

## 【16】

氏名	室井 大 人
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第676号
学位授与の日付	平成28年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (腫瘍外科学)
学位論文題目	Low PHLDA3 expression in oesophageal squamous cell carcinomas is associated with poor prognosis (食道扁平上皮癌におけるPHLDA3発現低下と予後の関連性について)
論文審査委員	(主査) 教授 千 田 雅 之 (副査) 教授 釜 井 隆 男 教授 杉 本 博 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

食道癌は、世界で8番目に多い癌であり、本邦でも罹患率、死亡率ともに第6位となっている。本邦での男女比は5：1と男性に多く、罹患率は男女ともに徐々に増加している。組織型は欧米では腺癌が多いが、日本を含むアジアや途上国では扁平上皮癌の頻度が高率である。食道癌は表在癌でも容易にリンパ節転移し、有症状で見つかるものの多くは進行癌であることから根治が難しい悪性腫瘍の一つである。食道癌の治療は、手術技術や周術期管理、化学療法、放射線療法などの発展にも関わらず、長期予後は十分とはいえず、更なる治療戦略の発展が求められる。また、分子標的治療薬や実臨床に応用可能な食道癌の予後、再発予測に対する鋭敏な指標の開発は他癌に比較し遅れており、早急な開発が望まれているのが現状である。

Aktは腫瘍の成長、増殖などに関連するタンパクであり、多くの悪性腫瘍で過剰発現していると考えられている。食道癌においても同様に、発癌、増殖、転移等にAktが関連しているという報告がある。Aktは増殖因子等の刺激を受けて誘導されたPIP3によって細胞膜上でリン酸化され、活性化Aktはその下流の基質を介して細胞生存シグナルを伝達している。*PHLDA3* (*pleckstrin homology-like domain, family A, member 3*) は、*p53*の標的遺伝子として2008年にKawaseらによって報告された癌抑制遺伝子である。*PHLDA3*は*p53*によって誘導され、細胞膜上でAktとPIP3の結合を競合的に阻害することで細胞のアポトーシスの誘導に寄与している。また、定常状態でもPHLDA3の発現が認め

られており、定常状態のPHLDA3は、p53非依存性増殖の抑制に寄与していることから、PHLDA3自体も癌抑制的に作用していることが示唆されている。

*PHLDA3*は癌抑制遺伝子として同定されたが、食道扁平上皮癌におけるその詳細は未だ不明であり報告例もなく、食道癌においても十分に検討する余地がある。

## 【目 的】

食道扁平上皮癌におけるp53の標的遺伝子PHLDA3の発現解析と予後、再発への関連を食道癌臨床検体を用いて検討する。

## 【対象と方法】

2009年5月から2012年9月までに、当科において食道扁平上皮癌の診断で手術を施行された84症例を対象とした。組織型はすべて扁平上皮癌（SCC）であり、術前補助療法を施した症例と遠隔転移を有する症例は除外した。Stage分類は、TNM分類第7版を用いた。脈管侵襲については、食道癌取扱規約第10版に従った。観察期間は、手術後から2013年11月29日までとし、観察期間の中央値は877.6日（range, 208-1647日）であった。方法は、免疫染色法を用いてPHLDA3の発現を評価した。染色はパラフィン包埋組織切片の最深部を含む標本を用い、同一切片内の正常扁平上皮と比較し、その染色強度を2群（高発現群vs低発現群）に分けて検討した。統計はJMP5.0 softwareを使用し、 $\chi^2$ 検定、t検定、生存時間分析にはKaplan-Meier法を用いた。多変量解析には、Cox比例ハザード分析を用いた。また、すべての患者から告知に基づく同意を得ている。

