

食道扁平上皮癌の分子生物学的バイオマーカーの発現と

根治的化学放射線療法の結果の関係

東京大学大学院医学系研究科 生体物理医学専攻

小林 紫野

目次

1. 序論	6
1.1 食道癌の疫学	6
1.2 食道癌の解剖学的部位	8
1.3 食道癌の臨床	11
1.4 食道癌の化学放射線療法	12
1.5 食道癌の放射線治療	15
1.5.1 照射手技	15
1.5.2 副作用	20
1.6 化学放射線療法の今後	20
1.7 放射線治療における分子・細胞学的反応	23
1.7.1 放射線傷害	23
1.7.2 放射線に対する分子・細胞学的反応	25
1.7.3 低酸素と放射線応答	26
1.8 分子生物学的バイオマーカーと癌	27
2. 予備研究「食道扁平上皮癌において根治的放射線療法を施行した 10 症例に ついての 16 種類の分子生物学的バイオマーカーと臨床成績の関係」	31
2.1 目的	31
2.2 対象と方法	32
2.2.1 症例	32

2.2.2	化学放射線療法	34
2.2.3	経過観察	36
2.2.4	免疫染色	36
2.2.5	統計解析	39
2.3	結果	40
2.3.1	症例	40
2.3.2	免疫染色	40
2.3.3	臨床成績	40
3.	研究1「食道扁平上皮癌において根治的化学放射線療法を施行した93例についてのHER-2、p53、MIB-1、HIF-1 α の発現と臨床成績の関係」	55
3.1	目的	55
3.2	対象と方法	55
3.2.1	症例	55
3.2.2	化学放射線療法	56
3.2.3	経過観察	57
3.2.4	免疫染色	57
3.2.5	統計解析	62
3.3	結果	65
3.3.1	症例	65
3.3.2	免疫染色	66
3.3.3	統計学的解析	66

4. 研究2「食道扁平上皮癌における CLDN-1、CLDN-4、CLDN-5、CLDN-7 の発現と根治的化学放射線療法の予後との関係」	89
4.1 目的	89
4.2 対象と方法	90
4.2.1 症例	90
4.2.2 免疫染色	91
4.2.3 統計解析	91
4.3 結果	92
4.3.1 症例	92
4.3.2 免疫染色	92
4.3.3 統計学的解析	92
5. 考察	100
5.1 概要	100
5.2 食道癌の根治的化学放射線療法	101
5.3 予備研究と研究1	101
5.3.1 p53 とアポトーシス・細胞周期	101
5.3.2 細胞周期関連タンパク質-p21、p16、Cyclin-D1	104
5.3.3 Bcl-2 とアポトーシス	107
5.3.4 HER-2 と分子標的薬	108
5.3.5 癌の浸潤・転移の機構-VEGF、E-cadherin、MMP	109
5.3.6 癌の浸潤・転移と上皮間葉転換	111

5.3.7 癌と低酸素-HIF-1 α	111
5.4 研究2 クローデインの研究.....	112
5.5 当研究の限界.....	113
5.6 今後の展望.....	115
6. 結論.....	117
7. 附1 「HIF-1 α の免疫染色の条件検討」	118
7.1 条件検討①.....	118
7.2 条件検討②.....	118
7.3 条件検討③.....	121
7.4 条件検討④.....	121
7.5 条件検討まとめ.....	122
8. 附2 「各分子生物学的マーカーの発現の相関とサブグループ解析」	124
8.1 方法.....	124
8.2 結果.....	125
8.3 考察.....	125
9. 謝辞.....	135
参考文献.....	136

1. 序論

食道癌は一般に予後の悪い癌であり、最近の医学の進歩にも関わらず、治療に難渋する場合が少なくない。難治癌の代表である食道癌を制御するには、その生物学的特性を理解し、手術、放射線療法、化学療法をうまく組み合わせることが必要である。わが国で多数を占める食道扁平上皮癌は、転移しやすい、放射線感受性や抗癌剤感受性が高いといった特性を有し、そのメカニズムを分子生物学的に解明することは大変重要であると考えられている。また、手術、放射線療法、化学療法に続く第4の治療法とも言うべき分子標的治療も視野に、生物学的特性の臨床応用も目前まできている。このような背景で、個々の症例に適した治療を展開し、よりよい予後と生活の質（quality of life: QOL）を得るために、さまざまな食道癌の基礎研究が行われている。

1.1 食道癌の疫学

食道癌は世界で8番目に多い癌で、毎年48万人以上が罹患し、40万人以上が死亡していると推計されている⁽¹⁾。60歳以上の男性に多く、死亡率も男性で高い。American Cancer Societyによる報告では、米国において、2012年に推定される食道癌の新規症例数は17,460人、死亡数は15,070人という⁽²⁾。また、死亡数全罹患の80%以上は発展途上国と推計されているが、罹患率・死亡率の国による較差はほかの癌に比べて大きい。たとえば東部南部アフリカや東アジアでは高い罹患率を、米国や西部中部アフリカでは低い罹患率を示し、その比は約16倍である。組織型に

も地域較差が存在する⁽³⁾。食道癌の組織型は主に扁平上皮癌と腺癌が占めているが、扁平上皮癌は後進国に多く、腺癌は先進国に多いとされている。罹患率が高い地域のひとつである中国では、その約 90%は扁平上皮癌である。米国および西ヨーロッパでは現在、食道腺癌の方が扁平上皮癌よりも多くみられ、腫瘍のほとんどが下部食道に発生する。罹患率の上昇および人口統計学的変化の原因は分かっていないが、栄養不良状態や野菜摂取不足、熱い飲料の摂取などが考えられている。食道扁平上皮癌の主なリスク因子は喫煙とアルコールであり、食道癌全体の罹患率は年々上昇しているにもかかわらず、食道扁平上皮癌の割合は減少している。一方、食道腺癌については、下部食道の扁平上皮が腺上皮に変化した Barrett 食道の存在が食道腺癌発生リスクの上昇と関係しており、慢性的胃食道逆流が Barrett 食道の主な原因であると考えられている。スウェーデンの集団ベースのケースコントロール研究の成績は、症候性胃食道逆流が食道腺癌の危険因子であることを強く示唆している。逆流症状の頻度、重症度、持続時間と食道腺癌のリスクの増大との間には、正の相関が認められる⁽⁴⁾。

本邦では、平成 21 年の食道癌死亡者数は 11,713 人で増加を続けている⁽⁵⁾。粗死亡率では、1950 年代の 4 倍近く上昇しているが、1985 年の標準人口を基準として年齢調整すると、死亡率はほぼ横ばいか減少傾向で、近年の粗死亡率の上昇は主に人口の高齢化によることを示している。組織型は扁平上皮癌が 90%以上を占めているが、近年の食生活の欧米化などにより、欧米諸国同様に扁平上皮癌の割合は減少していくと予想されている。

1.2 食道癌の解剖学的亜部位

AJCC (American Joint Committee on Cancer) の TNM 分類⁽⁶⁾を参考に、食道癌の解剖学的亜部位について述べる。食道とは食道入口部から食道胃接合部までをいい、食道入口部は輪状軟骨の下縁のレベルに一致する。食道癌を頸部食道 Ce (cervical esophagus)、胸部食道 Te (thoracic esophagus)、食道胃接合部に分ける (図 1)。胸部食道はさらに胸部上部食道 Ut (upper thoracic esophagus)、胸部中部食道 (middle thoracic esophagus)、胸部下部食道 Lt (lower thoracic esophagus) に分ける⁽⁷⁾。頸部食道は輪状軟骨の下縁から胸郭入口部 (胸骨上縁)、すなわち上門歯列から約 18 cm までの範囲をいう。胸部上部食道は胸郭入口部から気管分岐部の高さ、すなわち上門歯列から約 24 cm までの範囲、胸部中部食道は気管分岐部の高さから食道胃接合部との間の食道を 2 等分した上部の 1/2 であり、下縁は上門歯列から約 32 cm である。胸部下部食道は腹部食道を含む約 8 cm の長さであり、気管分岐部の高さから食道胃接合部との間の食道を 2 等分した下部の 1/2 である。下縁は上門歯列から約 40 cm である。食道胃接合部癌は、中心が食道胃接合部から 5 cm 以内であり、かつ食道に進展する主要は食道癌として分類される。中心が胃の中で、かつ食道胃接合部から 5 cm をこえて離れているか、5 cm 以内であっても、食道に進展していない腫瘍は、胃癌として分類する。

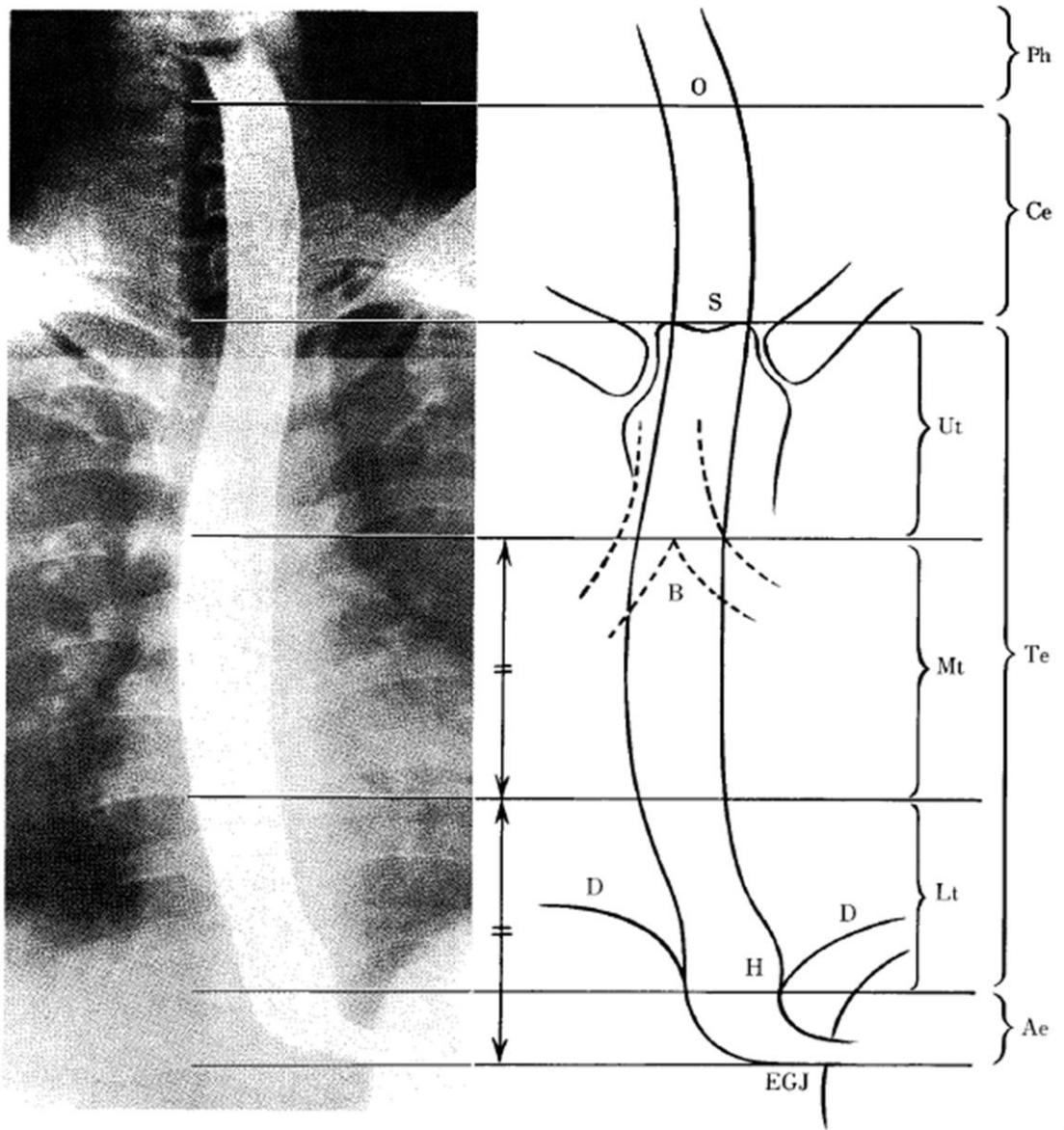


図 1. 食道の区分

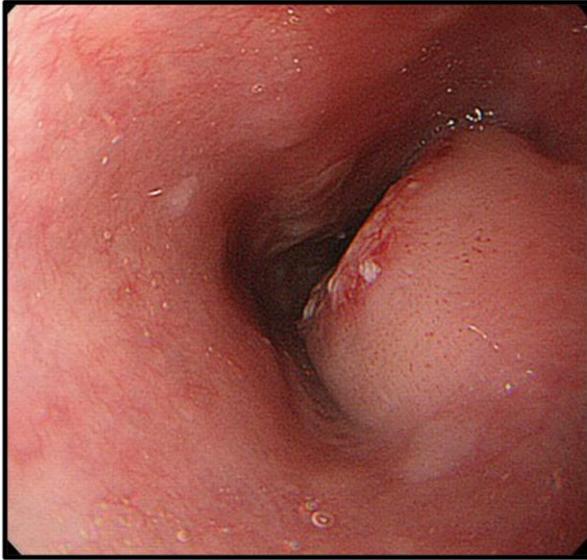


図 2. 食道癌の内視鏡検査所見

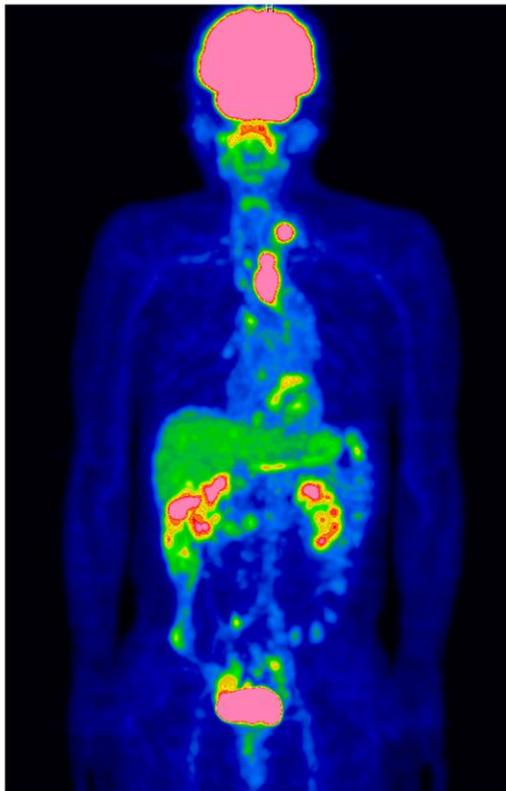


図 3. 食道癌症例の ^{18}F -FDG PET
検査所見
食道と左鎖骨上リンパ節への集積
を認める。

1.3 食道癌の臨床

無症状で経過し、健康診断や人間ドックで発見される食道癌も 20%程度あるとされている。このように偶発的に発見される癌は早期である場合が多く、予後もよい。しかし、食道がしみる感じ、食道のつかえ感、体重減少、胸痛、背部痛、咳、声のかすれといった症状で発症し、初診にいたる場合も多い。診断には、食道造影検査も有用であるが、内視鏡検査で直接観察が可能な臓器であり、また細胞採取も可能なこともあり、治療前の内視鏡検査は必須の項目であるといえる (図 2)。閉塞が高度な場合には施行できないが、超音波内視鏡 (endoscopic ultrasonography: EUS) も有用で、深達度とリンパ節転移を評価することができる。さらに CT (computer tomography) 検査やときに ^{18}F -FDG PET (^{18}F -fluorodeoxy glucose positron emission tomography) 検査 (図 3) も用いて癌の病期を診断する。必要に応じて骨シンチグラフィを行なうこともある。腫瘍マーカーとしては血清中の扁平上皮癌関連抗原 (squamous cell carcinoma antigen) と癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen: CEA) などがあるが、早期診断に有用として確立しているマーカーはない。

食道癌は再発率が高い疾患のひとつであり、根治的治療を受けた患者の全 5 年生存率は 5~30% である⁽⁸⁾。早期で発見された癌については、生存率は高くなる。I 期は II 期以上と比べて生存率が高く、5 年生存率は 70~80% 程度である⁽⁸⁾。根治治療は外科的切除術が中心ではあるが、その補助療法としては、化学療法や化学放射線併用療法が選択される。手術不能症例や拒否症例には根治的な化学放射線療法が考慮される。集学的治療 (術前化学療法+/-放射線療法+手術、もしくは根治化学放射線療法+/-手術) にも有用性がある⁽⁹⁾。緩和治療においては、化学療法、放射線

療法（小線源治療を含む）、ステント留置術などの併用によって、個々の症例において効果的な症状の緩和が得られる⁽¹⁰⁾。

1.4 食道癌の化学放射線療法

切除可能な食道癌の外科治療では5～30%の5年生存率が得られる。一方、食道温存を目的に、根治治療としての放射線療法と化学療法との併用が検討されてきた。根治的放射線療法と、放射線療法単独とを比較した Radiation Therapy Oncology Group のランダム化試験（RTOG 85-01）では、併用群の5年生存率に改善をみた（27% vs. 0%）⁽¹¹⁾。この試験の8年間の追跡で、化学放射線療法を受けた患者の全生存（OS）率は22%であることが示された⁽¹²⁾。この結果をうけ、放射線療法単独では食道癌の根治は目指せず、化学療法の同時併用が必須となった。RTOG 85-01の結果を改善する試みとして、Intergroup 0123（RTOG 94-05）は、食道に限局性腫瘍を有する236人の患者を、高線量の放射線療法（64.8 Gy）と5-フルオロウラシル（5-fluorouracil: 5-FU）およびシスプラチン（CDDP）の4ヵ月間のサイクルを併用する化学放射線療法群と従来の線量の放射線療法（50.4 Gy）と同様の化学療法スケジュールを併用する群にランダム化した⁽¹³⁾。当初、この試験は298人の患者を登録することになっていたが、予定されていた中間解析で高線量の放射線使用に対する有効性を得られる見込みが統計的にみて無かったため、1999年に中止された。追跡期間中央値2年の時点で、高線量放射線療法群と従来の線量の放射線療法群との間には、生存期間中央値（13ヵ月 vs. 18ヵ月）、2年生存率（31% vs. 40%）または局所再発率（56% vs. 52%）のいずれにおいても統計的な差は認め

られなかったが、むしろ高線量群で局所制御率が悪かった。高線量群では治療関連死が高率（10% vs. 2%）に生じた。ただし、高線量群での死亡 11 例のうち 7 例で、50.4 Gy 以下の時点で障害が発生していた。この試験の結果、化学放射線同時併用療法における放射線の線量は 50.4 Gy を超える線量には利益がないと判断された。

根治化学放射線療法の前に導入化学療法を施行すべきか否かについては、RTOG によって切除不能局所領域食道癌での第 II 相無作為比較試験 (RTOG 01-13) が行われた⁽¹⁴⁾。この試験では、導入化学療法として 5-FU、CDDP、パクリタキセルを併用して 2 コース行った後に、化学放射線療法を行う群と、導入化学療法として CDDP とパクリタキセルを併用した後に、そのまま 5-FU を使用せずに化学放射線療法を行う群に割り付けられた。この試験は、いずれかのレジメン（5-FU 使用群 vs. 5-FU 不使用群）による治療群が、前述の RTOG 94-05 (INT-0123) 試験の 1 年生存率 66%を上回る 77.5%を超えることをプライマリーエンドポイントにしていたが、いずれのレジメンもエンドポイントに達しなかった。またそれぞれ 27% (5-FU 使用群)、40% (5-FU 不使用群) のグレード 4 の毒性があったため、有望な治療とはされなかった。この試験の結果、根治化学放射線療法前の補助化学療法は否定された。

一方、手術の術前補助療法としては、複数の第 III 相試験で、食道癌患者に術前に同時化学放射線療法を施行した群と手術のみを施行した群とを比較している^(9, 15-17)。扁平上皮癌患者を対象として、術前に化学療法（CDDP）と放射線療法（1 回 3.7 Gy、計 37 Gy）を併用したのち手術を施行した群と手術のみを施行した群とを比較した多施設プロスペクティブ・ランダム化試験では、併用群の全生存率は改

善せず、術後死亡率は有意に高いことを示した（12% vs. 4%）⁽¹⁵⁾。食道腺癌患者では、単一施設での第 III 相試験により、5-FU、CDDP および 40 Gy の放射線（1 回 2.67 Gy）からなる導入化放射線療法と切除のみの手術とを施行した患者の生存利益は、切除のみを施行した患者よりわずかながら高い（16 ヶ月 vs. 11 ヶ月）ことが示された⁽⁹⁾。その後の単一施設における試験では、患者（75%が腺癌）を 5-FU、CDDP、ビンブラスチンおよび放射線（1.5 Gy を 1 日 2 回、計 45 Gy）による治療と切除とを施行する群、または食道切除のみを施行する群にランダムに割り付けた⁽¹⁶⁾。追跡期間の中央値が 8 年を越した時点で、手術単独療法群と併用療法群との間には、生存期間中央値（17.6 ヶ月 vs. 16.9 ヶ月）、全生存率（試験開始から 3 年時、16% vs. 30%）、および無病生存率（試験開始から 3 年時、16% vs. 28%）に有意な差は認められなかった。これらのランダム化試験の結果に基づくと、II B 期、III 期、および IVA 期の食道癌に対する至適治療法は未だ決定されていないが、手術のみでは不十分であると思われる。

食道表在癌（T1N0M0）の治療には内視鏡的粘膜切除術（endoscopic mucosal resection: EMR）、手術、放射線療法、化学放射線療法などが用いられる。このなかで、粘膜癌（m 癌）には EMR が標準治療として確立している。一方、粘膜下層癌（Sm 癌）ではリンパ節転移の頻度が高いこともあり、外科的切除が標準的な治療であった。しかしながら、90 年代後半から化学放射線療法あるいは放射線単独による手術に匹敵する良好な成績の報告があいつぎ⁽¹⁸⁻²²⁾、食道表在癌は化学放射線療法あるいは放射線単独が標準治療のひとつと考えられている。

わが国においては、T1-3N0M0 の切除可能食道癌に対しては手術が第一選択

の治療として行われていたため、90年代中頃まではT4の切除不能食道癌や、頸部リンパ節転移を有する胸部食道癌症例（M1-lymph）などの進行症例を中心に化学放射線療法が行われてきた。T4の切除不能食道癌や、頸部リンパ節転移を有する局所進行症例に対しても、化学放射線療法によって20-30%程度の2年生存率が得られている^(23, 24)。

1.5 食道癌の放射線治療

1.5.1 照射手技

照射は背臥位で行う。2次元の治療計画にはバリウム造影によるX線シミュレータが用いられてきたが、最近ではCTシミュレータを用いた3次元治療計画（three-dimensional conformal radiotherapy: 3DCRT）が主流となっている（[図4](#)）。3DCRTでは食道外への腫瘍進展範囲の同定が容易で、心臓や脊髄などの危険臓器への線量軽減し、腫瘍に対して十分な線量を照射することが可能である。

放射線治療には、肉眼的腫瘍体積GTV（Gross tumor volume）、臨床的標的体積CTV（Clinical target volume）、生理的動きを含む内的標的体積ITV（Internal target volume）、計画標的体積PTV（Planning target volume）という体積の概念が存在する（[図5](#)）。GTVは原発巣とリンパ節転移巣の体積であり、CTVはGTVに微視的な腫瘍浸潤範囲あるいは所属リンパ節領域を含む体積、ITVとはCTVに呼吸、嚥下、心拍動、蠕動などの体内臓器の動きによる影響を含めた標的体積、PTVはさらに毎回の照射における設定誤差SM（set-up margin）を含めた標的体積である⁽²⁴⁾。

食道癌はリンパ節転移の頻度が高く、治療開始時に臨床的にリンパ節転移が明

らかでない症例に対しても予防的に所属リンパ領域に照射を行う照射手法が用いられている。CTVに予防リンパ領域を含む場合のPTVの例を図6に示す。しかし照射範囲が広くなるにつれて有害事象は増加すると考えられており、予防領域の照射については一定のコンセンサスはない。予防領域を含む広いCTVでの食道癌の化学放射線療法では、心外膜炎、心不全、胸水、肺炎などの重篤な晚期合併症の頻度が高いとの報告がある⁽²⁵⁾。加えて最近では化学放射線療法で治療した食道癌の遺残、再発例に対して積極的に救済手術が行われるようになってきているが、広範囲のCTVでの治療後は、救済手術の合併症が増加する懸念もある。一方、予防域を含まない照射野のデメリットは予防域リンパ節からの再発である。当院では、2010年以前はおもに予防領域を含む照射範囲で、2011年以降は予防領域を含まない照射範囲で化学放射線療法を施行している。

照射野のデザインは前後対向2門にて40 Gy / 20 fr程度照射したのち、続けて脊髄をはずした斜入2門照射にて残りの線量を照射する手法を行う施設も本邦では多い。しかし、3DCRTの普及に伴い、肺などへの正常組織線量を最小限にするために、欧米諸国では前後と斜入あるいは側方からの多門照射が広く用いられている。当科では、6 MV以上のX線を使用し、前後と斜入からの4門照射で、前後方向により重みづけしている(図7)。線量の制限だが、脊髄は1回1.8 Gyの場合で45 Gy以下に、肺は両肺の70%は20 Gy未満に抑える。また、心臓は心室体積の50%は25 Gy未満に抑える。

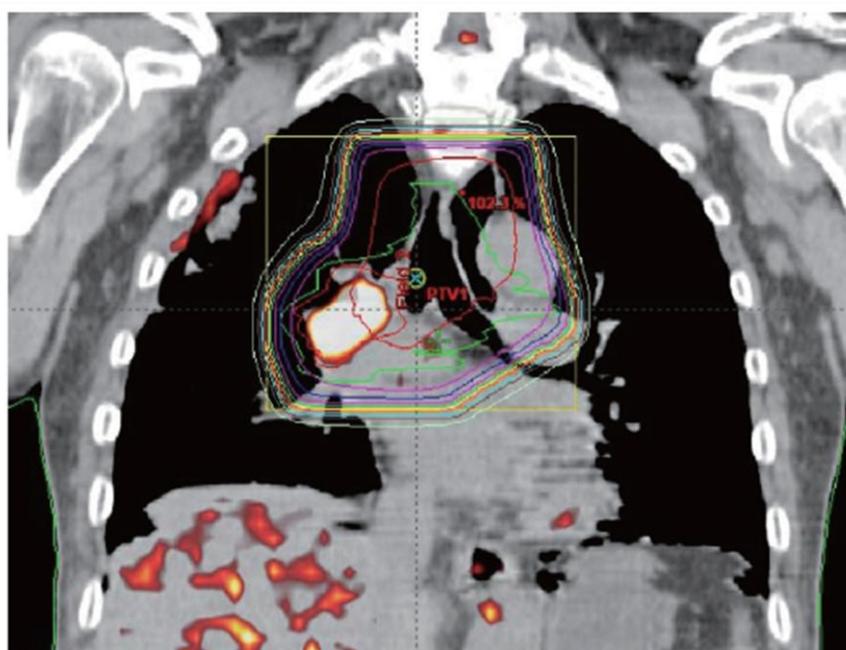
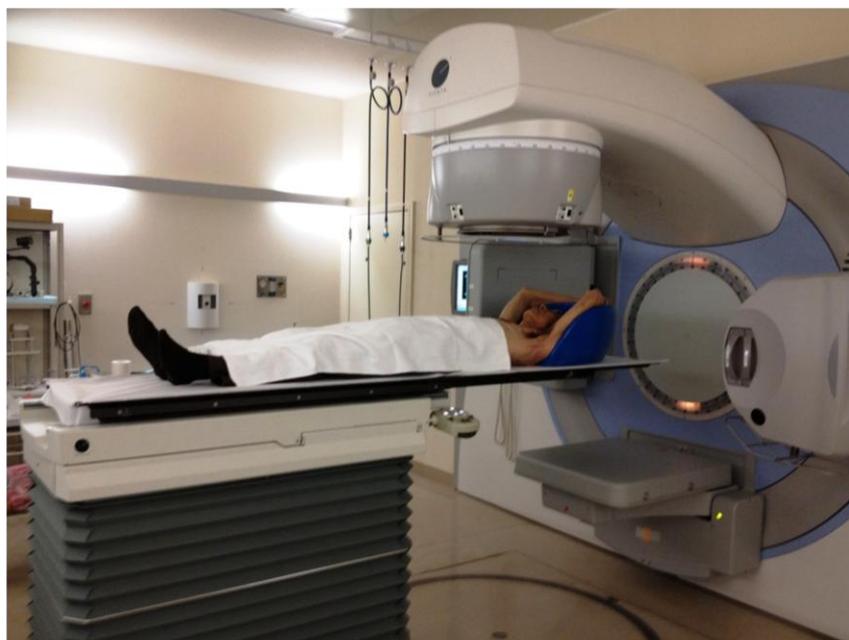


図 4. 三次元治療計画 (3DCRT)

上) 当院で使用しているライナック (Elekta Synergy)

下) 三次元治療計画 (3DCRT) の一例 (放射線治療計画ガイドライン・2008 より抜粋)

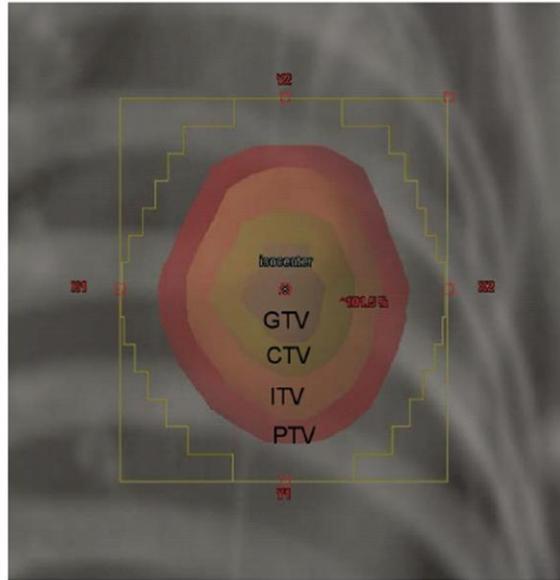


図 5. 放射線治療における target volume の概念
(放射線治療計画ガイドライン・2008 より抜粋)

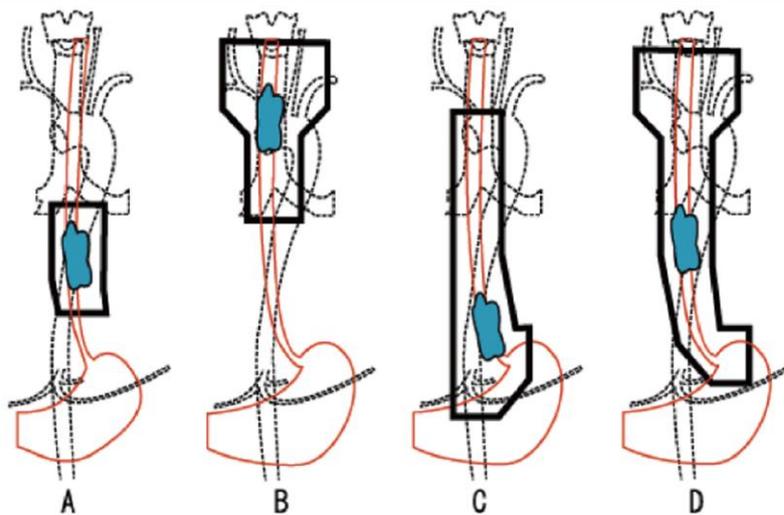


図 6. 食道の部位ごとの PTV の一例
(放射線治療計画ガイドライン・2008 より抜粋)

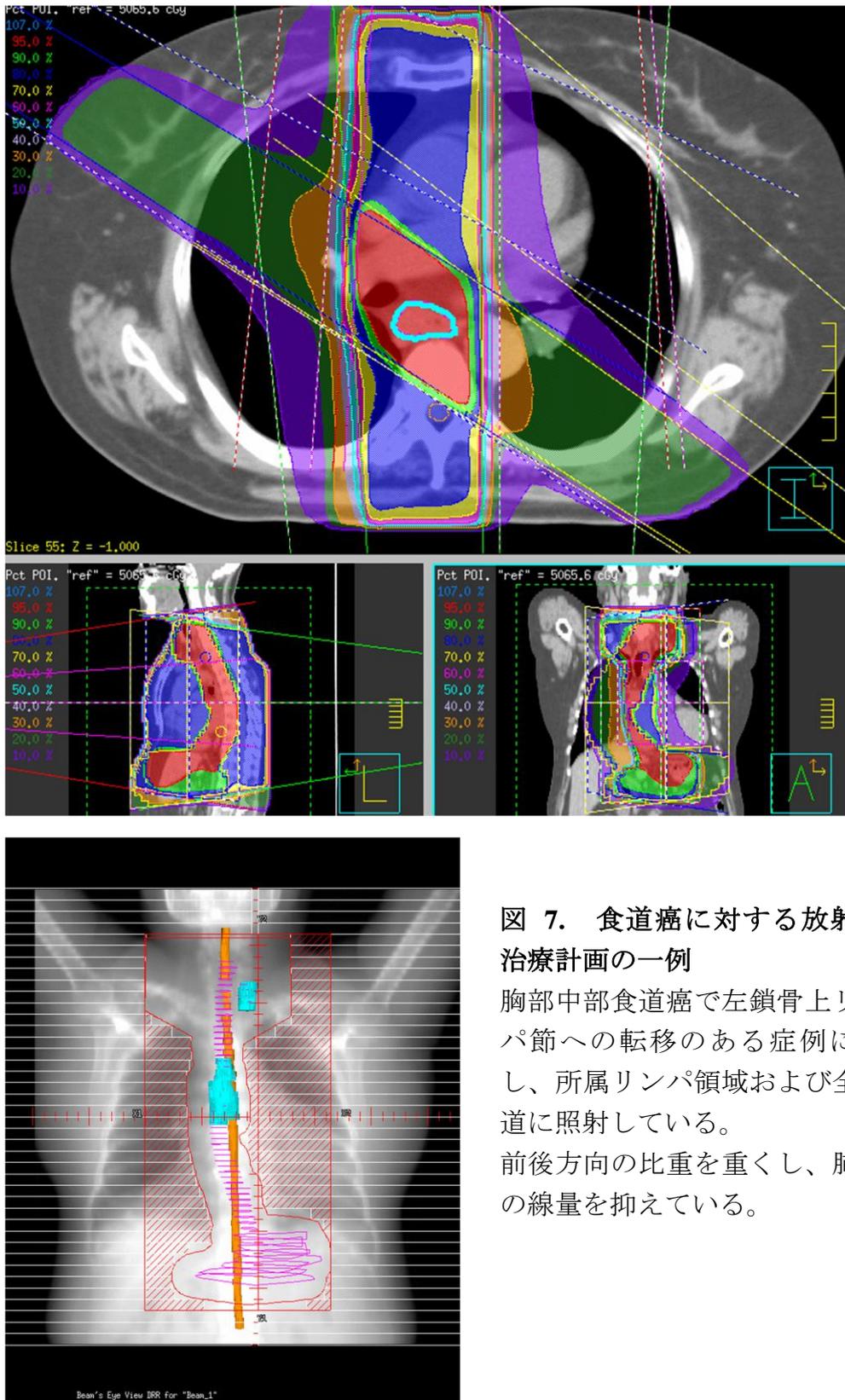


図 7. 食道癌に対する放射線治療計画の一例

胸部中部食道癌で左鎖骨上リンパ節への転移のある症例に対し、所属リンパ領域および全食道に照射している。前後方向の比重を重くし、肺への線量を抑えている。

1.5.2 副作用

放射線治療の副作用には、急性期障害と晩期障害がある。急性障害には食道炎、体重減少、易疲労感、食思不振がある。肺臓炎（図 8）は亜急性で、照射後 26 週未満に生じることが多い。症状は咳、呼吸苦、低酸素や発熱があるが、重篤な場合にはステロイド投与が必要となる場合がある。晩期障害には前述の心外膜炎、冠動脈疾患などのほかに、食道穿孔や食道狭窄（図 9）がある。しかし、遅発性の食道狭窄の半数は局所再発が原因で、良性狭窄の場合には、拡張術は大多数の患者に緩和治療として有効である。悪性狭窄の場合には、拡張術は効果が少ないばかりか、合併症のリスクが大きい。

