

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

臨床病理 (1995.03) 43巻3号:227～232.

食道癌の診断と治療-最近の進歩
食道癌におけるDNA量解析と主要組織適合抗原の発現

平田 哲、山崎弘資、久保良彦、松井英夫

▷食道癌の診断と治療—最近の進歩(4)◁

食道癌における DNA 量解析と主要組織適合抗原の発現

平田 哲*¹ 山崎 弘 資*²
久保 良彦*³ 松井 英夫*⁴

DNA Content Analysis and Expression of Human Leucocyte Antigen on Esophageal Cancer

Satoshi HIRATA, MD*¹, Kosuke YAMAZAKI, MD*²,
Yoshihiko KUBO, MD*³ and Hideo MATSUI*⁴

To examine the usefulness of DNA analysis of cancer cells in estimating the prognosis of the patients with cancer, we measured the DNA content of cancer cells using flow cytometry in 82 patients bearing esophageal cancer. Although neither DNA content nor DNA ploidy alone was a prognostic factor, the aneuploid pattern with a DNA index greater than 1.3 was an indicator of poor prognosis.

In addition, we studied the HLA class I expression in the same patient group using immunohistochemical staining (anti-HLA class I monoclonal antibody; w6/32). Forty-four cases (53.7%) were HLA class I positive and 38 (46.3%) were negative. Pathological lymph node metastasis was found more frequently in HLA class I negative patients than positive patients with statistical significance ($p < 0.05$). The tumors with positive HLA expression induced significantly more TILs around them ($p < 0.05$). The patients with the aneuploid pattern and negative HLA class I appeared to have the poorest prognosis from the survival curve study, although the difference was not statistically significant.

These findings suggest that the expression of HLA class I on tumors is an important prognostic factor in patients with esophageal cancer.

[Jpn J Clin Pathol 43:227~232, 1995]

*¹The 1st Surgical Department, Asahikawa Medical College, Asahikawa 078

【Key Words】 esophageal cancer(食道癌), DNA content(DNA量), DNA ploidy, HLA, TIL

手術手技の確立, 術前術後管理の進歩により食道癌の成績も向上し, リンパ節の3領域郭清や浸潤臓器合併切除など拡大手術も安全に行われるようになった。一方, 診断学の進歩より早期の発見を可能にし, 内視鏡的粘膜切除など手術以外の侵襲度の軽い治療が適用される症例もみられるようになった。

しかし, m_1 , m_2 の表在癌の成績は良好であるが, 未だ日常診療で遭遇する多くの深達度 sm 以上の腫瘍の治療成績は決して満足するものではない。教室の食道癌の成績は耐術例の5年生存率が30.5%である。また, その再発死亡の多くは術後2年以内という成績である。

*¹⁻³旭川医科大学第一外科, **同 附属病院病理部(〒078 旭川市西神楽4線5号3-11)

近年、悪性腫瘍に関していろいろな観点からみた悪性度の仕事の報告が多い。1986年、Kokal⁴⁾は colorectal cancer の癌細胞核 DNA 量をフローサイトメトリー (FCM) を用い測定し、予後に影響すると報告した。大量の癌細胞を短時間に処理し、その細胞の情報をコンピュータで定量的に数量化されるフローサイトメトリーの進歩は、これらの癌細胞の研究に大きく貢献した。教室でも 1983 年より、FCM を用いる食道癌、大腸癌における癌細胞核 DNA 量の解析を行ってきた。

さらに、癌の悪性度は癌細胞自体の悪性度と宿主側の免疫系などの因子の拮抗の上に成り立っていると考えられることから、宿主側の防御因子の解析として、主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) の腫瘍における発現を同時に検索し評価した。HLA Class I 抗原は外来抗原を提示する機能を持ち CD8 陽性 T 細胞の分化誘導に関与している。また、HLA Class I 抗原はほとんどの体細胞に発現しているが、細胞の癌化により消失したり、減弱すると報告されている²⁾³⁾。

