

学 位 論 文 題 名

Cyclin D1, E2F1 expression levels are associated  
with characteristics and prognosis  
of esophageal squamous cell carcinoma

(Cyclin D1, E2F1の発現レベルは食道扁平上皮癌の特徴  
および予後に関連する)

学位論文内容の要旨

背景と目的

食道扁平上皮癌患者の予後は、外科的技術や術後管理、集学的治療の進歩によって、近年改善してきたものの術後 5 年粗生存率は依然 50%を下回っている。こうしたことから新しい臨床病理学的予後因子の解析および補助療法の研究、開発が必要と考えられる。近年、食道扁平上皮癌と細胞周期に関与する遺伝子に関する報告を認める。Cyclin D1 は細胞周期の G1 期において働く主要な因子のひとつであり、頭頸部癌などでその過剰発現が報告されており、癌細胞の増殖に関与していると考えられている。E2F1 も同様に腫瘍の増殖に関与すると考えられており、これらは共に Cdk-Rb 経路における重要な遺伝子である。今回 122 例の食道扁平上皮癌切除標本を用いてこれらの遺伝子に対する免疫染色を行い、臨床病理学的因子から予後に至るまで検討し、Cyclin D1, E2F1 の発現に対する生物学的意義を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

対象および方法

1989 年から 1999 年に北海道大学付属病院および関連 2 施設において根治切除術が施行された術前未治療の原発性食道扁平上皮癌症例 122 例を対象とした。122 例の内訳は、男性 105 例、女性 17 例、平均年齢 62.3 歳(38-82 歳)であり、平均観察期間は 29 ヶ月であった。切除された食道癌における最深部切片において、それぞれ Anti-Cyclin D1, E2F1 monoclonal 抗体を一次抗体としビオチン化 2 次抗体、DAB を用い免疫染色を施行した。Cyclin D1, E2F1 の免疫染色の評価については共に食道扁平上皮癌細胞核における染色率が癌細胞全体の 10%以上を陽性群(+), 10%未満を陰性群(-)と分類し、臨床病理学的所見、予後との相関をそれぞれ比較検討した。さらに Cyclin D1, E2F1 を組み合わせた評価を行うために、Cyclin D1/E2F1 (-/-), Cyclin D1/E2F1 (+/-), Cyclin D1/E2F1 (-/+), Cyclin D1/E2F1 (++) に分類し、それぞれの群における相関について同様の検討を行った。統計解析は、chi-square test ならびに Fisher's exact test を用いた。生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し、Log rank 法にて比較検討した。Cox 比例ハザードモデルを用い、それぞれの

群において比較し、予後に及ぼす影響を検討した。

### 結果

免疫染色では、Cyclin D1, E2F1 の染色は共に食道扁平上皮癌細胞核に認められ、正常細胞では認めなかった。Cyclin D1, E2F1 の発現と背景因子との間に有意な相関は認めなかった。Cyclin D1 発現群は 59 例(48.4%)、非発現群は 63 例(51.6%)であった。臨床病理学的因子の検討について、pStage( $p=0.0112$ ), pT( $p=0.0497$ ), pN( $p<0.0001$ )および腫瘍径( $p=0.0105$ )と有意な相関を認めた。術後 5 年生存率に関して、Cyclin D1 発現群は非発現群と比較して有意に予後不良であった( $p=0.0490$ )。一方、E2F1 発現群は 73 例(59.8%)、非発現群は 49 例(40.2%)であった。臨床病理学的因子の検討について、pStage( $p=0.0103$ ), pT( $p=0.0192$ ), pGrade( $p=0.0014$ )と有意な相関を認め、術後 5 年生存率に関して、E2F1 発現群は非発現群と比較して有意に予後不良であった( $p=0.0290$ )。さらに、両者を合わせた検討においては、Cyclin D1, E2F1 が共に発現していた Cyclin D1/E2F1(+ / +)群は 41 例(33.6%)で、Cyclin D1/E2F1(- / -)群は 31 例(25.4%)であり、Cyclin D1/E2F1(- / -)群と、どちらか一方の発現を認めた群との比較において、臨床病理学的因子の検討について、pStage( $p=0.0019$ ), pT( $p=0.0067$ ), pN( $p<0.0001$ ), pGrade( $p=0.0001$ )および腫瘍径( $p=0.0284$ )と有意な相関を認めた。術後 5 年生存率に関して、Cyclin D1/E2F1(- / -)群は他のどちらか一方が発現している群と比較して有意に予後良好であった( $p=0.0232$ )。