## 【結 果】

対象症例の年齢は、68.2 + 9.7歳（range, 40 ~ 86歳）、男性は72例（85.7%）、女性は12例（14.3%）であった。術式は、食道切除が62例（73.8%）、ESDが22例（26.2%）、癌の占拠部位は、胸部中部食道が44例（52.4%）と最も多く、胸部下部食道が28例（33.3%）、胸部上部食道が10例（11.9%）、頸部食道が2例（2.4%）であった。リンパ節因子については、N0が61例（72.6%）、N+が23例が27.4%、Stageは、Stage 0が15例（17.9%）、Stage Iが38例（45.2%）、Stage IIが13例（15.5%）、Stage IIIが18例（21.4%）であった。免疫染色による評価では、PHLDA3の高発現群は71.4%、低発現群は28.6%であった。各臨床病理学的因子とPHLDA3の発現の検討では、年齢、性別、占拠部位では有意差を認めなかったが、TNM分類のT因子、N因子、脈管侵襲、Stageの各因子ですべて有意差を示した（ $p < 0.05$ ）。

生存時間分析では、全生存率に対しては有意差を示すことはできなかったが、疾患特異的生存率については、高発現群が96.3%、低発現群が55.6%とPHLDA3低発現群で有意差を持って低下していた（ $p = 0.029$ ）。また、無病生存率（disease free survival：DFS）でも、高発現群が94.2%、低発現群が55.6%とPHLDA3低発現群で有意差を持って低下していた（ $p < 0.001$ ）。

単変量解析では、前述の臨床病理学的因子とPHLDA3発現に関連性を示すことができたが、予後に対する多変量解析では癌部のPHLDA3発現は独立予後因子とはならなかった。一方、再発に対する多変量解析の結果、癌部のPHLDA3低発現は術後再発の唯一の独立予測因子となった（relative risk=0.38：confidence interval =0.17-0.78： $p = 0.0074$ ）。

## 【考 察】

本研究では、癌抑制遺伝子である*PHLDA3*と食道扁平上皮癌の予後、再発との関連について検討した。免疫染色の結果、進行度が早期のものほど染色強度が強い傾向にあった。また、多変量解析で*PHLDA3*の発現の低下は予後に対する独立因子とは成り得なかった。しかし、術後再発に対しては唯一独立した予測因子となった。

我々は、食道癌臨床検体を用いた*PHLDA3*の発現を免疫染色法で評価したが、同様の手法で前立腺癌や乳癌の評価が行われており、正常腺管では高発現し、癌部では発現が抑制されていた。本研究の結果もこれに矛盾しない結果となった。また、RT-PCRとComparative Genomic Hybridizationを用いた報告では、大細胞神経内分泌肺癌で癌部の*PHLDA3*がしばしば欠損しており、その発現が抑制されたという報告がある。これらの報告から、複数の癌腫にまたがって発現が抑制されている*PHLDA3*は、食道扁平上皮癌においても癌抑制因子として働く可能性が示唆される。

これまで乳癌を用いて*PHLDA3*の低発現とp53の核内蓄積の関係性を示した報告はあるが、食道扁平上皮癌を用いて*PHLDA3*の発現と各臨床病理学的因子や予後、再発との関連を検討した報告はなく、本研究が最初の報告である。

*PHLDA3*の発現については、*p53*による転写制御と*PHLDA3*のヘテロ接合性の消失 (LOH) によって報告されている。食道扁平上皮癌では*p53*の点変異を持つものが少なくとも50%以上を占め、*p53*の変異によって*PHLDA3*の発現が抑制されることやAktのmouse double minute 2を介したp53の発現の抑制、*PHLDA3*を含む1q32の獲得、大細胞内分泌癌におけるLOHの証明などによって*PHLDA3*発現低下が証明されている。

*PHLDA3*は、乳癌や大細胞神経内分泌癌を用いた検討で癌抑制因子であることが示され、本研究でも、食道扁平上皮癌の進行に伴い*PHLDA3*の発現が低下していた。他にも*PHLDA3*の過剰発現は細胞死を増加させp53依存性細胞死を誘導するという*in vitro*の報告や*PHLDA3*を標的としたsiRNAによる*PHLDA3*の抑制によるp53依存性細胞死の減少の報告からも*PHLDA3*が癌抑制因子であることが示されている。

Aktは様々な癌腫で異常な活性化が認められており、Akt活性に依存的な癌腫ではAkt阻害薬を用いることで癌細胞を特異的かつ強力に死滅することが可能かもしれない。本研究の結果を含めたこれまでの報告例からは、*PHLDA3*のAkt阻害因子としての可能性も期待される。