I. 大腸癌および食道癌における癌細胞核 DNA 量の測定

A. フローサイトメトリー

パラフィンブロックからの細胞の調整は Hedley⁴⁾の方法に準じて行った。即ち、3 μm 切片を作製後、HE 染色を行って癌巢の部を確認し、同部位の 50 μm 切片を 1~2 枚を作製する。50 μm 切片を xylene にて 10 分ごと 3 回脱パラし、99.5% から 50% の ethanol 系列で親水化した。蒸留水で 2 回洗浄後、0.5% ペプシン (pH 1.5 HCL, Sigma, 1:60000) にて 37°C, 90 分処理し細胞単離、裸核化した。ガーゼで濾過した後、生食で 3 回洗浄、1500 units/ml RNase A (Worthington Biochemical Corporation) にて 37°C, 30 分処理した。さらに生食で

洗浄した後、100 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI, Carbiochem) にて 30 分蛍光染色した。これらの資料を 40 μm ナイロンメッシュで濾過し、EPICS-C Clinical Flow Cytometer (Coulter Electronics) にて 10000 から 15000 個の細胞 (核) を測定した。腫瘍組織中の contamination した正常細胞を internal standard とし、この G_0/G_1 peak を diploid G_0/G_1 peak とした。

B. DNA histogram の解析

DNA index (DI) は癌組織の G_0/G_1 のピークチャンネル数を internal standard の G_0/G_1 のピークチャンネル数で割った商として計算し、DI が 1.0 のものを diploidy, それ以外を aneuploidy とした。パラフィンブロック材料のため、やや CV 値が高かったが、検討に際しては CV 値が 5% 以下の症例のみ使用した。

C. 統計学的検討

生存率は Kaplan-Meier 法で算出し、その検定を generalized Wilcoxon 法で行った。また、他の検定にはカイ二乗検定を用いた。

D. 対象

教室において術前加療のない原発性食道癌症例 82 例を対象とした。

E. 結果

癌細胞核 DNA 量にて diploidy であった症例は 47 例、aneuploidy であった症例は 35 例であった。aneuploidy のうち、hypoploid は 3 例、DI が 1.3 未満のものは 17 例、DI が 1.3 以上のものは 15 例であった (Table 1)。

abnormal G_0/G_1 peak が複数存在する heterogeneity の症例は 8 例 (9.8%) あった。DNA ploidy と摘出標本におけるリンパ節転移との関係ではリンパ節転移陽性例 52 例中、diploidy 30 例 (57.7%), aneuploidy 22 例 (42.3%) であった。一方、リンパ節転移陰性の 30 例中 diploidy は 17 例

Table 1 FCM analysis on 82 esophageal carcinomas

DNA ploidy pattern	diploid	47 cases (57.3%)
	aneuploid	35 cases (42.7%)
	DI < 1.30	17 cases
	DI \geq 1.30	15 cases
	hypoploid	3 cases

	heterogeneity	8 cases (9.8%)

(56.7%)で, aneuploidy 13例(43.3%)であり, リンパ節転移と ploidy pattern において相関性は認められなかった (Table 2)。

腫瘍周囲のリンパ球浸潤 (tumor infiltrating leucocyte, TIL) と ploidy pattern の相関をみた。TILの多くは T cell であったが, TIL(+)の51例中, diploidy 29例, aneuploidy 22例であり TIL(-)の31例中 diploidy 18例, aneuploidy 13例であった (Table 3)。

ploidy pattern による生存曲線を教室の山崎が大腸癌症例で検討したが, Kokalの報告と同様に diploidy 症例の予後が有意に良好であった (Fig. 1)。一方, 同様の検討を食道癌症例で行ったが, 差は認められなかった (Fig. 2)。しかし, aneuploidy 症例を DI 1.3未満と1.3以上の群にわけ検討すると, 深達度 a_{1+2+3} の進行した癌でも (Fig. 3a), リンパ節転移陽性例 (Fig. 3b)でも, DI 1.3以上の high ploidy aneuploidy の症例の予後が不良であっ

た (Fig. 3)。

II. 食道癌腫瘍組織における主要組織適合抗原 (特に HLA Class I 抗原) の発現

A. 対象と方法

前述の癌細胞核 DNA 量の検索をした食道癌症例 82例を対象とした。方法は HLA Class I 抗原に対するモノクローナル抗体 w6/32 (Sera Lab 社) を一次抗体として用い, 免疫組織染色を行った。全体の癌細胞における染色された細胞の比を算出し, 50%を越える症例を陽性とした。