1.6 化学放射線療法の今後

食道癌の化学放射線療法に関するエビデンスは年々増加し、標準治療のひとつの選択肢として重要な地位を占めるようになった。放射線治療の手法の変化に伴い、強度変調放射線療法（intensity-modulated radiotherapy: IMRT）や陽子線を用いた化学放射線療法も検討され、一部の施設は実施されている^(26,27)。平成 24 年 11 月現在では、当院でも一部の食道癌根治化学放射線療法症例に IMRT を使用している（図 10）。また、化学放射線療法では合併基礎疾患や高齢などによる手術不能例に対しても十分な根治治療が可能である⁽²⁸⁾。最適な治療法の選択は食道癌治療における重要な課題のひとつである。治療法選択の一助として、免疫組織化学的手法や遺伝子発現などを用いて治療前に治療効果予測を行おうという試みもなされている。有用と思われる指標がいくつか報告されている⁽²⁹⁾が、いまだ研究段階である。

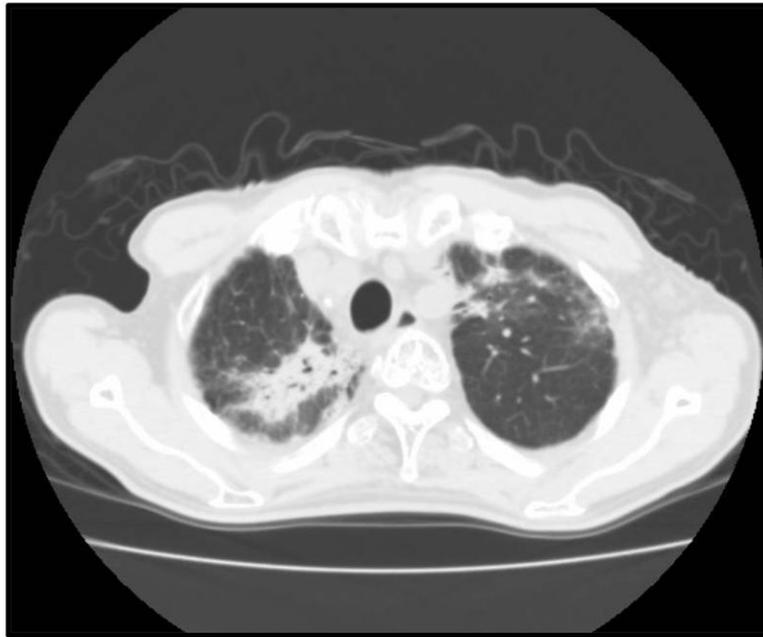


図 8. 食道癌に対する放射線化学療法後にきたした放射線肺臓炎
(Grade2)

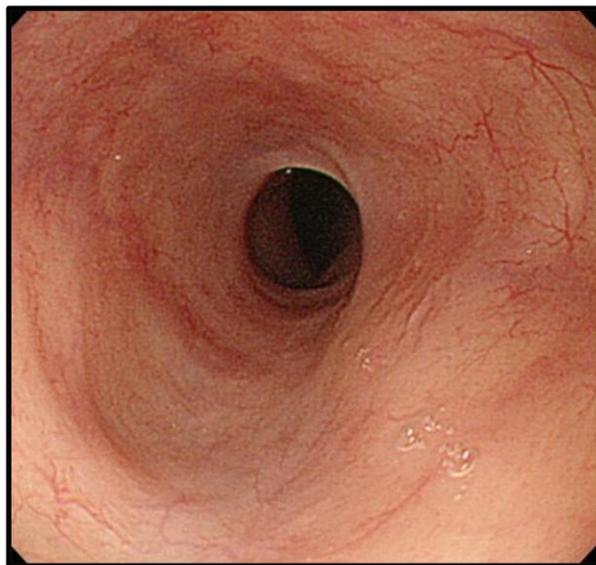


図 9. 食道癌に対する放射線化学療法後にきたした食道狭窄

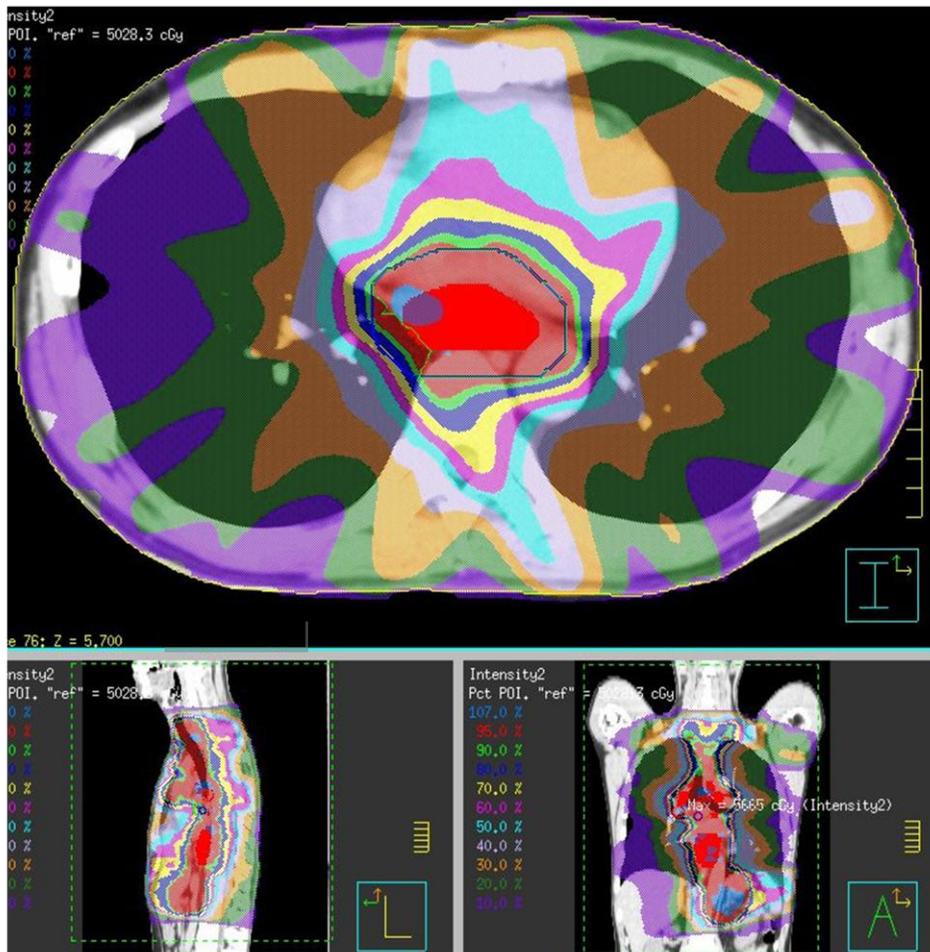


図 10. 食道癌に対する IMRT を用いた放射線治療計画の一例

1.7 放射線治療における分子・細胞学的反応

1.7.1 放射線傷害

X線の個々の光子には、物質との相互作用により原子核周囲の軌道から1個の電子を完全に離脱させるのに十分なエネルギーがある。そのような原子や分子は、正電荷を残されてイオンとなる。これが電離放射線という用語の所以である。生体を構成する物質における電子の典型的な結合エネルギーはおおよそ10 eVである。したがって10 eVを超えるエネルギーをもつ光子が電離放射線と考えられる。

細胞にX線が照射されると、細胞に付与されたエネルギーの大部分は最初に水に吸収され、多くの反応性に富むラジカル中間代謝物が迅速に ($10^{-14} \sim 10^{-4}$ 秒以内) 生成され、これらが細胞内のほかの分子と相互作用することになる。中でも、酸化物質であるヒドロキシルラジカル ($\text{OH}\cdot$) は傷害能力が最も高い。エネルギー付与自体は、細胞内のどこでも生じうるが、とくにDNAは、細胞にとっての生物学的重要性のために、電離放射線の重要な標的になる。

DNAに対する電離放射線の効果は、直接効果と間接効果に分けられる(図11)。間接モデルでは、化学的に反応性の自由電子が電離により形成され、DNAらせんに近接(10~20 Å)する水分子と反応する^(30, 31)。ヒドロキシルラジカル ($\text{OH}\cdot$) などのフリーラジカルは、DNAと化学的に反応してDNA傷害をおこす。一方、直接モデルでは、反応性自由電子の吸収が直接にDNA内でおこり、中間のフリーラジカルの段階を経ずに局所的な損傷をおこす。間接および直接傷害は、DNAの1本鎖および2本鎖切断の集積、DNA塩基傷害、DNA-DNAまたはDNA-タンパク質架橋結合を誘導しうる。これらは局所的な多数の損傷部位 (locally multiply damaged

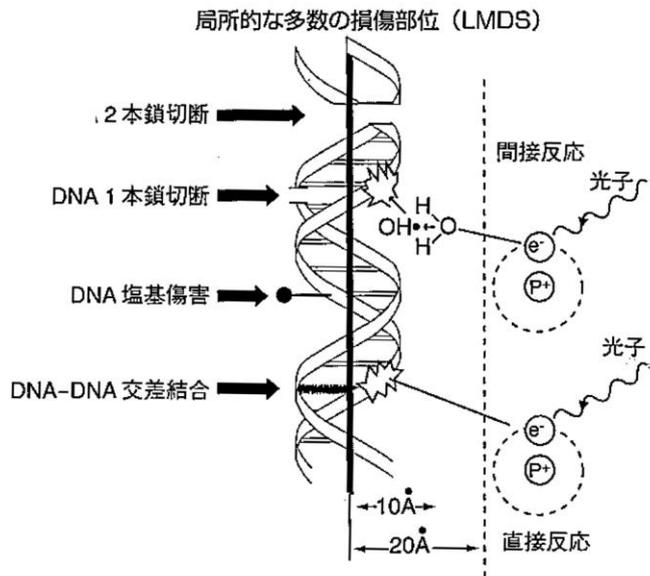


図 11. 放射線による DNA 傷害
 (「がんのベーシックサイエンス」より抜粋)

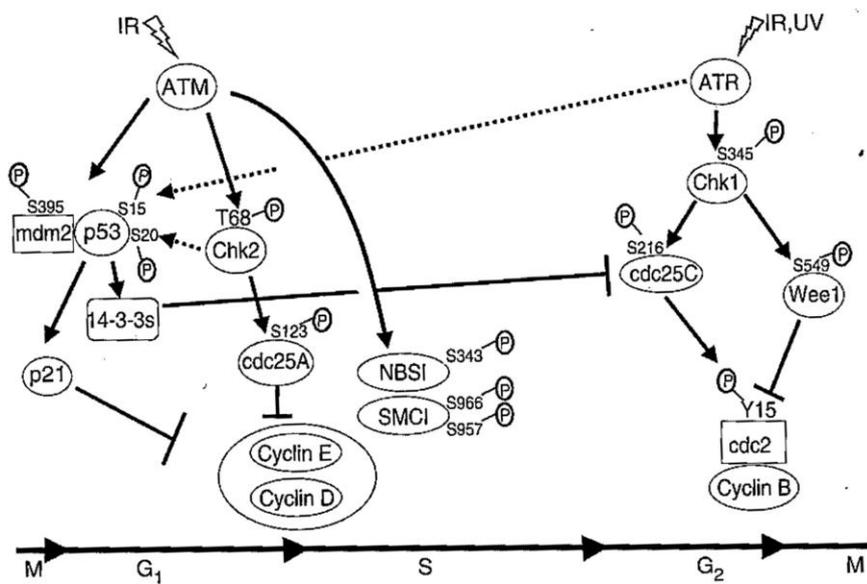


図 12. DNA 傷害に対する細胞応答～ATM 経路
 (「がんのベーシックサイエンス」より抜粋)

site: LMDS) として発生しうる。1つの細胞内において吸収線量 1 Gy あたりおよそ 10^5 の電離が発生し、約 1,000~3,000 の DNA-DNA または DNA-タンパク質架橋結合、1000 の DNA 塩基の損傷、500~1,000 の 1 本鎖 DNA 切断、20~50 の 2 本鎖 DNA 切断がもたらされる(すなわち、大部分の電離現象は DNA 損傷をひきおこさない)。これらの DNA 損傷の大部分は、さまざまな DNA 修復経路によって修復可能である。

1.7.2 放射線に対する分子・細胞学的反応

細胞は、電離放射線に対して細胞周期の進行を遅らせることで反応する。この遅れによって、DNA の複製または分裂の前に細胞で DNA 傷害を修復することが可能になり、その後の細胞世代における遺伝的不安定性が防止されていると考えられている⁽³²⁾。一定時間ののち、生存細胞は再び分裂期に入るが、この時間は分裂遅延といわれる。分裂遅延は、G2 期における細胞周期進行のブロックによる影響がもっとも大きく、G1 期と S 期の細胞でもおこる。細胞周期の異なる細胞は、異なる放射線感受性も持っている。S 期後期が最も放射線抵抗性で、G2/M 期の細胞が最も放射線感受性である。

ATM (ataxia telangiectasia mutated) タンパク質は、細胞周期の 3 つの相すべてにおいてチェックポイント経路を初期化する役割を果たしている。放射線照射後の G1 細胞周期停止は、正常な ATM-p53/Cdc25A 経路に集中し、サイクリン D および E 複合体の活性の減弱に集中する。(図 12) これは、G1/S 間における Rb タンパク質の継続した低リン酸化を誘導し、DNA 複製開始を阻止する。この放射線誘導性

G1 停止は、機能的 p53、ATM または Rb タンパク質を欠損する細胞では抑制される^(33, 34)。また、S 期のチェックポイントは、ATM が媒介する転写因子 BRCA 1、NBS1、SMC1 のリン酸化によって制御される。さらに放射線治療後の G2 遅延には、サイクリン B の減少や Chk1 キナーゼの放射線誘導性活性化などにより制御される。ATM 機能を欠落している細胞は、照射後の G2 チェックポイントの欠陥を示す。

1. 7. 3 低酸素と放射線応答

細胞に対する放射線照射の生物学的効果は、酸素により増強される。具体的な機序については不明な点があるが、前述のように、酸素は放射線照射により発生するラジカルと相互作用し、修復困難な傷害を DNA にもたらす。この生物学的効果が生じるには、酸素が放射線照射と同時または数ミリ秒以内に細胞に存在しなければならない。大気中で放射線照射される細胞は、著しい低酸素状態で照射される細胞に比較して約 3 倍の感受性を示す。極度の低酸素状態では細胞は抵抗性を示すが、酸素濃度の増加につれて感受性は急激に増大し、約 35 $\mu\text{mol/l}$ (酸素分圧 25 mmHg) を超えると最大となる。

一般的な癌細胞の微小環境の特徴としては、低栄養、低い細胞外 pH、高い間質組織液圧 (interstitial fluid pressure: IFP) および低酸素状態である。低酸素状態では、例えば血液の酸素運搬能に関わるエリスロポエチンや、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) のような血管新生に関連する遺伝子は、上向きに調節される。このような低酸素状態で調節される遺伝子の多くは、転写因子の低酸素誘導性因子 1 (hypoxia inducible factor-1: HIF-1) をプロモーター領域に持

っているとされている。HIF-1は低酸素に曝露された細胞で高度に発現し、しばしば腫瘍で過剰に発現している。HIF-1はHIF-1 α とHIF-1 β のヘテロダイマーであるが、とくにHIF-1 α は酸素存在下では非常に不安定で、短時間で分解される。このため、HIF-1 α を低酸素のマーカーとして用いることができる。

1.8 分子生物学的バイオマーカーと癌

癌の転移は転移カスケードと呼ばれる多数のステップを経て成立する⁽³⁵⁾。これらのステップが成立するには、癌細胞と周囲の細胞、細胞外マトリックスとの相互作用が重要な役割を担っている。近年、これらにおいて重要な役割を担うvascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor- β (TGF- β)、tumor necrosis factor α (TNF- α)、matrix metalloproteinase (MMP)などの分子を標的とした分子標的薬が開発されてきた。特に、VEGFに対する抗体阻害薬であるベバシズマブは切除不能・再発の大腸癌に対する一次療法において標準療法となっており、扁平上皮癌を除く切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌に対しても承認が追加されている。ベバシズマブは、転移性の胃食道接合部並びに胃の腺癌に対してCDDP、カンプトポテンシン併用療法の効果をみた第II相試験で、明らかな化学療法への上乗せ効果が示されている⁽³⁶⁾。今後も食道癌の治療における分子標的薬の導入が検討されていくものと考えられる。

このように腫瘍における分子生物学的バイオマーカーの意義は非常に大きいと考えられている。乳癌を筆頭に個別化医療が進む現在、腫瘍の性格や微小環境を理解することは、適切な医療が行われ予後が改善する一助となるはずである。

また、癌に関わる因子は1つの経路ではなく、多方面に広がっている⁽³⁷⁾。細胞周期の脱制御もそのひとつである。ここ10年来の研究により、有限な寿命の正常細胞と癌由来細胞における細胞周期制御分子の比較から、癌の発生過程で細胞周期が必ず脱制御されていることが明らかになっている。細胞周期タンパク質の脱制御は、多くの場合、患者の予後と深く関連している。細胞周期関連タンパク質としては、p53、p21、p16、Cyclin-D1などがあげられる。p53はアポトーシスおよび細胞周期関連タンパク質をコードする遺伝子として最も有名な癌抑制遺伝子の1つである⁽³⁸⁻⁴⁰⁾。また、p21タンパク質およびp16タンパク質も細胞周期調節、特にG1期停止に寄与する。細胞周期を回転させる役割のcyclinの働きを阻害することによってG1期停止させる。

癌とアポトーシスの関係も非常に重要である。アポトーシスを異常に抑制したり、逆に亢進したりする細胞死経路が制御不能になると癌や自己免疫性疾患、神経変性疾患の原因となる⁽⁴¹⁾。Bcl-2は抗アポトーシス遺伝子であり、アポトーシスの制御に関わる。その産物は二量体を形成し、bcl-2の発現増加はアポトーシスの阻害に関与している。アポトーシスを阻害するため、癌遺伝子である可能性もあるとされる。

また、癌の多くは、炎症を母地として発生する。食道癌においても、慢性の逆流性食道炎は食道胃接合部癌のリスクであるし、アルコールやタバコなどがリスクとなるのも、慢性炎症が関与している。このように、炎症と発癌は密接な関係を持っているが、炎症からの発癌についてはさまざまな経路が考えられている。炎症性サイトカインは増殖因子のnuclear factor kappa B (NF-κB)を活性化させ、NF-κB

は cyclooxygenase-2 (COX-2) を強く活性化させる。

癌の性質を細かく認識するために、分子の動きに着目することが重要であると
考えられる。食道癌における分子生物学的バイオマーカーの過去の報告を表 1 に示
す。

表 1. 食道癌におけるバイオマーカーに関する過去の報告

First author	Therapy	Pathology	N	Conclusion
Okumura H ^{*1}	CRT	SqCC	62	p53 ↓ p53R2 ↓ でCRT高感受性
Miyazaki T ^{*2}	CRT or RT	SqCC	61	p53 ↑ で低感受性 p21 ↑ Hsp27 ↓ Hsp70 ↓ で高感受性
R Langer ^{*3}	S	AC	137	EGFR ↓ でOS ↓
Gotoh M ^{*4}	CRT	SqCC	62	EGFR ↑ でCR ↑
Sarbia M ^{*5}	NA-CRT	SqCC	94	p53, EGFR, ATM, CHK2は予後との相関なし
Ressiot E ^{*6}	CRT	SqCC / AC	56	Ki67 ↑ でCR ↑
Yamasaki M ^{*7}	NAC	SqCC	77	p53変異でOS ↓
Luo KJ ^{*8}	S	SqCC	134	VEGF ↑ でOS ↑
Wang QM ^{*9}	S	SqCC	132	ERβ ↑ でDFS ↑
Akutsu Y ^{*10}	NA-CRT	SqCC	58	COX2陽性でCRT耐性
Na Zhan ^{*11}	S	SqCC	145	HER-2陰性のほうが予後良好

Abbreviation: CRT = chemoradiotherapy, RT = radiotherapy, NA-CRT = neoadjuvant chemoradiotherapy, S = surgery, SqCC = squamous cell carcinoma, AC = adenocarcinoma, CR = complete response, DFS = disease-free survival

*1) Okumura H, Natsugoe S, Matsumoto M, Mataka Y, Takatori H, Ishigami S, Takao S, Aikou T: The predictive value of p53, p53R2, and p21 for the effect of chemoradiation therapy on oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2005 Jan 31;92, 284-289.

*2) Miyazaki T, Kato H, Kimura H, Inose T, Faried A, Sohda M, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Manda R, Fukuchi M, Tsukada K, Kuwano H: Evaluation of tumor malignancy in esophageal squamous cell carcinoma using different characteristic factors. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec;25, 4005-4011.

*3) Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J, Von Weyhern C, Reiter R, Feith M, Stein HJ, Siewert JR, Höfler H, Sarbia M: Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. *J Clin Pathol*. 2006 Jun;59, 631-634.

*4) Gotoh M, Takiuchi H, Kawabe S, Ohta S, Kii T, Kuwakado S, Katsu K: Epidermal growth factor receptor is a possible predictor of sensitivity to chemoradiotherapy in the primary lesion of esophageal squamous cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2007 Sep;37, 652-657.

*5) Sarbia M, Ott N, Pühringer-Oppermann F, Brücher BL: The predictive value of molecular markers (p53, EGFR, ATM, CHK2) in multimodally treated squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer*. 2007 Nov 19; 97, 1404-1408.

*6) Ressiot E, Dahan L, Liprandi A, Giorgi R, Djournon XB, Padovani L, Alibert S, Ries P, Laquière A, Laugier R, Thomas P, Seitz JF: Predictive factors of the response to chemoradiotherapy in esophageal cancer. *Gastroenterol Clin Biol*. 2008 Jun-Jul;32, 567-577.

*7) Yamasaki M, Miyata H, Fujiwara Y, Takiguchi S, Nakajima K, Nishida T, Yasuda T, Matsuyama J, Mori M, Doki Y: p53 genotype predicts response to chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol*. 2010 Feb;17, 634-642.

*8) Luo KJ, Hu Y, Wen J, Fu JH: CyclinD1, p53, E-cadherin, and VEGF discordant expression in paired regional metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma: a tissue array analysis. *J Surg Oncol*. 2011 Sep 1;104, 236-243.

*9) Wang QM, Qi YJ, Jiang Q, Ma YF, Wang LD: Relevance of serum estradiol and estrogen receptor beta expression from a high-incidence area for esophageal squamous cell carcinoma in China. *Med Oncol*. 2011 Mar;28, 188-193.

*10) Akutsu Y, Hanari N, Yusup G, Komatsu-Akimoto A, Ikeda N, Mori M, Yoneyama Y, Endo S, Miyazawa Y, Matsubara H: COX2 expression predicts resistance to chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Oct; 18, 2946-2951.

*11) Zhan N, Dong WG, Tang YF, Wang ZS, Xiong CL: Analysis of HER2 gene amplification and protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2012 Jun;29, 933-940.

2. 予備研究「食道扁平上皮癌において根治的化学放射線療法を施行した 10 症例についての 16 種類の分子生物学的バイオマーカーと臨床成績の関係」

2.1 目的

食道癌の予後因子、とくに化学放射線療法における予後因子を特定するために、まず、筆者らは過去の文献で予後因子となる可能性があるとされている各種分子生物学的バイオマーカーを抽出した。過去の報告を参考に、16 種類のバイオマーカー、すなわち p53⁽⁴²⁻⁴⁴⁾、p21⁽⁴⁵⁾、molecular immunology borstel-1 (MIB-1、Ki-67)^(43, 46)、p16⁽⁴⁷⁾、Cyclin-D1^(43, 48, 49)、E-cadherin⁽⁴⁹⁾、Bcl-2⁽⁴²⁾、TNF- α ⁽⁵⁰⁾、NF- κ B⁽⁵¹⁾、TGF- β ⁽⁵²⁾、MMP-7⁽⁵³⁾、COX-2^(54, 55)、epidermal growth factor receptor (EGFR)⁽⁵⁶⁾、human epidermal growth factor receptor type 2 (HER-2)、estrogen receptor (ER)、HIF-1 α について検討した。予備的研究であり、症例は 10 症例（生存例 5 例、死亡例 5 例）に限定した。これらのバイオマーカーについての過去の報告は術前化学放射線療法症例や手術単独症例含んでいる場合が多く、根治的化学放射線療法を対象とした研究はほとんどない⁽⁵⁷⁾。術前化学放射線療法+手術の場合や、手術単独症例の場合と、根治的化学放射線療法の場合にはそもそも異なる治療法であり、それぞれの場合で予後因子の種類や臨床成績との相関の程度は異なると考えられる。とりわけ、手術に比べ化学放射線療法では、腫瘍の性質により奏効率が変わると考えられる。治療前に根治化学放射線療法に適した症例を分別することができれば、食道を温存し、手術侵襲を与えずに、しかも成績が劣らない治療を行うことができることになる。このため、根治的化学放射線療法により適している症例を抽出することこそが予後

因子探究の主目的となる。以上より、根治的化学放射線療法に特化して、その予後因子を検討することは、非常に重要である。

さらに、臨床成績と相関するようなバイオマーカーを発掘することは、将来的に分子標的薬の標的となる可能性もあり、新たな治療法を見出すきっかけになるかもしれない。

2.2 対象と方法

2.2.1 症例

当院で2000年6月から2010年6月に根治的化学放射線療法を施行した食道扁平上皮癌197例のうち、当院で治療前の生検を施行し、かつパラフィンブロックが保存されている患者の中から、新規に薄切するのに十分な量の検体がある10例(生存例5例、死亡例5例)を選択し、研究対象とした。症例の一覧を表2に示す。症例は、4例の治療奏効例と、6例の再発例からなる。これらの症例の病期はAJCCのTNM分類第5版(58)に基づいて決定した。初診時の病期診断は、病歴、問診、血液検査、胸部X線検査、上部消化管内視鏡検査、胸部および上腹部CT検査、食道および胃透視検査、呼吸機能検査によって行った。脳のCT検査やMRI検査、骨シンチグラフィ検査は臨床的に転移が疑わしいときにのみ施行した。症例には、切除不能食道癌(進行例、高齢者、合併症を有する例)に加え、患者本人が手術を拒否したために根治的化学放射線療法が施行された症例も含めた。

表 2 10 症例の患者背景

Pt No.	Age (Y)	Sex	Primary Site	Stage	cTNM	Hb (g/dl)	BW loss (kg)	Dysphagia Score	Tumor Length	Differentiate	Chemotherapy total cycle
1	68	Male	Lt	I	T1N0M0	14.8	0	0	7cm	M/D	2
2	70	Male	Lt	I	T1N0M0	15.9	0	1	7cm	P/D	3
3	46	Male	Lt	IVB	T3N1M1b	10.9	13	3	4cm	P/D	2
4	66	Male	Lt	IIA	T3N0M0	10.9	0	3	3.5cm	NA	4
5	80	Male	Lt	III	T3N1M0	11.3	0	3	5cm	W/D	4
6	70	Female	Mt	IVB	T2N1M1b	11.5	0	1	6cm	W/D	3
7	68	Female	Lt	III	T3N1M0	12.1	0	0	4cm	M/D	4
8	79	Male	Lt	III	T3N1M0	13.5	8	2	7cm	P/D	2
9	69	Male	Mt	IVB	T2N1M1b	11.6	0	1	2cm	M/D	2
10	65	Male	Lt	IIB	T2N1M0	14.8	7	2	NA	P/D	4

Abbreviation: Mt = middle thoracic, Lt = lower thoracic, BW = body weight

2.2.2 化学放射線療法

東京大学医学部附属病院で施行する放射線療法については、序文でも触れたが、この研究に含まれる全患者には、予防リンパ節領域への照射（elective nodal irradiation: ENI）を含む放射線治療を施行した（図 7）。照射線量は 1 回 1.8 Gy×28 回、合計 50.4 Gy を 5.6 週間にわたって照射した。治療計画用 CT は自由呼吸下で撮像した。全食道（食道入口部から胃食道接合部まで）を CTV とし、CT 検査や PET 検査などで臨床的に転移が疑われる M1a までのリンパ節も CTV に含んだ。PTV は CTV に 5~10 mm のマージンをつけて作成した。照射計画は全例で CT を用いた 3DCRT で行った。前後方向および斜入方向の少なくとも 4 門以上の多門照射を用いた。前後方向により重みづけをし、斜入方向で脊髄を避けるような計画とした。必要に応じて、前後・斜入以外に 1~2 門の照射野内照射法（Field-in-field 法）を用いて追加した。放射線治療は 6~10MV の X 線外照射で行った。

全患者は放射線療法と同時に化学療法を併用した（図 13）。化学療法は 5-FU を 800 mg/m²/日の用量で第 1~4 日目と第 29~32 日目に持続点滴し、同時にネダプラチン（NDP）を 80 mg/m²/日の用量で第 1 日目と第 29 日目にボラスで点滴投与した。化学療法開始第 1 日目に同時に放射線治療を併用した。化学放射線療法終了後、補助治療として、同様の化学療法を 28 日目までを 1 サイクルとして、1~2 サイクル追加した。この補助化学療法は、十分な骨髄機能や全身状態（performance states: PS）があり、拒否しなかった患者に施行した。

図 13. 当院での食道癌に対する根治的化学放射線療法のレジメン

放射線治療	1	2	3	4	5	6	7	8	9	...	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
開始	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Rp1 アクブラ(NDP) 生理食塩水	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
80mg/m ² 500ml																									
Rp2 5-FU 生理食塩水	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
800mg/m ² 1000ml																									
Rp3 ソルテム3A デガドロン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6.6mg 200mg																									
タガメット ナゼア	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0.3mg 100ml																									
Rp4 生理食塩水 タガメット ナゼア	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
200mg 0.3mg 100ml																									
生理食塩水																									
100ml																									

2.2.3 経過観察

患者は化学放射線療法から1ヵ月後の外来診察ののち、2年までは3ヵ月ごと、以後は6ヵ月ごとに定期的な診察を受けた。診察ごとに胸部レントゲンと血算、生化学と腫瘍マーカーSCCの血液検査を実施し、胸部上腹部CTを少なくとも6ヵ月ごとに実施し、臨床的に転移が疑われた場合にはその都度検査を行った。内視鏡検査は治療後2年までは3ヵ月ごとを目安に施行した。

2.2.4 免疫染色

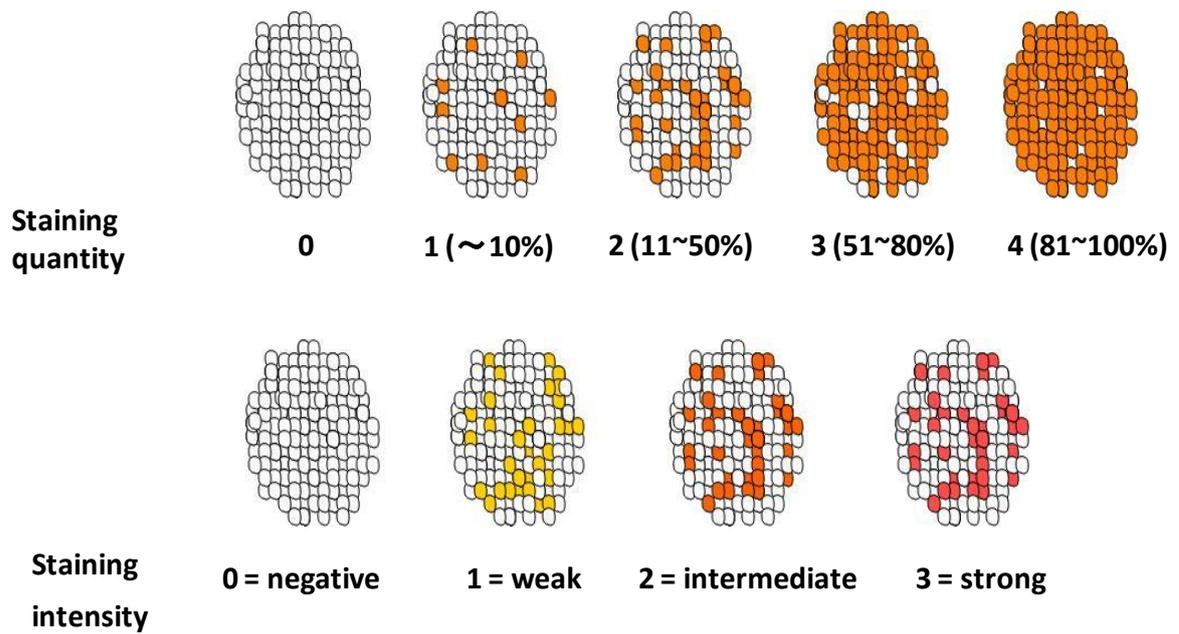
対象として、治療前の内視鏡検査の際に採取され、10%中世緩衝ホルマリンにて固定され、パラフィン包埋されて保存されている腫瘍検体を用いた。パラフィンブロックを厚さ4 μ mに薄切してスライドを作成した。スライドは脱パラフィンののち、各種抗体に応じた前処置で抗体賦活化処理された。使用した16種類の抗体の種類と前処置の手法について表3に示す。自動染色機を使用し、水洗したのちにヘマトキシリンで核染色を行った。

免疫染色の判定は2名の医師によって行い、半定量的手法であるIRS (immunoreactive scoring) システム⁽⁵⁹⁾を採用した(図14)。スコアは染色強度と範囲によって判定される。染色強度を0から3の4段階(0 = 不染、1 = 弱、2 = 中等度、3 = 強度)に判定し、染色範囲を0から4の5段階で判定する(0 = 不染、1 = 1~10%、2 = 11~50%、3 = 51~80%、4 = 81~100%)。IRSスコアはこの染色強度と染色範囲を積算することによって算出し、その範囲は0から12となる。IRSスコアでは0を陰性、1~4を弱陽性、5~8を中等度陽性、9~12を強陽性とする。

表 3. 1 次抗体の種類とプロトコル

Protein	Type	Source	Pretreatment	Titer	Incubation	Staining
p53	Mouse MC	DO7 NCL-p53-DO7 Leica	Microwave 1 mM EDTA (pH8.0) Heating (121°C15min)	1:200	30 min 37°C	Nucleus
p21	Mouse MC	SNCL-WAF-1 Novocastra	Citrate buffer (pH6.0)	1:100	overnight 4°C	Nucleus
MIB-1	Mouse MC	MIB-1 M7240 DAKO	Microwave 1 mM EDTA (pH8.0) Heating (121°C15min)	1:25	30 min 37°C	Nucleus
p16	Mouse MC	Z2117 Zeta	Citrate buffer (pH6.0)	1:200	overnight 4°C	Cytoplasmic & Nucleus
CyclinD1	Rabbit MC	SP4 RM-9104-S Thermo	Microwave 1 mM EDTA (pH8.0)	1:250	30 min 37°C	Cytoplasmic
E-cadherin	Mouse MC	36B5 NCL-E-Cad Leica	Microwave 1 mM EDTA (pH8.0)	1:25	30 min 37°C	Membrane (Cytoplasmic)
Bcl-2	Mouse MC	124 M0887 DAKO	Microwave 1 mM EDTA (pH8.0)	1:80	30 min 37°C	Cytoplasmic
TNF α	Mouse MC	2C8 sc-52250 Santa Cruz	Heating (121°C20min) Citrate buffer	1:100	overnight 4°C	Cytoplasmic
NFkB	Rabbit PC	sc-7178 Santa Cruz	Heating (121°C20min) Citrate buffer (pH6.0)	1:1000	overnight 4°C	Cytoplasmic
TGF- β 1	Rabbit PC	Y241 Yanaihara	None	1:200	overnight 4°C	Cytoplasmic
MMP-7	Rabbit PC	AB19135 Chemicon International	None	1:500	overnight 4°C	Cytoplasmic
COX-2	Rabbit PC	18515 IBL	None	0.5ug/ml	overnight 4°C	Cytoplasmic
EGFR	Mouse MC	K1492 DAKO	Proteinase K (kit)	R-to-U	30 min RT	Membrane (Cytoplasmic)
HER2	Rabbit PC	K5204 DAKO	Water bath (99°C) Citrate buffer (pH6.0)	R-to-U	30 min RT	Membrane
ER	Mouse MC	790-4325 Roche	Microwave 0.01 M Citrate buffer (pH6.0)	1:100	60 min RT	Membrane (Cytoplasmic)
HIF-1 α	Rabbit PC	07-628 MILLIPORE	None	1:200	overnight 4°C	Nucleus

Abbreviations: RT = room temperature; R-to-U = ready to use (kit).



