

学 位 論 文 題 名

DRD2/DARPP-32 Expression Correlates with
Lymph Node Metastasis and Tumor Progression in
Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

（食道扁平上皮癌症例における DRD2/DARPP-32 遺伝子の発現は
リンパ節転移及び腫瘍の進行度と相関する）

学位論文内容の要旨

【緒言】

食道癌は、予後が極めて不良な疾患である。外科的技術と術中管理の進歩により、生存率が改善されたものの、全症例の 5 年生存率は、50%未満にとどまっている。

近年、腫瘍細胞の遊走性はドーパミン、ノルエピネフリン等の神経伝達物質によって誘導されることが報告された。神経伝達物質が直接遺伝子発現を制御し、遊走能を増大させることによって、腫瘍細胞の転移能が誘導される。

ドーパミンは、消化器における主要な神経伝達物質である。ドーパミンレセプター (DR) を活性化させることによって、遺伝子発現を制御している。DR には 5 種類のサブタイプ (DRD1-DRD5) があり、すべてのサブタイプは七回膜貫通型タンパクであり、三量体 GTP 結合タンパク質に属する。ドーパミンが DR を介した、複数の経路で DARPP-32 のリン酸化を制御することが知られている。たとえば、DRD1 が活性化されることによって、cAMP 濃度が増大する。すると、プロテインキナーゼ A (PKA) が活性化され、チロシン 34 がリン酸化された DARPP-32 がプロテインホスファターゼ 1 (PP-1) を強く抑制する。DRD2 の活性化は、二通りの機序でリン酸化された DARPP-32 を減少させる：一つは、アデニルシクラーゼを抑制し、cAMP 濃度を減少させるところで、PKA の活性を減少し、DARPP-32 のリン酸化を減少させる；他は、細胞内 Ca^{2+} を増加させて、カルシニューリンを活性化し、DARPP-32 のチロシン 34 を脱リン酸化させる。

in vitro における研究では、腫瘍細胞の増殖がドーパミンによって直接抑制されことが示された。近年、血漿ドーパミン濃度が、健常のボランティアと比較して、肺悪性腫瘍では有意に高値であることが判明された。また、DR の発現は多くの他の悪性腫瘍で、例えば胃癌、大腸癌、乳がん、悪性黒色腫や下垂体腫瘍などで見られている。本研究では 122 例の食道扁平上皮癌 (ESCC) に於ける DRD1, DRD2 の発現と DARPP-32 の発現の相関、また、これらと症例の予後および臨床病理学的因子との相関を、免疫組織化学的手法を用いて検討した。

【対象と方法】

1989 年から 1999 年までに北海道大学病院第 2 外科およびその関連病院において外科的に切除された、遠隔転移のない、術前未治療の ESCC 症例 122 例を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋組織より 4 μ m 厚の薄切切片を作製し、これを用いて免疫組織染色を行った。

薄切切片、キシレンを用いて脱パラフィン化し、エタノールを段階希釈した溶液を通して水和させた。抗原賦活のため 120℃で 12min 処理し、内因性ペルオキシダーゼに対しては、0.3%過酸化水素で 30 分間処理した。PBS で希釈した rabbit 抗-DRD1 (1:500 希釈, Calbiochem; 324390) と 抗-DRD2 (1:450 希釈, Chemicon International Inc. Temecula, CA, AB1558) ポリクローナル抗体を一次抗体として用い、4℃にて一晩反応させた。洗浄後、二次抗体を反応させ、DAB と DAB H₂O₂ を用いて発色させた。核染色としてヘマトキシリンを用いた。同一切片に存在する神経節細胞を陽性対照とした。染色強度の判定は、陽性対照を参考にして、陽性(+)と陰性(-)に分類した。症例は、DRD1 と DRD2 の発現を基にして、以下の 4 つの群に分類された: DRD1/DRD2 (+/+), DRD1/DRD2 (+/-), DRD1/DRD2 (-/+) と DRD1/DRD2 (-/-)。同様に、他の群分けとして、DRD1/DARPP-32 (+/+), DRD1/DARPP-32 (+/-), DRD1/DARPP-32 (-/+)、DRD1/DARPP-32 (-/-) と DRD2/DARPP-32 (+/+), DRD2/DARPP-32 (+/-), DRD2/DARPP-32 (-/+) と DRD2/DARPP-32 (-/-) と分類された。以上の分類に従って、臨床病理学的因子との相関を統計学的に解析分類された。以上の分類に従って、臨床病理学的因子との相関を統計学的に解析した。