腫瘍周囲のリンパ球浸潤 (TIL) の評価は HE 染色にて (++) (+) (±) (-) と4段階に分け, (++) (+) を陽性とした。また, 20例は抗 CD3 抗体で染色し TILの主体が T細胞であり, 他の症例は HE 染色のみで評価した。

B. 統計学的検討

前述の方法と同様に生存率を Kaplan-Meier 法

Table 2 Difference in nodal metastasis between diploid and aneuploid cases

		diploid	aneuploid
lymph node metastasis (+)	52 cases	30 (57.7%)	22 (42.3%)
lymph node metastasis (-)	30 cases	17 (56.7%)	13 (43.3%)

N.S.

Table 3 Difference in the presence of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) between diploid and aneuploid cases

		diploid	aneuploid
TIL positive	51 cases	29 (56.9%)	22 (43.1%)
TIL negative	31 cases	18 (58.1%)	13 (41.9%)

N.S.

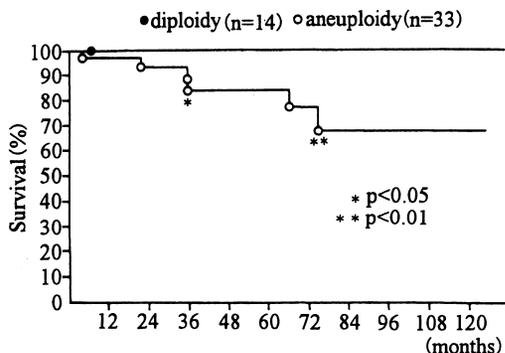


Figure 1 Survival curves of colorectal cancers by classification of DNA ploidy.

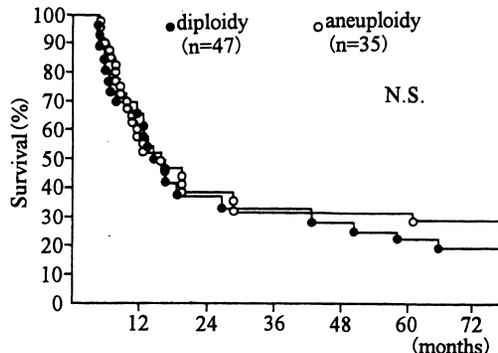


Figure 2 Survival curves of esophageal cancers by classification of DNA ploidy.

で算出し、その検定を generalized Wilcoxon 法で行った。また、他の検定にはカイ二乗検定を用い

た。

C. 結果

術前加療のない食道癌 82 例における腫瘍組織の HLA Class I 抗原の発現は、陽性 44 例 (53.7%)、陰性 38 例 (46.3%) であった (Table 4)。病理組織学的因子との検討では分化度との相関性は認められなかった。リンパ節転移では HLA Class I 抗原の発現の陽性だった 44 例中 23 例 (52.3%) がリンパ節転移陽性であり、21 例 (47.7%) がリンパ節転移陰性であった (Table 5)。一方、HLA Class I 抗原の発現の陰性であった 38 例中 29 例 (76.3%) がリンパ節転移陽性であり、9 例 (23.7%) が陰性であり HLA Class I 抗原の陰性例に有意にリンパ節転移が多かった ($p < 0.05$)。これは深達度 a_0 症例に限っても同様であった。

腫瘍周囲のリンパ球浸潤 (TIL) と HLA 抗原の発現との相関をみた。TIL 陽性の 51 例中、HLA Class I 抗原の発現の陽性であった症例は 33 例、陰性例は 18 例であった。TIL 陰性の 31 例中 HLA Class I 抗原の発現の陽性であった症例は 11 例、陰性例は 20 例であった (Table 6)。HLA Class I 抗原陽性の症例に、腫瘍周囲のリンパ球浸潤 (TIL) の出現が多かった ($p < 0.05$)。

次に生存率での検討をした。diploidy 47 例では、HLA 抗原の発現の有無による予後への影響は認められなかった。aneuploidy 35 例では HLA Class I 抗原陰性の症例の予後が不良であったが、統計学的

