

上皮成長因子の発現からみた食道癌の進展と予後

滋賀医科大学第1外科

川口 晃 柴田 純祐 小玉 正智

滋賀医科大学第1病理

九 嶋 亮 治 服 部 隆 則

当科で治癒切除された食道癌37症例を対象として、食道癌組織内 epidermal growth factor (EGF) の発現の有無と病理組織学的因子、予後および DNA ploidy pattern に関する検討を行った。EGF の発現には酵素抗体染色法を、また DNA ploidy pattern の測定には蛍光顕微測光法を用いた。結果：① EGF 陽性群は陰性群に比べ有意に予後不良であった。②組織型別では高分化型扁平上皮癌で EGF 陽性率が高率であった。③ EGF の発現は壁深達度、リンパ管侵襲度との間に有意な相関関係を示した ($p < 0.05$)。④ EGF 陽性例に高次リンパ節転移陽性例が多い傾向を認めた。⑤ DNA ploidy pattern との相関では、diploid pattern に比べ、non-diploid pattern において EGF 陽性例の増す傾向を認めた。結論：① EGF は癌の増殖分化に対して重要な役割を担っていると考えられた。② EGF は食道癌の予後に影響を及ぼしているものと考えられた。

Key words: esophageal carcinoma, expression of epidermal growth factor, DNA ploidy pattern of esophageal carcinoma

I はじめに

1962年に Cohen¹⁾らにより発見された上皮成長因子 (epidermal growth factor: 以下 EGF) は、上皮系組織の増殖分化促進作用を有することや、胃癌に代表される上皮系悪性腫瘍においてその発現が進行度や予後と相関を示すことが報告され、注目を集めるようになってきた。また、特に消化器癌のなかでもきわめて悪性度の高い食道癌において高頻度に EGF-receptor の発現が認められる報告が散見されるようになり、EGF の発現と食道癌の悪性度との相関が示唆されている。そこで今回われわれは、食道癌原発巣を用い組織内 EGF の発現と予後、ならびに病理組織学的予後因子との関連について検討を試みるとともに食道癌核内 DNA 量分布パターンとの関連についても追求した。

II 材料および方法

滋賀医大第1外科において、1979年より1989年までに治癒切除された食道癌37例を対象とした (Table 1)。材料はすべて10%ホルマリンにて固定した後、パラフィン包埋したものをを用いた。なお、病理組織学

的検索は食道癌取扱規約²⁾に従った。

1) 酵素抗体法による食道癌組織内 human-EGF (以下 h-EGF) の染色

h-EGF 染色は、Vector 社 ABC キット PK-4002 を用い以下のように行った。

① 4 μ m の薄切片を2枚作製後、脱パラフィン処理を行った。

② 内因性ペルオキシダーゼ阻止操作施行

③ 10%非感作血清で10分間、室温で反応の後、phosphate buffer saline (以下 PBS) にて洗浄。

④ 1枚には500倍希釈した1次抗体 (Monoclonal Antibody to Human Epidermal Growth Factor, 湧永製薬株式会社) を、また他の1枚には negative-control として PBS を滴下した後、湿室中で16時間反応した。以下、2枚とも同様の操作とした。

⑤ PBS にて洗浄

⑥ 希釈ビオチン化2次抗体と湿室中で30分間反応。

⑦ PBS にて洗浄

⑧ アビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体と湿室中で1時間反応。

⑨ PBS にて洗浄

⑩ DAB (3,3-Diaminobenzidine-4HCl)·H₂O₂ 溶液にて発色。

① 水道水にて洗浄後、核対比染色を施し、透徹、永久標本を作製した。

なお、positive control として正常ヒト耳下腺を用いた。

2) 食道癌細胞核内 DNA 量の測定法³⁾

食道癌細胞核内 DNA 量の測定は、パラフィン包埋ブロックより作製した単離細胞塗抹標本に DAPI (4', 6-diamidino-2-phenyl indole dihydro-chloride, 半井化学薬品) 染色を施し、落射型蛍光顕微測光法にてその核内 DNA 蛍光強度を測定することにより行った。

