

氏 名	つのだ しげる 角 田 茂
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3193 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Significance of nerve growth factor overexpression and its autocrine loop in oesophageal squamous cell carcinoma (食道扁平上皮癌における神経成長因子の過剰発現と自己分泌ループの意義)
論文調査委員	(主 査) 教 授 千 葉 勉 教 授 上 本 伸 二 教 授 武 藤 誠

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) はチロシンリン酸化活性をもつ高親和性受容体; TrkA および低親和性受容体; p75NTR の二つの受容体を持つことが知られており、神経細胞の維持、増殖のみならず神経系以外の組織および種々の癌における発現が知られている。しかし、食道扁平上皮癌における NGF 発現の意義については未だ明らかではないので、その臨床病理学的意義および生物学的意義の検討を行った。

【材料と方法】(1) 食道扁平上皮癌手術症例 109 例について NGF および高親和性 NGF 受容体 TrkA および低親和性 NGF 受容体 p75NTR の発現を、免疫組織化学染色により臨床病理学的検討を行った。(2) 食道扁平上皮癌手術症例 19 例の凍結標本より RNA を抽出し、癌部および非癌部における NGF、TrkA および p75NTR の mRNA 発現を検討した。(3) 食道扁平上皮癌細胞株 5 株を用いて NGF、TrkA および p75NTR の mRNA およびタンパク質発現を RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて検討した。(4) これら細胞株 5 株についてさらに NGF の培養上清中への分泌を ELISA 法にて確認し、(5) NGF 高発現細胞株 HSA/c を用いてイオノマイシン刺激による NGF 分泌を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。(6) 更に、HSA/c を用いて、細胞移動能に関する NGF および TrkA の関与を抗 NGF 抗体および TrkA 阻害剤を用いてトランスウェルチャンバーにて検討した。(7) 最後に、HSA/c を用いて siRNA の遺伝子導入により NGF 発現抑制し、トランスウェルチャンバーにより細胞移動能を検討した。

【結果】(1) NGF 過剰発現は 109 例中 63 例 (57.8%) で認められ、リンパ節転移 ($p=0.005$) および遠隔リンパ節転移 ($p=0.017$)、高い TNM stage ($p=0.025$)、低分化型扁平上皮癌 ($p=0.033$) と有意に相関し、悪い患者予後 ($p=0.019$) と関連していた。また、NGF の過剰発現は TrkA の高発現 ($p=0.032$) および p75NTR の発現低下 ($p=0.033$) とともに有意に相関していた。(2) NGF 発現は 19 例中 17 例 (89%) において非癌部に比し癌部にて増強していた。(3) 検討した全 5 株において NGF と TrkA および p75NTR 両者の受容体の発現を認め、(4) ELISA 法にて培養上清中への NGF 分泌が認められ、NGF 分泌量は mRNA 発現に相関していた。(5) 更に、イオノマイシン刺激により NGF の細胞質内の濃度が低下したことより NGF の分泌が確認された。(6) 培養液中の NGF の抗 NGF 抗体による中和、および TrkA 阻害においても用量依存性に HSA/c に対する移動能の抑制が認められた。(7) siRNA により HSA/c の NGF 発現および分泌は約 85%抑制され、細胞移動能も有意に抑制された ($p=0.0009$)

【結論】食道扁平上皮癌において、NGF の過剰発現は、TrkA を介した自己分泌のループを通じ腫瘍細胞の移動を促進し、リンパ節転移を促進することで患者予後を悪化させている可能性が示唆された。NGF-TrkA 経路の遮断は、食道扁平上皮癌における新たな治療標的になりうると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は、食道扁平上皮癌における神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) の過剰発現と autocrine による転移促

進の機構について、臨床病理学的意義および生物学的意義について検討を行った。

食道扁平上皮癌手術症例 109 例における免疫組織化学染色による検討では、NGF 過剰発現は 63 例（57.8%）で認められ、所属リンパ節転移、遠隔リンパ節転移、高い TNM stage、低い腫瘍分化度と有意に相関し、悪い患者予後と関連していた。また、NGF の過剰発現は高親和性受容体 TrkA の高発現および低親和性受容体 p75NTR の発現低下とも有意に相関していた。手術標本より採取した RNA を用いての RT-PCR では、NGF の mRNA 発現は 89%（17/19）の症例で、食道正常粘膜に比べ、腫瘍部で発現が増強していた。

食道扁平上皮癌細胞株における検討では、検討した細胞株全 5 株において、NGF の発現および分泌がウエスタンブロット法および ELISA 法にて認められ、また、TrkA および p75NTR の両受容体の発現も認められた。培養液中に分泌される NGF の抗 NGF 抗体による中和、および TrkA の阻害のそれぞれにおいて、NGF 高発現細胞株 HSA/c の移動能が抑制されたことより、分泌された NGF が autocrine の機序により TrkA を介して細胞移動を促進していることが示唆された。さらには、siRNA 投与により NGF の発現、分泌は著明に抑制され、細胞移動能も有意に抑制された。

以上の研究は、食道扁平上皮癌における、過剰発現した NGF の TrkA を介した autocrine による細胞移動と転移促進機構の解明に貢献し、NGF-TrkA 経路の遮断の食道扁平上皮癌に対する新たな治療標的としての可能性が示唆され、将来の食道癌治療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 11 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。