

氏 名	藤 田 純 輝
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第829号
学位授与の日付	令和4年3月4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	The prognostic significance of Plakophilin-1 expression in esophageal cancer (食道癌の予後におけるPlakophilin-1発現の意義について)
論文審査委員	(主査) 教授 矢 澤 卓 也 (副査) 教授 入 澤 篤 志 教授 窪 田 敬 一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背 景】

食道癌は一般的な癌の1つであり、世界中の年間死亡者数は50万人を超える。我が国における食道癌は9割以上が扁平上皮癌である。近年の診断・治療技術の進歩によって食道癌の治療成績は向上してきているが、未だに予後不良な癌の1つとされている。したがって、食道癌の発癌と進展、治療標的の特定等に有用なバイオマーカーを発見することは、最適な治療を行う為に非常に有益と考えられる。

Plakophilin (PKP) は、デスモソーム、すなわち中間径フィラメントの固定点として作用する主要な細胞間接着部のプラーク成分である。中でも扁平上皮癌との関連の強いPKP1の発現が細胞増殖、コロニー形成、遊走、浸潤を阻害し、アポトーシスを増強すると言われており、その発現レベルと癌の悪性度には逆相関の関係があると言われている。

### 【目 的】

PKP-1の強発現は咽頭癌や大腸癌、肺癌、卵巣癌等の癌腫で観察されているが、これまでのところ食道扁平上皮癌に関する研究の報告は皆無である。予後不良な癌である食道扁平上皮癌におけるPKP1の関わりについて研究を行うことは、バイオマーカーとしての意義を含め治療に対する非常に重要な知見をもたらす可能性がある。本研究では食道癌におけるPKP1発現の状況と、その臨床的意義を調べることを目的とした。

## 【対象と方法】

対象は2009年5月から2018年12月までに獨協医科大学病院第一外科で食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術を含む根治切除術が施行された患者99名とした。化学療法、化学放射線療法などの術前治療が施行された症例は除外した。病理組織学的病期分類はUICC病期分類システムに従って実施された。扁平上皮癌のみを対象とした。すべての患者から術前に書面によって治療・研究に関するインフォームドコンセントを得た。本研究は獨協医科大学病院の倫理委員会によって承認された（承認番号R-24-11J）。

免疫染色は手術検体から得た切除標本に対してABC法を用いて施行した。正常なヒトの食道組織を陽性対照として使用した。PKP1の染色は200倍希釈した抗PKP-1抗体（HPA027221：ATLAS ANTIBODIES, Sweden）を用いて施行し、評価は細胞質・細胞膜・核に分けて行なった。細胞の染色の程度に基づいて、免疫染色反応は均質染色（50%～100%）、局所染色（10%～50%）、または陰性（0%～10%）に分類された。そのうえでスコアリングを行い、均質染色は6（強褐色）、5（中等度黄色）、4（弱淡黄色）、局所染色は3（強褐色）、2（中等度黄色）、1（弱淡黄色）とした。染色陰性は0とした。染色強度は染色スコア0-4を弱陽性、5-6を強陽性とした。

カテゴリー変数間の統計的差異に関してはFisherの正確確率検定を行った。p<0.05の場合に統計的有意とした。Kaplan-Meier法を使用して生存時間分析を行い、生存時間分布を評価した。

## 【結 果】

細胞質におけるPKP1発現は71.7%（71/99）で強陽性を示した。腫瘍の壁深達度（p=0.002）、リンパ節転移（p=0.003）、進行度（p=0.0004）、リンパ管侵襲（p=0.001）と逆相関を示した。

細胞膜におけるPKP1の発現では45.5%（45/99）において強陽性を示した。細胞質の発現と同様に、腫瘍の壁深達度（p=0.00007）、リンパ節転移（p=0.001）、進行度（p=0.0001）、リンパ管侵襲（p=0.001）と逆相関を示し、さらに静脈侵襲とも逆関係を呈した（p=0.001）。これらの逆関係はPKP1細胞質発現と比較してより強い傾向を示した。

核内のPKP1発現に関しては50.5%（50/99）が強陽性を示した。またその発現は壁深達度（p=0.02）、リンパ節転移（p=0.004）、進行度（p=0.006）と逆相関の関係にあった。

本研究の対象となった99名の患者のうち20名（20.2%）に再発が確認された。再発症例20名のうち12名には遠隔転移が認められた。PKP1染色パターンと遠隔転移の間に有意な相関は認められなかった。

生存率に関する検討も行った。細胞質染色においては強陽性群の5年全生存率（overall survival：OS）が81.7%であり、弱陽性群（60.7%）と比較して有意に良好であった（p=0.0187）。しかし5年無再発生存率（disease free survival：DFS）は強陽性群と弱陽性群で有意な差を認めなかった（p=0.18）。細胞膜染色に関しては5年OSにおいて強陽性群と弱陽性群で有意差を認めなかった（84.4%vs.68.5%、p=0.0912）が、DFSにおいては強陽性群が弱陽性群と比較して有意に良好であった（p=0.0111）。核染色に関する検討ではOS、DFSともに両群間に有意な差は認められなかった。