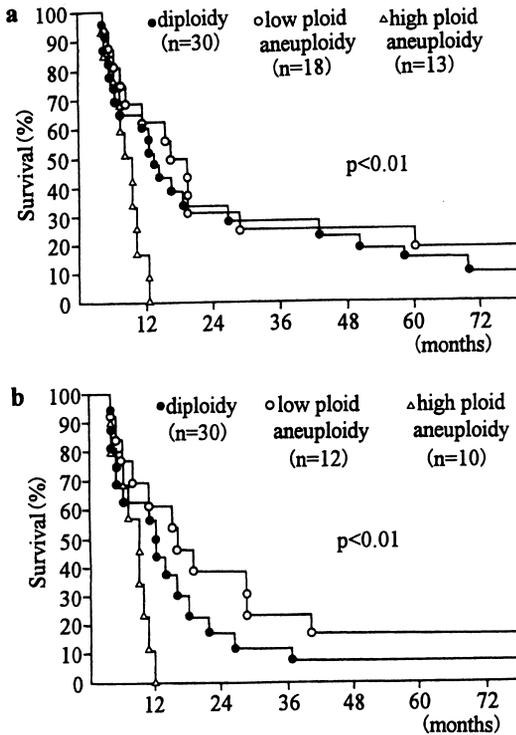


Figure 3 Survival curves between high ploidy aneuploid and low ploidy aneuploid (a: a_{1+2+3} cases, b: lymph node metastatic cases).

Table 4 HLA Class I expression on esophageal cancers

all cases (82 cases)	positive	44 cases (53.7%)
	negative	38 cases (46.3%)

Table 5 Difference in nodal metastasis on HLA Class I expression

		n (+)	n (-)
HLA Class I	positive (44)	23 (52.3%)	21 (47.7%)
HLA Class I	negative (38)	29 (76.3%)	9 (23.7%)

($p < 0.05$)

Table 6 Relationship between DNA ploidy and TIL

		HLA class I (+)	HLA class I (-)
TIL positive	51 cases	33 (64.7%)	18 (35.3%)
TIL negative	31 cases	11 (35.5%)	20 (64.5%)

($p < 0.05$)

有意差は得られなかった (Fig. 4)。

III. 考 察

予後不良な食道癌の成績向上のため、診断、治療の研究と並行し、多くの malignant potential の仕事が行われてきた。しかし、現時点ではリンパ節転移因子など食道癌取り扱い規約⁹⁾の各因子以外の明確なものも報告されていない。近年、フローサイトメトリー (FCM) の進歩により、短時間に大量の細胞の性質を数量化することができ、多くの cytological な研究が行われてきた。固形癌においても細胞核 DNA 量や細胞回転、癌特異抗原などの仕事が行われてきた。食道癌における癌細胞核 DNA 量の報告では現在のところ、DNA ploidy だけでは食道癌の予後を評価できないというのが多くの研究者の一致した意見である。筑波ら⁶⁾は Aneuploidy 症例に ly(+), リンパ節転移が多いと報告しているが、異論のあるところでもある。また、癌細胞核 DNA 量の異常に多いもの (たとえば、DI が 1.3 以上, 1.7 以上, 1.8 以上) の予後は不良であるという報告も多い⁷⁻⁹⁾、一方、掛谷ら¹⁰⁾は、ひとつの腫瘍のなかに多数の stem line の存在する heterogeneity の存在する症例の予後は不良だと報告している。教室の成績でも heterogeneity の存在する症例は 8 例 (9.8%) はあり、その予後も不良であった。従来言われている、発癌における stem cell line theory の概念に対し、この heterogeneity という腫瘍の状態の存在は、食道癌がモノクローナルな発生にせよポリクローナルな発生にせよ、癌の増殖中に腫瘍を形成する stem cell は変動していると考えられた。また、Heterogeneity の存在する症例において癌遺伝子 hst-1 増幅率が 7 倍以上のものでは臓器再発が高頻度であり、2 年生存はないという筑波らの報告¹¹⁾や、DI が 1.7 以上の症例でしかも Leu7 陽性細胞 (NK 細胞) 浸潤度が低い症例は予後が非常に悪いという入江の報告¹²⁾がある。このように ploidy pattern や DI 値を指標として食道癌の予後を推測することは困難であり、核 DNA 量と他の予後因子との組み合わせによる検討も最近多くみられる。

我々は DNA ploidy 単独では食道癌の予後を評価できないと考え、癌組織周囲の免疫ネットワークに影響を与えると考えられる癌細胞における主要組織適合抗原 (HLA) の発現について検討を加えた。