IRS score = proportion score × intensity score (range 0–12)

☒ 14. IRS システムと IRS スコア

今回の研究では、低発現か高発現かを判定するにあたり、カットオフ値を以下のように定めた。

- a) p53、p16INK4A、Cyclin-D1、E-cadherin、TGF- β 、MMP-7、COX-2、EGFR、and HIF-1 α : 低発現= 0-2; 高発現= 3-12.
- b) Bcl-2 and HER-2: 低発現= 0-8; 高発現= 9-12.
- c) MIB-1 (Ki-67) : 低発現= 0-3; 高発現= 4-12.
- d) p21、ER、and TNF- α : 低発現= 0-3; 高発現= 4-12.
- e) NF- κ B: 低発現= 0-11; 高発現= 12.

2.2.5 統計解析

臨床成績および染色結果の関係の統計解析には、症例数が 10 例と少なく、フィッシャーの正確性検定を用いた。染色結果のそれぞれ 2 項目ずつの組み合わせにおいて、ピアソンの積率相関係数を求めて相関性を評価した。

生存解析（全生存率 OS、局所制御率 LC、無病再発率 DFS）は Kaplan-Meier 法により評価し、2 群間の比較はログランク検定を用いた。生存期間は化学放射線療法の第 1 日目から起算して、患者死亡または 2012 年 2 月 28 日までの期間を算出した。局所制御率は遠隔転移による再発を最初にきたした患者では、局所再発を認めない限り局所制御群に含み、局所再発をした時点をもって局所制御失敗群に分類した。局所再発しないまま死亡した症例は打ち切り例とした。なお、局所残存症例は局所再発期間を 0 日とした。統計解析は SAS 社の StatView for Windows Version 5.0 を使用し、 p 値 0.05 以下をもって有意とした。

2.3 結果

2.3.1 症例

10例の年齢中央値は68.1歳、範囲は46歳から80歳であった。原発巣の位置は、胸部中部食道癌が2例、胸部下部食道癌が8例であった。病期はI期からIV期までを含んでいた。生存5例における追跡期間中央値は76.2ヶ月(+/- 24.8ヶ月)であった。

2.3.2 免疫染色

16種類の1次抗体に対する免疫染色の結果を表4と図15に示す。

また、各抗体間の相関についても調査した(図16)。有意な相関を認めた抗体は以下のとおり:p53 vs. Cyclin-D1 ($r = 0.791, p = 0.045$)、EGFR vs. p53 ($r = 0.803, p = 0.0034$)、MIB-1 vs. p21 ($r = 0.752, p = 0.0097$)、HER-2 vs. ER ($r = 0.823, p = 0.020$)、TNF- α vs. p21 ($r = 0.739, p = 0.012$)、TGF- β vs. COX-2 ($r = 0.714, p = 0.018$)、TGF- β vs. HIF-1 α ($r = 0.730, p = 0.014$)、and COX-2 vs. HIF-1 α ($r = 0.794, p = 0.0042$)。

2.3.3 臨床成績

16種類の抗体を2.2.4の項に示したカットオフ値で2群に分け、生存分析を行った(表5)。生存分析は全生存率OS (overall survival) (図17)、局所制御率LC (local control) (図18)、無再発生存率DFS (disease free survival) (図19)について分析した(TNF- α については全例陰性であったため、生存分析できなかった)。2年生存率は、MIB-1高発現群 (MIB-1 IRS ≥ 9) と低発現群 (MIB-1 IRS < 9)

では 71% vs. 0% ($p = 0.019$) で、有意差を認めた。また、NF- κ B 高発現群 (NF- κ B IRS = 12) と低発現群 (NF- κ B IRS < 12) では 0% vs. 100% ($p < 0.018$) で、有意差を認めた。

2年局所制御率は、HER-2 高発現群および ER 高発現群 (HER-2 IRS ≥ 3 、ER IRS ≥ 4) と低発現群 (HER-2 IRS = 1 or 2、ER IRS < 4) でいずれも 0% vs. 88% (+/- 12%) ($p = 0.027$) であった。HER-2 と ER はいずれも 10 例中 1 例で高発現を示したが、これは同一患者であったため、結果が同一のものとなった。無再発生存率でも同様に、HER-2 高発現群と ER 高発現群はともに低発現群に比べて有意な差を示した。2年無再発生存率は高発現群対低発現群で、0% vs. 56% (+/- 17%) ($p = 0.027$) であった。また、2年無再発生存率については、NF- κ B 高発現群対低発現群で 0% vs. 80% (+/- 18%) ($p = 0.018$) であり、有意な差を認めた。

以上の MIB-1、NF- κ B、HER-2、ER 以外の 12 種類のバイオマーカー、すなわち p53、p21、p16INK4A、Cyclin-D1、E-cadherin、Bcl-2、TNF- α 、TGF- β 、MMP-7、COX-2、EGFR、HER-2、ER、および HIF-1 α の抗体については、生存分析において有意な差を認めなかった。

表 4. 16 種類のバイオマーカーの免疫染色の結果

Pt No	再発の有無	bcl2	cyclinD	E-cadherin	EGFR	MIB-1	p53	HER2	ER	p16	TNFα	p21	TGFβ	NFκb	MMP7	COX2	HIF-1α
1	(-)	W	S	M	M	S	S	W	W	W	W	W	M	S	M	M	M
2	(+)	W	S	S	M	M	M	W	W	S	W	W	S	S	S	S	S
3	(-)	W	W	S	W	S	W	W	W	S	W	W	W	S	S	M	M
4	(+)	W	W	W	W	M	W	W	W	S	W	W	M	S	S	M	S
5	(+)	W	S	M	M	M	S	W	W	W	W	W	M	S	S	M	..
6	(+)	W	S	S	S	S	S	W	W	S	W	S	S	S	S	S	S
7	(-)	W	M	S	S	S	S	W	W	W	W	W	W	S	M	M	S
8	(-)	W	S	S	S	S	S	W	W	S	W	M	M	S	M	S	S
9	(+)	W	S	S	M	S	S	W	W	S	W	W	S	S	M	M	M
10	(+)	W	S	S	S	S	S	W	W	M	W	W	W	S	S	W	W
Weak		10	2	1	2	0	2	10	10	3	10	8	3	0	0	1	
Moderate		0	1	2	4	3	1	0	0	1	0	1	4	0	4	6	
Strong		0	7	7	4	7	7	0	0	6	0	1	3	10	6	3	

Abbreviation: W = weak, M = moderate, S = strong

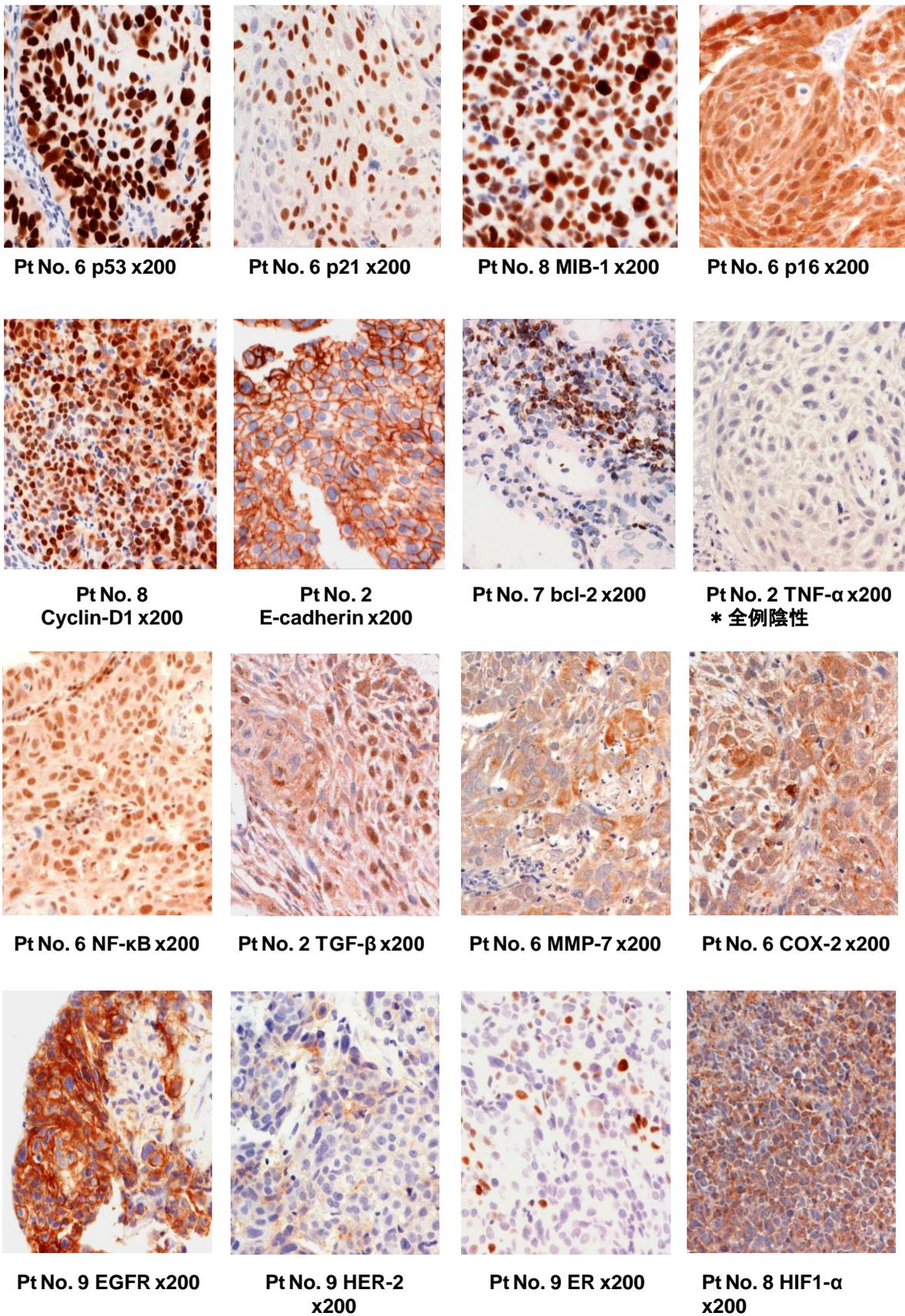


図 15. 16 種類のバイオマーカーの陽性例
TNF- α は全例陰性のため陰性群を提示

図 16. 16 種類の各バイオマーカー発現の相関関係

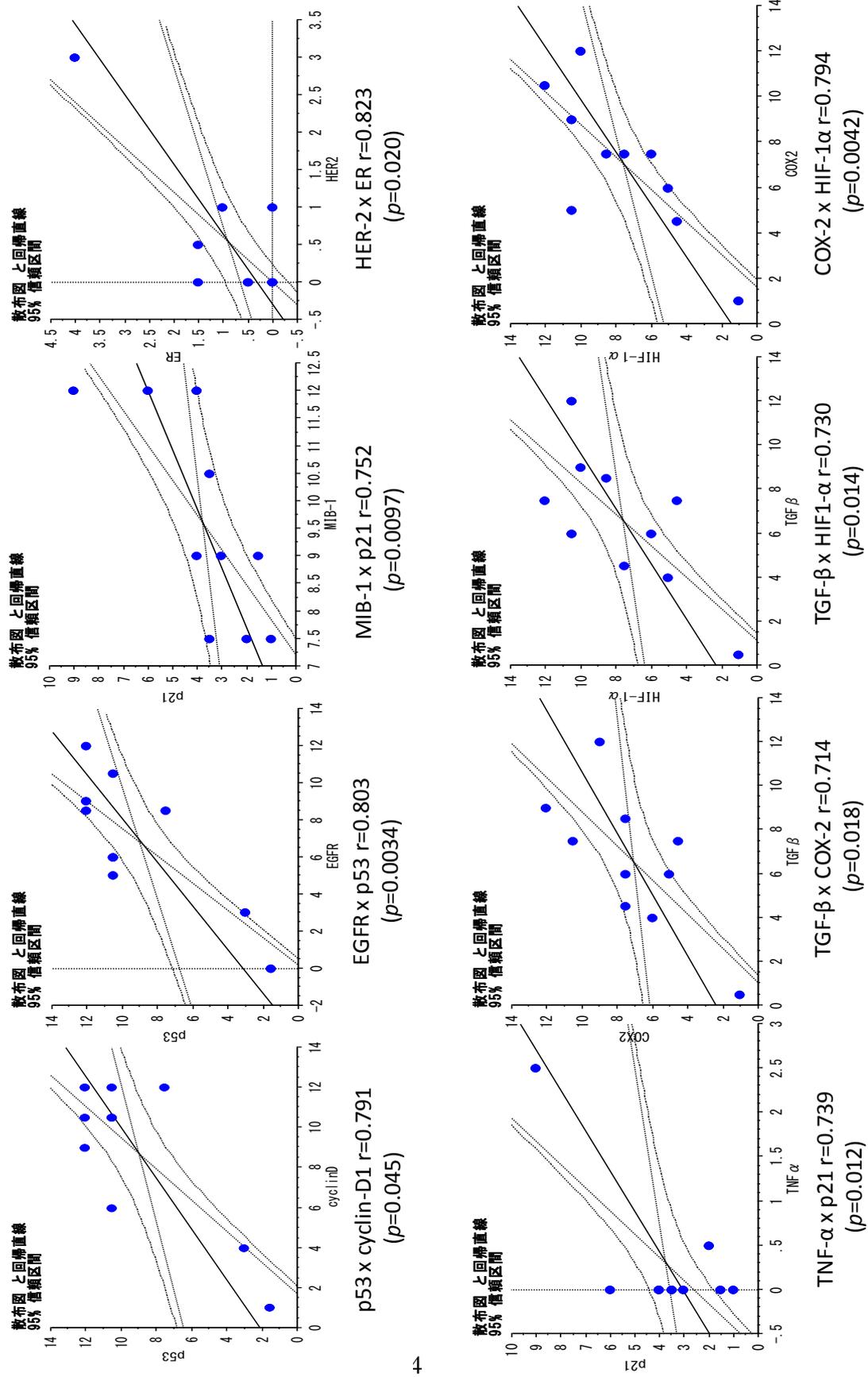


表 5. 各種バイオマーカーと臨床成績の関係

IHC	IRS score	No.	2y-OS	SD	p value log-rank	2y-LC	SD	p value log-rank	2y-DFS	SD	p value log-rank
bcl-2											
High	(3-12)	3	67	27	0.55	67	27	0.19	67	27	0.85
Low	(0-2)	7	43	19		83	15		43	19	
cyclinD1											
High	(6-12)	7	43	19	0.38	69	19	< 0.19	43	19	0.32
Low	(0-5)	3	67	27		100	0		67	27	
E-cadherin											
High	(6-12)	8	50	18	0.76	73	17	< 0.90	50	18	0.75
Low	(0-5)	2	50	35		100	0		50	35	
EGFR											
High	(6-12)	5	60	22	0.57	80	18	0.75	60	22	0.67
Low	(0-5)	5	40	22		80	18		40	22	
MIB-1											
High	(9-12)	7	71	17	0.019*	71	17	< 0.83	71	17	0.90
Low	(0-8)	3	0	0		100	0		0	0	
p53											
High	(6-12)	8	50	18	0.76	73	17	< 0.98	50	18	0.75
Low	(0-5)	2	50	35		100	0		50	35	
HER-2											
High	(3-12)	1	0	0	0.22	0	0	0.027*	0	0	0.027*
Low	(0-2)	9	56	17		88	12		56	17	
ER											
High	(4-12)	1	0	0	0.22	0	0	0.027*	0	0	0.027*
Low	(0-3)	9	56	17		88	12		56	17	
p16											
High	(6-12)	7	50	18	0.75	75	15	< 0.23	50	17	0.95
Low	(0-5)	3	50	35		100	0		50	35	
TNF-α											
High	(4-12)	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Low	(0-3)	10	—	—		—	—		—	—	
p21											
High	(4-12)	6	50	20	0.70	67	19	< 0.16	50	20	0.65
Low	(0-3)	4	50	25		100	0		50	25	
TGFβ											
High	(6-12)	7	44	17	< 0.17	76	15	0.34	44	17	0.19
Low	(0-5)	3	100	0		100	0		100	0	
NF-kB											
High	(12)	5	0	0	< 0.0018*	53	25	0.11	0	0	0.0018*
Low	(0-11)	5	100	0		100	0		80	18	
MMP-7											
High	(6-12)	9	44	17	< 0.90	76	15	< 0.66	44	17	< 0.92
Low	(0-5)	1	100	0		100	0		100	0	
COX-2											
High	(6-12)	7	43	19	0.38	69	19	0.93	43	19	0.88
Low	(0-5)	3	67	27		100	0		67	27	
HIF-1α											
High	(6-12)	7	29	17	< 0.19	69	19	0.74	29	17	0.19
Low	(0-5)	3	100	0		100	0		67	27	

Abbreviation: IHC = Immunohistochemistry, IRS = immunoreactive score, OS = overall survival, LC = local control, DFS = disease free survival, SD = standard deviation.

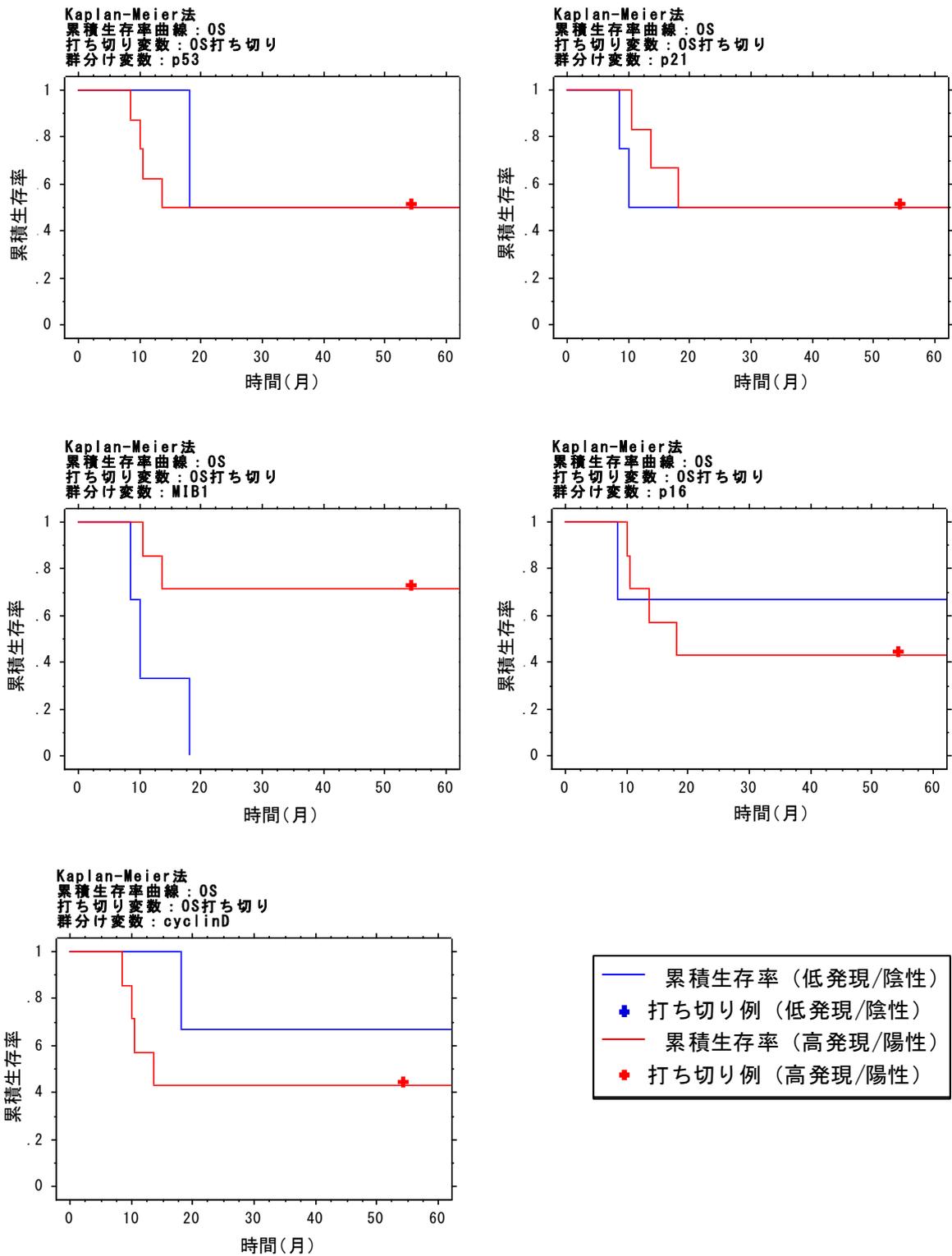


図 17. 全生存率のカプラン・マイヤー曲線 (予備研究)

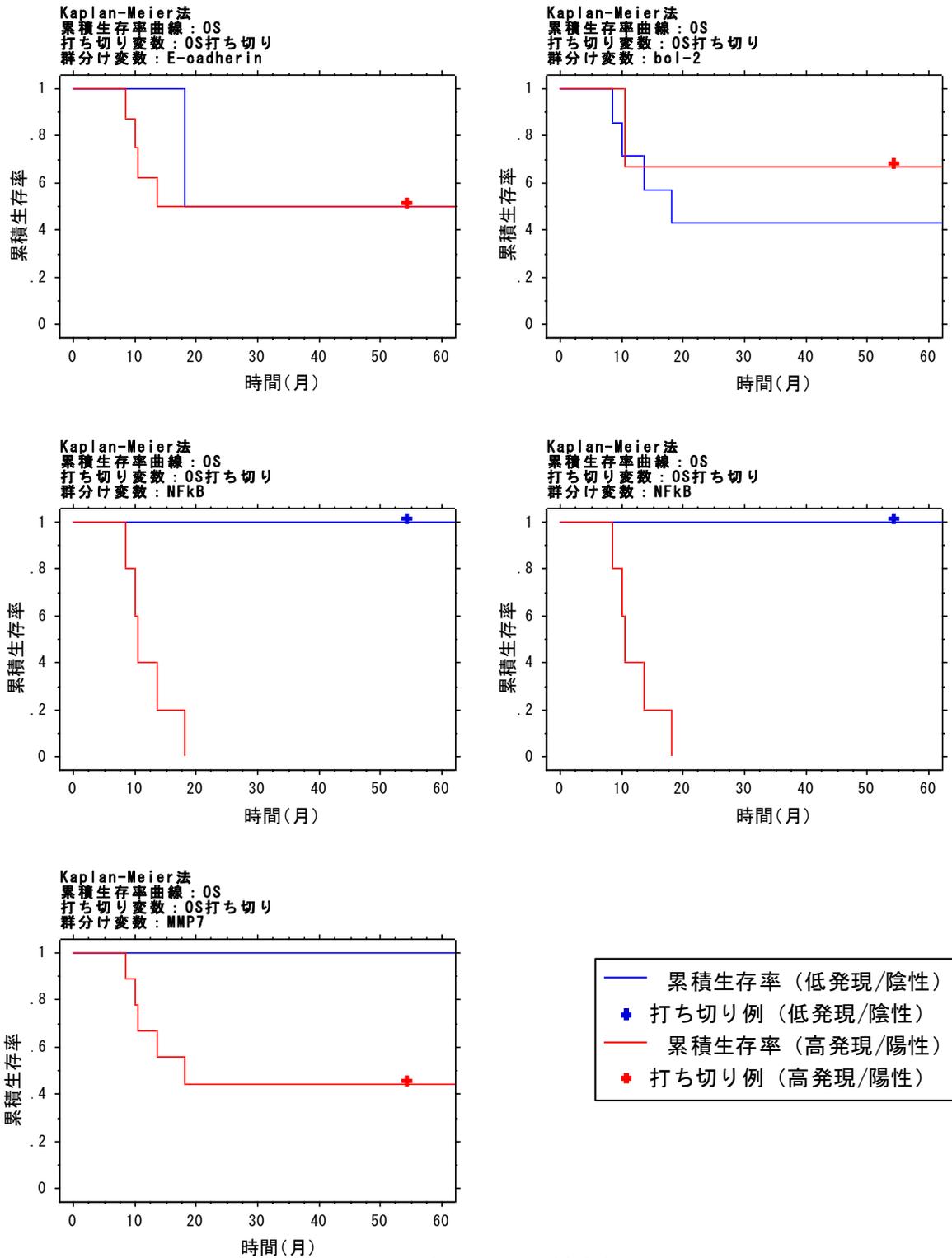


図 17. (続き)
 全生存率のカプラン・マイヤー曲線
 (予備研究)

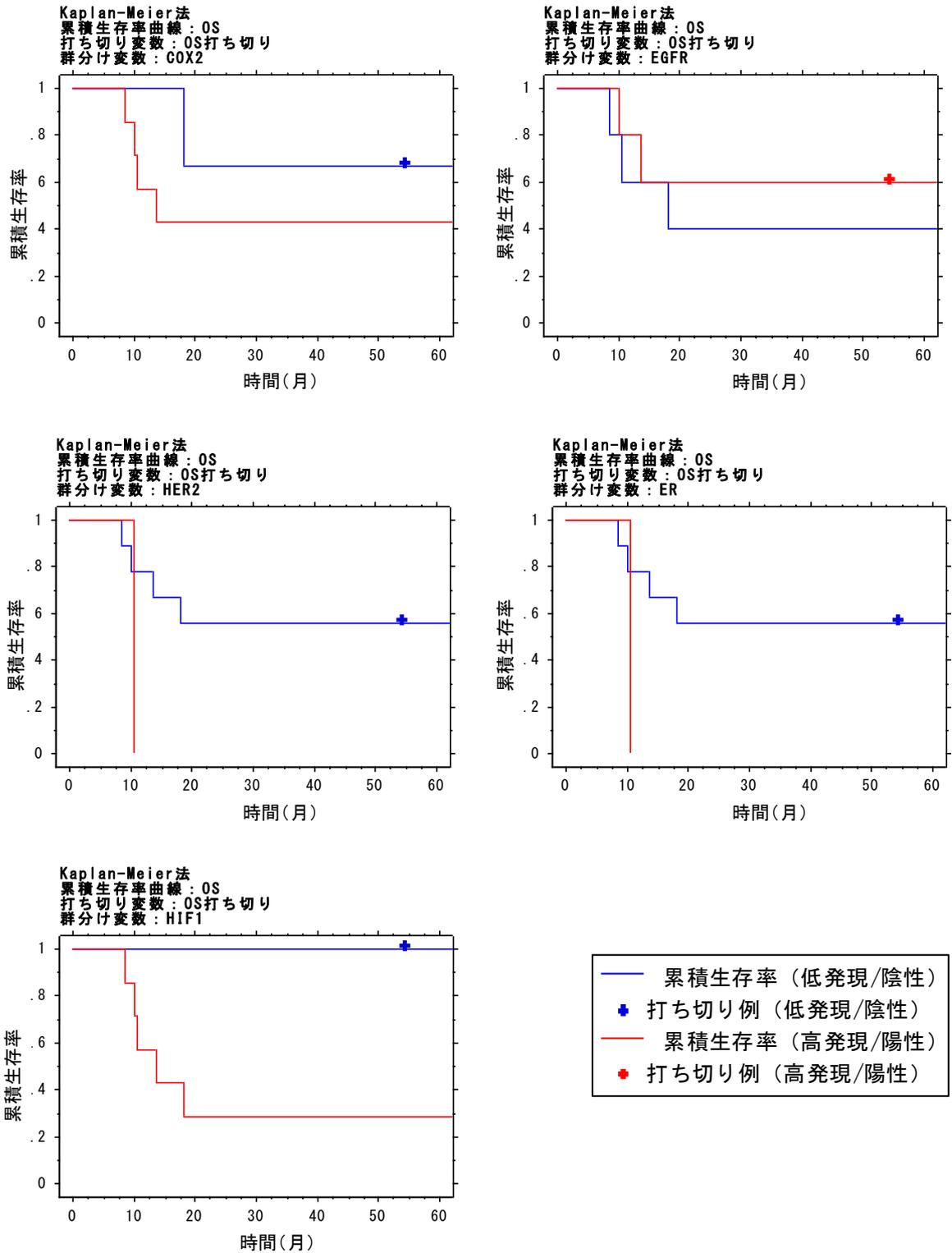


図 17. (続き)
 全生存率のカプラン・マイヤー曲線
 (予備研究)

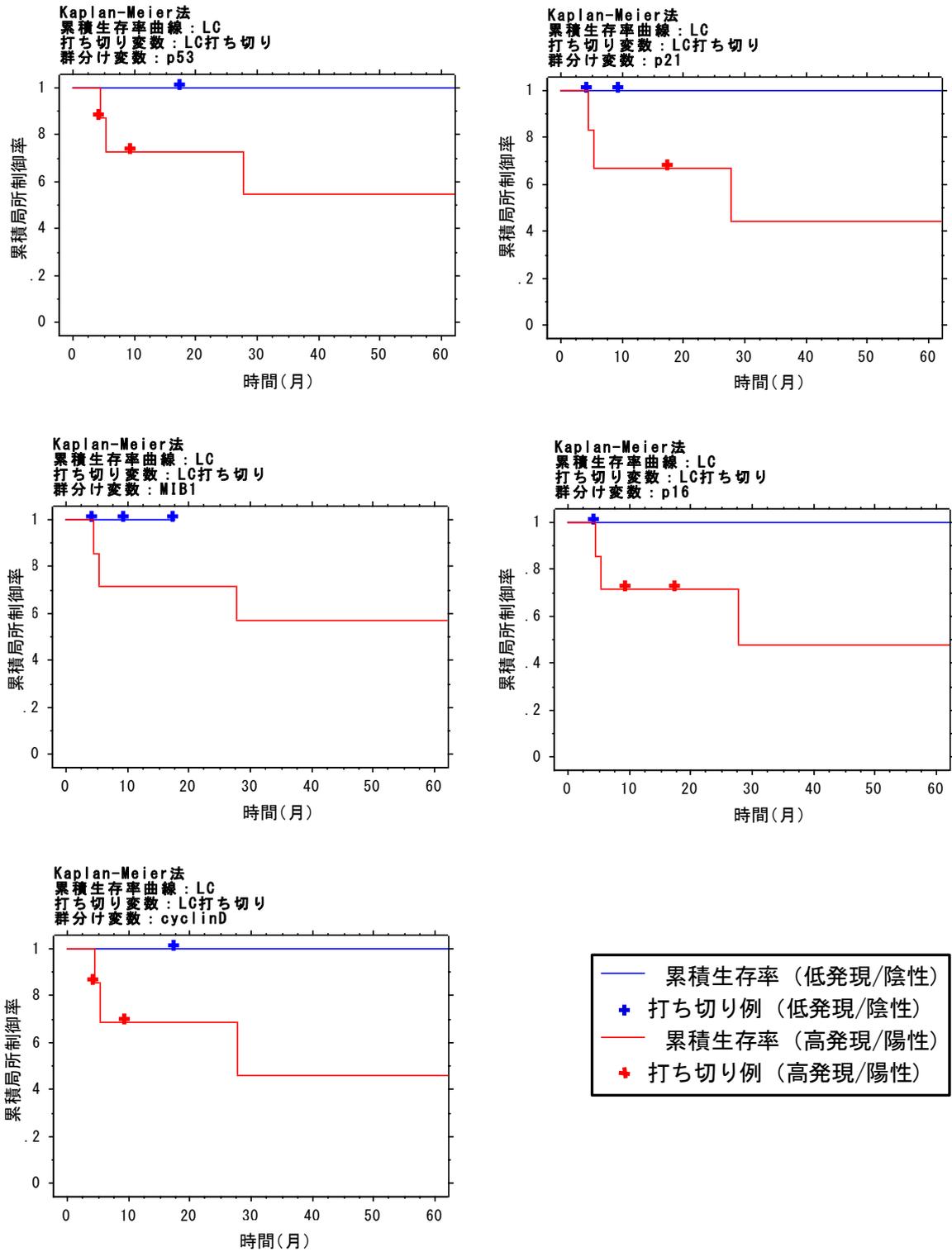


図 18. 局所制御率のカプラン・マイヤー曲線 (予備研究)