## 【考 察】

近年、発癌・浸潤・転移においていくつかの接合タンパク質が重要な役割を果たしているという報告が多く認められる。これまでの研究では、PKP1では十分に分化していない部位よりも分化度の高い部位において染色強度が高いことが報告されている。

今回の研究ではPKP1の細胞質・膜・核の染色において、染色腫瘍の進行に伴ってPKP1の発現が全般的に低下していることが明らかとなった。すなわち染色強度が低下すると腫瘍がより深く浸潤し、脈管侵襲をきたし、リンパ節転移が拡がり、病期が進行することが判明した。PKP1の染色性が弱い症例においては染色性が強い症例よりも遠隔転移が多い傾向にあった。PKP1が細胞接着に関与しているという背景から、これらの結果は妥当であると思われる。発癌時にPKP1の発現が抑制されると、細胞接着の低下がもたらす移動の増加により腫瘍の進行が加速する可能性がある。PKP1の減少が遠隔転移の発生を促進し、疾患特異的生存率の低下につながるという報告はこれまでに認められていないが、本研究の結果では腫瘍細胞内でのPKP1発現が腫瘍の進行度を反映したことから、食道扁平上皮癌の予後を予測するひとつの因子になりうると思われる。

## 【結 論】

PKP1の発現は悪性度と逆相関の関係を示すことが示された。細胞質、細胞膜、核のいずれの染色性においても深達度、リンパ節転移、進行度、生存率等との関係において同様の結果が得られ、PKP1が食道癌の有力な予後予測因子となり得る可能性が示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

食道癌の治療成績は向上してきているが、未だに予後不良な癌の1つとされている。Plakophilin (PKP) は、デスモソーム内の細胞間接着部のプラーク成分である。中でも扁平上皮癌との関連の強いPKP1の発現が細胞増殖、コロニー形成、遊走、浸潤を阻害し、アポトーシスを増強する。その発現レベルと癌の悪性度には逆相関の関係があると言われている。申請論文では食道扁平上皮癌におけるPKP1発現と臨床的意義を明らかにすることを目的として、根治切除術が施行された患者99名の臨床像を抗PKP1抗体の染色強度別に検討している。染色部位は細胞質・細胞膜・核に分けて評価されている。結果、細胞質におけるPKP1発現は、染色強度と腫瘍の壁深達度、リンパ節転移、進行度、リンパ管侵襲との間に逆相関が見られた。細胞膜での発現は細胞質と同様に腫瘍の壁深達度、リンパ節転移、進行度、リンパ管侵襲と逆相関を示し、さらに静脈侵襲とも逆相関を呈した。これらの逆相関はPKP1細胞質発現と比較してより強い傾向を示した。核に関しては、壁深達度、リンパ節転移、進行度と逆相関の関係にあった。再発症例20名のうち12名には遠隔転移が認められたが、PKP1染色パターンとの間に有意な相関は認められなかった。細胞質染色においては強陽性群のoverall survival (OS) が81.7%であり、弱陽性群 (60.7%) と比較して有意に良好であった。細胞膜染色に関しては、disease free survival (DFS) においては強陽性群が弱陽性群と比較して有意に良好であった。これらの結果から、腫瘍細胞内でのPKP1発現は腫瘍の進行度を反映しており、細胞接着の低下がもたら

す遊走の増加により腫瘍の進行が加速する可能性があり、食道扁平上皮癌の予後を予測するひとつの因子になりうると結論づけている。

#### **【研究方法の妥当性】**

申請論文では、獨協医科大学病院での2009年5月から2018年12月までの豊富な症例を対象とし、標準的な抗PKP-1抗体を用いたPKP1免疫組織染色を評価している。適切な対照群の設定の下、客観的な統計解析を行っており、本研究は妥当なものである。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

種々の癌でPKP1との関連性の報告がされているが、食道扁平上皮癌においてPKP1発現レベルによる進行度や予後に関する研究の報告はこれまでにない。申請論文では豊富な症例を用いて、細胞質・細胞膜・核と3箇所の染色部位に分けた上で進行度や予後との関連が明らかであ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】**

申請論文では、多数の症例を、適切な対照群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いてPKP1の部位別染色強度と予後を含めた臨床病理学的因子との検討を行なっている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、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】**

申請論文では、生存曲線を用いた分析により、細胞質染色でのOSの有意な延長や細胞膜染色でのDFSの有意な延長を示している。腫瘍細胞内でのPKP1発現が腫瘍の進行度を反映している。これは、今後の食道癌の予後予測を考える上で大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、病理学や腫瘍外科学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載が承認されており、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。学位審査においての質疑応答においても論理的であった。よって、博士（医学）の学位授与に相応しい能力を十分有していると判定した。

#### **（主論文公表誌）**

Anticancer Research

(41 : 3401-3407, 2021)