

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	藤谷 幹浩
学 位 論 文 題 目			
Reduced Expression of Syndecan-1 Affects Metastatic Potential and Clinical Outcome in Patients with Colorectal Cancer (大腸癌における Syndecan-1 発現低下と転移および予後との関連性に関する研究)			
共 著 者 名			
渡 二郎, 蘆田知史, 本田光則, 田邊裕貴, 藤城貴教, 斉藤裕輔, 高後 裕			
Japanese Journal of Cancer Reseach Vol. 92, No.10 October 2001 (平成 13 年 10 月) 掲載			
研 究 目 的			
<p>大腸癌における治療選択や予後予測の指標として TNM 分類が広く用いられている。しかし近年の治療法の多様化により、内視鏡治療、腹腔鏡手術の適応基準や stage II 病変に対する術後追加切除の選択など、TNM 分類のみでは十分に対応できない問題が指摘されるようになり、新たな転移・予後マーカーの確立が望まれている。</p> <p>Heparan sulfate proteoglycan は、細胞-細胞間、細胞-細胞外基質の接着や情報伝達に関与し、組織の発育や修復過程において中心的な役割をなすことが知られている¹⁾。この Heparan sulfate proteoglycan の一種である syndecan-1 は皮膚や消化管上皮に広く存在しており、我々は syndecan-1 発現が消化性潰瘍における胃粘膜上皮の修復や肝癌の悪性度に関係していることを見いだした^{2,3)}。本研究では大腸癌における syndecan-1 の転移・予後マーカーとしての意義とその発現制御機構を明らかにすることを目的とした。</p>			
材 料・方 法			
大腸癌組織			
1990 年から 1998 年までに旭川医科大学付属病院で手術を行った 105 例の大腸癌を対象とした。対象に術前治療を受けたものはなかった。臨床病理学的所見は UICC TNM 分類に従い評価した。生命予後については診療録を参照し、患者本人および家族の同意のもとに情報を得た。			

免疫組織化学的検討

切除標本から 4 μ m の連続切片を作製し, anti-syndecan-1 monoclonal antibody (MCA681, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA)を一次抗体として, avidin-biotin indirect immunoperoxidase 法で染色した. 正常 mouse IgG を 1 次抗体として染色したものを negative control とした.

染色性は以下の 4 段階に分類した. —: 陽性細胞を認めない, \pm : 弱い染色性のみ, もしくは陽性細胞が 25% 以下, +: 陽性細胞が 25% から 75%, ++: 陽性細胞が 75% 以上. 染色性の評価は臨床的な情報を得ていない 2 人の判定者により行った.

In situ hybridization (ISH)

ヒト新鮮胃粘膜より acid guanidinium-phenol-chloroform (AGPC) 法にて RNA を抽出, oligo dT primer を用いて逆転写反応を行い cDNA を生成した. 次に syndecan-1 遺伝子に特異的な 5' primer (Syn1) と 3' primer (Syn2) を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法にて DNA を増幅した. さらに, SP-6 promoter 配列をもつ 5' primer (Syn1SP6) と Syn2, T7 promoter 配列をもつ 3' primer (syn2 T7) と Syn1 を用いて PCR を行い, その産物を Digoxigenin で標識し sense, anti-sense RNA probe を作製した.

ISH には免疫染色で使用したものの隣の切片を用いた. 脱パラフィン後 proteinase K (25 mg/ml) と 37°C, 1 時間反応させ, 4% paraformaldehyde 溶液で再固定した. sense, anti-sense RNA probe にて 37°C, 18 時間 hybridization を行い, RNase A で処理後, 発色させた.

メチル化抑制実験

ヒト大腸癌細胞株 SKCO-1, SW480, COLO320DM, HT-29 を, メチル化酵素阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza dC) を用いて培養した. 培養液には Dulbecco's modified Eagle's medium あるいは RPMI medium を用いた. 5×10^5 個の細胞を 5cm の plate に撒き, 最終濃度 2 μ M の 5-aza dC を加えて 3-5 日間培養した.

Syndecan-1 mRNA の定量

Light CyclerTM を用いた fluorescence monitoring 法で定量した.

各細胞株から AGPC 法で RNA を抽出し, oligo-dT primers を用いて逆転写反応を行い cDNA を生成した. これを syndecan-1 遺伝子特異的 primer を用い PCR 法にて増幅し, 生成物の量を二本鎖 DNA に結合する蛍光色素を用いて計測した. 内部基準値として Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) mRNA も計測した. サンプル中の mRNA 含量を GAPDH mRNA の増幅量で補正し syndecan-1 mRNA 量を算出した.

統計学的解析

臨床病理学的所見と syndecan-1 発現との関連性の検討には χ^2 検定を用いた. syndecan-1 発現と予後の関係は Kaplan-Meier 法で累積生存率を求め, log-rank test により検定した. syndecan-1 発現の有無が独立した予後因子であるか否かの検討は Cox's proportional hazards model による多変量解析により行った. p 値が 0.05 未満を有意差ありとした.