## 【結 論】

食道扁平上皮癌において、癌抑制遺伝子*PHLDA3*の発現が再発に対して唯一独立した予後予測因子であり、再発を予見するマーカーとなる可能性が示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

食道癌は、本邦での年間死亡数が一万人を超える重要な悪性腫瘍である。日本を含むアジアや途上国では扁平上皮癌の頻度が高率である。食道癌は表在癌でも比較的早期にリンパ節転移を起し、有

症状で見つかることが多く進行癌の状態であることから、根治が難しい悪性腫瘍の一つである。進行癌では、手術を中心に化学療法や放射線療法を併用する集学的治療が用いられ、徐々に予後は改善傾向にあるがその成績は未だ満足できるものではない。また食道癌の予後、再発予測に対する鋭敏な指標はなく、その早急な開発が望まれている。

Aktは腫瘍の成長、増殖などに関連するタンパクであり、多くの悪性腫瘍で過剰発現していると報告されており、食道癌においても同様の報告がある。*Pleckstrin homology-like domain, family A, member 3 (PHLDA3)* は、p53の標的遺伝子として報告された癌抑制遺伝子で、PHLDA3はAktを直接阻害することで細胞のアポトーシスの誘導に寄与している。申請論文では、食道癌手術84症例の摘出標本を用いてPHLDA3の発現を免疫染色で評価し、臨床病理学的因子、予後、再発との関連を検討している。

結果として癌抑制タンパクPHLDA3の発現は、深達度、病期、リンパ節転移、脈管侵襲が高度な症例ほど低下していた。また、PHLDA3の低発現群では有意に予後、再発について不良であり、多変量解析では、再発に対して唯一独立した予測因子であった。これらの結果から、PHLDA3が術後再発を予測し得るマーカーになる可能性がある結論づけている。

#### 【研究方法の妥当性】

申請論文では、単一施設の食道癌切除標本を用いて、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片、ポリクローナル抗体を用いたavidin-biotin complex (ABC) 法により、PHLDA3の発現を評価している。研究対象の臨床病理学的因子や予後、再発との関連性を解析している統計学的手法も適切であり、本研究は妥当と判断される。

#### 【研究結果の新奇性・独創性】

肺癌、乳癌、前立腺癌におけるPHLDA3の発現に関する報告は過去にも認められるが、臨床材料を用いて臨床病理学的な検討を行った報告はない。食道扁平上皮癌の臨床検体を用いた臨床病理学的因子や予後、再発との解析は申請論文が初めての報告である。その結果、PHLDA3の発現低下が再発を予測すると結論づけている。この点において本研究は新奇性、独創性に優れた研究と評価できる。

#### 【結論の妥当性】

申請論文は、多数の食道癌手術症例を適切な対象設定に基づき、確立された実験手法と統計解析を用いて、食道扁平上皮癌におけるPHLDA3の発現と臨床病理学的因子、再発、予後との関連性を検討している。導き出されたPHLDA3の発現低下が予後不良を予測する因子であるという結論は、論理的に矛盾するものではなく、腫瘍学、分子生物学、病理学などの関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### 【当該分野における位置付け】

申請論文は、PHLDA3発現の意義を検討し、食道扁平上皮癌の増殖、進展との関連を研究している。その結果、PHLDA3発現低下が進行癌で多く、深達度、リンパ節転移、脈管侵襲と相関し、予後不良であることを証明した。食道扁平上皮癌において、PHLDA3発現とAkt発現の比較検討など今

後さらなる検討が必要であるが、この研究結果は、他癌種の発生や進展の研究の一助になる大変有意義な研究と評価できる。

**【申請者の研究能力】**

申請者は、病理学や分子生物学の理論を学び実践した上で仮説を立て、実験計画を立案し、適切に本研究を遂行した結果、貴重な知見を得ることとなった。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

**【学位授与の可否】**

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高いと評価できる。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Anticancer Research

35 : 949-954, 2015