B* 増幅であり、それはリンパ節転移と関連性が強い。治療成績の向上のためにはその産物である EGFR を標的とした診断法・治療法の開発が望まれる。一方、cyclin D1 増幅も扁平上皮癌に特異的とはいえないものの癌患者の予後を規定する遠隔臓器転移に関係が深いので臨床的に重要である。cyclin-dependent kinase 4 (Cdk 4) に cyclin D1 が結合して細胞増殖を促進するが、Cdk 4 に結合して逆に増殖抑制作用を発揮する P16蛋白の存在が最近報告され

た²⁸⁾。cyclin D1、P16などをさらに詳細に検討することにより、細胞増殖を制御することも将来可能となるであろう。しかし現時点では、遺伝子異常の情報を治療前の内視鏡生検で手に入れ、悪性度に応じた治療法を選択することが集学的治療体系の中で重要である。

文 献

- 1) 厚生省人口動態統計課：最近の人口動態，pp. 16-17，厚生統計協会，東京，1994.
- 2) 安藤暢敏，篠沢洋太郎，小澤壯治・他：食道癌切除術後の10年生存率と10年生存例。臨床胸部外科，11：417-420，1991.
- 3) 蒲生 忍，清水信義：上皮増殖因子とそのレセプター。日本臨床，50：193-200，1992.
- 4) Ullrich, A., et al. : Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature, 309 : 418-425, 1984.
- 5) Casey, G., Smith, R., McGillivray, D., et al. : Characterization and chromosome assignment of the human homolog of *int-2*, a potent proto-oncogene. Mol. Cell. Biol., 6 : 502-510, 1986.
- 6) Sakamoto, H., Mori, M., Taira, M., et al. : Transforming gene from human stomach cancers and a noncancerous portion of stomach mucosa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 3997-4001, 1986.
- 7) Motokura, T., Bloom, Y., Kim, H. G., et al. : A novel cyclin encoded by a *bcl1*-linked candidate oncogene. Nature, 350 : 512-515, 1991.
- 8) 蒲生 忍，清水信義：増殖因子レセプター。ホルモンと臨床，42：71-80，1995.
- 9) Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., et al. : Epidermal growth factor receptors in cancer tissues of esophagus, lung, pancreas, colorectum, breast and stomach. Jpn. J. Cancer Res., 79 : 1201-1207, 1988.
- 10) Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., et al. : High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal squamous cell carcinomas. Int. J. Cancer, 39 : 333-337, 1987.
- 11) Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., et al. : Stimulation by EGF of the growth of EGF receptor-hyperproducing tumor cells in athymic mice. Int. J. Cancer, 40 : 706-710, 1987.
- 12) Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., et al. : Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. Cancer, 63 : 2169-2173, 1989.
- 13) Hunts, J., Ueda, M., Ozawa, S., et al. : Hyperproduction and gene amplification of the

- epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinomas. Jpn. J. Cancer Res., 76 : 663-666, 1985.
- 14) Ozawa, S., Ueda, M., Ando, N., et al. : Selective killing of squamous carcinoma cells by an immunotoxin that recognizes the EGF receptor. Int. J. Cancer, 43 : 152-157, 1989.
 - 15) Hirota, N., Ueda, M., Ozawa, S., et al. : Suppression of an epidermal growth factor receptor-hyperproducing tumor by an immunotoxin conjugate of gelonin and a monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibody. Cancer Res., 49 : 7106-7109, 1989.
 - 16) Osaku, M., Ueda, M., Ando, N., et al. : Targeted killing of squamous carcinoma cells by a monoclonal antibody-peplomycin conjugate which recognizes the EGF receptor. Anticancer Res., 11 : 1951-1956, 1991.
 - 17) Jiang, W., Kahn, S.M., Tomita, N., et al. : Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. Cancer Res., 52 : 2980-2983, 1992.
 - 18) Tsuruta, H., Sakamoto, H., Onda, M., et al. : Amplification and overexpression of *EXPI* and *EXP2/cyclinD1* genes in human esophageal carcinomas. Biochem. Biophys. Res. Commun., 196 : 1529-1536, 1993.
 - 19) 上田政和, 菊地 潔, 小澤壯治・他 : 遺伝子異常からみた転移予測——一般消化器外科領域の癌を中心として——. 実験医学, 12 : 1113-1117, 1994.
 - 20) Kitagawa, Y., Ueda, M., Ando, N., et al. : Significance of *int-2/hst-1* coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. Cancer Res., 51 : 1504-1508, 1991.
 - 21) Lu, S.H., Hsieh, L.L., Luo, F.C., et al. : Amplification of the EGF receptor and *c-myc* genes in human esophageal cancers. Int. J. Cancer, 42 : 502-505, 1988.
 - 22) Hollstein, M.C., Metcalf, R.A., Welsh, J.A., et al. : Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 9958-9961, 1990.
 - 23) Boynton, R.F., Huang, Y., Blount, P.L., et al. : Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. Cancer Res., 51 : 5766-5769, 1991.
 - 24) Boynton, R.F., Blount, P.L., Yin, J., et al. : Loss of heterozygosity involving the *APC* and *MMC* genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 3385-3388, 1992.
 - 25) Wagata, T., Ishizaki, K., Imamura, M., et al. : Deletion of 17p and amplification of the *int-2* gene in esophageal carcinomas. Cancer Res., 51 : 2113-2117, 1991.
 - 26) Leonard, J.H., Kearsley, J.H., Chenevix-Trench, G., et al. : Analysis of gene amplification in head-and-neck squamous-cell carcinomas. Int. J. Cancer, 48 : 511-515, 1991.
 - 27) Jares, P., Fernandez, P.L., Campo, E., et al. : *PRAD-1/cyclin D1* gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. Cancer Res., 54 : 4813-4817, 1994.
 - 28) Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., et al. : A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science, 264 : 436-440, 1994.