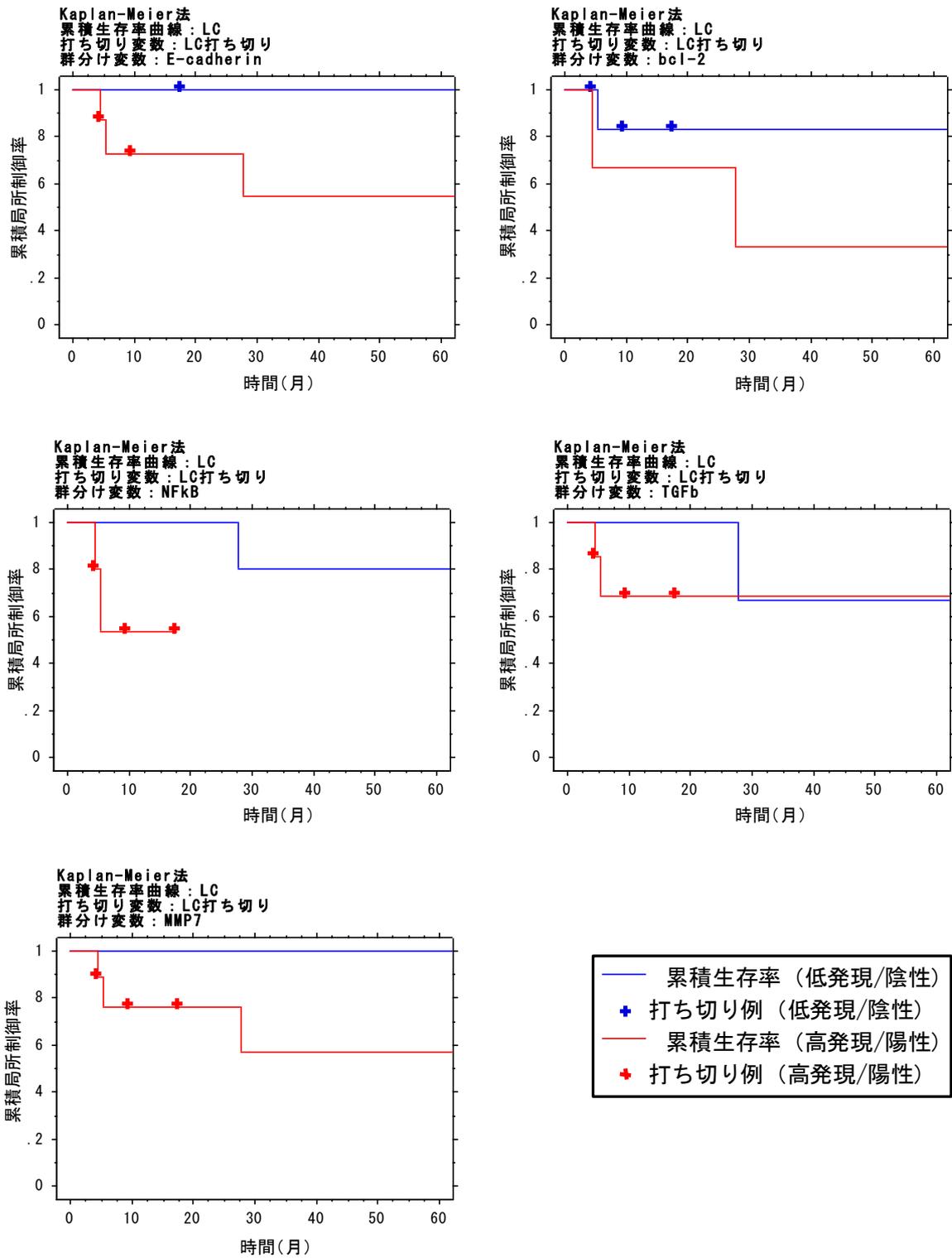


図 18. (続き)
局所制御率のカプラン・マイヤー曲線
(予備研究)

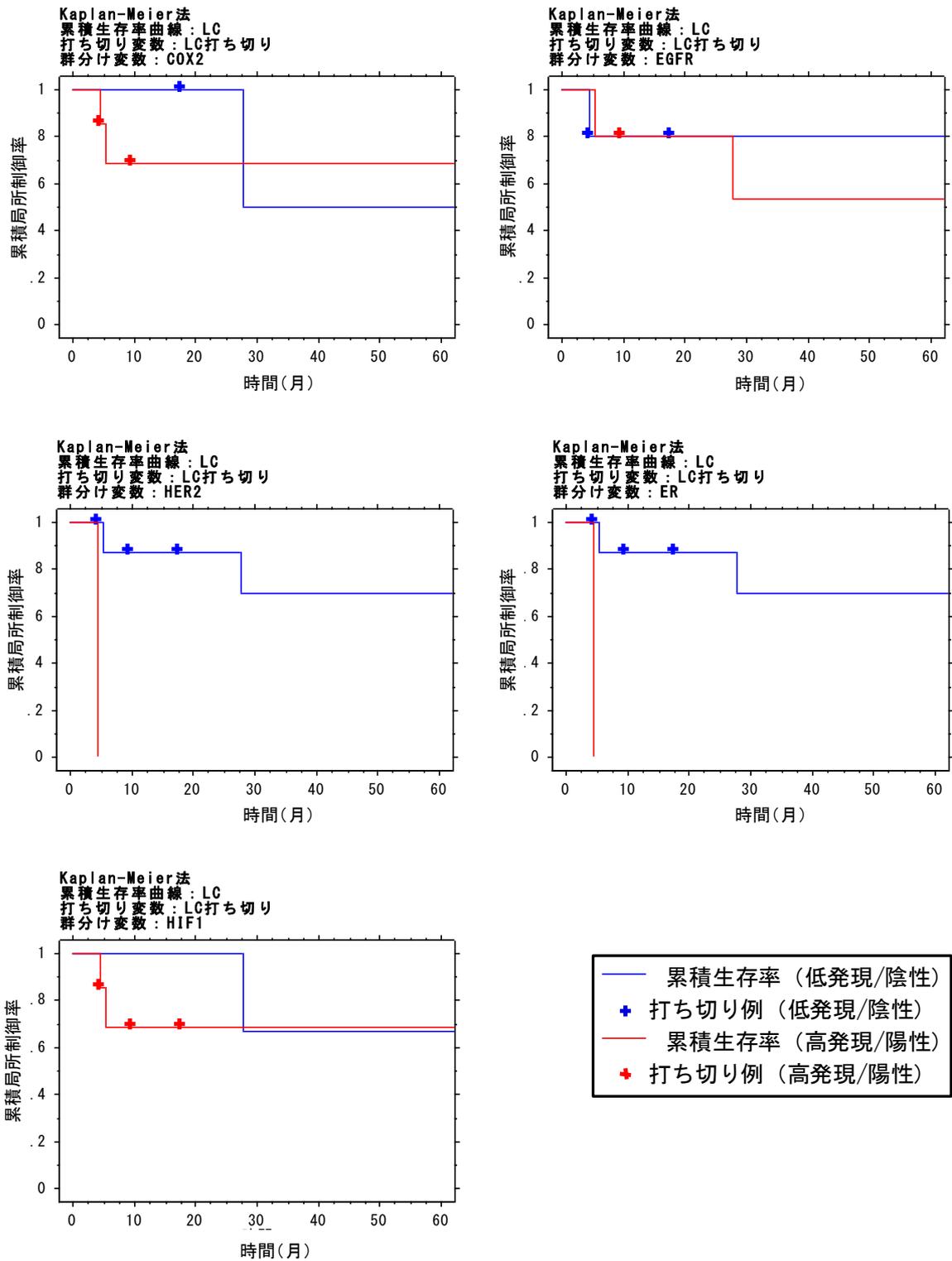


図 18. (続き)
 局所制御率のカプラン・マイヤー曲線
 (予備研究)

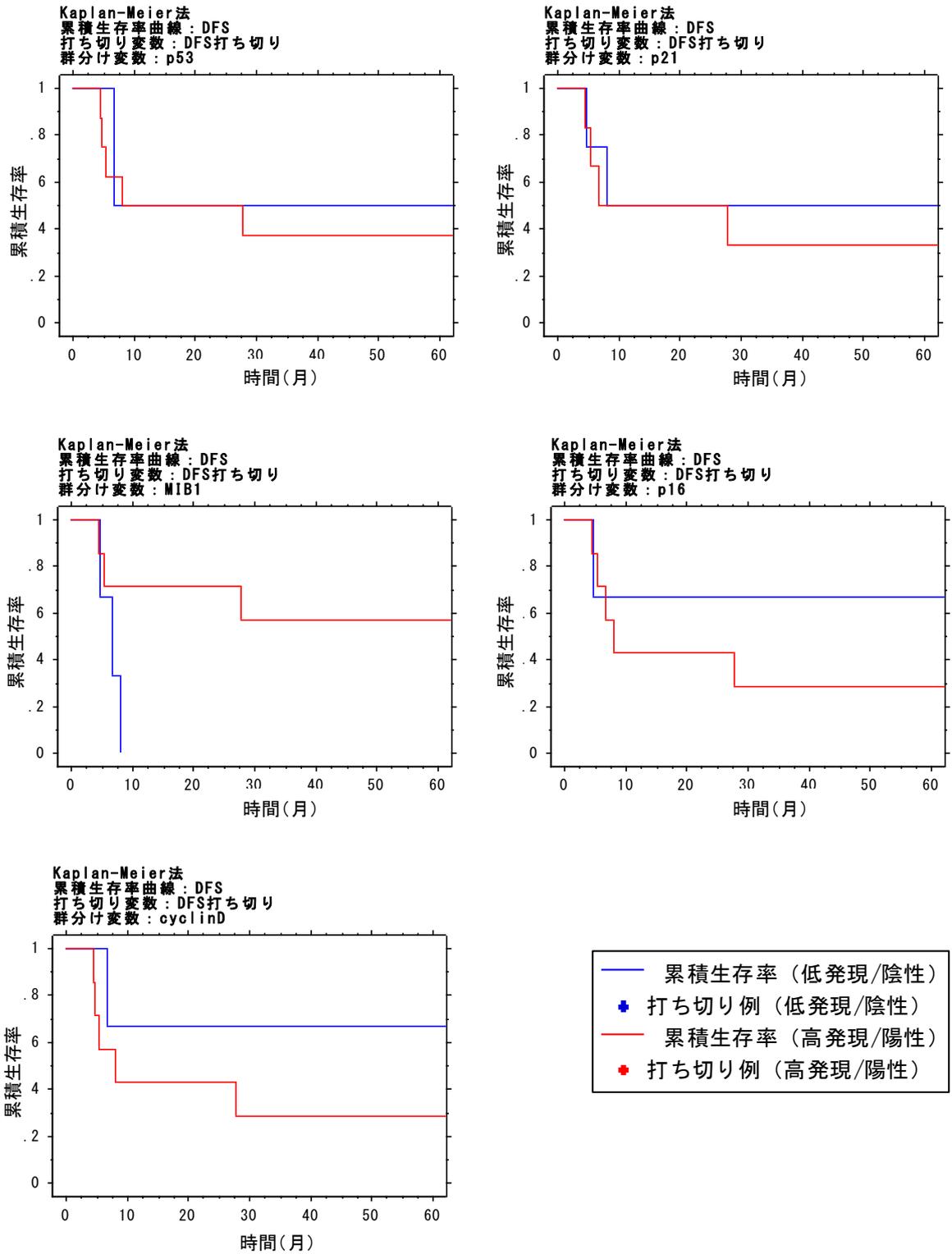


図 19. 無病再発率のカプラン・マイヤー曲線 (予備研究)

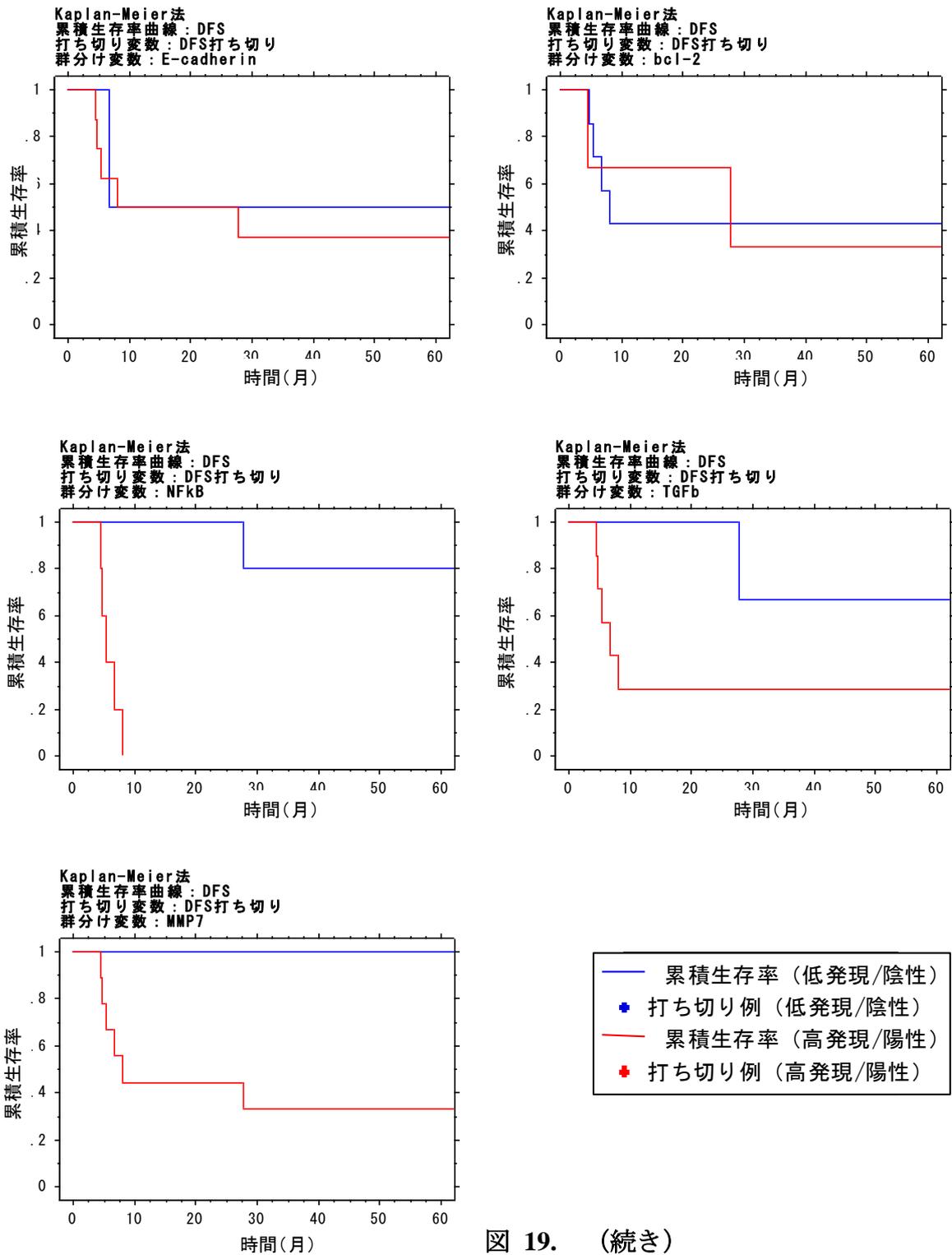


図 19. (続き)
 無病再発率のカプラン・マイヤー曲線
 (予備研究)

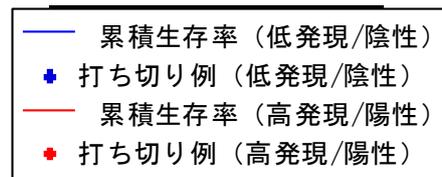
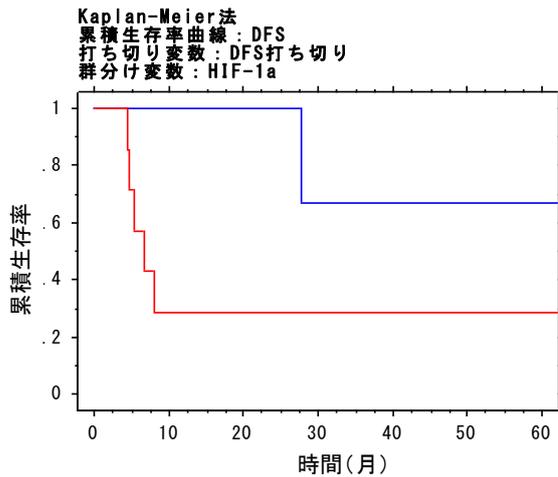
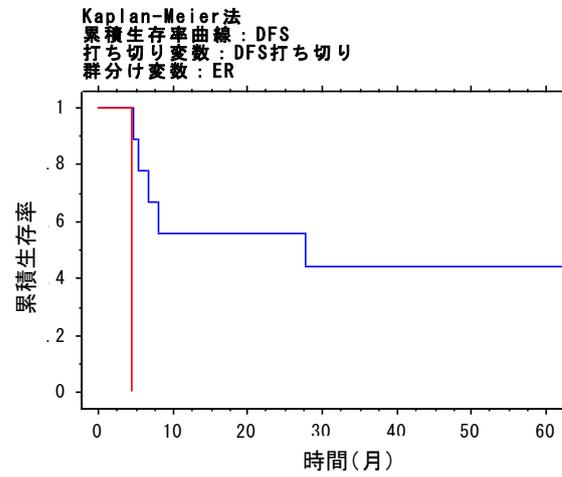
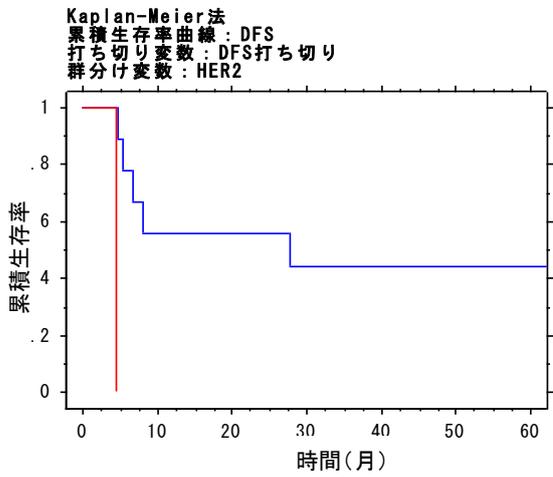
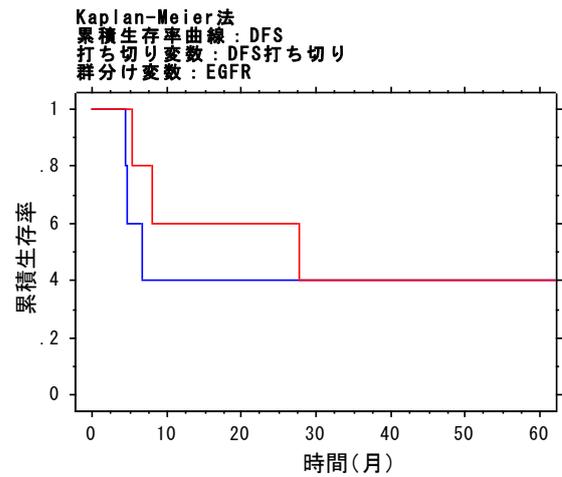
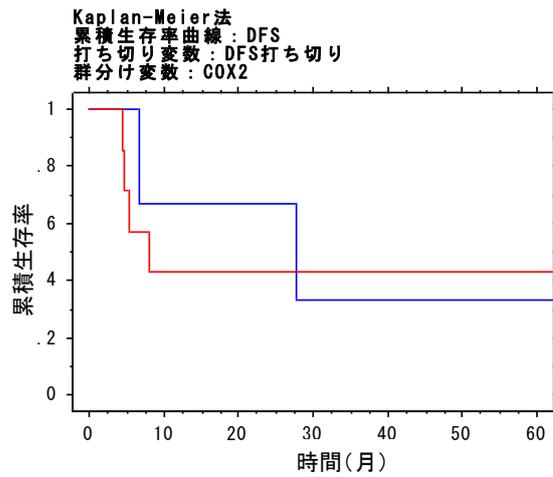


図 19. (続き)
無病再発率のカプラン・マイヤー曲線
(予備研究)

3. 研究 1「食道扁平上皮癌において根治的化学放射線療法を施行した 93 例についての HER-2、p53、MIB-1、HIF-1 α の発現と臨床成績の関係」

3.1 目的

前述した予備研究「食道扁平上皮癌において根治的化学放射線療法を施行した 10 症例についての 16 種類の分子生物学的バイオマーカーと臨床成績の関係」をふまえて、p53、MIB-1、HER-2、HIF-1 α について、症例数を拡大して同じ内容の後ろ向き調査を施行した。

3.2 対象と方法

3.2.1 症例

東京大学医学部附属病院で 2000 年 6 月から 2010 年 6 月に根治的化学放射線療法を施行した食道扁平上皮癌 197 例のうち、同院で治療前の生検を施行し、かつパラフィンブロックが保存されている 128 例を抽出した。さらにその中から、新規に薄切するに十分な量のある 93 例を決定した。前章の予備研究の対象患者 10 例もこの 93 例の中に含み、新たに薄切を行い、他切片と同様に染色し検鏡した。

病理組織学的に扁平上皮癌が確定されているものを対象とした。これらの症例の病期は AJCC の TNM 分類第 5 版⁽⁵⁸⁾に基づいて決定した。AJCC の TNM 分類の 2002 年に第 6 版へ、2007 年に第 7 版へ改定されているが、この調査にあたり、対象症例が 2000 年治療例（当時は第 5 版）を含むことから、全症例の病期を第 5 版に則り判定を見直した。初診時の検査は、病歴、問診、血液検査、胸部 X 線検査、

上部消化管内視鏡検査、胸部および上腹部 CT 検査、食道および胃透視検査、呼吸機能検査を全症例に施行した。脳の CT 検査や MRI 検査、骨シンチグラフィ検査は臨床的に転移が疑わしいときにのみ施行した。腫瘍長は内視鏡検査で評価し、狭窄や閉塞のために内視鏡が通過しない症例など、内視鏡検査で腫瘍長の評価が困難な症例では、食道造影検査を用いて判定した。しかし狭窄や閉塞が高度な症例では、食道造影検査でも腫瘍長の評価が困難であったり、誤嚥リスクが高いために施行されていなかったりする場合には、胸部上腹部 CT 検査を参考にした。症例には、T4/M1 (Lym) 症例などの切除不能食道癌に加え、患者本人が手術を拒否したために根治的化学放射線療法が施行された症例も含めた。切除不能食道癌の中には、高齢や合併症のために手術困難と判定された症例も含まれた。

なお、この研究は人体材料を使用するため、東京大学医学部附属病院倫理委員会にて審査をうけ、審査番号 3669 で承認されている。

3.2.2 化学放射線療法

化学放射線療法の方法は前章で述べたとおり。全食道+予防的リンパ領域 (ENI) に 50.4 Gy/28 分割/5.6 週間の放射線外照射を施行した。化学療法は 5-FU とネダプラチン (NDP) を併用した。

3. 2. 3 経過観察

前章の予備研究と同様に行った。

経過観察中に転移・再発をきたした症例については、救済手術や化学療法、孤発肺転移巣への体幹部定位照射（stereotactic radiotherapy: SRT）を適宜施行した。

3. 2. 4 免疫染色

治療前の内視鏡検査の際に採取され、10%中性緩衝ホルマリンにて固定され、パラフィン包埋されて保存されている腫瘍検体を用いた。生検検体は多くの場合複数採取されており、大きさに応じて1~4個ずつパラフィンブロックに包埋される。このため、ひとつの症例で複数のパラフィンブロックが存在する。このような場合には、病理医の判断により、より適切な検体と考えられるブロックを選択し、ひとつの症例につきひとつのパラフィンブロックを選択して使用した。すなわち、症例によって1~4個ずつの染色を行った。パラフィンブロックを厚さ4 μ mに薄切してスライドを作成した。免疫染色（[図 20](#)）に用いた1次抗体は、p53、MIB-1、HER-2、HIF-1 α の4種類である。それぞれの性質（モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、作成動物、メーカーなど）と賦活化のための前処置の詳細を[表 6](#)に示す。p53、MIB-1、HER-2については自動染色機 BenchMarkXT (Roche® (Ventana®)) ([図 21](#))を用いた。HIF-1 α については附記に記すような条件検討を行い、最適と考えられる条件で染色を行った。HIF-1 α の染色では1次抗体の反応時間が一晩必要であり、自動染色機ではなくマニュアルで染色を行った。すべての染色は免疫染色後、緩衝液を水洗したのちに、ヘマトキシリンで核染色を行った。そののち、エタノール・

キシレンで脱水・透徹し、封入した。

免疫染色の判定は、2名の医師によって行った。p53 および MIB-1 については前章に示した IRS (immunoreactive scoring) システム (図 14) を採用し、半定量的に評価した。前述のとおり、IRS システムでは染色強度 (0 から 3 の 4 段階) と染色範囲 (0 から 4 の 5 段階) を積算することにより、IRS スコア (0 から 12) を算出するものである。低発現/高発現の判定は、p53 は IRS スコア 0 から 3 を低発現、4 以上を高発現とし、MIB-1 は IRS スコア 0 から 4 を低発現、6 以上を高発現とした (積算で算出するスコアなので 5 は存在しない)。

HER-2 および HIF-1 α の評価は経験ある病理医を含む 2 名の医師で行った。HER-2 の評価については胃癌の生検検体における HER-2 判定基準 (表 7) を参考に (胃癌では切除標本と生検検体で判定基準が異なる)、陰性と陽性に判定した。HER-2 抗体では正常および腫瘍組織の一部の核および細胞質に交差性反応を認めるが、胃癌の場合と同様、細胞膜への反応性のみを対象とし、細胞質や核への反応は対象外とした。一方、HIF-1 α の評価は 0、1+、2+ の 3 段階で行い、0 を陰性、1+および 2+を陽性とした。

前述のように、1 症例あたり複数の生検個数が存在しうるが、p53 および MIB-1 については、1 つのパラフィンブロック内の複数の生検検体を通して 1 症例あたりの腫瘍部分における発現状況を検討し IRS を用いて半定量的に評価した。HER-2 および HIF-1F の評価については、前述の胃癌 HER2 検査ガイド同様、陽性染色のある癌細胞クラスターが 1 つでもあれば陽性と判断した。

なお、判定の際には患者の臨床情報と照らし合わせることなく判定を行った。

表 5. 1 次抗体の種類とプロトコル (研究 1)

Protein	Type	Source	Method	Cell conditioning	Titer	Incubation	Staining
p53	Mouse MC	DO7 NCL-p53-DO7	Automatic (VENTANA)	pH 8.0 Heating 60 min	1:50	60 min	Nucleus
MIB-1	Mouse MC	Ki-67 M7240 DAKO	Automatic (VENTANA)	pH 8.0 Heating 60 min	1:200	60 min	Nucleus
HER-2	Rabbit PC	HER2(4B5)107918 Roche	Automatic (VENTANA)	pH 8.0 Heating 60 min	R-to-U	60 min	Membrane
HIF-1 α	Mouse MC	610958 BD Biosciences	Manual	Heating (121°C15min) Citrate buffer (pH6.0)	1:1000	overnight RT	Nucleus

Abbreviations: RT = room temperature; R-to-U = ready to use (kit).

免疫組織化学 (ABC 法)

1. 脱パラフィン (キシレン、エタノール各 4 槽ずつ 3 分ずつ)、流水水洗
2. 抗原の賦活化
 - * 賦活化溶液
 - pH6 クエン酸 buffer
 - pH7 クエン酸 buffer
 - pH8 EDTA
 - 蛋白分解酵素
 - トリプシン 室温 20 分
 - プロテアーゼ K 室温 20 分
 - * 方法
 - オートクレーブ 121°C10 分
 - ウォーターバス 95°C40 分
 - マイクロウェーブ 100°C15 分
3. 熱処理の場合、室温程度まで冷却
4. 流水水洗、乾燥、切片のまわりをパップペンで囲む
5. 正常ヤギ血清 室温 20 分
6. 一次抗体 室温 90 分または 4°C 一晚 (今回 HIF-1 α では室温一晚)
7. TBS 洗浄 3 分×3 回
8. 内因性 POD の処理 3%過酸化水素水加 TBS 室温 10 分
9. 流水水洗 (短めに) TBS 洗浄 3 分×1 回
10. ビオチン標識二次抗体 (一次抗体を作成した動物による) 室温 30 分
11. TBS 洗浄 3 分×3 回
12. ABC 試薬室温 30 分 (使用 30 分前には調製)
13. TBS 洗浄 3 分×3 回
14. DAB 発色
15. 流水水洗
16. ヘマトキシリンで核染色
17. 流水水洗、色だし
18. 脱水 (エタノール)、透徹 (キシレン)、封入

図 20. 免疫染色 ABC 法の手順.



図 21.
自動染色機 BenchMarkXT (Roche® (Ventana®))

↓ 表 7. 胃癌 HER-2 判定ガイド

胃癌トラスツズマブ病理部会 HER2検査ガイド胃癌編

判定強度 スコア	切除標本の染色パターン	生検標本の染色パターン	HER2過剰発現 判定
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が1切片に10%未満である。	陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞なし	陰性
1+	弱/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が1切片に10%以上認められる。癌細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている。	癌細胞の染色割合に関係なく、弱/ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の陽性染色がある癌細胞クラスターが1つ以上ある。	陰性
2+	弱～中程度の完全な基底側または側方の細胞膜の陽性染色がある癌細胞が1切片に10%以上認められる。	癌細胞の染色割合に関係なく、弱～中程度の完全な基底側または側方の細胞膜の陽性染色がある癌細胞クラスターが1つ以上あり	境界域
3+	強い完全な基底側または側方の細胞膜の陽性染色がある癌細胞が1切片に10%以上認められる。全周性に認められない場合ある。	癌細胞の染色割合に関係なく、強い完全な基底側または側方の細胞膜の陽性染色がある癌細胞クラスターが1つ以上あり	陽性

3.2.5 統計解析

生存分析（全生存率 OS、局所制御率 LC、無病再発率 DFS）は Kaplan-Meier 法により評価し、2 群間の比較はログランク検定を用いた。生存分析は、各バイオマーカーの染色結果および、年齢・性別・原発巣占拠部位（Ce/Ut/Mt/Lt）・腫瘍長・T ステージ・病期について行った。また、バイオマーカー陽性/陰性群の背景因子の比較は χ^2 検定を用いて行い、この際には必要に応じてイェーツの補正を使用した。背景因子としては、他のバイオマーカーの発現状況・年齢・性別・原発巣占拠部位（Ce/Ut/Mt/Lt）・腫瘍長・T ステージ・病期を調査した。多変量解析は単変量解析で有意と思われた項目について検討し、比例ハザードモデルを用いた。

なお、T ステージの分析にあたっては、T1・T2・T3・T4 の 4 段階の分析のほかに、T1/T2 vs. T3/T4 の 2 群比較も行った。病期の分析にあたっては、I 期・II/III 期・IV 期の 3 群比較のほか、I 期 vs. II/III/IV 期の 2 群比較と、I/II/III 期 vs. IV 期の 2 群比較を行った。この目的は、3 群以上の群分けをすることにより 1 群あたりの症例数が減じてしまい、その差を統計学的に過小評価してしまうことを避けるためである。

生存期間は化学放射線療法の第 1 日目から起算して、患者死亡または 2012 年 6 月 30 日までの期間を算出した。局所制御期間は遠隔転移による再発を最初にきたした患者では、局所再発を認めない限り局所制御群に含み、局所再発をした時点をもって局所制御失敗群に分類した。統計解析は SAS 社の StatView for Windows Version5.0 を使用し、 p 値 0.05 以下をもって有意とした。

表 8. 93 例の患者背景

Factors		(n=93)	%
Age	average	67 y.o.	(range:41 - 86)
	<65 y.o.	37	40%
	>=65 y.o.	56	60%
Sex	Male	84	90%
	Female	9	10%
Location	Ce	7	8%
	Ut	15	16%
	Mt	46	49%
	Lt	25	27%
TumorLength	=<5cm	39	42%
	>5cm	54	58%
T-stage	1	21	23%
	2	12	13%
	3	34	37%
	4	26	28%
Stage	I	17	18%
	II	19	20%
	III	27	29%
	IV	30	32%

Abbreviations :

Ce = cervix, Ut = upper thoracic,
Mt = middle thoracic, Lt = lower thoracic.