統計用ソフトウェア Statview 5.0 を用い、DR の発現と組織病理学的因子との相関を χ^2 検定もしくは Fisher の直接法で解析した。累積生存率は、Kaplan-Meier 法によって求め、統計学的有意性は log-rank 法で検定した。単変量・多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いた。P 値が 0.05 未満を有意差ありと定義した。

【結果】

染色は、他の報告と同様に腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に認められた。122 例のうち、DRD1 の陽性症例は 63 例; DRD2 の陽性例は 60 例であった。DRD1 の発現と分化度との間に有意な相関を認めた。DRD2 の発現と病理病期、N 因子と間に有意な相関を認めた。DRD1 と DRD2 との発現に正相関が認められたが、DRD1 および DRD2 の発現と DARPP-32 との発現には相関が認めなかった。

DRD1/DARPP-32 の組合せで群分けした場合、(++) / (-/+) 群と (+/-) / (-/-) 群では、p-N、p-T、および腫瘍径に著しい差が見られた。同様に、DRD1/DRD2 の組み合わせで (++) / (-/+) 群と (+/-) / (-/-) 群では、p-N、p-T、病理病期と腫瘍径に差が見られた。

同様に DRD2/DARPP-32 (+/-) 群は病理病期、pN、pT、腫瘍径に有意な相関を認めた。同様に、DRD1/DARPP-32 (++) および (+/-) 群は病理病期、pT、pN、腫瘍径に有意な相関を認めた。DRD1/DRD2 (+/-) および (-/-) 群は病理病期、pN に有意な相関を認めた。DRD2/DARPP-32 (+/-) 群は他の 3 つの群と比較して、有意に予後不良であった。多変量解析での検討では、DRD2/DARPP-32 は独立予後因子ではなかった。DRD1/DARPP-32 の (++) と (+/-) グループは他の 2 つのグループと比べて、有意的に予後良好であった。

【考察】

神経伝達物質が接着能、遊走能、白血球の帰巢能を制御することが知られている。近年では、神経伝達物質は DR、 β 2-adrenoceptors 或いはニューロキニン-1 レセプターの活性化を通して、腫瘍細胞の遊走能を増大させることが報告された。DARPP-32 は、ドーパミン情報伝達に関する重要な役割を演じている。DARPP-32 は、DR の活性化を介して、MAPK と CREB のリン酸化を制御している。DARPP-32 ノックアウトマウスにおいては、MAPK と CREB のリン酸化レベルが亢進しており、DRs を介した、MAPK、CREB リン酸化が誘導されない。DRD1/DRD2 の発現と予後には相関がなかったことから、ESCC 患者にて DRD1 または DRD2 の過剰発現のみでは予後を予測できないことが示唆された。DRD1、DRD2 と DARPP-32 の発現の相関関係から見ると、DRD1 と DRD2 の発現機序が類似している一方で、DR と DARPP-32 の発現機序は全く異なっていると考えられる。

神経系では、DRD2/DARPP-32/PP-1 経路によって、DRD2 が活性化された場合、CREB 発現が低下し、増殖が低下する。このことから、当初、DRD2/DARPP-32 (-/+) 群は予後不良であると仮説を立てた。しかし、本研究では逆に、DRD2/DARPP-32 (+/-) 群が他の群と比較して、有意に予後不良であった。

DRD2/DARPP-32/PP-1 経路が ESCC では正常に機能していない可能性が示唆された。また、同じ病期における症例間で全ての DRD2/DARPP-32 組み合わせを比較検討したが、有意な差が認められなかった。全て DRD1/DARPP-32 群の解析から、ESCC における予後への影響は DRD1 ではなく、DARPP-32 に依存することが判明した。同様に、DRD1/DRD2 の組合せにおいても、DRD2 に依存して有意差が認められている。DRD1/DARPP-32 または DRD1/DRD2 では、DRD1 の相加作用は認めなかった。DRD1/DRD2 の染色が原発部分よりむしろ浸潤部分に強かったことから DRD1/DRD2 が腫瘍の浸潤に相関する可能性がある。DRD2/DARPP-32 (+/-) 群が他の群と比べて、病理病期、pN に有意な相関を認めたことから ESCC では、DRD2/DARPP-32 の発現がリンパ節転移と腫瘍進行度の指標になるかもしれない。

