

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
岡野浩和	主査 教授 谷川 允彦 副査 教授 勝 健一 副査 教授 森 浩志 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 勝岡 洋治
主論文題名 Concomitant overexpression of cyclooxygenase-2 in HER-2-positive on smad4-reduced human gastric carcinomas is associated with a poor patient outcome (ヒト胃癌における HER-2 発現陽性、Smad4 発現減弱ならびに COX-2 の高発現は担癌患者の予後不良に関連する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景および研究目的》</p> <p>今日、様々な悪性腫瘍において、アラキドン酸カスケードにおけるプロスタグランジン(PG)の律速酵素である cyclooxygenase-2 (COX-2)の過剰発現が認められ、腫瘍増殖への関与が示唆されているが、その発現のメカニズムは未だ完全には解明されていない。近年の研究により Epidermal growth factor (EGF) ファミリーのレセプターの一つである Human epidermal growth factor receptor-2(HER-2)や細胞増殖コントロール作用を持つ Transforming growth factor-β(TGF-β)が COX-2 の誘導に関与している可能性が考えられている。本研究では、ヒト進行胃癌における COX-2 発現と HER-2、TGF-βおよび TGF-βの細胞内シグナル伝達物質である Smad4 の関連を調べることを目的に、各蛋白の発現状況を免疫組織染色を用いて評価し、その相関関係および患者予後との関連を検討した。</p> <p>《対象および方法》</p> <p>大阪医科大学 一般・消化器外科において1990年から1995年の間に治療した166症例の胃癌患者からの手術摘出腫瘍標本を対象とした。標本を4 μm厚でスライスし、脱パラフィン後、L.V. Dako LSAB kit (DAKO, Carpinteria, CA)を用いた standard avidin-biotin-peroxidase complex techniqueにて下記抗体を用いて各蛋白の免疫組織化学的染色を行い、顕微鏡下(200倍視野)で観察した。それぞれ10視野を観察し、発現状況を100分率で算出し、下記のごとく半定量的に判定した。各蛋白の発現状況の相関関係ならびに病理組織学的因子や患者予後との関連性を検討した。全166症例のうち、根治術は136症例に行われ、平均観察期間は48.8ヶ月であった。</p> <p>1) COX-2 の染色及び評価</p> <p>一次抗体として抗 COX-2 マウスモノクローナル抗体(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI)を用いた。COX-2 発現陽性は腫瘍細胞質の染色状況で判断し、陽性細胞数を百分率で表し、半定量的に求めた。level 0, &lt; 10%; level 1, 10 - 30%; level 2, 30 - 60%; level 3, &gt; 60%とし、Level 2 以上を COX-2 過剰発現とした。</p>	

## 2) HER-2 の染色及び評価

一次抗体は抗 HER-2 マウスモノクローナル抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) を用いた。HER-2 発現陽性はトラスツズマブ病理部会作成ガイドラインに沿って腫瘍細胞表面の染まりで判断し、陽性細胞数を百分率で表し、半定量的に求めた。スコア 0;細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞< 10%、スコア 1;ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある癌細胞 $\geq$ 10% 癌細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている、スコア 2;弱~中等度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞 $\geq$ 10%、スコア 3;強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞 $\geq$ 10% とし、スコア 1 以上を HER-2 陽性とした。

## 3) TGF- $\beta$ 1 の染色及び評価

一次抗体には抗 TGF- $\beta$ 1 ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) を用いた。TGF- $\beta$ 1 陽性は腫瘍細胞の 10%以上で細胞質が染まる事で陽性と判定した。

## 4) Smad4 の染色及び評価

抗 Smad4 マウスモノクローナル抗体 (Santa Cruz) を一次抗体として用いた。細胞質または核の染まりで判定し、腫瘍細胞の 50%以上が正常細胞と同等の染色強度をもつ場合発現保持とし、50%未満の場合を発現減弱とした。

## 《結果》

1. 全症例 166 例中、COX-2 過剰発現は 91 例(54.8%)に認め、過剰発現頻度は非分化型腺癌に比べ分化型腺癌に有意に多く、壁深達度がより深い症例、およびリンパ節転移陽性症例に多く認められた。HER-2 陽性は 22 例(13.3%)に認め、組織型とのみ相関が見られ、陽性症例は分化型腺癌症例に有意に多く認められた。TGF- $\beta$ 1 陽性は 51 例(30.7%)に認められ、陽性症例は最大腫瘍径が有意に小さく、肉眼型は限局型に多く、組織型では分化型癌症例に多く認められた。Smad4 については発現減弱を 104 例(62.7%)に認め、減弱症例では保持症例に比べ腫瘍サイズが有意に大きく、壁深達度がより深い症例、リンパ節転移陽性症例に多く見られた。組織型に関しては有意な相関を認めなかった。

2. HER-2 陽性は 22 例に過ぎなかったが、その中でスコア 2 以上の COX-2 過剰発現を 19 例(86.4%)に認め、Smad4 発現減弱 104 症例においても COX-2 過剰発現は 67 例(64.4%)に認め、COX-2 過剰発現と HER-2 陽性および Smad4 発現減弱には有意な相関関係が認められた。