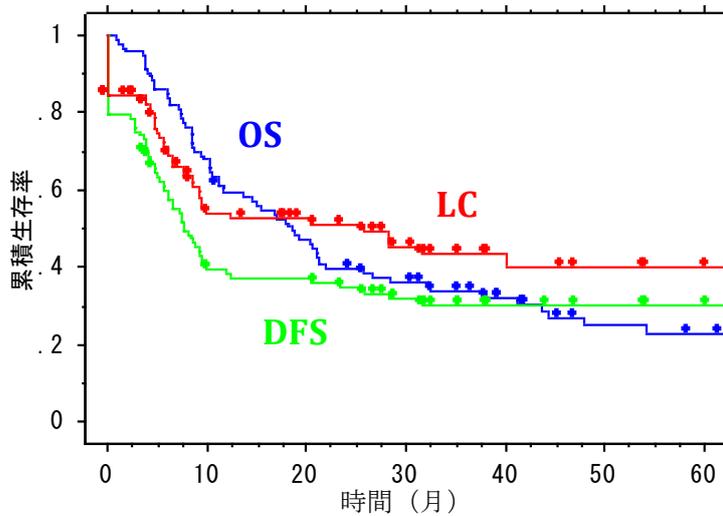


図 22. 全 93 例の臨床成績

表 9. 救済手術/ESD を施行された症例

No.	Age	Sex	Location	Stage	Tumor length	First response	First recurrence	DFS(mo)	Salvage	OS after salvage (mo)	Alive/Dead	Cause of death
1	50	M	Mt	IVA	5cm	CR	local	6.0	op	8.5	11.3	Dead Systemic
5	49	M	Mt	IVB	11cm	residual	non-CR	0.0	op	2.4	6.0	Dead Systemic
11	69	M	Mt	IVB	2cm	CR	local	4.6	op	5.2	10.5	Dead Systemic
13	79	F	Ut	IVB	6cm	CR	local	0.0	op	2.9	16.7	Dead TRD
15	69	F	Mt	IVB	8cm	CR	local	3.7	op	17.7	21.1	Dead Systemic
18	76	M	Lt	III	7cm	CR	local	7.6	ESD	13.5	21.2	Dead Systemic
23	54	M	Lt	IVB	5cm	CR	local	35.7	op	37.7	39.7	Alive -
31	55	M	Mt	IVB	6cm	CR	local	4.9	op	14.7	20.3	Dead Systemic
34	60	M	Mt	IIA	4cm	residual	non-CR	0.0	op	-	25.8	Dead Systemic
37	61	F	Lt	III	9cm	residual	local	8.6	op	1.2	11.6	Dead TRD
38	70	M	Mt	III	5cm	CR	local+distant(lung)	9.8	op	10.1	21.2	Dead Systemic
39	64	M	Ut	I	3cm	CR	local	8.7	ESD+op	7.7	32.5	Dead Local
54	65	M	Lt	IIIB	5cm	CR	local	28.2	op	36.4	61.8	Alive -
71	78	M	Ce	III	3cm	CR	local(LN)	7.3	ESD	18.5	28.5	Dead Local
76	59	M	Mt	I	2cm	PR	local(LN)+distant(lung)	25.8	op	13.8	41.2	Dead Systemic
78	71	M	Ce	I	6cm	CR	local	9.1	APC	6.8	17.0	Dead Systemic

Abbreviation: Mt = middle thoracic, Ut = upper thoracic, Lt = lower thoracic, Ce = cervical, CR = complete response, PR = partial response, LN = lymph node, op = operation, ESD = endoscopic submucosal dissection, APC = argon-plasma coagulation, TRD = treatment-related death

3.3 結果

3.3.1 症例

年齢は平均 67 歳（範囲：41～86 歳）で、男性 84 例（90%）、女性 9 例（10%）であった（表 8）。原発巣の位置は Ce から Lt まで含み、Ce 7 例（8%）、Ut 15 例（16%）、Mt 46 例（49%）、Lt 25 例（27%）と Mt が最多であった。腫瘍長が 5cm 以下の症例は 39 例（42%）、5cm より大きい症例は 54 例（58%）であった。T ステージは TNM 分類の T 因子であるが、T1 から T4 までを含む。病期は I から IV までで、I 期は 17 例（18%）、II 期は 19 例（20%）、III 期は 27 例（29%）、IV 期は 30 例（32%）であった。化学放射線療法の適応理由は、切除不能食道癌（IV 期）は 30 例（32%）、75 歳以上の高齢が 18 例（19%）（高齢かつ IV 期の 3 例を除く）、合併症が 40 例（43%）、手術拒否が 5 例（5%）。

全体の生存期間中央値（MST: Median survival time）は 18.6 ヶ月（95%信頼区間；15.2-22.0 ヶ月）、生存者の追跡期間中央値は 37 ヶ月（範囲：11～130 ヶ月）であった。2 年、3 年、5 年全生存率はそれぞれ 39%（+/-5%）、34%（+/-5%）、23%（+/-5%）であり、2 年、3 年、5 年局所制御率はそれぞれ 53%（+/-6%）、50%（+/-6%）、39%（+/-6%）、2 年、3 年、5 年無再発生存率はそれぞれ 35%（+/-5%）、30%（+/-5%）、30%（+/-5%）であった（図 22）。

全 93 例のうち、経過中に救済手術または救済内視鏡的粘膜下層剥離術（endoscopic submucosal dissection：ESD）を施行された症例は 16 例で、救済手術のみが 12 例、ESD のみが 2 例、アルゴンプラズマ凝固療法（argon plasma coagulation：APC）が 1 例、ESD 施行後に続けて救済手術を施行された症例が 1 例であった。救

済処置を受けた症例を表 9 に示す。救済処置後の生存期間中央値は 10.1 ヶ月（範囲：1.2～37.7 ヶ月）であった。

3.3.2 免疫染色

免疫染色の結果を図 23 に示す。各バイオマーカーの高発現率（陽性率）はそれぞれ p53 で 69%、MIB-1 で 54%、HER-2 で 14%、HIF-1 α で 67%であった。

3.3.3 統計学的解析

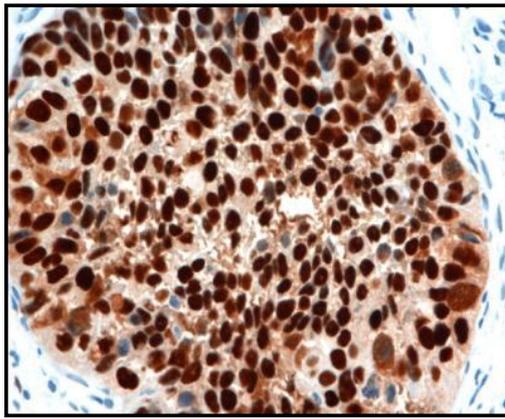
各バイオマーカーの発現についての生存分析の結果を表 10 に示す。2 年生存率は p53 高発現群（p53 IRS \geq 4）と低発現群（p53 IRS $<$ 4）では 50% vs. 17%（ $p < 0.0001$ ）で、有意差を認めた。また、HER-2 陽性群と HER-2 陰性群では 18% vs. 43%（ $p = 0.02$ ）で、こちらも有意差を認めた（図 24）。2 年局所制御率は p53 高発現群（p53 IRS \geq 4）と低発現群（p53 IRS $<$ 4）では 57% vs. 36%（ $p = 0.0005$ ）であり、HER-2 陽性群と HER-2 陰性群では 0% vs. 57%（ $p = 0.003$ ）であった（図 25）。2 年無再発生存率は p53 高発現群（p53 IRS \geq 4）と低発現群（p53 IRS $<$ 4）では 44% vs. 13%（ $p < 0.0001$ ）で、HER-2 陽性群と HER-2 陰性群では 0% vs. 41%（ $p = 0.003$ ）であった（図 26）。以上のように、HER-2 および p53 においては全生存率、局所制御率、無再発生存率のすべてで有意差を認めた。一方、MIB-1 および HIF-1 α においては、全生存率、局所制御率、無再発生存率のいずれでも有意差を認めなかった。

背景因子ごとの生存分析の結果を表 11 に示す。全生存率についての Kaplan-Meier 生存曲線を図 27 に示す。腫瘍占拠部位ごとの全生存率の検討では、2 年

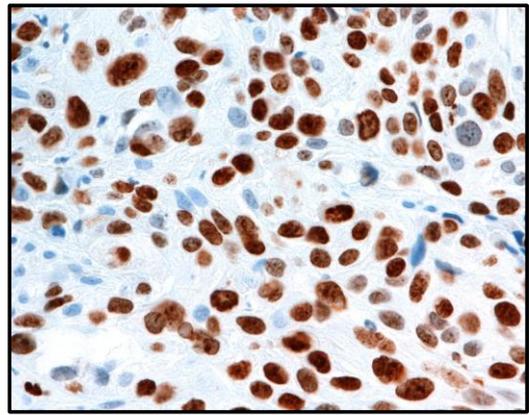
生存率は Ce で 43%、Ut で 20%、Mt で 37%、Lt で 55%であった ($p = 0.02$)。また、T ステージごとには、2 年生存率は T1 で 67%、T2 で 50%、T3 で 37%、T4 で 15%であった ($p = 0.03$)。また、T1/T2 vs. T3/T4 の解析では、2 年生存率は T1/T2 で 61%、T3/T4 で 28%であった ($p = 0.01$)。全生存率については、それ以外の因子（年齢・性別・腫瘍長・病期）については有意差を認めなかった。

各背景因子の局所生存率についての Kaplan-Meier 曲線を [図 28](#) に示す。病期ごとの 2 年局所制御率は、I 期 79%、II/III 期 47%、IV 期 38%であった ($p = 0.07$)。I 期 vs. II/III/IV 期の解析では 2 年局所制御率は 79% vs. 43%であり ($p = 0.03$)、I/II/III 期 vs. IV 期の解析では 55% vs. 38%であった ($p = 0.14$)。局所制御率については、それ以外の因子（年齢・性別・腫瘍長・T ステージ）については有意差を認めなかった。

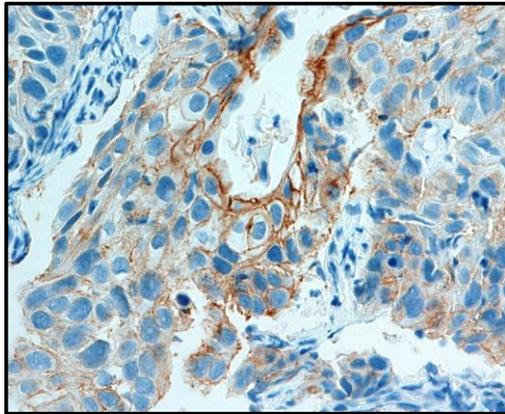
各背景因子の無病生存率についての Kaplan-Meier 曲線を [図 29](#) に示す。T ステージごとには 2 年無病生存率は T1 で 66%、T2 で 33%、T3 で 29%、T4 で 17%であった ($p = 0.35$)。しかし、T1/T2 vs. T3/T4 の解析では、2 年生存率は 54% vs. 24% ($p = 0.005$) であり、有意差を認めた。一方、病期ごとの 2 年無病生存率は、I 期 64%、II/III 期 35%、IV 期 18%であった ($p = 0.006$)。I 期 vs. II/III/IV 期の解析では 2 年局所制御率は 64% vs. 28%であり ($p = 0.01$)、I/II/III 期 vs. IV 期の解析では 43% vs. 18%であった ($p = 0.009$)。



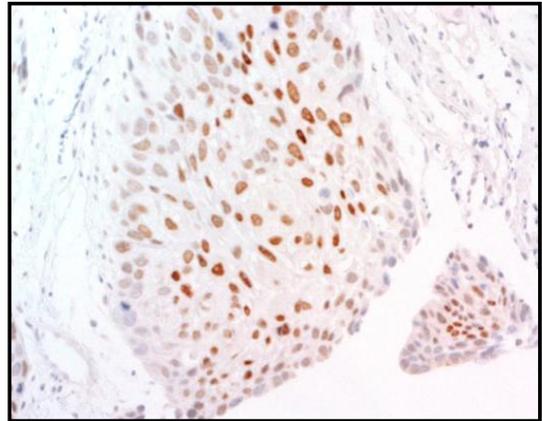
a)



b)



c)



d)

図 23. 陽性例の代表的写真

a) p53 陽性例、b)MIB-1 陽性例、c)HER-2 陽性例、c)HIF-1 α 陽性例.

表 10. 染色陽性率と単変量解析結果

IHC	total=93	2y-OS	SD	p value	2y-LC	SD	p value	2y-DFS	SD	p value
	n	%		log-rank			log-rank			log-rank
p53				$p < 0.0001$			$p = 0.0005$			$p < 0.0001$
High(IRS \geq 4)	64	69%	50%	(6%)	57%	(7%)		44%	(6%)	
Low(IRS $<$ 4)	29	31%	17%	(7%)	36%	(10%)		13%	(6%)	
MIB-1				$p = 0.91$						$p = 0.46$
High(IRS \geq 6)	51	54%	41%	(7%)	51%	(8%)		33%	(7%)	
Low(IRS \leq 4)	42	46%	38%	(8%)	50%	(8%)		37%	(8%)	
HER-2				$p = 0.02$			$p = 0.003$			$p = 0.003$
Positive(1+, 2+)	13	14%	18%	(11%)	0%	(0%)		0%	(0%)	
Negative(0)	80	86%	43%	(6%)	57%	(6%)		41%	(6%)	
HIF-1 α				$p = 0.75$						$p = 0.26$
Positive(1+, 2+)	62	67%	38%	(6%)	49%	(7%)		32%	(6%)	
Negative(0)	31	33%	42%	(9%)	53%	(10%)		38%	(10%)	

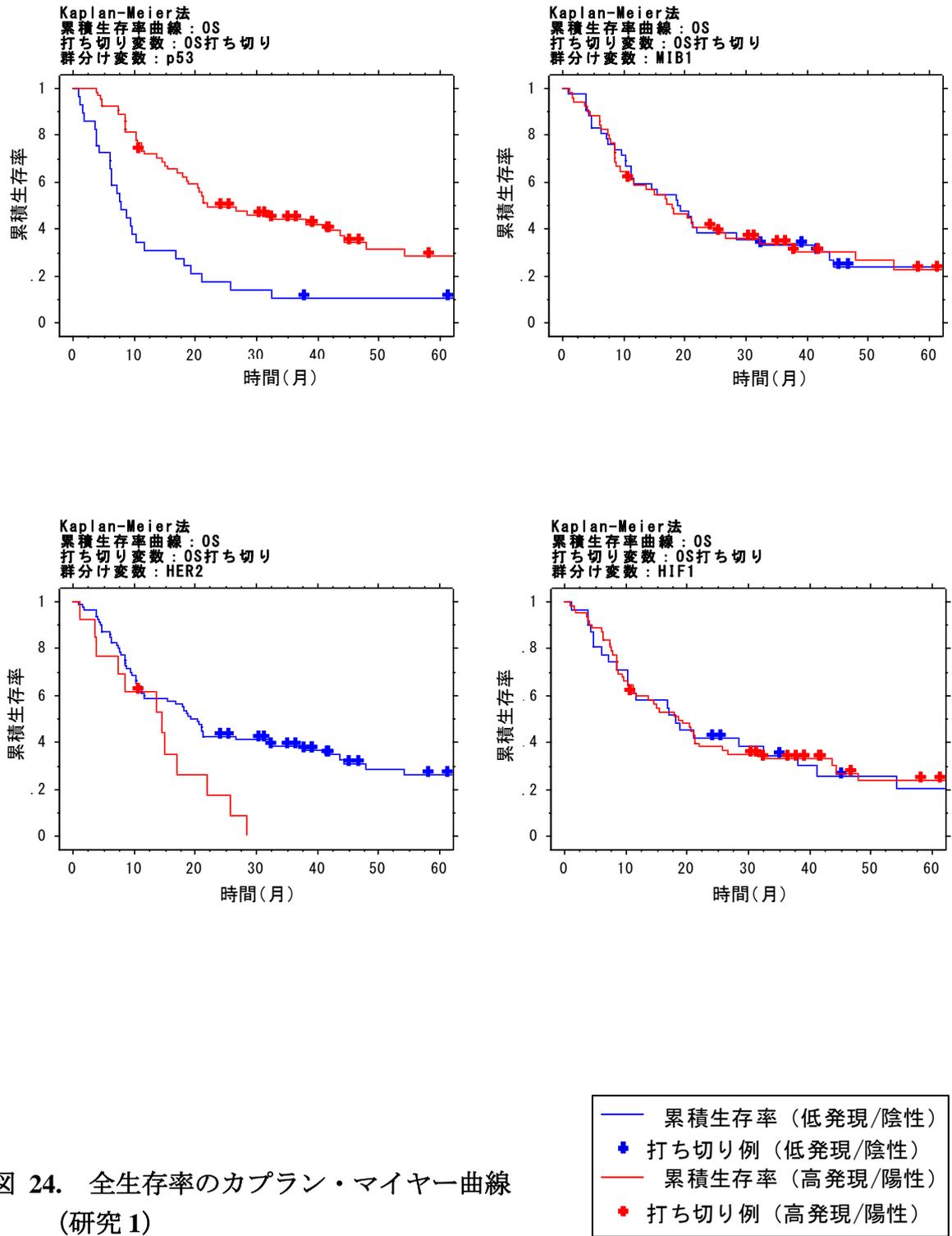


図 24. 全生存率のカプラン・マイヤー曲線 (研究 1)

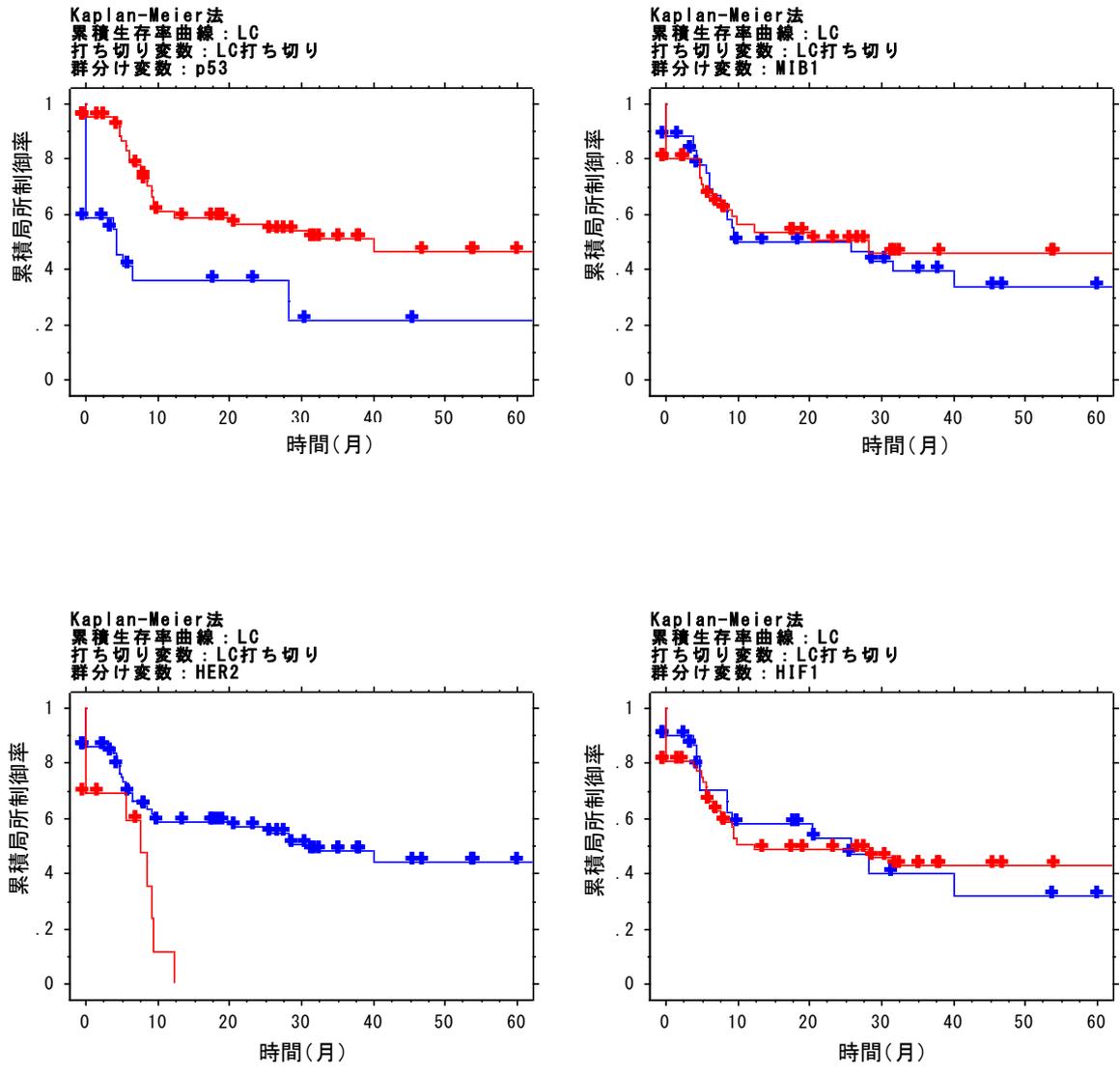
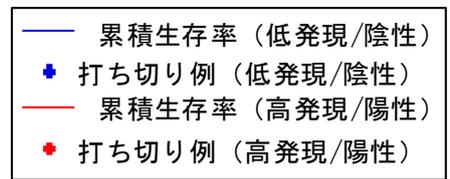


図 25. 局所制御率のカプラン・マイヤー曲線 (研究 1)



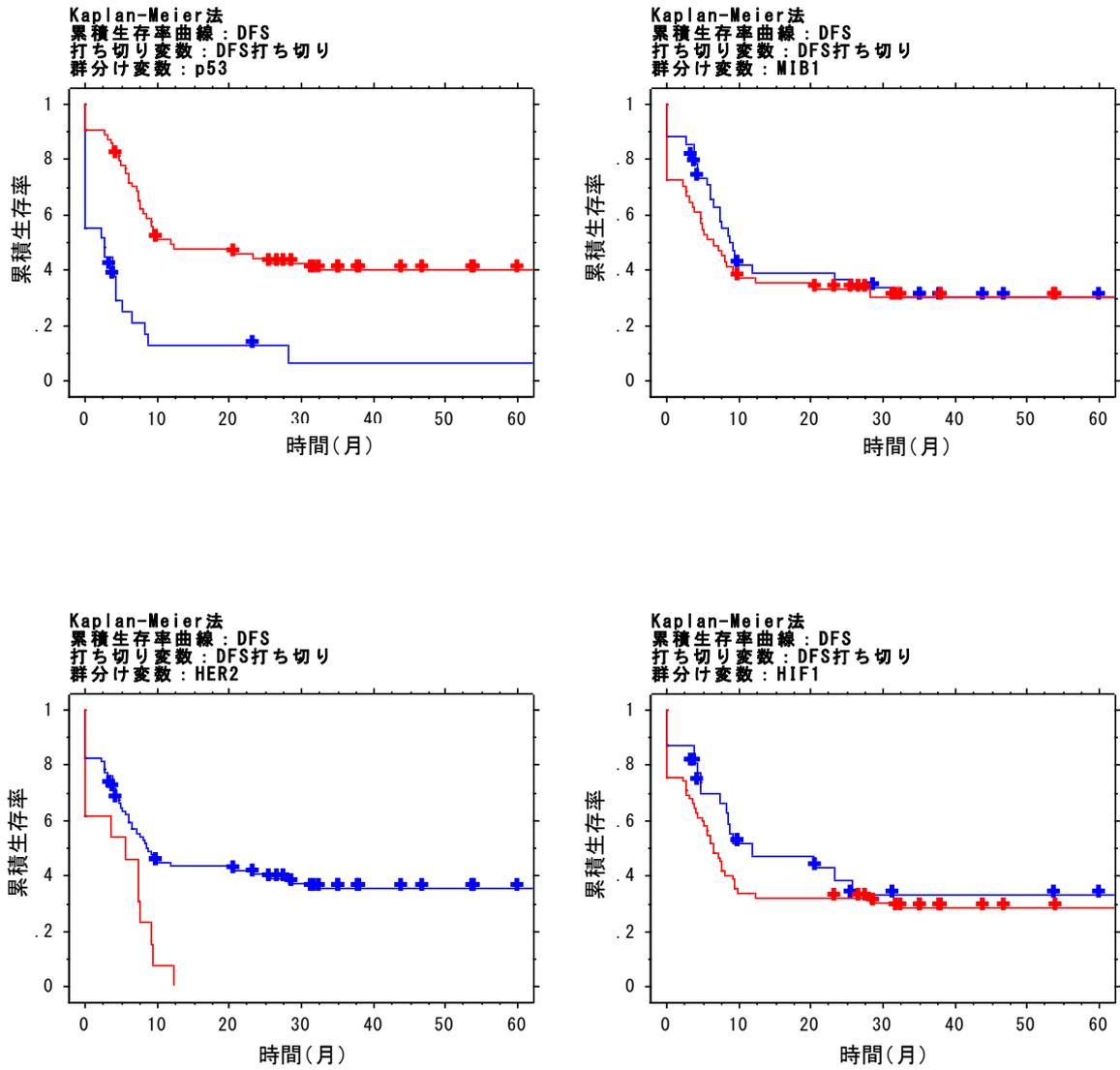


図 26. 無病生存率のカプラン・マイヤー曲線
(研究 1)

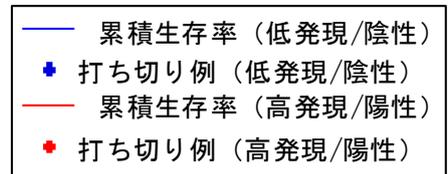


表 11. 背景因子による生存分析

Factor	n	2y-OS	SD	p value	2y-LC	SD	p value	2y-DFS	SD	p value
	total=93			log-rank			log-rank			log-rank
Age				$p = 0.32$			$p = 0.46$			$p = 0.35$
<65	37	38%	(8%)		55%	(9%)		30%	(8%)	
>=65	56	40%	(7%)		47%	(7%)		38%	(7%)	
Sex				$p = 0.70$			$p = 0.58$			$p = 0.80$
Male	84	41%	(5%)		52%	(6%)		36%	(5%)	
Female	9	22%	(14%)		32%	(18%)		27%	(16%)	
Location				$p = 0.02$			$p = 0.77$			$p = 0.35$
Ce	7	43%	(19%)		0%	(0%)		17%	(16%)	
Ut	15	20%	(10%)		46%	(14%)		23%	(11%)	
Mt	46	37%	(7%)		50%	(8%)		34%	(7%)	
Lt	25	55%	(10%)		60%	(10%)		48%	(10%)	
TumorLength				$p = 0.54$			$p = 0.77$			$p = 0.94$
=<5cm	39	41%	(8%)		51%	(9%)		36%	(8%)	
>5cm	54	38%	(7%)		49%	(7%)		34%	(7%)	
T-stage				$p = 0.03$			$p = 0.07$			$p = 0.35$
1	21	67%	(10%)		78%	(10%)		66%	(11%)	
2	12	50%	(14%)		42%	(14%)		33%	(14%)	
3	34	37%	(8%)		47%	(9%)		29%	(8%)	
4	26	15%	(7%)		34%	(11%)		17%	(8%)	
1 or 2	33	61%	(9%)	$p = 0.01$	64%	(9%)	$p = 0.20$	54%	(9%)	$p = 0.005$
3 or 4	60	28%	(6%)		42%	(7%)		24%	(6%)	
Stage				$p = 0.14$			$p = 0.07$			$p = 0.006$
I	17	65%	(12%)		79%	(11%)		64%	(13%)	
II or III	46	41%	(7%)		47%	(8%)		35%	(7%)	
IV	30	22%	(8%)		38%	(11%)		18%	(7%)	
Not I (II - IV)	76	34%	(6%)	$p = 0.16$	43%	(6%)	$p = 0.03$	28%	(5%)	$p = 0.01$
Not IV (I - III)	63	48%	(6%)	$p = 0.07$	55%	(7%)	$p = 0.14$	43%	(6%)	$p = 0.009$

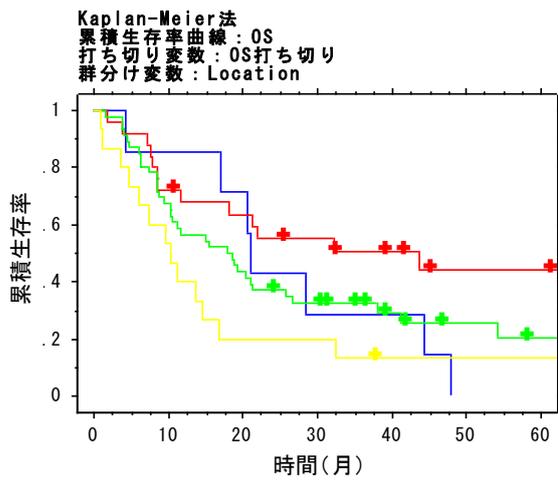
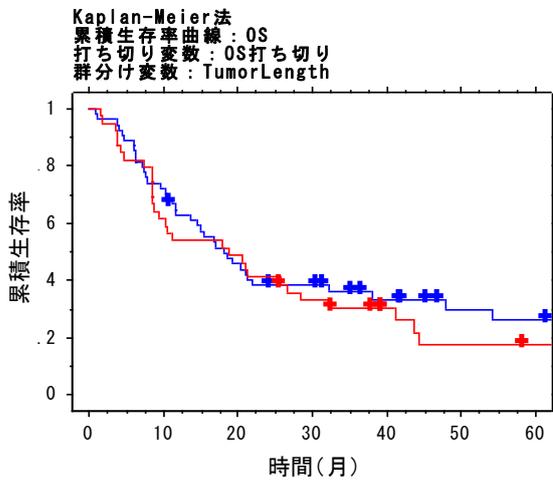
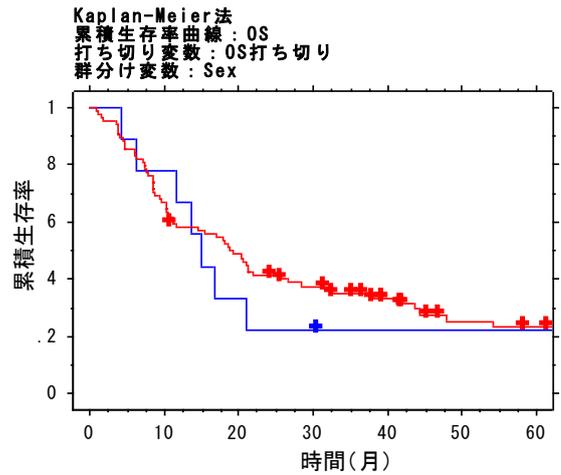
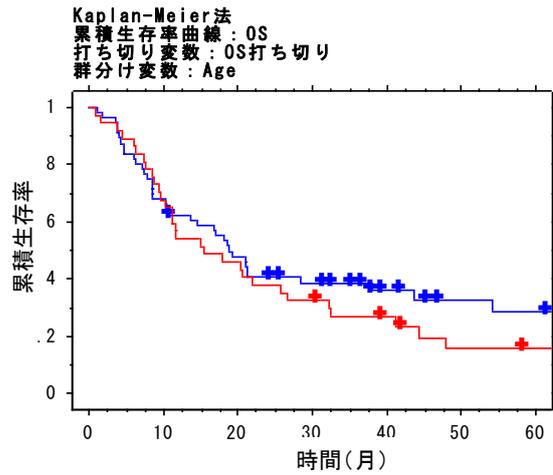


図 27. 背景因子ごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線 (研究1)

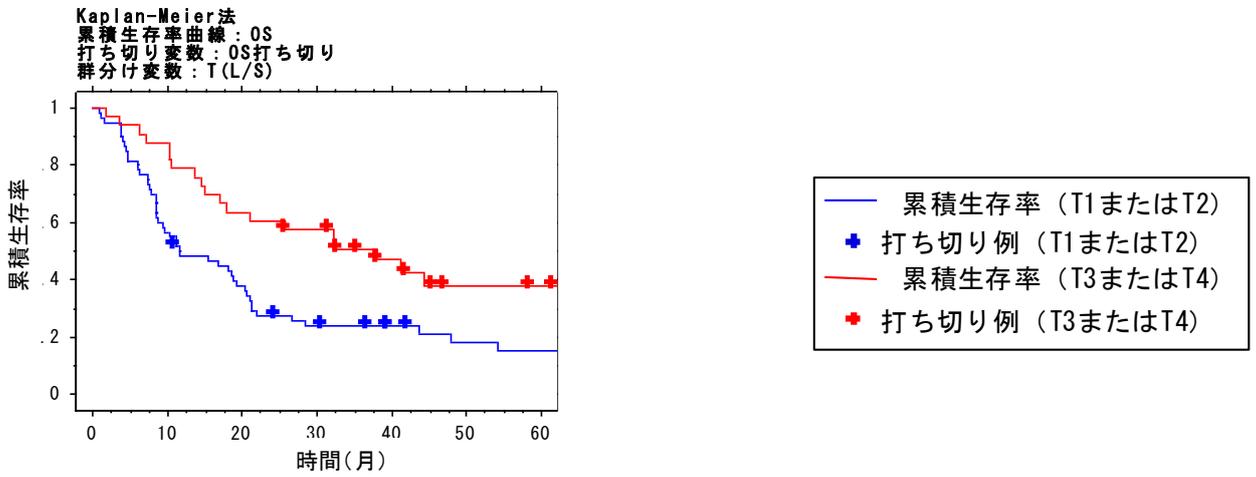
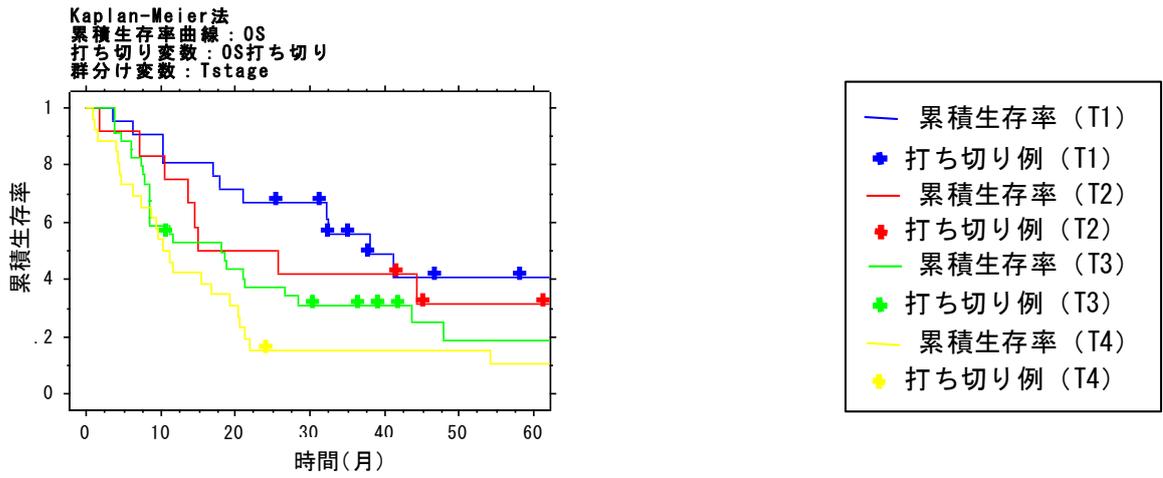


図 27 (続き)
 背景因子ごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線
 (研究 1)