成 績

正常大腸上皮および大腸癌組織における syndecan-1 蛋白の発現

大腸癌組織における syndecan-1 の発現を免疫組織化学的に解析した。正常大腸上皮細胞は全て syndecan-1 染色陽性であり主に基底側が染色された。一方、大腸癌組織では、一群が 105 病変中 26 病変、±群が 10 病変、+群が 51 病変、++群が 18 病変であった。染色部位は、正常上皮と同様に基底側が染色されるものと、細胞質がびまん性に染色されるものがあった。まとめると、syndecan-1 陽性群(+群, ++群)が 105 病変中 69 病変(65.7%), syndecan-1 陰性群(一群, ±群)が 36 病変(34.3%)であった。

大腸癌における syndecan-1 の発現低下と臨床病理学的所見の関係

syndecan-1 の発現と、大腸癌組織の病理学的特徴との関連性を解析した。

syndecan-1 陰性群では陽性群に比べ、リンパ節転移(15/36; 41.6%), 肝転移(6/36; 17%)の頻度が高く($p=0.0319$, 0.0116), 高分化腺癌に比し中・低分化腺癌(28/36; 78%)が多かった($p=0.0020$)。一方、年齢、性別、腫瘍径、T 因子に関しては両群間に差は無かった。

浸潤の初期段階である T1 癌に限って検討した結果、syndecan-1 陰性群では陽性群に比べ、リンパ節転移(6/15; 40.0%)および中・低分化腺癌(10/15; 66.7%)の頻度が高く($p=0.0479$, 0.0063)、さらに、癌細胞が小塊状、遊離細胞状に浸潤している部分(簇出)に一致して syndecan-1 の染色性低下を認めた。一方、脈管侵襲の有無は両群間に差がなかった。

大腸癌症例における syndecan-1 の発現と予後との関係

大腸癌組織における syndecan-1 の発現と大腸癌患者の予後との関係を検討した。

syndecan-1 陽性群の 5 年生存率は 85.4%で陰性群(58.1%)に比べ有意に累積生存率が高かった($p=0.0036$)。さらに多変量解析の結果、syndecan-1 発現低下は独立した予後不良因子であった (Hazard ratio 2.908, 95%CI 1.275-6.635)。

進行度による影響を避けるため stage II の 30 例を対象を限定し同様の検討を行った結果、syndecan-1 陽性群 21 例の 5 年生存率は 85.0%で陰性群 9 例(51.8%)に比べ有意に累積生存率が高かった($p=0.034$)。

syndecan-1 遺伝子の発現

大腸癌組織における syndecan-1 mRNA の発現を ISH で解析した。

その結果、正常大腸上皮細胞では全て syndecan-1 mRNA の発現が陽性であった。検討した大腸癌組織では、免疫染色が陽性であった部分では ISH も陽性、免疫染色が陰性であった部分では ISH 陰性であった。

また、大腸癌細胞株を用いてメチル化抑制実験の結果、4 種全ての細胞株でメチル化抑制により syndecan-1 mRNA の発現増加を認め、増加率(% increase)は SKCO-1 では 353%, COLO320 で 219%, HT29 で 210%, SW480 で 150%であった。

考 按

本研究で我々は syndecan-1 の発現低下が、大腸癌における組織学的分化度の低下や浸潤、転移と強く相関する事、さらに TNM 分類とは独立した予後不良因子である事を明らかにした。すなわち、syndecan-1 は大腸癌の浸潤・転移に抑制的に働く重要な分子であり、発現が低下している症例では術後追加治療を積極的に行うべきであると考えられる。

腸管上皮において syndecan-1 は腺管構造の形成や修復に中心的役割を果たす分子であること¹⁾²⁾、大腸腺腫から癌に進展する際に syndecan-1 の発現が低下することが報告されている。さらに、本研究で大腸癌のなかでも中、低分化腺癌や癌先進部の遊離癌細胞で syndecan-1 の著明な発現低下を認めること、その反面、尿管侵襲の有無と syndecan-1 の発現は関連性がないことが示された。これらの事実は、syndecan-1 が正常腸管上皮のみならず癌組織においても、腺管形成や細胞接着に重要な役割を果たし、その発現低下は癌転移の初期段階である間質浸潤の過程に関与することを示唆している。syndecan-1 が bFGF の co-receptor として働くことや大腸腺腫から大腸癌へと進展するにつれ bFGF receptor の発現も低下することが報告されており、syndecan-1 の発現低下は、接着分子としての作用と bFGF の co-receptor としての作用の両方を低下させ、癌の脱分化を引き起こすのかもしれない。

癌細胞における syndecan-1 発現低下のメカニズムについて、細胞外ドメインが蛋白分解酵素により切断されるとの報告や、mRNA 3'末端の非翻訳領域の異常に起因するとの報告がある。我々は ISH により syndecan-1 蛋白と mRNA の発現が一致していること、さらに大腸癌細胞株においてメチル化抑制により syndecan-1 mRNA の発現量が増加することを明らかにした。これらの結果から、大腸癌細胞における syndecan-1 の発現抑制は、遺伝子 promoter 領域のメチル化に起因する可能性が示唆された。この点については、メチル化抑制による syndecan-1 蛋白発現量の検討やメチル化特異的 PCR 法などを用いた遺伝子解析によりさらに明確にしていく必要があると考えられる。