3. 根治術施行 136 例における患者予後との関連性の検討では、COX-2 や HER-2 の過剰発現及び Smad4 発現減弱症例は予後が有意に不良であった。COX 比例ハザードモデルを用いた解析でも単変量解析では腹膜播種やリンパ節転移などの既知のリスクファクターに加え、COX-2、HER-2 及び Smad4 が有意な予後規定因子として認められたが、多変量解析では COX-2 過剰発現ならびに Smad4 発現減弱のみが独立した予後規定因子として認められた。さらに Smad4 減弱症例群のうち、COX-2 過剰発現症例は更に有意に予後不良であり、特にハイリスク症例であることが示された。

## 《考察および結論》

悪性腫瘍の増殖・進展において COX-2 が関与している事は多くの知見が示しているが、その詳細なメカニズムは完全には解明されていない。HER-2 からのシグナルが Ras-MAPK 経路を介して COX-2 発現に作用している可能性が考えられており、本研究においてヒト胃癌の HER-2 の発現頻度は低いものの、HER-2 陽性症例で COX-2 過剰発現の頻度および程度が際だって増強されていることを示し、ヒト胃癌において HER-2 が COX-2 発現規定因子の一つである可能性を示した。TGF- $\beta$ の作用には TGF- $\beta$ タイプ II 受容体から種々の Smad を介して機能する細胞増殖抑制作用と、各種 MAPK を経由し、COX-2 発現・PGE2 発現を介した細胞増殖促進作用があり、通常の細胞においてはこの二つの作用の均衡が保たれていると考えられている。多くの腫瘍細胞では Smad4 減弱や COX-2 過剰発現が見られことより、Smad 減弱に伴う TGF- $\beta$ の細胞増殖抑制作用減弱化と COX-2 過剰発現で生じる細胞増殖促進作用亢進により、細胞増殖のバランスが全体として増殖促進作用優勢に傾くことが腫瘍細胞の異常増殖の一端を担っている可能性が考えられている。今回の研究でヒト胃癌においても COX-2 過剰発現や Smad4 発現減弱を過半数以上の症例に認め、COX-2 過剰発現は Smad4 発現減弱症例において有意に増加しており、COX-2 は TGF- $\beta$ や Smad4 減弱の影響を受けながら胃癌細

胞の増殖に強く関与している可能性が示唆された。COX-2 過剰発現や HER-2 陽性症例、また Smad4 減弱症例の予後は不良であり、特に COX-2 過剰発現や Smad4 減弱は進行胃癌において独立した予後規定因子であることが認められた。加えて、Smad4 減弱症例で有意に多く COX-2 が過剰発現すること、ならびにこれらの発現異常を共に来した患者は特に予後不良のハイリスク群である事が判明した。以上のように COX-2 発現は TGF- $\beta$ /Smad4 や HER-2 のシグナリングと密接に関連し、腫瘍細胞増殖に大きく関わっている可能性が示唆された。

以上の結果からヒト胃癌の治療に際し、選択的 COX-2 阻害剤と HER-2 や TGF- $\beta$ シグナル伝達系を標的とする薬剤との併用療法は、より優れた治療効果が得られる可能性を示唆された。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	岡野浩和
論文審査担当者		主査 教授 谷川 允彦 副査 教授 勝 健一 副査 教授 森 浩志 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 勝岡 洋治	
主論文題名 Concomitant overexpression of cyclooxygenase-2 in HER-2-positive on smad4-reduced human gastric carcinomas is associated with a poor patient outcome (ヒト胃癌における HER-2 発現陽性、Smad4 発現減弱ならびに COX-2 の高発現は担癌患者の予後不良に関連する)			
論文審査結果の要旨			
<p>近年、cyclooxygenase-2(COX-2)の過剰発現は様々な悪性腫瘍の発生・増殖に影響を及ぼすことが知られてきているが、その発現のメカニズムに関しては未だ完全には解明されていない。申請者はヒト進行胃癌における COX-2 発現と HER-2 及び TGF-<math>\beta</math>/Smad4 系発現との相関性およびそれらと患者予後との関連を検討して、以下の結果および結論を得ている。</p> <p>COX-2 過剰発現は HER-2 陽性および TGF-<math>\beta</math>陽性とともに分化型腺癌に有意に多く認められた。COX-2 過剰発現は HER-2 陽性、Smad4 発現減弱と有意な相関を認めた。予後検討では COX-2 過剰発現、HER-2 陽性及び Smad4 減弱症例で累積生存率が有意に低く、特に COX-2 及び Smad4 は独立した予後規定因子であった。加えて、Smad4 減弱症例のうち COX-2 過剰発現を共に来した症例は更に予後不良であり、特にハイリスク症例であった。以上より COX-2 発現は HER-2 や TGF-<math>\beta</math>/Smad4 のシグナリングと密接に関連し、腫瘍細胞増殖に大きく関わっている可能性が高く、これらを対象とする分子標的薬の併用療法が、ヒト胃癌の治療に際し、より優れた抗腫瘍効果を得る可能性が示唆されたとの結論を得ている。</p> <p>本研究はヒト胃癌における COX-2 発現に影響を及ぼすと考えられる複数の蛋白に対する複合的な検討を行った最初のものであり、また申請者によって得られたこれらの研究結果は新しい癌治療戦略の構築に重要な情報を提供するものと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Clinical Cancer Research 10: 6938-6945, 2004</p>			