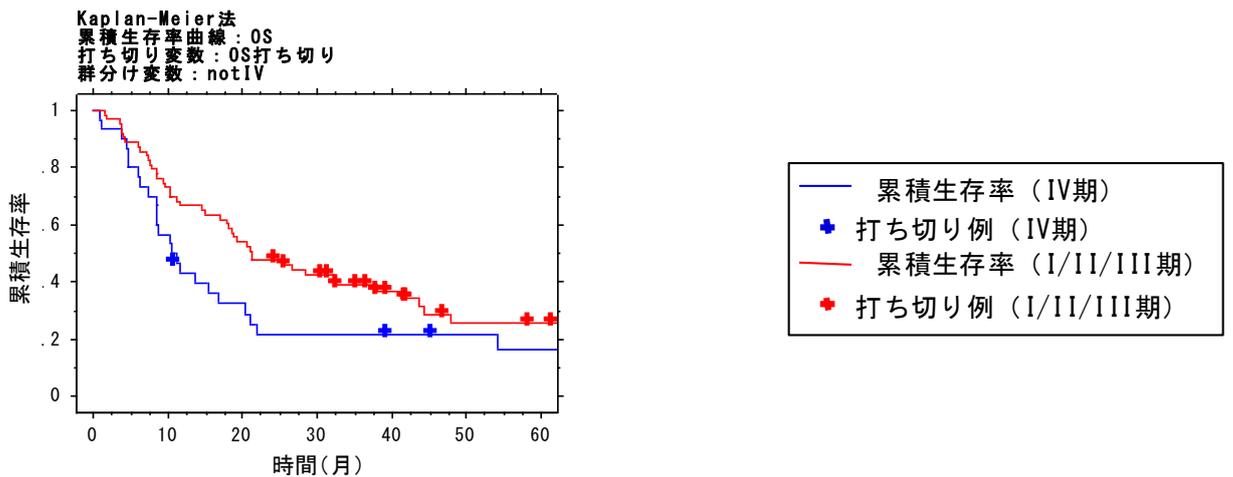
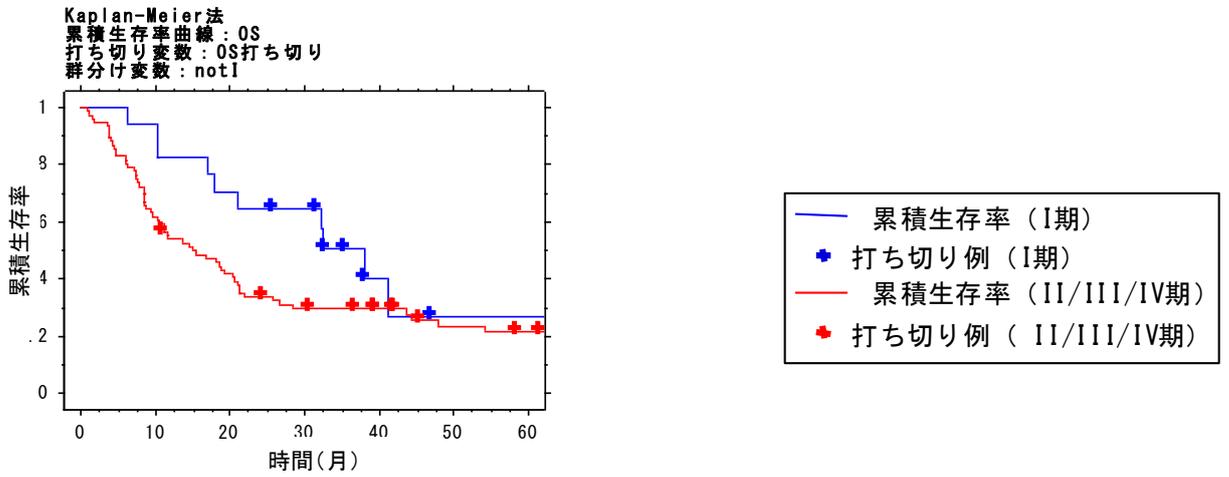
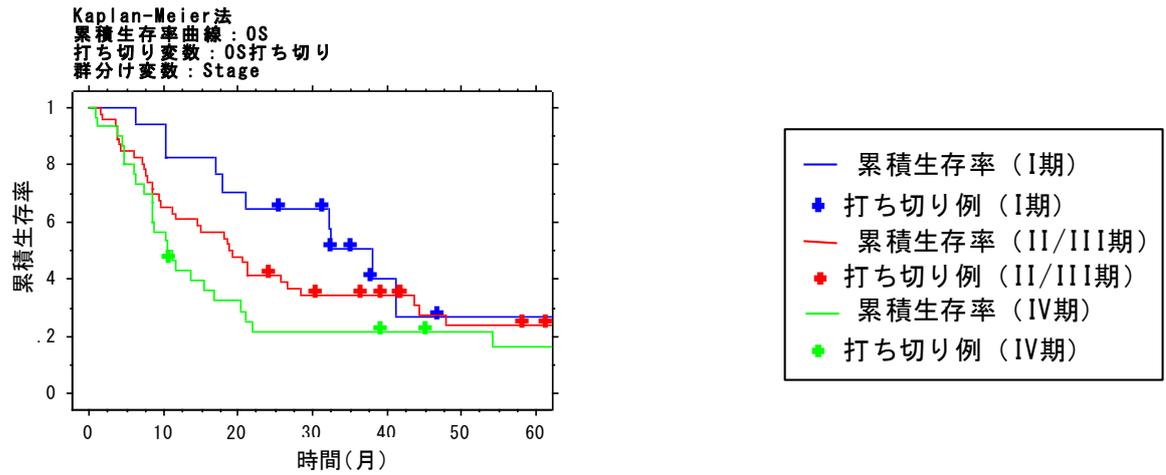


図 27 (続き)
 背景因子ごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線
 (研究 1)

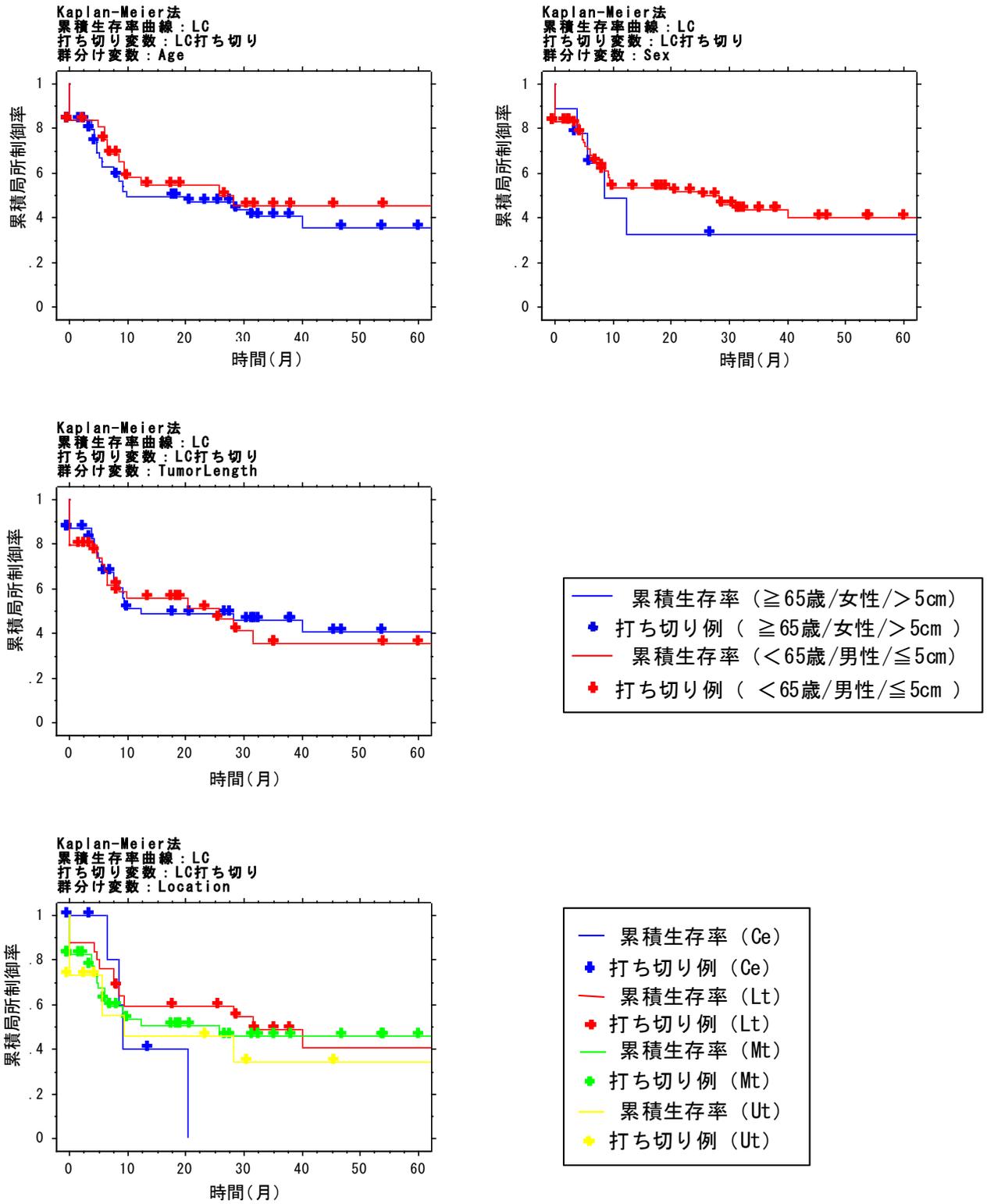


図 28. 背景因子ごとの局所制御率のカプラン・マイヤー曲線 (研究 1)

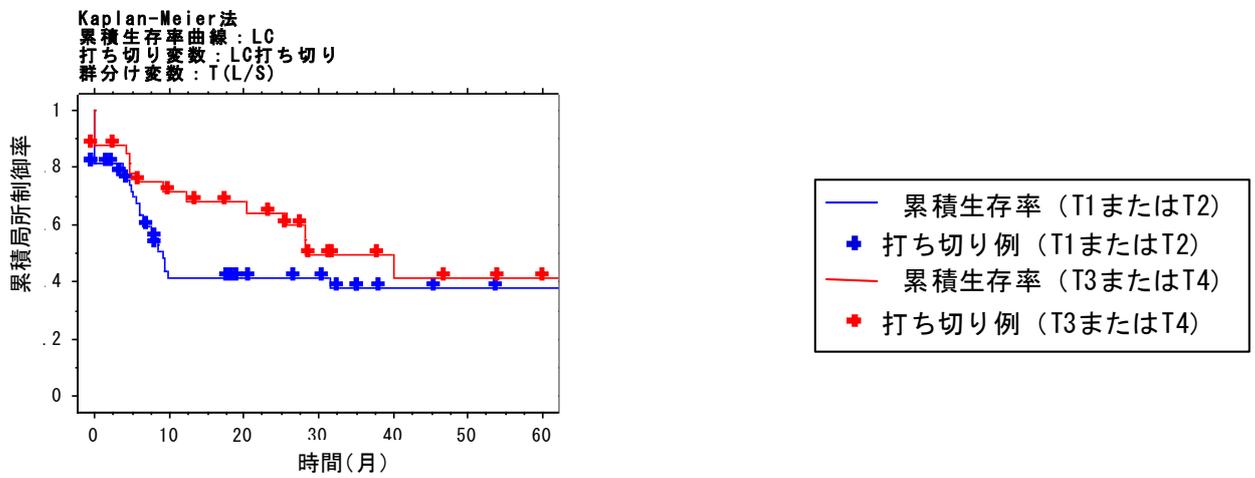
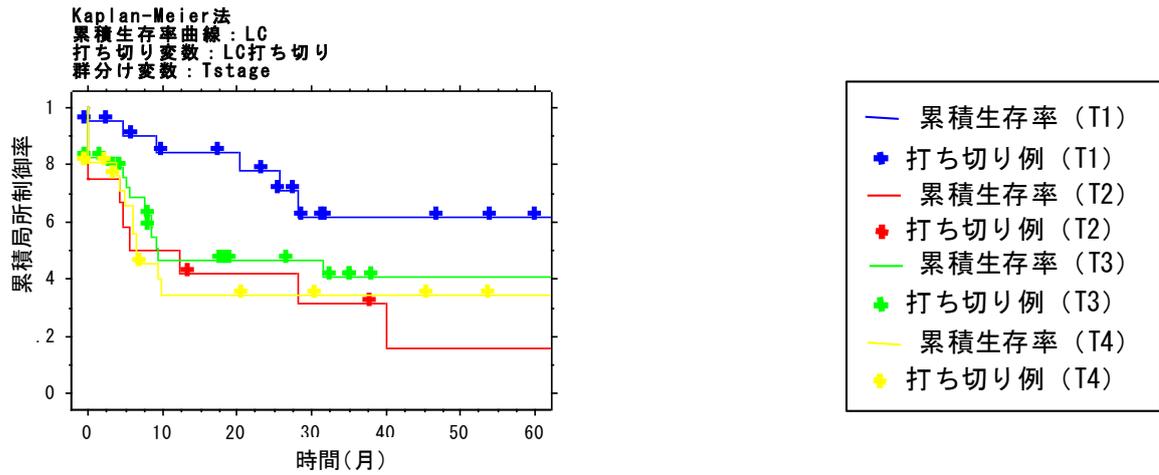


図 28. (続き)
 背景因子ごとの局所制御率のカプラン・マイヤー曲線
 (研究 1)

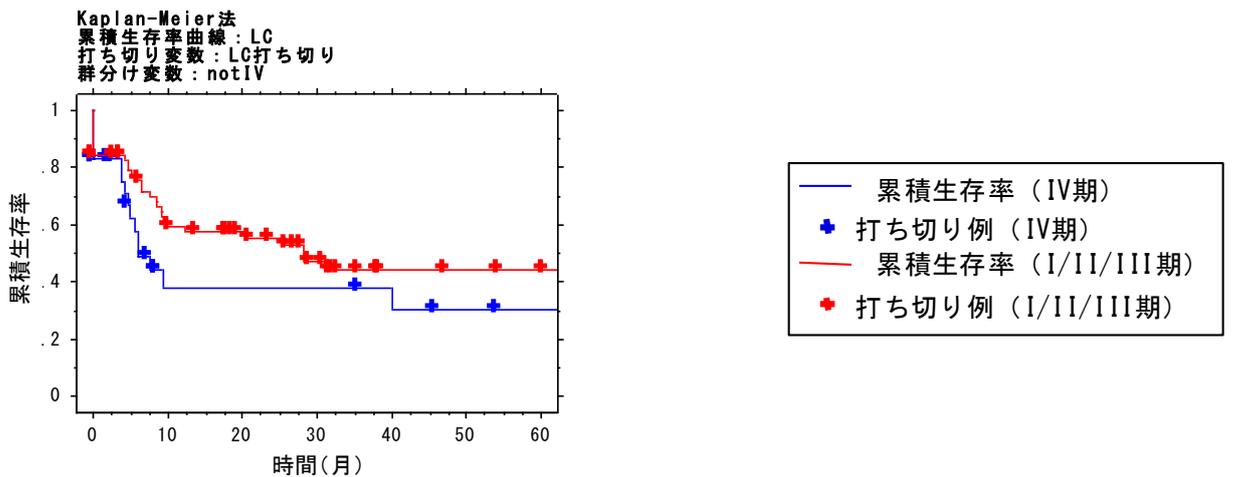
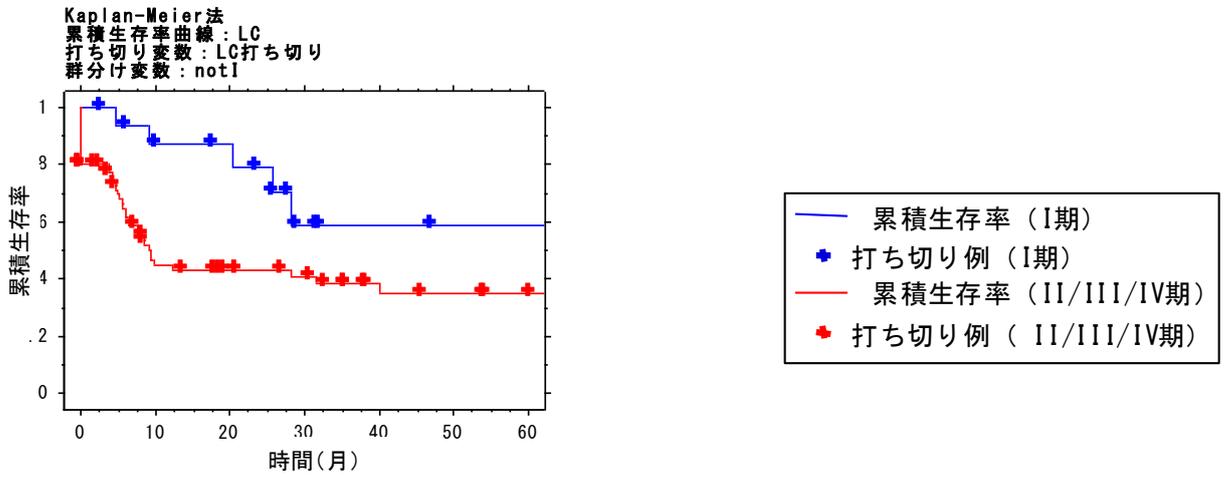
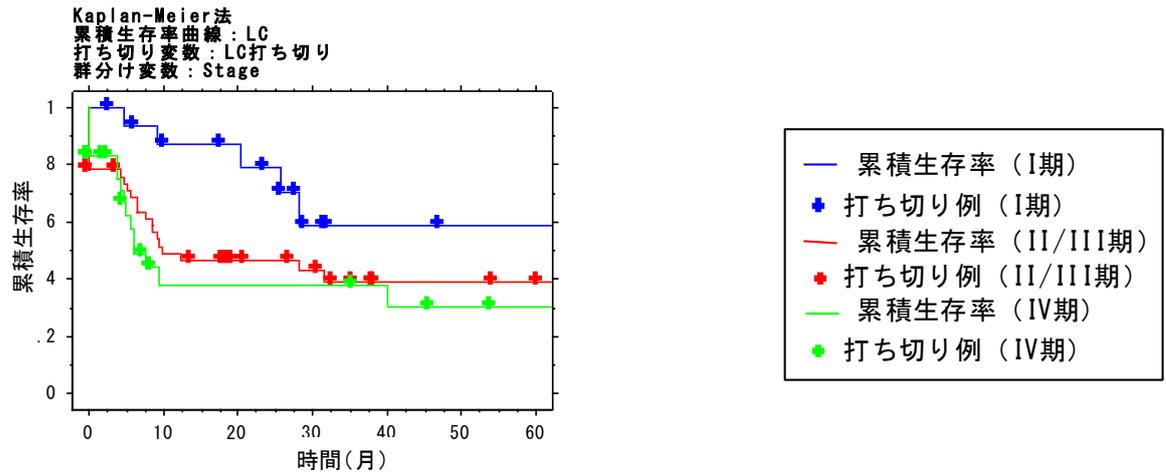


図 28. (続き)
 背景因子ごとの局所制御率のカプラン・マイヤー曲線
 (研究 1)

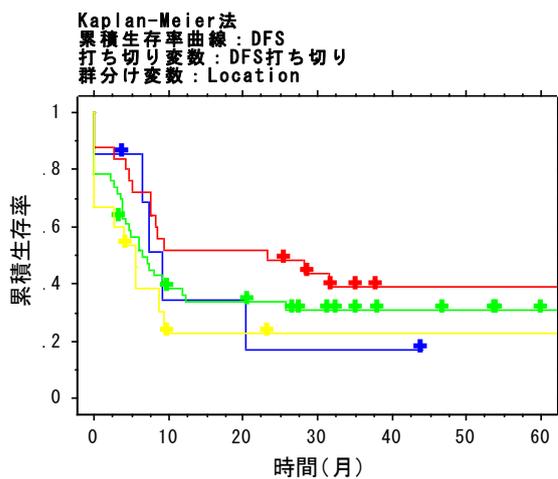
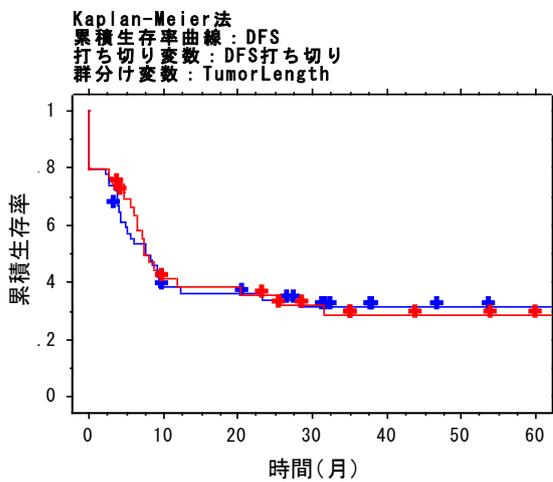
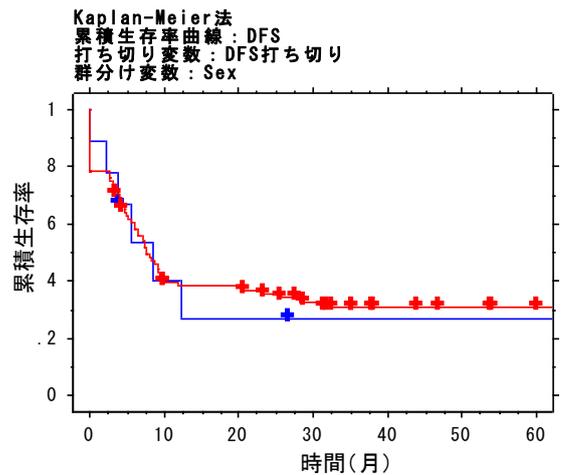
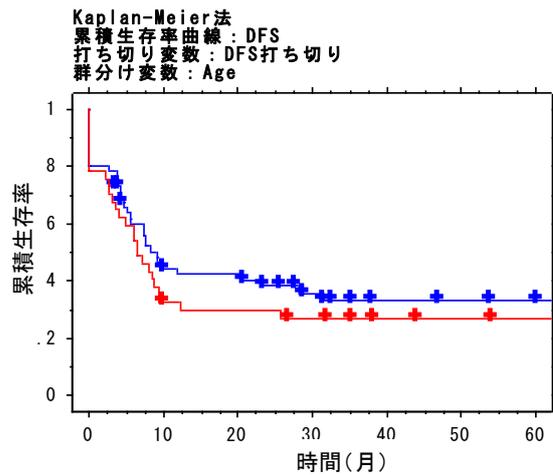


図 29. 背景因子ごとの無病生存率のカプラン・マイヤー曲線 (研究 1)

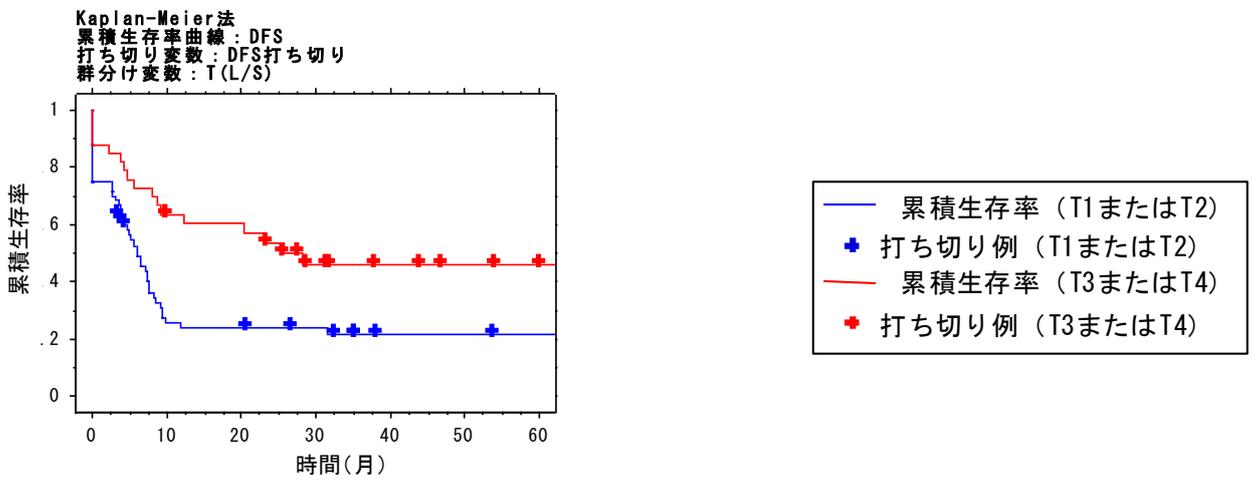
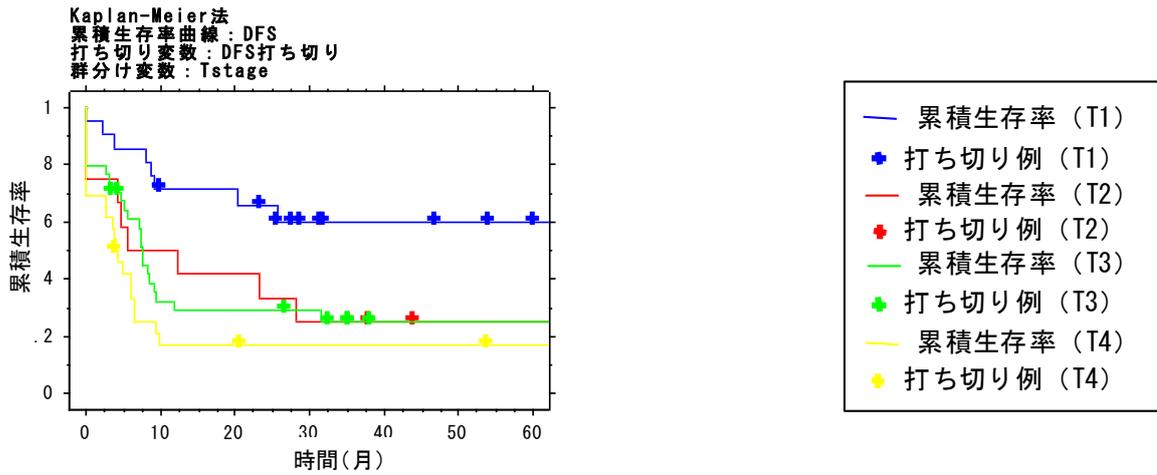


図 29. (続き)
 背景因子ごとの無病生存率のカプラン・マイヤー曲線
 (研究 1)

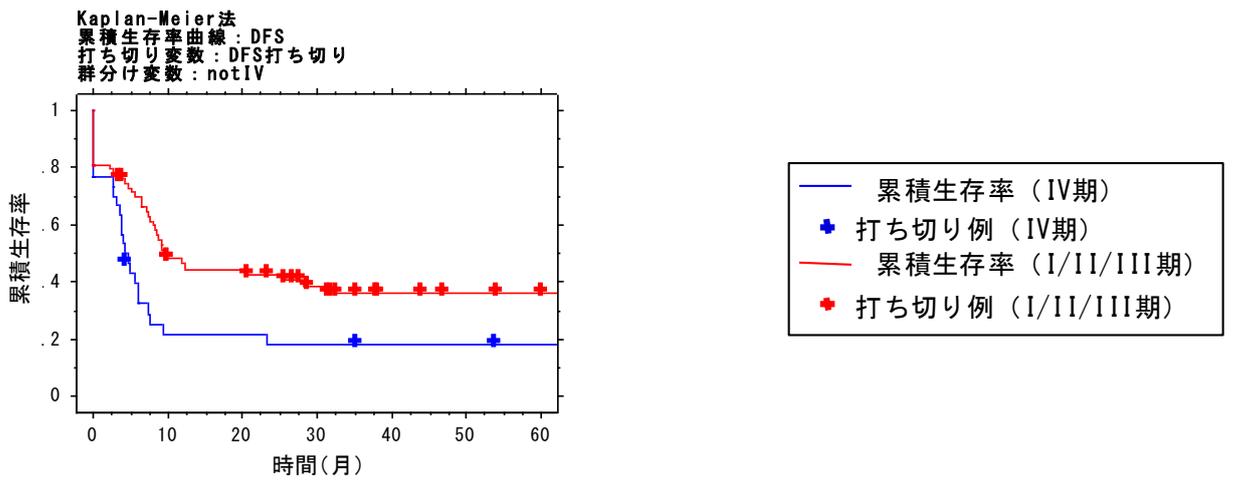
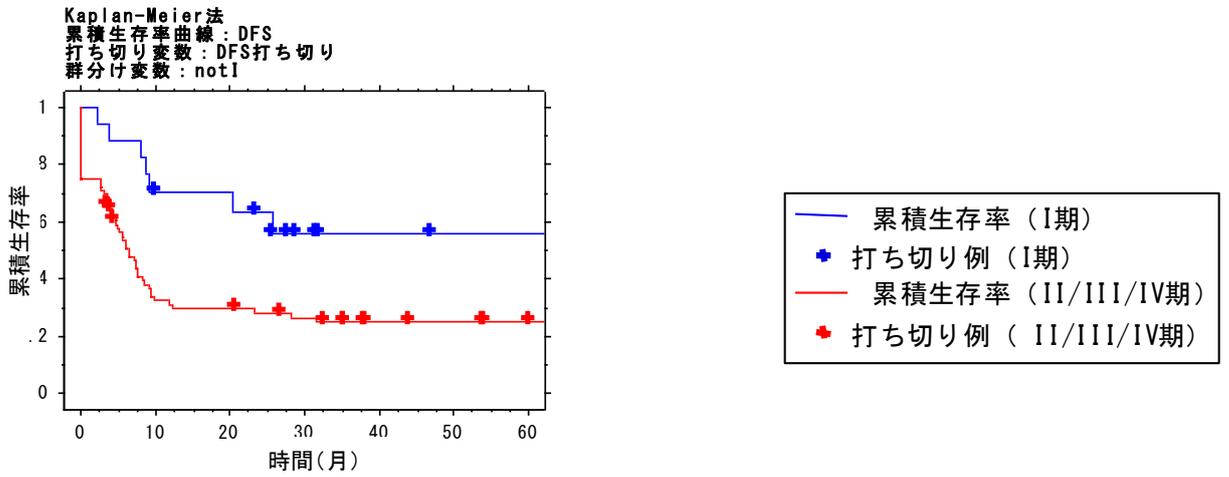
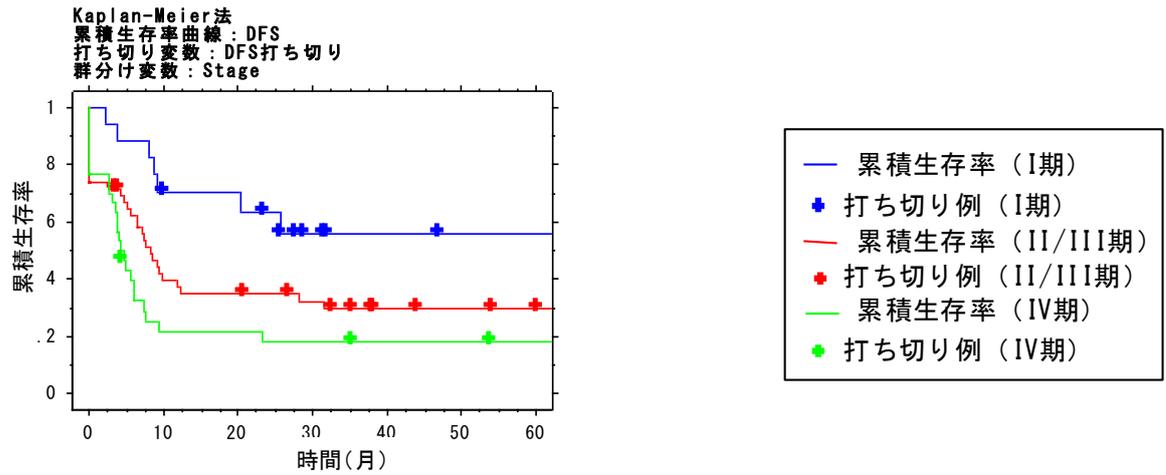


図 29. (続き)
 背景因子ごとの無病生存率のカプラン・マイヤー曲線
 (研究 1)

生存分析で有意差がついた p53 と HER-2 それぞれの背景因子の比較を表 12、表 13 に示す。p53 高発現群と低発現群の背景因子、および、HER-2 陽性群と陰性群の背景因子には有意な差を認めなかった。

多変量解析は、全生存率については p53、HER-2、原発巣の占拠部位、T ステージで行い (図 30)、p53 陽性、T1/T2、Lt は予後良好因子、HER-2 陽性は予後不良因子であった。ハザード比はそれぞれ、p53 陰性で 2.57 (95%CI: 1.51~4.39、 $p = 0.0005$)、HER-2 陰性で 0.36 (95%CI: 0.18~0.72、 $p = 0.004$)、T1/T2 で 2.65 (95%CI: 1.48~4.73、 $p = 0.001$)、Lt 食道癌で 0.26 (95%CI: 0.12~0.60、 $p = 0.002$) であった。

局所制御率についての多変量解析は、p53、HER-2、病期の 3 因子で行い (図 31)、p53 陽性は局所制御良好因子、HER-2 陽性は局所制御不良因子であった。ハザード比はそれぞれ、p53 陰性で 3.05 (95%CI: 1.64~5.68、 $p = 0.0004$)、HER-2 陰性で 0.31 (95%CI: 0.15~0.65、 $p = 0.002$)、I 期で 0.45 (95%CI: 0.17~1.14、 $p = 0.09$) であった。

無再発生存率についての多変量解析は、p53、HER-2、病期で行い (図 32)、p53 陽性と I 期は無再発生存率の予後良好因子、HER-2 陽性は予後不良因子であった。ハザード比はそれぞれ、p53 陰性で 3.77 (95%CI: 2.17~6.57、 $p < 0.0001$)、HER-2 陰性で 0.37 (95%CI: 0.19~0.71、 $p = 0.003$)、I 期で 0.36 (95%CI: 0.15~0.85、 $p = 0.02$) であった。

表 12. p53 発現と背景因子の比較

		Total	p53 expression		χ^2 p value
		(n=93)	High (n=64)	Low (n=29)	
p53	High	69%	-	-	-
	Low	31%	-	-	
MIB-1	High	54%	52%	18%	0.35
	Low	46%	48%	82%	
HER-2	Positive	14%	16%	10%	0.72
	Negative	86%	84%	90%	
HIF-1	Positive	67%	64%	72%	0.43
	Negative	33%	36%	28%	
Age	<65	40%	39%	41%	0.83
	\geq 65	60%	61%	59%	
Sex	Male	90%	92%	86%	0.60
	Female	10%	8%	14%	
Location	Ce	8%	9%	3%	0.20
	Ut	16%	11%	28%	
	Mt	49%	52%	45%	
	Lt	27%	28%	24%	
TumorLength	\leq 5cm	42%	44%	38%	0.60
	>5cm	58%	56%	62%	
T-stage	1 or 2	35%	39%	28%	0.28
	3 or 4	65%	61%	72%	
Stage	I	18%	22%	10%	0.41
	II or III	49%	47%	55%	
	IV	32%	31%	34%	
	Not I (II - IV)	82%	78%	90%	0.18
	Not IV (I - III)	68%	69%	66%	0.76

Abbreviations: Ce = cervix, Ut = upper thoracic,
Mt = middle thoracic, Lt = lower thoracic.

表 13. HER-2 の発現と背景因子の比較

		Total	HER-2 expression		χ^2 p value
		(n=93)	Positive (n=13)	Negative (n=80)	
p53	High	69%	68%	77%	0.68
	Low	31%	34%	23%	
MIB-1	High	54%	54%	62%	0.60
	Low	46%	46%	38%	
HER-2	Positive	14%	-	-	-
	Negative	86%	-	-	
HIF-1	Positive	67%	66%	69%	0.96
	Negative	33%	35%	31%	
Age	<65	40%	40%	38%	0.92
	>=65	60%	60%	62%	
Sex	Male	90%	91%	85%	0.81
	Female	10%	9%	15%	
Location	Ce	8%	6%	15%	0.22
	Ut	16%	14%	31%	
	Mt	49%	53%	31%	
	Lt	27%	28%	23%	
TumorLength	=<5cm	42%	54%	38%	0.78
	>5cm	58%	73%	62%	
T-stage	1 or 2	35%	34%	46%	0.58
	3 or 4	65%	66%	54%	
Stage	I	18%	20%	8%	0.18
	II or III	49%	51%	38%	
	IV	32%	29%	54%	
	Not I (II - IV)	82%	80%	92%	
	Not IV (I - III)	68%	71%	46%	0.14

Abbreviations: Ce = cervix, Ut = upper thoracic,
Mt = middle thoracic, Lt = lower thoracic.