結 論

大腸癌細胞における syndecan-1 の発現低下は、癌の浸潤・転移に密接に関係しており、重要な予後不良マーカーと考えられた。また、大腸癌細胞における syndecan-1 の発現低下に、遺伝子 promoter 領域のメチル化の関与が示唆された。

引 用 文 献

- 1) Perrimon N, Bernfield M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 404: 725-728, 2000
- 2) Tanabe H, Yokota K, Kohgo Y. Localization of syndecan-1 in human gastric mucosa associated with ulceration. *J Pathol* 187: 338-44, 1999.

3) Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer* 74: 482-91, 1997;.

参 考 論 文

1) Fujiya M, Maruyama M: Small depressed neoplasms of the large bowel: radiographic visualization and clinical significance. *Abdom Imaging* 22: 325-331, 1997

2) 藤谷幹浩, 富松久信, 光永憲央, 瀬の口洋史, 斉藤彰一, 浜本順博, 早川尚男, 池延東男, 市川平三郎: 胃の小発赤斑の内視鏡的検討. *Gastroenterol Endosc* 38: 1020-1028, 1996.

3) 藤谷幹浩, 渡 二郎, 斉藤裕輔, 太田智之, 村上雅則, 折居 裕, 高後 裕: 早期大腸癌のX線診断—治療方針決定のための深達度診断を中心に. *消化器科* 27: 46-53, 1998.

4) 藤谷幹浩, 北 慎一郎, 斉藤裕輔, 斉藤浩之, 小野寺秀, 富樫一夫, 綾部時芳, 蘆田知史, 北守 茂, 横田欽一, 並木正義: 微小表層型リンパ腫の1例. *Gastroenterol Endosc* 34: 846-854, 1992.

5) 渡 二郎, 斉藤裕輔, 藤谷幹浩, 太田智之, 折居 裕, 高後 裕: 大腸癌発育進展のメインルート—隆起型・表面型大腸癌の位置づけ. *Pharma Media* 17: 37-42, 1999.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	藤 谷 幹 浩
審査委員長 葛 西 眞 一 ㊞ 審査委員 高 後 裕 ㊞ 審査委員 原 潤 保 明 ㊞ 審査委員 塩 野 寛 ㊞			
学 位 論 文 題 目 Reduced Expression of Syndecan-1 Affects Metastatic Potential and Clinical Outcome in Patients with Colorectal Cancer (大腸癌における syndecan-1 発現低下と転移および予後との関連性に関する研究) syndecan-1 は皮膚や消化管上皮に広く存在する膜貫通型のプロテオグリカンであり、細胞-細胞間、細胞-細胞外基質の接着や情報伝達に深く関与している。論文発表者らは、肝細胞癌の組織学的分化度や転移あるいは胃潰瘍における粘膜修復に syndecan-1 の発現が深く関係している事を明らかにしてきた。一方、大腸癌は癌死亡原因の上位を占める疾患であり、診断・治療の目安には TNM 分類が広く用いられている。しかし最近の治療法の進歩により、内視鏡治療、腹腔鏡手術の適応や術後治療の選択基準など、TNM 分類では十分に対応できない問題が指摘され、新たな転移・予後マーカーの確立が望まれている。本論文では大腸癌における syndecan-1 の発現を調べ、転移・予後マーカーとしての意義およびその発現制御機			

構を検討した。

大腸癌 105 例を対象として免疫組織化学的に検討した結果、69 例 (65.7%)では正常大腸上皮とほぼ同等の syndecan-1 の発現を認めたのに対し、36 例 (34.3%)では明らかな発現低下を認め、これら発現低下例では陽性例に比し、リンパ節転移、肝転移および中・低分化腺癌の頻度が有意に高かった。さらに予後調査の結果、syndecan-1 発現低下例では累積生存率が低く、多変量解析により独立した予後不良因子であることが示された。以上から、syndecan-1 の発現低下は大腸癌の有用な転移・予後マーカーであることが明らかにされた。

また、大腸癌組織に対し *in situ* hybridization を行った結果、syndecan-1 蛋白の発現は mRNA の発現と一致することが確認され、さらにメチル化抑制剤 5-aza-2'-deoxycytidine を用いた培養実験の結果、4 種の大腸癌細胞株においてメチル化抑制により syndecan-1 mRNA 発現は増加していた。以上から大腸癌における syndecan-1 の発現低下に遺伝子メチル化が関与している可能性が示唆された。

本研究は大腸癌の転移・予後を予測できる新しい分子マーカーを明らかにした重要な論文であり、この分野の研究の発展に寄与すると考えられる。

論文提出者に対する試問審査においても適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることを確認した。以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値するものと判定した。