### 考察

本研究において Cyclin D1 の発現と食道扁平上皮癌患者における臨床病理学的因子との相関に対する検討の結果は、頭頸部扁平上皮癌などでこれまで報告された結果と同様であり、Cyclin D1 の過剰発現は、腫瘍の深達度を増大させ、予後不良につながり、悪性度と関係していることが確認された。また E2F1 の過剰発現についても、腫瘍の増大、リンパ節転移および予後と相関していた。これらの結果は、組織系や実験的状況にもよるが、Cyclin D1 と E2F1 が発癌もしくは腫瘍の増大に関与することを示唆する。E2F1 は Cyclin-Cdk-Rb 経路で制御される最も有名な転写制御因子であるため、これらを同時に分析することで、Cyclin D1 と E2F1 における生物学的機能および相互関係の意義をより詳細に評価できると考えた。本研究は、食道扁平上皮癌切除症例における Cyclin D1 と E2F1 の発現を同時に解析した最初の報告である。本研究の結果、これら 2 つの遺伝子を同時に解析することが、食道扁平上皮癌の特徴を予測する上で、個々の遺伝子分析より有用であると考えられた。今後、臨床の場において、内視鏡検査によって術前に得られる生検標本を用いて Cyclin D1 と E2F1 の発現を調べることは、腫瘍マーカーのひとつとして有用な情報を与え、治療法を選択する指標になる可能性も考えられる。また将来、Cyclin D1 と E2F1 によって制御される経路を抑制する治療法が、食道扁平上皮癌患者のために有用となる可能性も考えられる。

以上より、Cyclin D1 と E2F1 の免疫組織化学研究が食道扁平上皮癌の特徴と食道扁平上皮癌患者の予後予測において重要であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

## Cyclin D1, E2F1 expression levels are associated with characteristics and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma

(Cyclin D1, E2F1の発現レベルは食道扁平上皮癌の特徴  
および予後に関連する)

近年、食道扁平上皮癌と細胞周期に関与する遺伝子に関する報告を認める。Cyclin D1 は細胞周期の G1 期において働く主要な因子のひとつであり、頭頸部癌などでその過剰発現が報告されており、癌細胞の増殖に関与していると考えられている。E2F1 も同様に腫瘍の増殖に関与すると考えられており、これらは共に Cdk-Rb 経路における重要なタンパク質である。今回申請者は、122 例の食道扁平上皮癌切除標本を用いてこれらの遺伝子に対する免疫組織染色を行い、臨床病理学的因子から予後に至るまで検討し、Cyclin D1、E2F1 の発現に対する生物学的意義を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

1989 年から 1999 年に北海道大学病院および関連 2 施設において根治切除術が施行された術前未治療の原発性食道扁平上皮癌症例 122 例を対象とした。122 例の内訳は、男性 105 例、女性 17 例、平均年齢 62.3 歳(38-82 歳)であり、平均観察期間は 29 ヶ月であった。切除された食道癌における最深部切片において、それぞれ抗 Cyclin D1、E2F1 モノクローナル抗体を 1 次抗体としビオチン化 2 次抗体、DAB を用い免疫染色を施行した。Cyclin D1、E2F1 の免疫染色の評価については共に食道扁平上皮癌細胞核における染色率が癌細胞全体の 10% 以上を陽性群(+)、10%未満を陰性群(-)と分類し、臨床病理学的所見、予後との相関をそれぞれ比較検討した。さらに Cyclin D1、E2F1 を組み合わせた評価を行うために、Cyclin D1/E2F1 (-/-)、Cyclin D1/E2F1 (+/-)、Cyclin D1/E2F1 (-/+), Cyclin D1/E2F1 (+/+) に分類し、それぞれの群における相関について同様の検討を行った。統計解析は、chi-square test ならびに Fisher's exact test を用いた。生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し、Log rank 法にて比較検討した。