① パラフィンブロックから薄切切片 (4 μ m) とそれに隣接する厚切切片 (100~150 μ m) を作製した。

② 薄切切片には hematoxylin-eosin (以下 HE) 染色を施して観察に供した。

③ 厚切切片を脱パラフィン処理、続いて hematoxylin にて核単染色を行った後、HE 染色標本を参照しつつ実体顕微鏡下で目的部位を採取した。

④ 採取した組織片をスピッツグラスに移した後、10 mM EDTA-Na 加リン酸緩衝液にて 37 $^{\circ}$ C 下 1 時間浸漬し、hematoxylin を脱色した。

⑤ 200 μ g/ml proteinase K 加リン酸緩衝液にて 37 $^{\circ}$ C 下 1 時間浸漬し、酵素処理を行った。

⑥ 数回の洗浄操作の後、ホモジェナイザーにて細胞を単離、得られた細胞浮遊液をナイロンメッシュにて濾過した。

⑦ 洗浄操作を 2 回繰り返した後、Auto smear (SAKURA CF120) を用いてスライドグラス上に単離細胞塗抹標本を作製した。

⑧ 細胞核内 DNA 染色には DAPI 染色法を用いた。

⑨ 細胞核内 DNA 蛍光定量には落射型蛍光顕微測光装置 (Nikon UFX-P1) を使用した。波長 365nm の光で核を励起し、波長 450nm の核蛍光強度を測定した。

⑩ 測光データの集録と統計処理は、測光装置に接続されたコンピュータ (NEC model PC-9801 VM21) にて行った。各標本における 2C-DNA 量の基準としては、標本内に混在するリンパ球 20 個以上について核蛍光強度を測定し、その平均値を用いた。癌細胞については裸核であり、かつ核の形態に異常をきたしていないもの 200 個以上を選び測定を行った。

⑪ 2C-DNA 量の基準値が 20 となるように測定データ全体を換算した後、核内 DNA 量分布をヒストグラム表示した。

⑫ 蛍光顕微測光法にて得られた核内 DNA 量分布

Table 1-1 Summary of patients data

Characteristic or Pathohistologic findings	No. (%)
Sex	
Male	28 (75.7)
Female	9 (24.3)
Age	27-75 yr (mean age : 62.4 yr)
Histologic types	
Well	14 (37.8)
Moderately	16 (43.2)
Poorly	4 (10.8)
Others	3 (8.1)
Depth of infiltration	
ep-sm	10 (27.0)
mp	6 (16.2)
al-a3	21 (56.8)
Lymphnode metastasis	
n0	14 (37.8)
n1	3 (8.1)
n2	11 (29.7)
n3	9 (24.3)
Lymphatic invasion	
ly (-)	13 (35.1)
ly (+)	24 (64.9)
Blood vessel invasion	
v (-)	25 (67.6)
v (+)	12 (32.4)
Intraepithelial spread	
ie (-)	24 (64.9)
ie (+)	13 (35.1)

のヒストグラムを以下の 3 パターンに分類した (Fig. 1)。

Diploid pattern : 2C 域に基本モードを有するもの。

Aneuploid pattern : 2C 域以外に基本モードを有するもの。

Mosaic pattern : 複数の基本モードを有するもの。

III 結 果

全症例の年齢、性別、病理組織学的検索の詳細を Table 1 に示した。深達度分類では表在癌 10 例、筋層以下への高深達度癌 27 例で、また組織学的分類では高分化型扁平上皮癌 14 例、中分化型 16 例、低分化型 4 例、その他 3 例であった。