DRs の生物学的機能が癌において、未だ不明な点が多く、更なる研究が必要である。結論として、本研究は、DRD2/DARPP-32 の発現がリンパ節転移と腫瘍進行度と関係しており、DRD2/DARPP-32 発現が ESCC 患者にて予後予測因子になる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

DRD2/DARPP-32 Expression Correlates with Lymph Node Metastasis and Tumor Progression in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

(食道扁平上皮癌症例における DRD2/DARPP-32遺伝子の発現は
リンパ節転移及び腫瘍の進行度と相関する)

ドーパミン、ノルエピネフリン等の神経伝達物質は腫瘍細胞の遊走性を誘導する。ドーパミンは、消化器における主要な神経伝達物質であり、ドーパミンレセプター (DR) を活性化させることによって、遺伝子発現を制御している。DR ファミリーには DRD1 から DRD5 まで、5つのサブタイプの存在が知られている。本研究では122例の食道扁平上皮癌 (ESCC) に於ける DRD1, DRD2 の発現と DARPP-32 の発現の相関、またこれらと症例の予後および臨床病理学的因子との相関を、免疫組織化学的手法を用いて検討した。

北海道大学病院第2外科およびその関連病院において外科的に切除された、遠隔転移のない、術前未治療の ESCC 症例 122 例を対象とした。パラフィン包埋切片を、キシレンを用いて脱パラフィン化し、エタノールを段階希釈した溶液を通して溶解させた後、抗原賦活し、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。抗-DRD1 または 抗-DRD2 ウナギポリクローナル抗体を一次抗体として用いた後、二次抗体処理し、それぞれ DAB と DAB H₂O₂ を用いて発色させた。核染色にはヘマトキシリンを用いた。同一切片に存在する神経節細胞を陽性対照とした。染色強度の判定は、陽性対照を参考にして、陽性(+)と陰性(-)に分類した。症例は、遺伝子の発現を基にして、4つの群に分類された。分類に従って、臨床病理学的因子との相関を統計学的に解析した。統計用ソフトウェア Statview 5.0 を用い解析を行った。P 値が 0.05 未満を有意差有りと定義した。

染色は、腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に認められ、122例のうち、DRD1 の陽性症例は 63 例、DRD2 の陽性例は 60 例であった。DRD1 の発現と分化度との間に有意な相関を認め、DRD2 の発現と病理病期、N 因子と間に有意な相関を認めた。DRD1 と DRD2 との発現に正相関が認められたが、DRD1 または DRD2 の発現と DARPP-32 との発現には相関を認めなかった。DRD2/DARPP-32 (+/-) 群とそうでない群を分けて検討した場合、病理病期、pN、pT、腫瘍径と有意な相関を認めた。また、DRD2/DARPP-32 (+/-) 群はそうでない群と比較して、有意に予後不良であった。

DARPP-32 は、ドーパミン情報伝達に関する重要な役割を演じており、DR の活性化を介して、MAPK と CREB のリン酸化を制御している。ESCC 患者において DRD1 または DRD2 の発現と予後には相関がなかったことから、DRD1 または DRD2 の過剰発現のみでは予後を予測できないことが示唆された。DRD1、DRD2 と DARPP-32 の発現の相関関係から見ると、DRD1 と DRD2 の発現機序が類似している一方で、DR と DARPP-32 の発現機序は全く異なっていると考えられる。MAPK と CREB の活性化を抑制すると考えられる DRD2/DARPP-32 (+/-) 群が他の群と比較して有意に予後不良であることから、DRD2/DARPP-32/PP-1 経路が ESCC では正常に機能していない可能性が示唆された。DRD2/DARPP-32 の発現がリンパ節転移および腫瘍進行度と相関しており、その発現が ESCC 患者にて予後予測因子になる可能性が示唆された。本研究が、今後 ESCC における DR/DARPP-32 遺伝子の研究において大いに役立つことが期待される。

口頭発表において、副査秋田弘俊教授より、食道癌における DRD2 遺伝子の陽性細胞発現率、腫瘍の陽性判定基準、DARPP-32 のリン酸化特異抗体による検討の有無、今後の研究の展望について質問があった。続いて副査近藤哲教授より、過去における DARPP-32 と癌の予後に関連する報告、他の研究で使用している抗体や手法との差異、本研究で予想と反対の結果が得られた理由について質問があった。最後に主査今村雅寛教授より、神経で働く分子が癌で発現した理由、食道癌において DARPP-32 の発現していない腫瘍では元来 DRD2 が機能していない可能性のあること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に回答した。

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。