総括的な帰無仮説：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 モデル：比例ハザード

	カイ2乗	自由度	p値
Wald検定	34.285	6	<.0001
スコア検定	37.758	6	<.0001
尤度比検定	37.449	6	<.0001

モデルの係数：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 モデル：比例ハザード

	自由度	係数	標準誤差	係数／標準誤差	カイ2乗	p値	Exp (係数)
Location	3	.	.	.	10.274	.0164	.
Ce	1	-.583	.530	-1.100	1.211	.2712	.558
Lt	1	-1.335	.423	-3.156	9.959	.0016	.263
Mt	1	-.556	.345	-1.611	2.595	.1072	.573
T(L/S) : L	1	.974	.296	3.292	10.839	.0010	2.650
HER2 : N	1	-1.015	.353	-2.872	8.251	.0041	.362
p53 : N	1	.945	.272	3.478	12.099	.0005	2.574

信頼区間：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 モデル：比例ハザード

	Exp (係数)	95%下側	95%上側
Location : Ce	.558	.198	1.577
Location : Lt	.263	.115	.603
Location : Mt	.573	.291	1.128
T(L/S) : L	2.650	1.483	4.733
HER2 : N	.362	.181	.724
p53 : N	2.574	1.511	4.385

図 30. 全生存率の多変量解析
 (研究 1)

総括的な帰無仮説：LC
 打ち切り変数：LC打ち切り
 モデル：比例ハザード

	カイ2乗	自由度	p値
Wald検定	22.041	3	<.0001
スコア検定	24.464	3	<.0001
尤度比検定	22.093	3	<.0001

モデルの係数：LC
 打ち切り変数：LC打ち切り
 モデル：比例ハザード

	自由度	係数	標準誤差	係数／標準誤差	カイ2乗	p値	Exp (係数)
p53 : N	1	1.115	.317	3.515	12.352	.0004	3.049
HER2 : N	1	-1.177	.383	-3.074	9.448	.0021	.308
notI : I	1	-.810	.480	-1.689	2.851	.0913	.445

信頼区間：LC
 打ち切り変数：LC打ち切り
 モデル：比例ハザード

	Exp (係数)	95%下側	95%上側
p53 : N	3.049	1.637	5.676
HER2 : N	.308	.145	.653
notI : I	.445	.174	1.139

図 31. 局所制御率の多変量解析
 (研究 1)

総括的な帰無仮説：DFS
 打ち切り変数：DFS打ち切り
 モデル：比例ハザード

	カイ2乗	自由度	p値
Wald検定	33.998	4	<.0001
スコア検定	38.082	4	<.0001
尤度比検定	34.165	4	<.0001

モデルの係数：DFS
 打ち切り変数：DFS打ち切り
 モデル：比例ハザード

	自由度	係数	標準誤差	係数/標準誤差	カイ2乗	p値	Exp (係数)
p53 : N	1	1.328	.283	4.694	22.029	<.0001	3.773
HER2 : N	1	-1.001	.338	-2.962	8.775	.0031	.368
Stage	2	.	.	.	5.410	.0669	.
I	1	-1.024	.441	-2.320	5.382	.0203	.359
II/III	1	-.291	.278	-1.046	1.095	.2954	.747

信頼区間：DFS
 打ち切り変数：DFS打ち切り
 モデル：比例ハザード

	Exp (係数)	95%下側	95%上側
p53 : N	3.773	2.167	6.570
HER2 : N	.368	.190	.713
Stage : I	.359	.151	.853
Stage : II/III	.747	.433	1.290

図 32. 無病再発率の多変量解析
 (研究 1)

4. 研究 2「食道扁平上皮癌における CLDN-1、CLDN-4、CLDN-5、CLDN-7 の発現と根治的化学放射線療法の予後との関係」

4.1 目的

化学放射線療法は、局所治療である放射線療法に、全身療法である化学療法を組み合わせることによって予後を改善するが、根治治療を行っても局所または遠隔にしばしば再発するのは、序論で触れたとおりである。癌の浸潤・転移の機構については、そのメカニズム、微小環境について、近年研究が盛んである。今回、前述した研究 1「食道扁平上皮癌において根治的化学放射線療法を施行した 93 例についての HER-2、p53、MIB-1、HIF-1 α の発現と臨床成績の関係」では食道扁平上皮癌の根治的化学放射線療法においては、p53 と HER-2 が予後因子になるという結果に至った。そして、この研究 1 では、MIB-1 および HIF-1 α の発現と臨床成績の間には、有意な関係を認めなかった。

研究 1 開始時点では、筆者は HIF-1 α が治療効果予測因子になるのではないかと予測していた。それは、一般に低酸素環境では放射線感受性は低下すると考えられており、低酸素マーカーである HIF-1 α と放射線治療は密接な関係があると予測されたからであった。HIF-1 α 単独、もしくは、HIF-1 α と p53 など他のバイオマーカーとの発現の組み合わせによって治療効果予測因子になるのではないかと考えられた。しかし、前述のように HIF-1 α は単独では治療効果予測因子とはならず、さらに附 2 として巻末に附したように、他のバイオマーカーの発現状況と組み合わせで検討しても、予後因子とはならなかった。

これをふまえ、新規の予後因子となるようなバイオマーカーを検討したいと考えた。そこで、いまだ食道扁平上皮癌での報告が極めて乏しく、また、浸潤・転移の機構に関わる膜タンパクであるクローディン (Claudin、CLDN) に着目した。クローディンは細胞接着因子のひとつで、タイトジャンクションを形成する4回膜貫通型蛋白質である。1998年京都大学の月田承一郎博士により発見され、現在までに少なくとも24種類のファミリーが同定されている。クローディンについては、食道扁平上皮癌における発現状況についての報告はなく、発現状況について検討すること自体も意義があると考えられたため、症例を限った予備研究を行わず、当初より93例を対象とした検討を行った。食道扁平上皮癌における発現状況の調査および、クローディンの発現と臨床成績の関係を調査することを目的に、研究1の症例で免疫染色を行った。

4.2 対象と方法

4.2.1 症例

研究1と同一の根治的化学放射線療法を施行した食道扁平上皮癌93例を対象とした。病期はAJCCのTNM分類第5版⁽⁵⁸⁾に基づいて決定している。

なお、研究1同様に、東京大学医学部附属病院倫理委員会にて審査を受け、審査番号3669で承認されている。

4.2.2 免疫染色

治療前の内視鏡検査の際に採取され、10%中性緩衝ホルマリンにて固定され、パラフィン包埋されて保存されている腫瘍検体を用いた。パラフィンブロックを厚さ $4\mu\text{m}$ に薄切してスライドを作成した。免疫染色に用いた1次抗体（希釈倍率）は、CLDN-1 (1:50)、CLDN-4 (1:400)、CLDN-5 (1:100)、CLDN-7 (1:200) の4種類である。すべてのCLDN抗体はZymed社（サンフランシスコ、カリフォルニア）製を使用した。染色は自動染色機 BenchMarkXT (Roche® (Ventana®)) を用いた。免疫染色後、緩衝液を水洗したのちに、ヘマトキシリンで核染色を行った。そののち、エタノール・キシレンで脱水・透徹し、封入した。

免疫染色の判定は、経験ある病理医を含む2名の医師によって行った。CLDN-1と-7は0、1+、2+、3+の4段階に、CLDN-4と5は0、1+、2+の3段階に判定した。高発現/低発現の群わけは、CLDN-1は0と1+を低発現、2+と3+を高発現とし、CLDN-4は0と1+を低発現、2+を高発現、CLDN-5は0+を低発現、1+と2+を高発現、CLDN-7は0と1+を低発現、2+と3+を高発現とした (図 33)。

なお、陽性染色のある癌細胞クラスターが1つでもあれば陽性と判断した。判定の際には患者の臨床情報と照らし合わせることなく判定を行った。

4.2.3 統計解析

研究1と同様に行った。

生存期間も研究1同様、化学放射線療法の第1日目から起算して、患者死亡または2012年6月30日までの期間を算出した。

4.3 結果

4.3.1 症例

症例は研究1と完全に同一である。

4.3.2 免疫染色

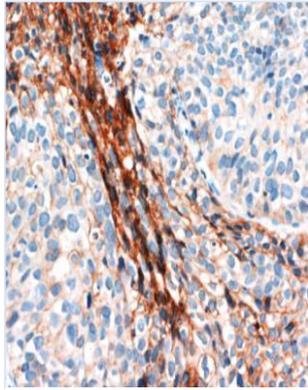
各クロードインの高発現率（陽性率）はそれぞれ CLDN-1 で 70%、CLDN-4 で 22%、CLDN-5 で 12%、CLDN-7 で 27%であった。

4.3.3 統計学的解析

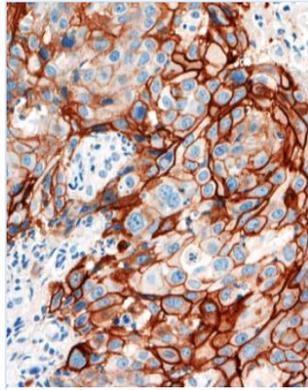
クロードインの発現についての生存分析の結果を表14および図34-36に示す。CLDN-5陽性群と陰性群の2年局所制御率は18% vs. 56% ($p = 0.01$)で、有意差を認めた。その他のCLDNについては、全生存率、局所制御率、無病再発率に有意な差を認めなかった。

生存分析で有意差がでたCLDN-5の背景因子の比較を表15に示す。 χ^2 検定ではCLDN-4とCLDN-5の発現に相関を認めた ($p = 0.01$)。また、原発巣の占拠部位 ($p = 0.04$) に有意な差を認めた。TステージについてはT1/T2症例でCLDNが発現する傾向を認めた ($p = 0.08$)。

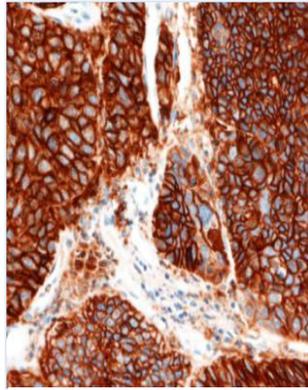
多変量解析は、局所制御率についてはCLDN-5、原発巣の占拠部位、病期（I期 vs. II-IV期）で行った（図37）。ハザード比はそれぞれ、CLDN-5陰性で0.36 (95%CI: 0.16~0.78、 $p = 0.009$)、I期で0.29 (95%CI: 0.11~0.76、 $p = 0.01$)であった。



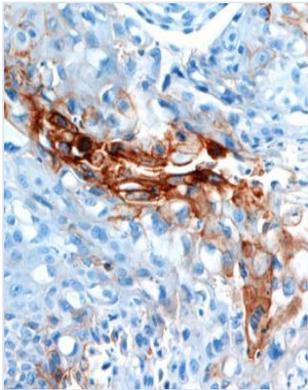
CLDN-1 1+ x200



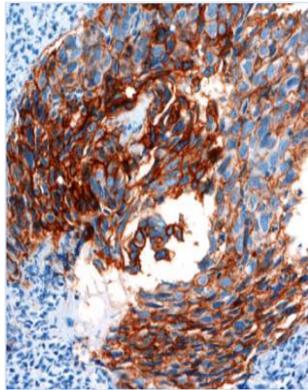
CLDN-1 2+ x200



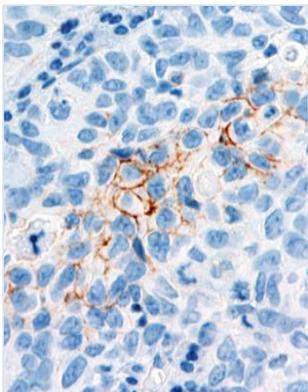
CLDN-1 3+ x200



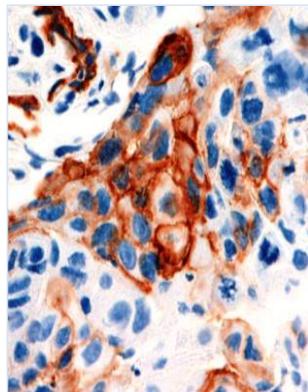
CLDN-4 1+ x200



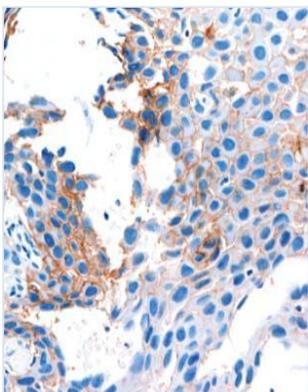
CLDN-4 2+ x200



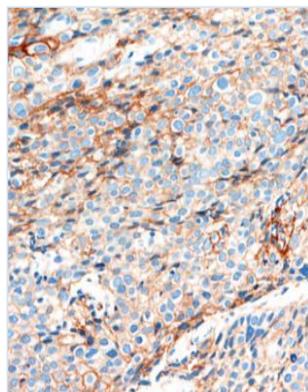
CLDN-5 1+ x400



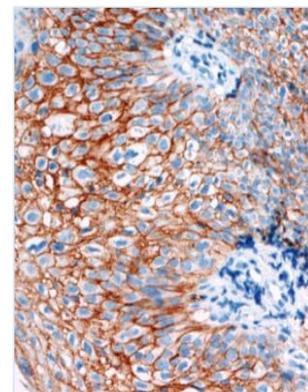
CLDN-5 2+ x400



CLDN-7 1+ x200



CLDN-7 2+ x200



CLDN-7 3+ x200

図 33. CLDN の免疫染色

表 14. CLDN の発現と生存分析

IHC	n	2y-OS	SD	p value	2y-LC	SD	p value	2y-DFS	SD	p value
	total=93			log-rank			log-rank			log-rank
CLDN1				$p = 0.81$			$p = 0.50$			$p = 0.19$
Positive(2+)	65	36%	(6%)		48%	(7%)		30%	(6%)	
Negative(0, 1+)	28	46%	(9%)		55%	(10%)		47%	(10%)	
CLDN4				$p = 0.16$			$p = 0.40$			$p = 0.20$
Positive(2+)	20	30%	(10%)		50%	(12%)		20%	(10%)	
Negative(0, 1+)	73	42%	(6%)		50%	(6%)		38%	(6%)	
CLDN5				$p = 0.48$			$p = 0.01$			$p = 0.13$
Positive(1+, 2+)	11	36%	(15%)		18%	(12%)		9%	(9%)	
Negative(0)	82	40%	(5%)		56%	(6%)		38%	(6%)	
CLDN7				$p = 0.35$			$p = 0.99$			$p = 0.68$
Positive(2+)	25	40%	(10%)		52%	(11%)		35%	(10%)	
Negative(0, 1+)	68	39%	(6%)		49%	(7%)		35%	(6%)	

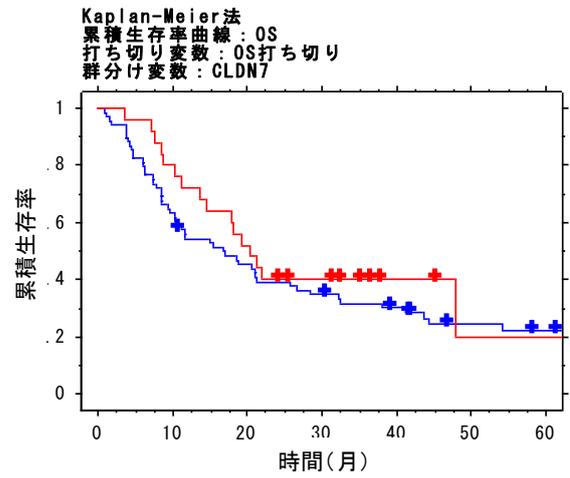
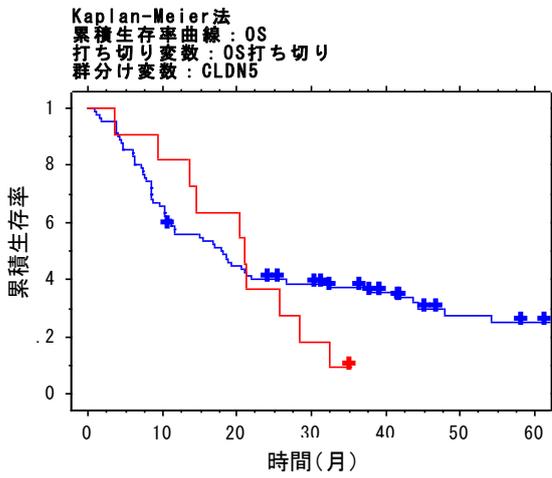
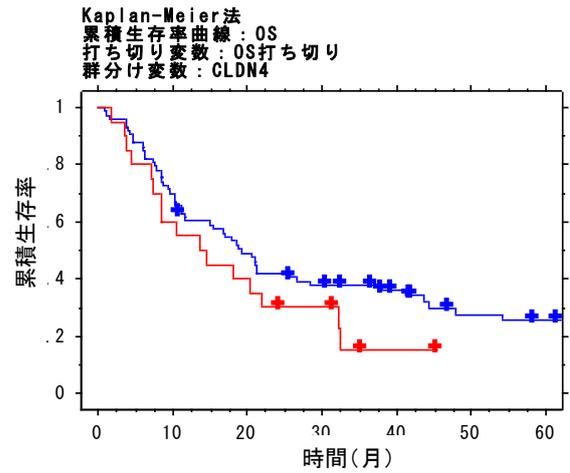
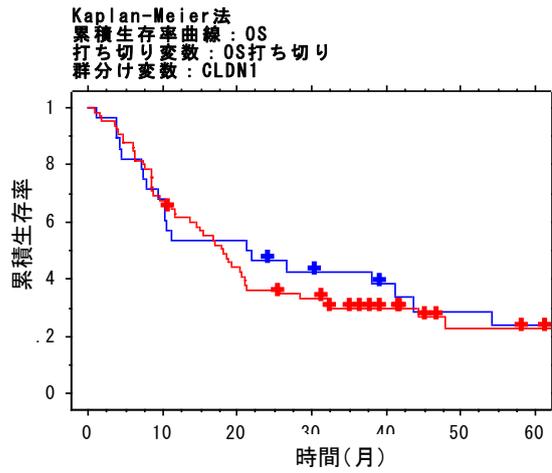
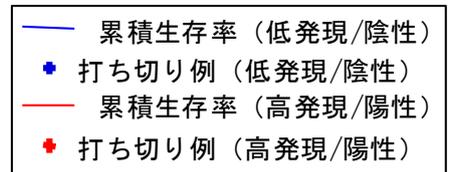


図 34. CLDN の発現と全生存率の
 カプラン・マイヤー曲線



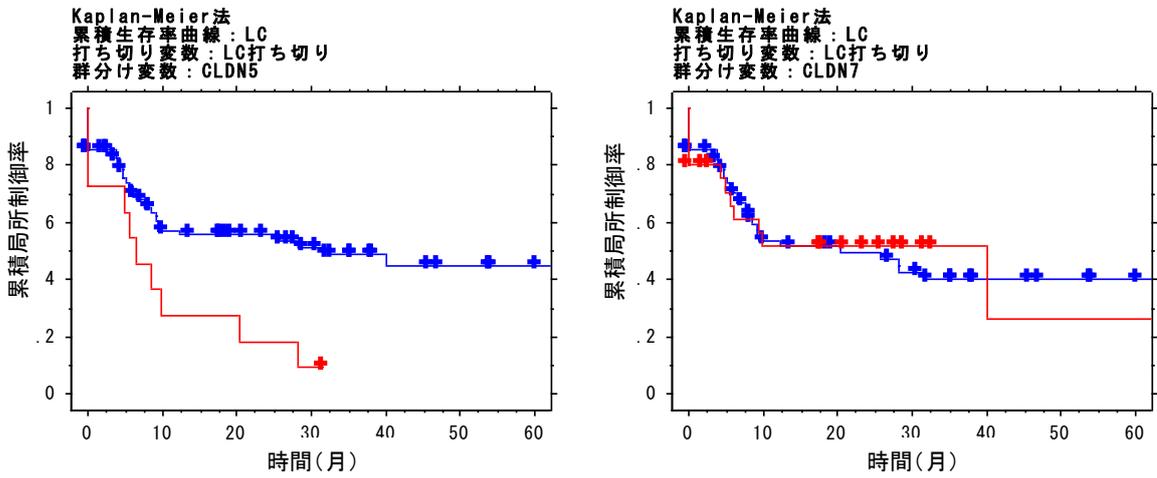
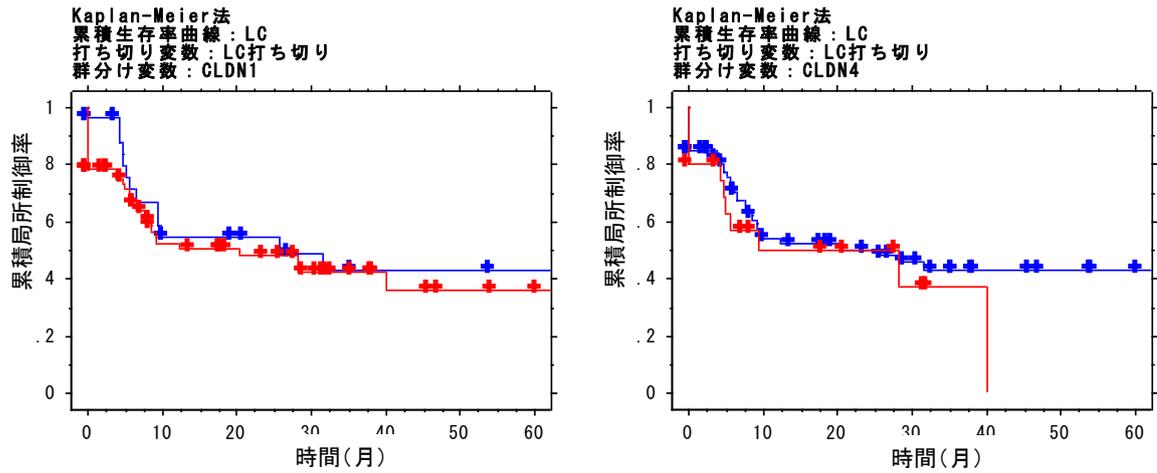
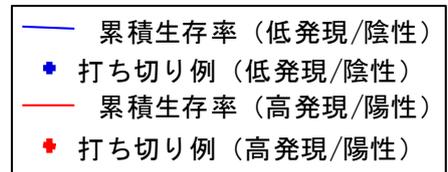


図 35. CLDN の発現と局所制御率の
 Kaplan・マイヤー曲線



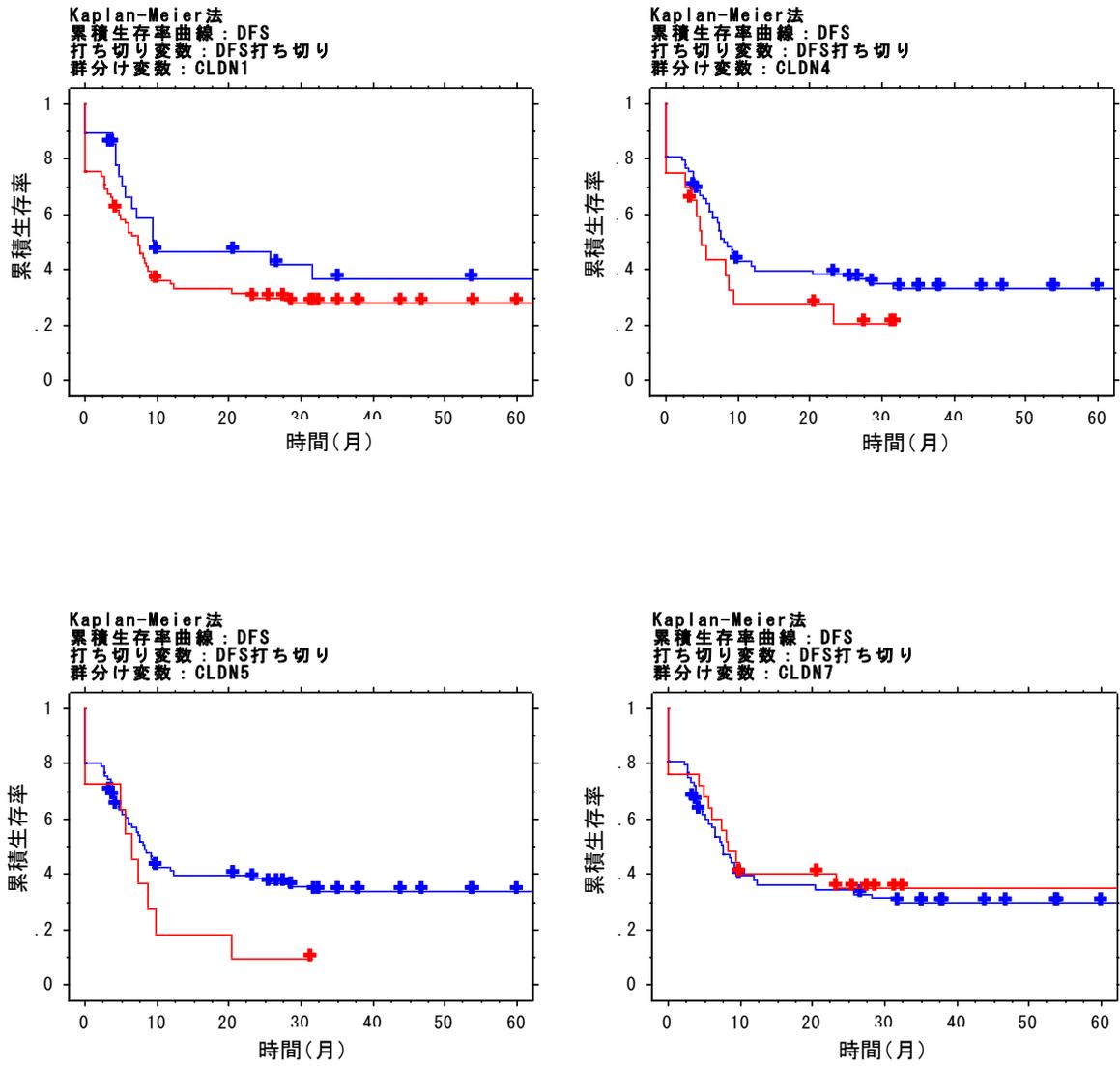


図 36. CLDN の発現と無病生存率の Kaplan・マイヤー曲線

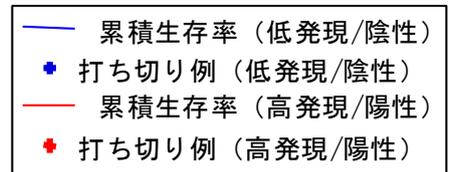


表 15. CLDN-5 の発現と背景因子

		Total	Claudin-5 expression		χ^2 p value
		(n=93)	Positive (n=11)	Negative (n=82)	
Claudin-1	Positive	70%	82%	68%	0.57
	Negative	30%	18%	32%	
Claudin-4	Positive	22%	55%	17%	0.01
	Negative	78%	45%	83%	
Claudin-5	Positive	12%	-	-	-
	Negative	88%	-	-	
Claudin-7	Positive	27%	55%	23%	0.07
	Negative	73%	45%	77%	
Age	<65	40%	36%	40%	0.94
	>=65	60%	64%	60%	
Sex	Male	90%	91%	90%	0.64
	Female	10%	9%	10%	
Location	Ce	8%	18%	6%	0.04
	Ut	16%	36%	13%	
	Mt	49%	45%	50%	
	Lt	27%	0%	30%	
TumorLength	=<5cm	42%	64%	39%	0.22
	>5cm	58%	36%	61%	
T-stage	1 or 2	35%	63%	32%	0.08
	3 or 4	65%	37%	68%	
Stage	I	18%	27%	17%	0.50
	II or III	49%	55%	49%	
	IV	32%	18%	34%	
	Not I (II - IV)	82%	73%	83%	0.68
	Not IV (I - III)	68%	82%	66%	0.47

Abbreviations: Ce = cervix, Ut = upper thoracic,
Mt = middle thoracic, Lt = lower thoracic.

総括的な帰無仮説：LC
 打ち切り変数：LC打ち切り
 モデル：比例ハザード

	カイ2乗	自由度	p値
Wald検定	13.082	5	.0226
スコア検定	13.527	5	.0189
尤度比検定	13.288	5	.0208

モデルの係数：LC
 打ち切り変数：LC打ち切り
 モデル：比例ハザード

	自由度	係数	標準誤差	係数／標準誤差	カイ2乗	p値	Exp (係数)
CLDN5 : N	1	-1.036	.399	-2.600	6.758	.0093	.355
notI : I	1	-1.236	.492	-2.511	6.304	.0120	.291
Location	3570	.9034	.
Ce	1	-.087	.620	-.141	.020	.8881	.916
Lt	1	-.344	.479	-.719	.517	.4720	.709
Mt	1	-.241	.422	-.571	.327	.5677	.786

信頼区間：LC
 打ち切り変数：LC打ち切り
 モデル：比例ハザード

	Exp (係数)	95%下側	95%上側
CLDN5 : N	.355	.162	.775
notI : I	.291	.111	.763
Location : Ce	.916	.272	3.092
Location : Lt	.709	.277	1.812
Location : Mt	.786	.343	1.798

図 37. 局所制御率についての CLDN5 の多変量解析

5. 考察

5.1 概要

本稿は、大きく2つの研究と1つの予備研究からなる。いずれも食道扁平上皮癌に対して根治的化学放射線療法を行った患者を対象とし、治療前の生検検体を用いた。各種バイオマーカーの抗体を使用して免疫染色を行い、臨床成績との関係を調査することにより、予後予測因子としての可能性を検討するものである。

まず予備研究において、10症例を対象に、16種類のバイオマーカーの発現を調査した。ここでは、①MIB-1高発現群で全生存率が良好、②HER-2およびERが陰性で局所制御率と無再発生存率が良好、③有意差はつかないが、HIF-1 α 陽性群で全生存率が良好な傾向、が示された。症例数が10症例と少なく結果の信頼性は十分でないが、この結果を参考に、次の研究へ進んだ。

研究1では、予備研究をふまえp53、MIB-1、HER-2、HIF-1 α の4種類について調査した。予備研究の標本を検鏡すると、ERは陽性と陰性の判定が比較的難しく、予後因子として免疫染色のみで判定するには不向きと考えられたため、除外した。ここでは、①p53陽性所見は全生存率・局所制御率・無再発生存率の予後良好因子、②HER-2陽性所見は全生存率・局所制御率・無再発生存率の予後不良因子、が示された。

続いて、研究2は、研究1と同じ症例を用い、癌の浸潤・転移機構に関わる因子として、クロロディンの調査を行った。食道癌は根治的化学放射線療法を施行し、一度CR (complete response) が得られた後にも再発する場合がしばしばあり、

癌細胞が潜んでいく機序を理解する一助として、研究 2 を行った。この研究では、単変量解析では CLDN-5 が局所制御率の予後不良因子であると考えられた。症例数は多くは無いが参考として、局所制御率に関して CLDN-5 の発現と原発巣占拠部位、T 因子について多変量解析を施行したところ、多変量解析では CLDN-5 の局所制御率への有意性は消失した。

5.2 食道癌の根治的化学放射線療法

今回の対象症例に施行した根治的化学放射線療法は、RTOG 85-01 での手法を踏襲している。RTOG 85-01 との相違点としては、プラチナ製剤として CDDP でなく NDP を使用している点がある。NDP は CDDP よりも骨髄抑制や嘔吐などの副作用の点で勝っており、しかも成績は悪化しない⁽⁶⁰⁾ため、NDP を採用した。今回対象とした 93 例の生存期間中央値は 18 ヶ月、2 年全生存率は 39%、2 年局所制御率は 50%、2 年無再発生存率は 35%であった。これは RTOG 94-05 (INT0123) 試験と比べて劣らない成績である (序文参照)。

5.3 予備研究と研究 1

5.3.1 p53 とアポトーシス・細胞周期

p53 はおそらく最も有名な癌抑制遺伝子の 1 つである⁽³⁸⁻⁴⁰⁾が、もともとは p53 遺伝子がコードするタンパク質の分子量 (約 53,000 Da) にちなんで名づけられた。p53 タンパク質 (特に G1 期から S 期への移行) を通して、細胞増殖の調節にかかわっている。DNA に損傷を受けた細胞が S 期へ入るのを妨げる、いわばチェック

ポイントの働きをしていると考えられている。p53 の代表的な転写標的として、細胞周期 G1 期から S 期への移行にとって重要なサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の 21k Da 阻害タンパク質である p21⁽⁴⁰⁾と、細胞増殖の阻害タンパク質である GADD45⁽⁶¹⁾を挙げることができる。DNA 傷害や低酸素、癌遺伝子活性化などによる細胞ストレスによって、p53 の細胞内での発現レベルが増加する。すなわち、増殖を抑制すべき時期に発現レベルが増加し、細胞を守っていると考えられる。

さらに p53 は、プログラム細胞死あるいはアポトーシスにも関与している。DNA 傷害を引き起こす放射線や種々の抗癌剤に反応して、p53 はいくつかの種類
の細胞でアポトーシスのプログラムを活性化する。変異 p53 がある細胞では、DNA 損傷を受けてもアポトーシスに陥らないために、多くの変異を蓄積することになり、直接に癌化を促す。現在、ほとんどの癌治療法は、放射線療法でも化学療法でも、細胞 DNA の傷害に基づいている。これらの治療により、細胞はアポトーシスのみならず壊死によっても死にいたる。細胞や腫瘍を放射線や抗癌剤で処理したあとに、よくアポトーシスの徴候がみられることから、これらの治療によりアポトーシスが誘導されるのであり、治療に対する抵抗性の原因の 1 つはアポトーシス機構の異常であるとみなされることが多かった⁽⁶²⁾。たとえば、内因性の変異型 p53 タンパク質をもつ大腸癌細胞に野生型 p53 遺伝子をトランスフェクションすると、5-FU、カンプトテシン、および放射線に対する感受性が増大するという報告がある^(63,64)。また、p53 が欠失すると、神経芽腫細胞が高度の多剤耐性になるという報告もある⁽⁶⁵⁾。近年では癌細胞のアポトーシスを誘導する治療方式が開発されつつある⁽⁶⁶⁾。抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 をターゲットに、Bcl-2 の働きを抑制する低分子化

合物などが開発されている。しかし、実際の癌治療の効果判定の基本的な尺度は、治療によって癌細胞の増殖力をいかに抑え込み、縮小できるかということであり、この増殖力抑制の効果は、コロニー形成アッセイで測定することができる。いくつかの研究によれば、この方法で調べた細胞の生存率の低下はアポトーシスの程度とはあまり合致しない⁽⁶⁷⁾。アポトーシスは、抗癌剤によって死をもたらす主要な機構ではなく、すでに自己増殖能を失った細胞を処理するための経路になっているかもしれないとも考えられている⁽³⁰⁾。アポトーシスと抗癌治療感受性の問題はまだ決着がつかっていない。

一方で、放射線治療または化学療法によってひきおこされる DNA 損傷は、細胞周期の進行に遅延をもたらす、いわゆる細胞周期チェックポイントが損なわれると、DNA 相同組み換え修復機構が不完全になる。そこで、チェックポイントで作用するタンパク質を阻害することにより、抗癌治療に対する感受性を上昇させる試みもなされている⁽⁶⁸⁾。