1. 食道癌における h-EGF の発現と予後、および病理組織学的予後因子との関連

Fig. 2 に食道癌原発巣の h-EGF 陽性像を示す。陽性例においては EGF は核周囲の細胞質に一樣に染まり、特に癌真珠部が強く染まる傾向がみられた。

Table 1—2 Summary of patients data

age/sex	a	n	stage	histology	ie	ly	v	ploidy	EGF
74/M	sm	n0	0	moderate. sq.	+	-	-	aneuploid	-
51/M	sm	n0	0	moderate. sq.	+	-	-	aneuploid	-
44/M	sm	n0	0	moderate. sq.	+	-	-	diploid	-
72/M	sm	n0	0	adeno	-	-	-	aneuploid	-
69/F	sm	n0	0	poorly. sq.	+	-	-	aneuploid	-
72/M	sm	n0	0	moderate. sq.	-	+	+	aneuploid	-
72/F	sm	n0	0	poorly. sq.	-	-	-	diploid	-
47/F	sm	n2	3	moderate. sq.	+	-	-	aneuploid	-
52/M	sm	n2	3	well. sq.	-	-	-	diploid	-
68/M	sm	n3	4	moderate. sq.	-	+	-	diploid	-
72/M	mp	n0	1	moderate. sq.	-	+	-	aneuploid	+
69/F	mp	n0	1	moderate. sq.	-	+	+	aneuploid	-
72/M	mp	n0	1	well. sq.	+	+	+	mosaic	-
61/M	mp	n2	3	well. sq.	-	+	-	aneuploid	-
69/M	mp	n2	3	poorly. sq.	+	-	-	aneuploid	+
75/F	mp	n3	4	moderate. sq.	+	+	+	mosaic	+
60/M	a 1	n0	2	moderate. sq.	-	-	-	diploid	+
27/F	a 1	n0	2	moderate. sq.	-	-	-	mosaic	-
64/F	a 1	n0	2	well. sq.	+	+	-	-	+
72/M	a 1	n0	2	well. sq.	-	+	-	-	+
63/M	a 1	n1	2	undiffer	-	+	+	mosaic	-
59/M	a 1	n2	3	moderate. sq.	+	+	-	aneuploid	+
73/M	a 1	n2	3	well. sq.	-	-	-	mosaic	-
65/F	a 1	n2	3	well. sq.	-	+	-	diploid	+
66/F	a 1	n2	3	moderate. sq.	-	+	+	aneuploid	-
47/M	a 1	n3	4	well. sq.	-	+	+	mosaic	+
46/M	a 1	n3	4	well. sq.	-	+	+	aneuploid	+
64/M	a 1	n3	4	moderate. sq.	-	+	-	mosaic	+
69/M	a 1	n3	4	well. sq.	-	+	-	mosaic	+
68/M	a 2	n1	3	poorly. sq.	+	-	-	mosaic	-
63/M	a 2	n2	3	well. sq.	-	+	+	aneuploid	+
73/M	a 2	n2	3	well. sq.	+	+	+	mosaic	+
57/M	a 2	n2	3	adeno	+	+	-	aneuploid	+
58/M	a 2	n2	3	moderate. sq.	-	+	-	diploid	-
57/M	a 2	n3	4	well. sq.	-	+	+	mosaic	-
56/M	a 2	n3	4	moderate. sq.	-	+	-	aneuploid	+
64/M	a 2	n3	4	well. sq.	-	+	+	mosaic	+

h-EGF の発現は37症例中17例(45.9%)に認め、陰性例は20例(54.1%)であった。これを深達度別にみると、表在癌においてはすべて EGF 陰性を示し、陽性例を認めなかったが、筋層に及ぶものは陽性例、陰性例とも各々3例ずつであり、さらに筋層を越え外膜に深達するものにおいては、陽性例14例(66.7%)、陰性例7例(33.3%)、と深達度が増すにつれて有意に EGF 陽性例の増加する傾向を認めた (Table 2)。

EGF の発現度別にみた予後判定を Kaplan-Meier 法にて解析すると、EGF 陽性例において有意な生存率

の低下を認め($p < 0.05$)、5年生存率は EGF 陰性例で 57.8%、陽性例においては18.5%であった (Fig. 3)。

組織型別に EGF 発現度を比較すると、高分化型扁平上皮癌では EGF 陽性例が64.3%を占めたのに対して、中分化型扁平上皮癌、低分化型扁平上皮癌における EGF 陽性例は37.5%、25.0%と有意差を認めるには至らなかった。しかしながら組織学的分化度が高い程 EGF 陽性例の増える傾向を認めた (Table 3)。