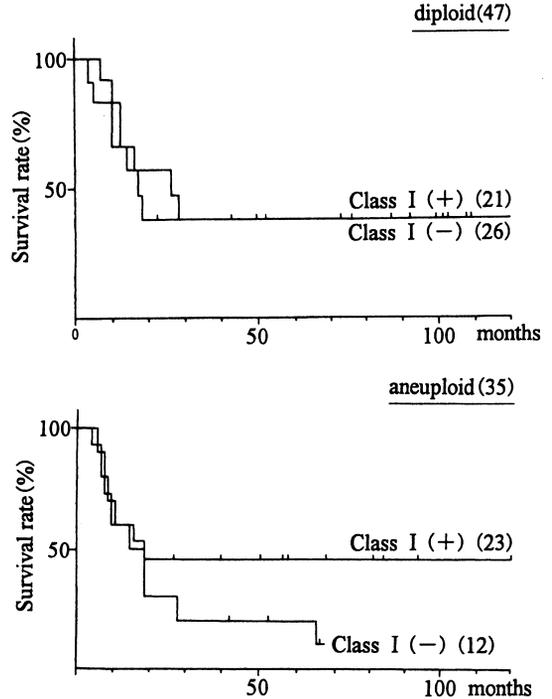


Figure 4 Survival curves of esophageal cancers on HLA Class I expression between diploid and aneuploid.

HLA Class I 抗原は外来抗原を提示する機能を持ち CD8 陽性 T 細胞の分化誘導に関与し、ほとんどの体細胞に発現しているが、細胞の癌化により消失したり、減弱すると報告されている²⁾³⁾。しかし食道癌における主要組織適合抗原 (HLA) の発現に関する報告は現在のところ皆無である。我々の今回の検討では HLA Class I 抗原陰性の症例ではリンパ節転移例が多く、腫瘍周囲のリンパ球浸潤 (TIL) の反応性が悪い結果を得た。TIL の主体は T cell であることは我々も CD3 などの染色にて確認しているが、その subset までは確認できていない。腫瘍組織における HLA 抗原の発現と腫瘍周囲免疫ネットワークに関する問題を今後、より詳細に検討しなければならないと考えている。また、癌細胞の RNA 量や増殖能力 (Ki-67, PCNA) さらには oncogene の異常発現の有無などの検索を含め詳細に解析し、臨床的意義を総合的に解析していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) Kokal WA, et al: Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg 121: 1434, 1986
- 2) Fleming KA, et al: Distribution of HLA class A1 antigens in normal human tissue and in mammary cancer. J Clin Pathol 34: 779, 1981
- 3) Natali PG, et al: Distribution of human class I (HLA-A, B, C) histocompatibility antigens in normal and malignant tissue of nonlymphoid origin. Cancer Research 44: 4679, 1984
- 4) Hedley DW, et al: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31: 1333, 1983
- 5) 食道疾患研究会編: 食道癌取り扱い規約 (第8版), 東京: 金原出版, 1992
- 6) 筑波貴与根, 他: hst-1, int-2 遺伝子同時増幅と核 DNA 量の組み合わせによる食道癌悪性度の評価. 日消外科会誌 25(2): 381, 1992
- 7) 山崎弘資: フローサイトメトリーによる食道癌および大腸癌の DNA ploidy の解析—予後, 病理所見, 家族歴との関連について—. 日外会誌 90(8): 1186, 1989
- 8) 掛谷和俊, 他: 食道癌核 DNA 量による悪性度の術前生検診断. 癌と化学療法 20(6): 741, 1993
- 9) 力武 浩, 他: 食道癌. KARKINOS 4(7): 821, 1991
- 10) 掛谷和俊, 他: Heterogeneity を考慮した食道癌原発巣および転移巣における核 DNA 量の解析. 日本癌学誌 49: 245, 1990
- 11) 筑波貴与根, 他: Heterogeneity を考慮した hst-1 高度増幅と食道癌悪性度との関連. 癌と化学療法 20(6): 763, 1993
- 12) 入江 均: 食道癌の細胞核 DNA 量による悪性度と担癌宿主の免疫応答に関する研究. 日消外学誌 22(6): 1161, 1989