免疫染色では、Cyclin D1、E2F1 の染色は共に食道扁平上皮癌細胞核に認められ、正常細胞では認めなかった。Cyclin D1、E2F1 の発現と背景因子との間に有意な相関は認めなかつ

た。Cyclin D1 発現群は 59 例(48.4%)、非発現群は 63 例(51.6%)であった。臨床病理学的因子の検討について、pStage(p=0.0112)、pT(p=0.0497)、pN(p<0.0001)および腫瘍径(p=0.0105)と有意な関係を認めた。術後5年生存率に関して、Cyclin D1 発現群は非発現群と比較して有意に予後不良であった(p=0.0490)。一方、E2F1 発現群は 73 例(59.8%)、非発現群は 49 例(40.2%)であった。臨床病理学的因子の検討について、pStage(p=0.0103)、pT(p=0.0192)、pGrade(p=0.0014)と有意な関係を認め、術後5年生存率に関して、E2F1 発現群は非発現群と比較して有意に予後不良であった(p=0.0290)。さらに、両者を合わせた検討においては、Cyclin D1、E2F1 が共に発現していた Cyclin D1/E2F1(+/+)群は 41 例(33.6%)で、Cyclin D1/E2F1(-/-)群は 31 例(25.4%)であり、Cyclin D1/E2F1(-/-)群と、どちらか一方の発現を認めた群との比較において、臨床病理学的因子の検討について、pStage(p=0.0019)、pT(p=0.0067)、pN(p<0.0001)、pGrade(p=0.0001)および腫瘍径(p=0.0284)と有意な相関を認めた。術後5年生存率に関して、Cyclin D1/E2F1(-/-)群は他のどちらか一方が発現している群と比較して有意に予後良好であった(p=0.0232)。

本研究において Cyclin D1 の発現と食道扁平上皮癌患者における臨床病理学的因子との関係に対する検討の結果は、頭頸部扁平上皮癌などでこれまで報告された結果と同様であり、Cyclin D1 の過剰発現は、腫瘍の深達度を増大させ、予後不良につながり、悪性度と関係していることが確認された。また E2F1 の過剰発現についても、腫瘍の増大、リンパ節転移および予後と関係していた。これらの結果は、組織系や実験的状況にもよるが、Cyclin D1 と E2F1 が発癌もしくは腫瘍の増大に関与することを示唆する。E2F1 は Cyclin-Cdk-Rb 経路で制御される最も有名な転写制御因子であるため、これらを同時に分析することで、Cyclin D1 と E2F1 における生物学的機能および相互関係の意義をより詳細に評価できると考えた。本研究は、食道扁平上皮癌切除症例における Cyclin D1 と E2F1 の発現を同時に解析した最初の報告である。本研究の結果、これら2つの遺伝子を同時に解析することが、食道扁平上皮癌の特徴を予測する上で、個々の遺伝子分析より有用であると考えられた。今後、臨床場において、内視鏡検査によって術前に得られる生検標本を用いて Cyclin D1 と E2F1 の発現を調べることは、予後予測因子のひとつとして有用な情報を与え、治療法を選択する指標になる可能性も考えられる。また将来、Cyclin D1 と E2F1 によって制御される経路を抑制する治療法が、食道扁平上皮癌患者のために有用となる可能性も考えられる。

以上より、Cyclin D1 と E2F1 の免疫組織化学研究が食道扁平上皮癌の特徴と食道扁平上皮癌患者の予後予測において重要であると考えられた。

口頭発表において、副査今村雅寛教授より①Cyclin D1 のみ発現群と E2F1 のみ発現群を比較検討した場合の有意差について、②免疫染色の評価に関し、10%をカットオフ値と定めた理由について、③それぞれの遺伝子の発現群に対し、陽性率で分類した評価について、④Rb 経路における cyclin E など他の因子を加えた検討について、質問があった。続いて副査近藤 哲教授より①Rb や p53 などの他の遺伝子との組み合わせた検討について、質問があった。最後に主査秋田弘俊教授より、①前癌病変である dysplasia での発現について、②免疫染色の染色強度および同一標本内での不均一性について、③細胞周期マーカーの Ki-67 との関係について、④臨床における生検検体での評価について質問があったが、いずれの質問

に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえて適切な回答をした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。