リンパ節転移との関係については、Table 4 に示すごとく高次リンパ節群に転移をきたした例の原発巣に

Fig. 1 DNA ploidy pattern

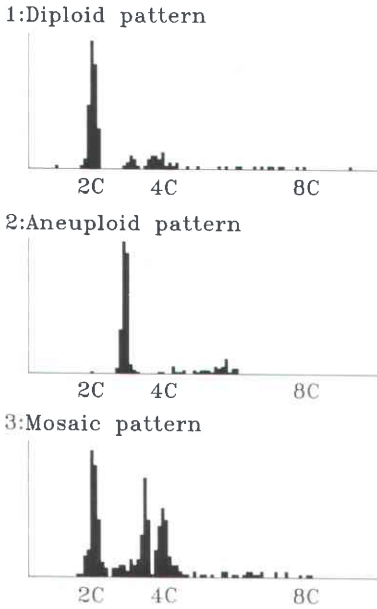
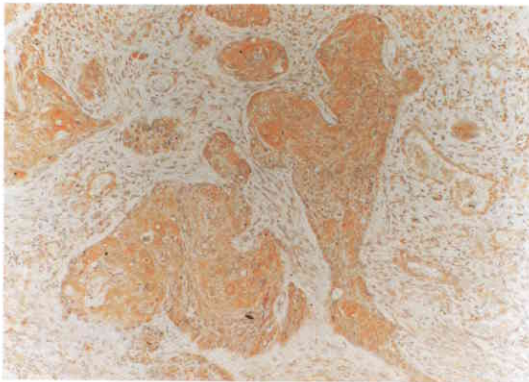


Fig. 2 Expression of EGF in esophageal carcinoma

Immunohistochemical staining of monoclonal antibody against h-EGF in esophageal carcinoma: Brown cytoplasmic stain indicates positive reaction. ($\times 100$)



おける EGF の陽性例が増加する傾向を認めた。

またこの傾向はリンパ管侵襲(ly)についても認められ、リンパ管侵襲陰性例の EGF 陽性例はわずか 15.4%を占めるにすぎないのに対し、リンパ管侵襲陽性例においては、62.5%と高い EGF 陽性率を示した (Table 5)。

しかしながら、血管侵襲 (v)、および粘膜上皮内伸

Table 2 Relationship between EGF expression and depth of tumor invasion

	EGF (-)	EGF (+)	Total
sm	10 (100.0%)	0	10 (100.0%)
mp	3 (50.0%)	3 (50.0%)	6 (100.0%)
a1 ≤	7 (33.3%)	14 (66.7%)	21 (100.0%)

p<0.01

Fig. 3 Survival curves with EGF expression

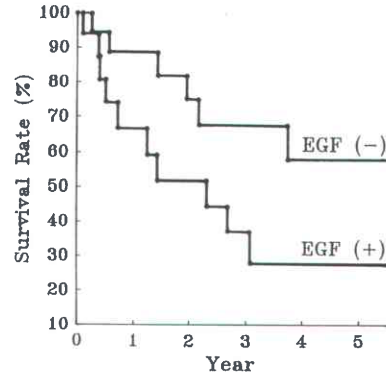


Table 3 Relationship between EGF expression and histologic types

	EGF (-)	EGF (+)	Total
well	5 (35.7%)	9 (64.3%)	14 (100.0%)
moderately	10 (62.5%)	6 (37.5%)	16 (100.0%)
poorly	3 (75.0%)	1 (25.0%)	4 (100.0%)
others	2	1	3

Table 4 Relationship between EGF expression and lymph node metastasis

	EGF (-)	EGF (+)	Total
n0+n1	12 (75.0%)	4 (25.0%)	16 (100.0%)
n2	6 (50.0%)	6 (50.0%)	12 (100.0%)
n3	2 (22.2%)	7 (77.8%)	9 (100.0%)

Table 5 Relationship between EGF expression and lymphatic invasion

	EGF (-)	EGF (+)	Total
ly (-)	11 (84.6%)	2 (15.4%)	13 (100.0%)
ly (+)	9 (37.5%)	15 (62.5%)	24 (100.0%)

p<0.01

Table 6 Relationship between EGF expression and blood vessel invasion

	EGF (-)	EGF (+)	Total
v (-)	14 (56.0%)	11 (44.0%)	25 (100.0%)
v (+)	6 (50.0%)	6 (50.0%)	12 (100.0%)

Table 7 Relationship between EGF expression and intraepithelial spread

	EGF (-)	EGF (+)	Total
ie (-)	13 (54.2%)	11 (45.8%)	24 (100.0%)
ie (+)	7 (53.8%)	6 (46.2%)	13 (100.0%)

Table 8 Relationship between EGF expression and DNA ploidy pattern

	EGF (-)	EGF (+)	Total
diploid	5 (71.4%)	2 (28.6%)	7 (100.0%)
aneuploid	9 (56.3%)	7 (43.7%)	16 (100.0%)
mosaic	6 (50.0%)	6 (50.0%)	12 (100.0%)

展 (ie) 別にみた EGF の発現については、特に有意な相関関係を認めなかった (Table 6, 7)。

2. 食道癌核内 DNA 量分布パターンと h-EGF 発現との関連

食道癌 DNA 量の測定可能であった35例の DNA ploidy pattern の内訳は、diploid pattern 7例、aneuploid pattern 16例、mosaic pattern 12例であった。このうち diploid pattern を示す症例においては、その71.4%が EGF 陰性であったのに対して、aneuploid pattern, mosaic pattern を示す症例における EGF 陰性例はおおの56.3%, 50.0%と癌細胞核の有する基本 DNA 量の変異、あるいは多モード化といった現象が進むほど EGF の発現率の増加する傾向が認められた (Table 8)。

IV 考 察

近年、上皮成長因子 (EGF, epidermal growth factor) は、上皮系組織および癌に対する増殖、分化との関連において注目を集めるようになってきた。胃癌において、その発現が進行度や予後と関連することが報告^{4)~7)}されてきたが、食道癌においては in vitro の系における癌細胞増殖に対する効果に一定の見解をみていない⁸⁾⁹⁾。しかし、in vivo の系においては¹²⁾¹⁵⁾、EGF による腫瘍増殖促進傾向を認めたと報告がみられ EGF の発現が癌の悪性度の指標となりうる可能性が

示唆されている。一方、扁平上皮癌において EGF receptor の発現が高頻度に認められること^{8)~12)}や、EGF-receptor の発現と予後との間に相関が認められること^{11)~14)}、さらに erbB 癌遺伝子産物と EGF receptor との構造的相同性が見いだされたことにより、EGF・EGF-receptor 系が腫瘍の増殖進展に関与している可能性がいっそう強く示唆されるようになってきている。そこで、今回われわれは当科において切除された37例の食道癌のパラフィン包埋ブロックを用い、食道癌の progression に及ぼす EGF の影響を検討した。

今回の検討において、EGF 陽性群は有意にその生存率の低下を認めた。さらに表層癌においては EGF 陽性例を認めず、深達度が進むにつれ EGF 陽性率が増加する傾向を示したことや、リンパ管侵襲およびリンパ節転移との間にも相関を認めたことより、EGF の発現が食道癌の進展になんらかの影響をおよぼしていることは明らかなようである。さて、ここに示された EGF は、h-EGF 抗体を用いた染色において細胞質内に均一に染め出されたことより外因性のものではなくむしろ癌細胞自身が発現しているものであろうと考えられる。しかし、表在癌においてその発現が認められず、深達度が進むにつれ発現度が増すこと、また growth fraction が小さくその progression に比較的長期間を費やすと考えられる高分化型扁平上皮癌¹⁶⁾において EGF の発現例が多く認められたことなどを考慮すると、癌が生長する時間的経過のなかで、次第に EGF の発現が起こってくるのではないかと考えられた。Autocrine pathway の理論、また EGF が EGF-receptor の gene exprssion を促進する¹⁷⁾といった報告などが散見されるが、EGF と EGF-receptor の同時発現率が深達度や stage が進むにつれ上昇するといった報告⁵⁾⁶⁾などにも示されるように、EGF-receptor gene あるいは erbB gene の増幅を有する癌細胞がその進展過程において autocrine の能力を次第に発現してくるのかもしれない。

一方近年、腫瘍細胞核の有する DNA 量の変化が腫瘍の悪性度を反映しているという観点から術前生検組織を試料とした DNA ploidy pattern の解析が行われるようになってきた。このような DNA ploidy の解析が腫瘍における EGF の発現とも相関を示すものであるか否かを調べるため、われわれはさらに DNA ploidy pattern と EGF の発現の相関をみることとした。その結果、diploid 群に比べ aneuploid, mosaic タイプとなるにつれ、すなわち癌細胞核内基本 DNA

量に変異をきたしているものにおいてEGFの発現が増している傾向を認めた。しかしながらEGF発現の指標となりうるだけの有意差をみとめるには至らず、DNA ploidyの解析は必ずしもEGF発現の指標とはなりえないと考えられた。

以上、このようにh-EGFは腫瘍の進展に伴って2次的に発現されてきたものである可能性が高いが、その予後およびリンパ管侵襲度やリンパ節転移との関連に示されるように、腫瘍の有する生物学的悪性度の一端をになっているものと考えられた。

文 献

- 1) Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incision eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562, 1962
- 2) 食道疾患研究会編: 食道癌取扱規程, 第7版, 金原出版, 東京, 1989
- 3) 浜田新七: 細胞単離法によるDNA蛍光測光法, 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学1988, 学際企画, 東京, 1988, p25-37
- 4) Tahara E, Sumiyoshi H, Hata J et al: Human epidermal growth factor in gastric malignancy. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 77: 145-152, 1986
- 5) Yasui W, Hata J, Yokozaki H et al: Interaction between epidermal growth factor and its receptor in pregression of human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 41: 211-217, 1988
- 6) 田原榮一, 落合淳志, 横崎 宏: 胃がんの増殖因子. *総合臨* 37: 48-52, 1988
- 7) 伏田幸夫, 米村 豊, 杉山和夫ほか: 胃癌におけるhuman epidermal growth factor (h-EGF)の検討. *日外会誌* 89: 1965-1968, 1988
- 8) Kamata N, Chida K, Rikimaru K et al: Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptor on human squamous cell carcinoma in culture. *Cancer Res* 46: 1648-1653, 1986
- 9) Banks-Schlegel SP, Jesse Q: Human esophageal carcinoma cells have fewer, but higher affinity epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 261: 4359-4362, 1986
- 10) Ozawa S, Ueda M, Ando N et al: High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer* 39: 333-337, 1987
- 11) Ozawa S, Ueda M, Ando N et al: Epidermal growth factors in cancer tissues of esophagus, Lung, Pancreas, Colorectum, Breast and Stomach. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 79: 1201-1207, 1988
- 12) 向田秀則, 平井敏弘, 戸井雅和ほか: ノドマウス可移植ヒト食道がんにおけるEpidermal Growth Factorの測定およびその増殖に及ぼす影響. *Oncologia* 21: 55-60, 1988
- 13) 向田秀則, 平井敏弘, 中村隆志ほか: 食道癌におけるepidermal-growth-factor receptorの測定および病理学的因子との関連. *医のあゆみ* 144: 819-820, 1988
- 14) Ozawa S, Ueda M, M, Ando N et al: Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 63: 2169-2173, 1989
- 15) Ozawa S, Ueda M, Ando N et al: Stimulation by EGF of the growth of EGF receptor-hyperproducing tumor cells in athymic mice. *Int J Cancer* 40: 706-710, 1987
- 16) 服部隆則: 腫瘍細胞の生物学的・生化学的性状. 現代病理学大系9A, 中山書店, 東京, 1985, p289-304
- 17) Yoshida K, Takanashi A, Kyo E et al: Epidermal Growth Factor Induce the Expression of Its Receptor Gene in Human Gastric Carcinoma Cell Line TMK-1. *Jpn J Cancer Res* 80: 743-746, 1989

Correlation between Human-epidermal Growth Factor and Prognosis, Histological Findings, and DNA Ploidy Patterns on Esophageal Carcinoma

Akira Kawaguchi, Jyunsuke Shibata, Masashi Kodama, Ryouji Kushima and Takanori Hattori*

The First Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

*The First Department of Pathology, Shiga University of Medical Science

The expression of epidermal growth factor (EGF) was studied immunohistochemically in a total of 37 esophageal carcinomas and compared with histological findings, prognosis, and DNA ploidy patterns which were measured by the cytophotometrical method. Histologically, the incidence of EGF immunoreactivity in well-differentiated squamous cell carcinomas was higher than in poorly differentiated squamous cell carcinomas. A significant correlation was observed between the depth of tumor invasion, lymphatic invasion and EGF immunoreactivity ($p < 0.05$). Furthermore a good correlation was demonstrated between lymphnode metastasis,

DNA ploidy pattern and EGF immunoreactivity. The survival rate was worse for patients with EGF-positive tumor cells than for those with EGF-negative cells. These findings suggest that EGF stimulates proliferation and differentiation of esophageal carcinoma and influences its prognosis.

Reprint requests: Akira Kawaguchi The First Department of Surgery, Shiga University of Medical Science
Seta, Ohtsu, 520-21 JAPAN