ここで今回の結果について検討したい。過去の報告では、p53 陽性群は放射線や化学療法への感受性が低く、予後も不良であるとされている⁽⁶⁹⁾が、下咽頭癌では p53 陽性群が予後良好との報告もあり⁽⁷⁰⁾、前述のように、アポトーシスと癌の関わりと同様、いまだ決着に至ってはいない。今回の研究では、p53 陽性群で予後良好であった。そもそも放射線治療による細胞死のほとんどは、放射線により DNA 損傷を受け、それを修復しきれずに数回分裂した後に細胞死をおこす、「分裂死」である。放射線による DNA 損傷は 1 本鎖損傷と 2 本鎖損傷があるが、1 本鎖損傷の場合は通常は速やかに修復され、2 本鎖損傷が事実上の主な作用機序である。しか

し、p53 に異常をきたしていると DNA 損傷の修復機能に障害がある状態となり、この修復がおこりづらくなっていると考えられる。この仮定で考えれば、p53 の異常発現例というのは、化学放射線治療においてはむしろ放射線の治療効果がよく出る症例であり、予後良好となったのではないかと考えられる。今後、放射線治療と p53 の関わりについては、血清マーカーと治療効果の関係や、再発腫瘍での発現などの研究も必要と考える。

今回の研究においては、p53 の発現状況を免疫染色で検討した。正常細胞では正常の p53 タンパクは非常に半減期が短く、免疫染色で陽性となるような量は存在しない。しかし、p53 の変異による異常 p53 タンパクは核内に蓄積する。一般には、p53 の陽性所見は、この異常 p53 タンパクの発現を見ていると考えられている。しかし、腫瘍における免疫染色での p53 の発現と、変異型 p53 の検出は、過去にさまざまな報告があり^(44,71)、免疫染色の発現と変異型 p53 の検出が必ずしも一致しないことも報告されており、注意が必要である。

5.3.2 細胞周期関連タンパク質-p21、p16、Cyclin-D1

細胞周期に関わる遺伝子/タンパク質は、p53 だけではない。p21 タンパク質および p16 タンパク質も細胞周期調節、特に G1 期停止に寄与する。p21 タンパク質と p16 タンパク質は、老化した線維芽細胞で増加し、G1 期停止をおこす⁽⁷²⁾ (図 38)。細胞周期停止は、治療薬による場合も含め、DNA 損傷への反応としてもおこる。この過程は S 期に損傷した DNA の複製を防げる。細胞周期を回転させる役割の Cyclin-D1 などと対比して、サイクリンをアクセル、p21などをブレーキ

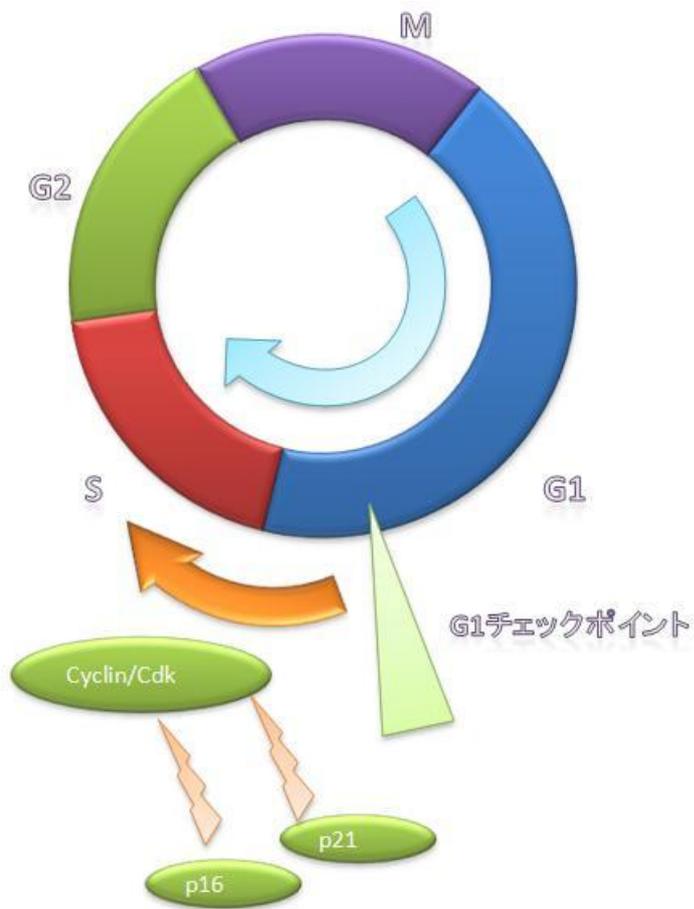


図 38. 細胞周期と G1 チェックポイント

と表現する場合もある。サイクリンは CDK-サイクリン複合体を成して細胞周期を回転させるほうに働くが、p21 はこのサイクリン E-CDK2 複合体に結合して作用を阻害し、同じように作用する p27、p57 とともに、Cip/Kip ファミリーと呼ばれる。また、p16 はサイクリン D と拮抗することによって、サイクリン D-CDK4、6 の作成を阻害する。p16 は同様に作用する p15、p18、p19 とともに Ink4 ファミリーと呼ばれる。Ink4 ファミリーと Cip/Kip ファミリーをあわせて、CDK 阻害因子 (CDK inhibitor: CKI) と呼ばれる。

癌細胞においてはこの細胞周期調節が脱制御している状態にある。その脱制御は、Cyclin-D1 の増幅や、p21 の欠失、p16 の欠失やメチル化によって生じる。ヒトの癌の予後予測における p21 の価値ははっきりしていない。たとえば、少数の小規模研究で、乳癌において p21 の低値が予後不良と相関することが示されているが、他の研究では p21 の高値が予後不良と相関することが示されている⁽⁷³⁾。一方、p21 タンパク質の減少は大腸癌の 33%に見られるとされており⁽³⁰⁾、大腸癌においては p21 の減少が独立予後因子であることが多変量解析によって示されている⁽⁷⁴⁾。

Cyclin-D1 の異常発現は、リンパ腫や頭頸部癌、肺や食道の扁平上皮癌、乳癌や膀胱癌などで認められる。Cyclin-D1 は組織培養やマウスにおいて発癌性を示し、乳癌の 45%でその過剰発現を認められているが、乳癌の予後と Cyclin-D1 の増加との間に確固とした相関はない⁽⁷⁵⁾。Cyclin-D1 の過剰発現はエストロゲンレセプター (ER) が陽性のときに見られ、かえって予後良好とする研究が多い。

このような細胞周期 G1 チェックポイントで作用する分子は、今回は予備研究の 10 症例のみで検討した。化学放射線療法においては、化学療法も放射線療法も

どちらも DNA を損傷する方向に働く。さらに X 線外照射においては、放射線効果としての細胞死は分裂死が主なものであり、細胞周期の脱制御状況と深く関わっていると考えられる。しかし、今回の検討では、食道癌の根治化学放射線療法において、これらの分子と予後との間には関係を見出せなかった。

5. 3. 3 Bcl-2 とアポトーシス

Bcl-2 は、アポトーシス抑制活性を持つ癌遺伝子である。Bcl-2 の機能は、当初は他の癌遺伝子と同じように、細胞増殖に関与していると予想されていたが、1988 年、Vaux らにより、IL-3 依存性細胞の IL-3 除去時の生存を Bcl-2 が保障するということが示された。続いて、1989 年には、辻本により、Bcl-2 がストレスや抗癌剤によるアポトーシスを抑制することが証明され、Bcl-2 が抗アポトーシス活性を持つことが明らかとなった。このように、Bcl-2 はアポトーシス抑制活性を持つ最初の例であり、また配列が明らかになった最初のアポトーシス関連遺伝子である。その後、Bcl-2 はかなり広範なアポトーシスを効率よく抑制することが明らかとなり、アポトーシス制御の最も重要な因子の一つと考えられている。また、Bcl-2 のアポトーシス抑制活性が明らかになって以来、多くのファミリー遺伝子が同定されており、その相互作用ネットワークにより、アポトーシス実行の制御を行なっている。Bcl-2 ファミリータンパク質の主な作用部位はミトコンドリア膜であり、この膜透過性を制御することにより、細胞の生死を決定している。

また、Bcl-2 は癌遺伝子の一つと考えられており、ゲノムの突然変異率を上昇させることにより癌化に寄与している可能性が報告されている。

今回の 10 症例での検討では、Bcl-2 は全体に染色性が低かった。ヒトの癌ではしばしば増加するといわれているが、予後との相関はわかっていない。

5. 3. 4 HER-2 と分子標的薬

ヒト上皮増殖因子レセプター2 (human epidermal growth factor receptor 2: HER-2) は、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) ファミリーの 1 つで、チロシンキナーゼ受容体である。正常細胞において細胞の増殖、分化などの調節に関与しているが、*HER-2* 遺伝子の増幅がおこると、細胞の増殖・分化の制御ができなくなり、細胞は悪性化する。すなわち *HER-2* 遺伝子は癌遺伝子でもあり、頭頸部扁平上皮癌、神経膠腫、乳癌、肺癌、大腸直腸癌、前立腺癌といった多くの種類の癌で遺伝子増幅がみられる^(76, 77)。およそ 25%の乳癌で過剰発現を認める。過剰発現は、疾患の悪性度が高いことと、予後が悪いことに関係している。しかし、抗 *HER-2* ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ (ハーセプチン®) を *HER-2* タンパク質過剰発現の転移性乳癌の女性に化学療法と併用して使用することによって、生存が延長した⁽⁷⁸⁾。さらに、国際共同第Ⅲ相臨床試験 ToGA 試験 (B018255) において、*HER-2* 陽性進行・再発胃癌で、トラスツズマブの併用により、全生存期間の有意な延長が示され⁽⁷⁹⁾、2010 年 1 月に EU、10 月に米国において「*HER-2* 陽性転移性胃癌または胃食道接合部癌」へのトラスツズマブの適応が承認された。2011 年 3 月には、本邦でもトラスツズマブの「*HER-2* 過剰発現が確認された治療切除不能な進行・再発の胃癌または胃食道接合部癌」への追加適応が承認された。

食道扁平上皮癌における HER-2 発現についても、いくつかの研究が報告されている。三村らは食道扁平上皮癌患者の 29.4%で HER-2 が発現していたとし、*in vitro* で HER-2 強発現食道扁平上皮癌細胞株に herceptin と lapatinib を投与し、増殖抑制とアポトーシスの増加を確認した^(80,81)。また、松本らは食道扁平上皮癌の化学放射線療法の感受性予測因子として、HER-2 発現は治療抵抗性であると述べている⁽⁸²⁾。これらの報告は今回の研究結果と矛盾しない。今回の研究では遺伝子増幅ではなく、免疫染色で評価を行っても同様の結果を得られた。食道癌においても、HER-2 高発現食道扁平上皮癌については、抗 HER-2 ヒト化モノクローナル抗体の適用も検討されるべきと考える。また、血清 HER-2 は組織学的 HER-2 陽性と相関しているとされており、今後は血清 HER-2 と臨床成績との関係や、経時的変化、上昇と再発の関係など、実地臨床に即した研究が求められる。

5.3.5 癌の浸潤・転移の機構-VEGF、E-cadherin、MMP

癌の転移は、①癌細胞の癌組織からの遊離、②周囲組織への浸潤、③血管内へ侵入、④血管内の移動と転移臓器血管内での停止、⑤血管外への遊出、⑥転移臓器への着床、⑦転移巣の形成など、転移カスケードと呼ばれる多数のステップを経て成立する⁽³⁵⁾。これらのステップが成立するには、癌細胞と周囲の細胞、細胞外マトリックスとの相互作用が重要な役割を担っている。

腫瘍血管新生は腫瘍の増殖にとって不可欠であると同時に、癌の転移に際しても重要である。腫瘍血管では周皮細胞と血管との接着がルーズであるため、原発巣から離脱した癌細胞が侵入しやすく、転移形成の経路となりうる。腫瘍血管新生の

もっとも重要な促進因子として VEGF が知られている。

細胞接着因子の機能低下は癌細胞の原発巣からの離脱を引き起こすが、その接着因子として E-cadherin が重要である。E-cadherin は α 、 β -catenin と複合体を形成して細胞間接着を保持している。これらの遺伝子に変異が生じると、細胞接着機能が低下し、癌細胞からの離脱が生じる⁽⁸³⁾。また、 β -catenin は転写促進因子として cyclin-D1 の発現を高める⁽⁸⁴⁾。食道癌については、食道扁平上皮癌 416 例の検討で、E-cadherin 低発現と cyclin-D1 高発現はそれぞれ独立予後規定因子との報告がある⁽⁴⁹⁾。

癌細胞は周囲に存在するコラーゲンやラミニンなどにより構成される細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) を分解し、ECM への接着を足場に遊走する。ECM を分解する酵素として MMP が重要な役割を果たしている⁽⁸⁵⁾。MMP は金属を活性中心に持つタンパク分解酵素で、これまでに 20 種類以上が同定されているが、その中でも特に MMP-7 が重要な役割を果たしている。MMP-7 は分泌された後、トリプシンによって活性化される。MMP-7 およびトリプシンは食道癌浸潤先進部の癌細胞に強く発現し、それがともに発現している症例では、癌の浸潤・転移が有意に多く、予後不良である^(53, 86)。

これらの浸潤・転移カスケードにかかわる因子について、今回の研究では臨床成績とタンパク質発現の間に有意な関係を認めることができなかった。理由としては、内視鏡した生検検体を用いており、真の癌の浸潤部が採取できていないことが考えられる。

5.3.6 癌の浸潤・転移と上皮間葉転換

近年、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が癌の浸潤・転移、とくに脈管内への侵入に関連することが示唆されている⁽⁸⁷⁾。EMT とは、上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得する現象である。本来は発生・器官形成のさまざまな局面で観察されているが、癌細胞の悪性化や浸潤・転移の過程においても重要な役割を担う⁽⁸⁸⁾。上皮細胞が癌化する過程において、細胞極性が失われて細胞間接着が減弱し、細胞の運動性が亢進して周辺組織への浸潤能が高まる。TGF- β は多彩な生理活性をもつが、EMT を制御する最も重要な因子である。チロシンキナーゼ型受容体や Ras シグナルと協調しつつ、転写抑制因子の発現を誘導する。これらの因子は、上皮細胞の性質を規定する E-cadherinなどを抑制する。TGF- β はさらに MMP (matrix metalloproteinase) や細胞外マトリックスの発現制御にかかわり、浸潤・転移のあらゆる段階で多面的に動く。癌細胞における EMT は、低酸素応答、抗癌剤耐性などとの関連も指摘されている。

5.3.7 癌と低酸素-HIF-1 α

低酸素は癌の分化に大きな影響をおよぼし、アポトーシス感受性や治療耐性に深くかかわっている。また、低酸素は血管新生の強力な誘導因子であり、同時に炎症・免疫系細胞の活性化にも関与する。組織マクロファージが低酸素に反応して、血管新生因子やサイトカインを産生することはよく知られている。

末梢組織において、1本の毛細血管が正常細胞を維持するために必要十分な酸素を、拡散によって供給できる距離は約 110 μm といわれる。これを反映するよう

に、たとえば正常の食道粘膜では乳頭内毛細管ループが約 100 μ m 間隔で構築されている。腫瘍の増殖、代謝亢進により酸素の需要と供給のバランスが崩れたときに低酸素環境は生じるが、そこに新たに誘導される腫瘍血管は、形態学的にも機能的にも正常血管とは異なるもので、いびつな低酸素環境はあらゆる浸潤性固形癌において多かれ少なかれ存在する。このように、血管新生や免疫応答におよぼす低酸素の影響は、癌の生態を理解するうえできわめて重要である。

放射線感受性と低酸素については序論で触れたが、今回の研究では根治的化学放射線療法を施行した食道扁平上皮癌の予後と低酸素マーカーHIF-1 α の発現とは、明らかな関係を認めなかった。この理由としてはいくつかの事柄が考えられる。ひとつは、放射線治療単独ではなく、化学放射線療法同時併用であったため、放射線抵抗性がマスクされたという可能性がある。また、生検検体であり、組織切片が微小であるため、腫瘍内部は低酸素環境であったとしても、露出して採取される病変は比較的酸素に曝されており、このためにそもそも HIF-1 α の発現が腫瘍そのものの低酸素環境を厳密に表していない可能性がある。

5.4 研究2 クローディンの研究

クローディン (Claudin: CLDN) は密着結合 (tight junction: TJ) の主要な接着分子で、これまでに 24 種類のサブタイプが見つかっており、これらがファミリーを形成している。癌の種類によって CLDN ファミリーの発現パターンは大きく異なることが報告されている。たとえば、CLDN-4 の発現は膵臓癌や前立腺癌で増加しているが、肝細胞癌や腎臓癌では減少している。CLDN の発現は細胞の癌化や癌

の浸潤・転移を抑制する方向に作用するものと想定されてきたが、CLDN-1 や CLDN-4 の発現はむしろ癌の浸潤・転移の促進に働く可能性があるとの報告もでてきている^(89,90)。逆に、CLDN-1 は癌の浸潤・転移の抑制因子となるという研究結果もあり、癌の浸潤・転移に関する CLDN の役割およびその分子機構の詳細については、今後の更なる検討が必要である。

今回の研究 2 では、CLDN-1、-4、-5、-7 について検討した。浸潤・転移に関わる分子と考えての検討であったが、CLDN-5 が局所制御率との関わりを認めたのみであった。CLDN-5 は血管内皮細胞に特異的に発現するとされ、血管内皮のバリア機能を担っている。今回、CLDN-5 陽性例で単変量解析では有意に局所制御不良であった。通常血管内皮細胞に発現している CLDN-5 が腫瘍細胞に出現しているという異常発現の状態であり、上皮細胞から EMT をおこしている状態なのかもしれない。

5.5 当研究の限界

今回、癌の微小環境に関わる分子を幅広く調査し、食道扁平上皮癌の根治的化学放射線療法との関わりについて検討した。この研究の限界としては、病期が I 期から IV 期まですべて含まれてしまうこと、後ろ向き試験であることがある。また、単一施設での治療経験であり、このために治療条件は比較的均一と考えられるが、患者背景などに多少の偏りがある可能性も否定できない。

また、生検検体を用いていることも弱点のひとつである。当研究は、手術症例ではなく、根治的化学放射線療法を施行した症例を対象としている。このため、手

術検体が入手できず、生検検体で評価せざるを得ない。しかし、生検検体はあくまで腫瘍の一部であることは当然であり、腫瘍全体の性質をどの程度反映できているかという点において、疑問が残る。とりわけ、腫瘍の浸潤部の中心は生検では届かないような深部にあると推測され、表面の生検検体で腫瘍の性質を評価することはある程度リスクを孕んでいるといえる。しかしながら、最終的な臨床応用を目標とするのであれば、治療前の生検検体で評価し、予後予測を行うことこそが重要であろうことは容易に推測できる。今回のバイオマーカーの発現状況の評価においては、専門の病理医の指導のもと、腫瘍の表層の性質を見るのではなく、腫瘍浸潤部の性質をより強く評価するなど、限られた生検検体の中で、より正確に腫瘍の性質を把握できるように努めている。

生検検体を用いたことの危険性は他にも存在する。p53 および MIB-1 の評価については、IRS システムを用いた判定量的評価を行っており、陽性細胞の広がりも評価に含んでいる。しかし HER-2、HIF-1 α 、CLDN については、陽性染色を示す癌細胞クラスターがひとつでもあれば陽性と判定した。これはつまり、生検検体を多数採取し、検査すればするほど陽性率が高まりうるということである。事実、過去の報告でも、それぞれの分子生物学的バイオマーカーの陽性率は報告によってまちまちであり、染色条件や抗体などの条件のほかに、生検個数も陽性率に寄与している可能性が高い。今回は後ろ向き研究であり、恣意的に多くの生検を施行したような事例には遭遇し得ないが、これらのバイオマーカーを予後因子として実際に臨床応用するとなれば、病理学的診断の正確性や恒常性を整えることが必須となるであろう。

免疫染色で評価している点は、この研究の限界のひとつと言えるであろうか。免疫組織化学、特に酵素抗体法は病理診断や形態学的研究に広く用いられている。免疫組織化学は生体内の物質の存在と分布を、生物試薬を用いて高感度に、かつ特異性高く検出する方法である。その特徴として 1)手技的に易しい、2)応用範囲が広いなどが挙げられる。免疫染色の結果が直接的に細胞異常を明示しているわけではない。とくに p53 については、前項で述べたように、免疫染色と遺伝子異常の双方を検討した報告が多く存在し、議論されている。しかし、生体内において機能するタンパクの証明にはやはり免疫染色が重要であり、精度を保つよう十分に配慮した検査法のもと、慎重な解釈とともに臨床に用いられるべきと考えられる。

5.6 今後の展望

今後の発展として望まれることとしては、病期をさらに限局させた調査や、血清マーカー（たとえば血清 HER-2 や血清 p53 など）で再発予測ができるか否かの検討、などが考えられる。

再発腫瘍でのタンパク質発現の状況の検討は、治療に伴う腫瘍の経時的変化を追うことができ、また再発しやすい腫瘍を判別するにあたり、重要な課題である。例えば HIF-1 については、放射線治療を生き延びた癌細胞は HIF-1 活性を獲得して腫瘍内血管に向かって移動するという報告もある⁽⁹¹⁾。腫瘍におけるタンパク発現を経時的に追うことによって、放射線治療や化学放射線治療に抵抗性を示す腫瘍の特性や、局在を明らかにできる可能性がある。

治療法の選択という観点からは、手術症例でのバイオマーカーの報告も十分に検討されるべきである。例えば、手術例を対象とした過去の報告では、p53 高発現症例は予後不良であるとされており、今回の研究では p53 高発現症例は化学放射線療法において予後良好因子であった。すなわち、p53 高発現症例は手術よりも化学放射線療法に適している可能性がある。無論、今回の研究結果と相反する過去の報告もあり、臨床応用するには十分な検討が不可欠ではあるが、このように、手術例の検討と化学放射線療法での検討を比較していくことにより、適切な治療法選択の一助となるであろう。抗 VEGF 抗体をはじめとした分子標的薬も、最近では *in vitro* で食道扁平上皮癌に有効性を示したとの報告もあり、興味深い。今回の研究結果をふまえれば、抗 HER-2 抗体による分子標的治療も効果を示すことが期待できる。各種臓器の腺癌を主体に個別化医療が進む今日、本邦に多い食道扁平上皮癌についても、詳しい調査を重ねることで、個別化医療・予後改善に一歩ずつ近づいていくことができると考える。

6. 結論

食道癌は難治癌のひとつであり、とくに本邦では扁平上皮癌の占める割合が大きい。食道扁平上皮癌に対して根治的化学放射線療法を行った患者を対象とし、治療前の生検検体を用い、各種バイオマーカーの抗体を使用して免疫染色を行った。免疫染色での各種バイオマーカーの発現状況と臨床成績との関係を調査することにより、予後予測因子としての可能性を検討した。

p53、HER-2 は食道扁平上皮癌の予後（全生存率・局所制御率・無病再発率）に関係があることが分かった。p53 陽性所見は予後良好因子、HER-2 陽性所見は予後不良因子であった。また、密着結合（タイトジャンクション）を形成する CLDN-5 陽性所見が、所制御不良因子である可能性も示唆された。

7. 附1「HIF-1 α の免疫染色の条件検討」

免疫染色において、染色の条件設定は大変重要である。染色する抗体によって適切な条件を設定する必要がある、条件が最適でない場合、誤った結果を導いてしまうこともある。染色状況は検体状況、抗体の種類、希釈濃度、賦活処理、1次抗体反応時間、手技などによって異なる。今回研究1で使用した抗体のうち、HIF-1 α については、最適の染色条件が確定していない。そこで、今回の本研究に先立ち、HIF-1 α の染色条件の検討を行った。

7.1 条件検討①

BD Biosciences 社（アメリカ合衆国、カルフォルニア）の HIF-1 α 抗体を使用した。BD Biosciences 社の HIF-1 α 抗体を使用した過去の論文を参考に⁽⁹²⁾、条件検討を行った。正常腎細胞と腎細胞癌の roll を陽性コントロールにおいた。まず、5種類の染色条件を検討した（表 16）。その結果、染色条件 No.4 と No.5 では全く染色されなかったが、染色条件 No.1、No.2、No.3 では核の良好な染まりを認めた（図 39）。しかし、一部ではバックグラウンドの染色も目立った。

7.2 条件検討②

条件検討①を踏まえ、抗原の賦活化のための前処置で用いるクエン酸バッファーを pH 9.0 に替え、内因性ペルオキシダーゼによるバックグラウンドの発色を抑える目的で、条件検討を行った。この検討での条件を表 17 に示す。

表 16. 条件検討①における染色条件

	Pretreatment	Blocking	Titer	Incubation	Note
1	Heating (120°C 15min)	Citrate buffer (pH 6.0)	S-block	x2000 room temperature, overnight	manually
2	Heating (120°C 15min)	Citrate buffer (pH 6.0)	S-block	x1000 room temperature, overnight	manually
3	Heating (120°C 15min)	Citrate buffer (pH 6.0)	S-block	x500 room temperature, overnight	manually
4	Microwave (120°C 60min)	1mM EDTA	AB-block (pH 8.0)	room temperature, 120min	VENTANA
5	Microwave (120°C 60min)	1mM EDTA	AB-block (pH 8.0)	room temperature, 120min	VENTANA

条件検討①

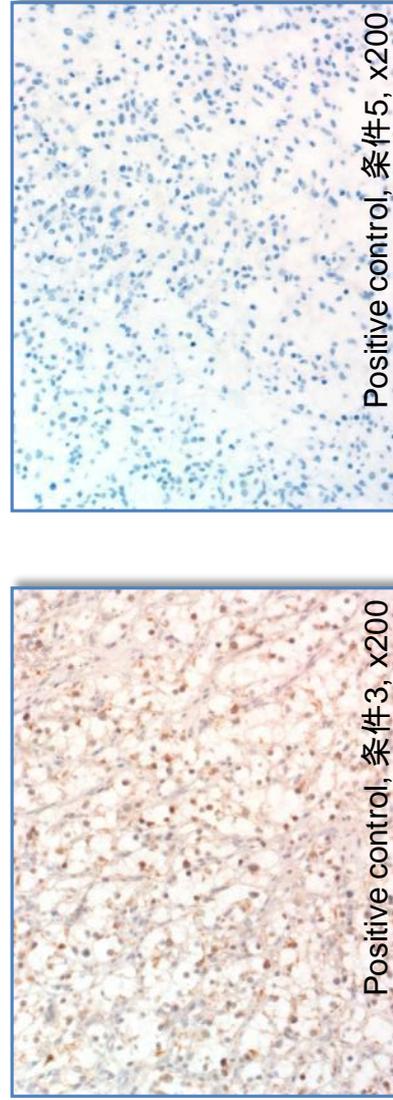


図 39 条件検討①の染色結果

陽性コントロールが、条件 4、5 ではまったく染まらなかった。

表 17. 条件検討②における染色条件

条件検討②		Pretreatment	Blocking	Titer	Incubation	Note
6	Heating (120°C 15min)	Citrate buffer (pH 9.0)	S-block	x1000	room temperature, overnight	manually
7	Heating (120°C 15min)	Citrate buffer (pH 9.0)	S-block	x500	room temperature, overnight	manually

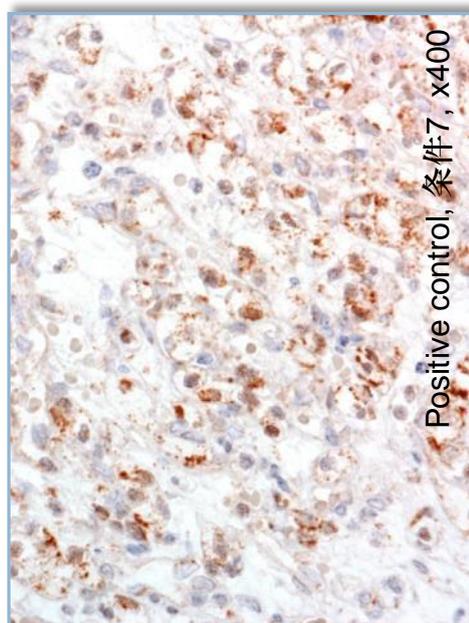


図 40. 条件検討②の染色結果

陽性コントロールでの核への染色は良好だが、組織が崩れている。

この結果、核の染まりは認めるものの、pHが高すぎたために組織が壊れてしまった（図 40）。一次抗体の希釈濃度は、1000 倍が適切と考えられた。

7.3 条件検討③

条件検討①および②を経て、染色条件はオートクレーブ 120 度 15 分、クエン酸バッファー pH 6.0、一次抗体希釈倍率 1000 倍、インキュベーション時間室温一晩、ジアミノベンジジン（DAB）反応時間 10 分で（表 16 の条件 2）、研究 1 で用いる 93 例の染色を行った。

その結果、組織以外のバックグラウンドが高く、大部分は判定に問題ないものの、一部で判定困難な症例が出てしまった（図 41）。

7.4 条件検討④

条件検討③の結果を踏まえ、染色の各行程で洗浄に用いる PBS（Phosphate buffered saline）を、界面活性剤加 PBS（phosphate buffered saline with tween 20: PBST）に変更し、高い洗浄力でコンタミネーションを予防する方針とした。また、染色を 93 症例同時に施行したために、手技中の時間差や乾燥が生じてしまい、バックグラウンドの発色を生じている可能性があると考えられた。このため、93 症例を約半分ずつにわけて染色し、これらを防止した。さらに、DAB の反応時間を 10 分から 8 分に短縮した。

この結果、バックグラウンドが抑えられ、陰性部分と陽性部分の判別がしやすい、よい状態の染色結果を得られた（図 42）。

7.5 条件検討まとめ

以上の条件検討より、染色条件はオートクレーブ 120 度 15 分、クエン酸バッファー pH 6.0、一次抗体希釈倍率 1000 倍、インキュベーション時間室温一晩、DAB 反応時間 8 分で、各種行程に PBS でなく PBST を使用するのが最適と考えられた。

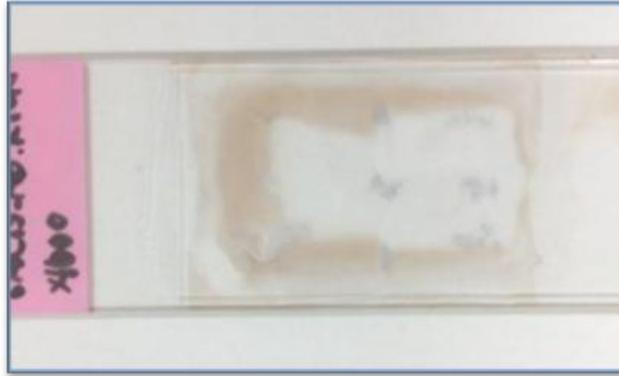


図 42. 乾燥などによりバックグラウンドが強く発色してしまい、判定困難になったスライド

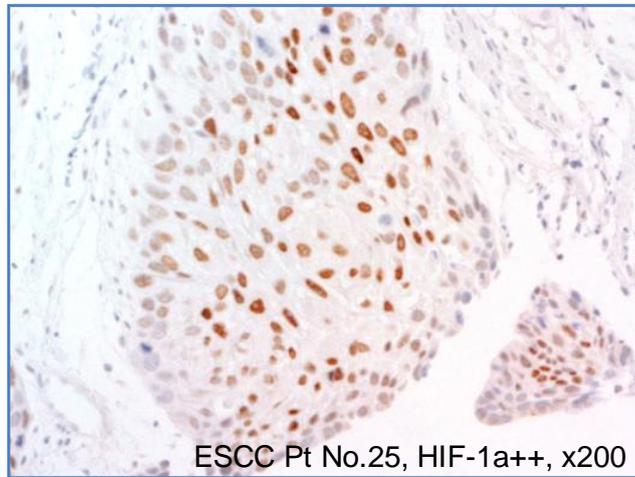


図 41. 最適と考えられた条件での染色

8. 附2「各分子生物学的マーカーの発現の相関とサブグループ解析」

研究1および研究2では、同一の93例の食道扁平上皮癌の治療前生検検体を対象とし、免疫染色を施行することによって、8種類の分子生物学的マーカー(p53、MIB-1、HER-2、HIF-1 α 、CLDN-1、CLDN-4、CLDN-5、CLDN-7)の発現状況を調べ、臨床成績との関係について検討した。ここで、研究1ではp53およびHER-2が、研究2ではCLDN-5が臨床成績との関わりがあることが明らかになった。そして、p53、HER-2、CLDN-5以外のバイオマーカー、すなわちMIB-1、HIF-1 α 、CLDN-1、CLDN-4、CLDN-7は、今回の研究では、食道扁平上皮癌の化学放射線療法症例において、臨床成績との有意な相関を認めなかった。

しかしながら、既存の報告などを参照すれば、こういったバイオマーカーは単独では予後因子とはならずとも、複数のバイオマーカーの条件付け(例えば、蛋白Aが陽性かつ蛋白Bで予後不良など)によって臨床成績との関わりを導いている報告も少なくなく、今回の研究においても、同様のサブグループ解析は必要であると考えられる。

8.1 方法

研究1および研究2で検討した8種類の分子生物学的マーカー(p53、MIB-1、HER-2、HIF-1 α 、CLDN-1、CLDN-4、CLDN-5、CLDN-7)から任意の2種類を選択し(28通りの組み合わせ)、免疫染色での発現状況についてそれぞれ検討した。具体的には、2種類ずつの組み合わせについての陽性/陰性の発現の比率を求め、 χ^2

検定で有意性の検定を行った。さらにその 28 通りの組み合わせごとに全生存率におけるサブグループ解析を行なった。全生存率での解析は、カプラン・マイヤー法により評価し、群間検定にはログランク検定を用いた。

8.2 結果

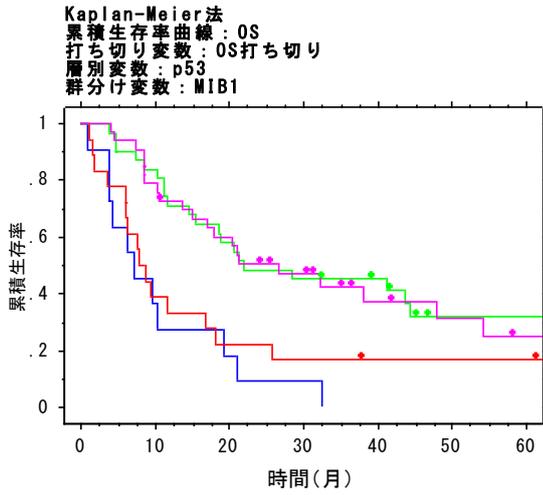
任意の 2 種類のバイオマーカーの組み合わせ (28 通り) の発現状況と、 χ^2 検定で求めた p 値を表 18 に示す。HER-2 と CLDN-5 ($p = 0.006$)、CLDN-4 と CLDN-5 ($p = 0.01$)、CLDN-4 と CLDN-5 ($p = 0.001$) で発現に有意な相関を認めた。それ以外の組み合わせには、発現に有意な相関を認めなかった。

さらに、組み合わせごとの生存解析 (図 43) では、p53 と HER-2 の組み合わせにおいて“p53 陽性かつ HER-2 陰性”で、その他 3 つのパターンよりも有意に予後良好であった ($p = 0.006$)。それ以外の組合せでは有意差は認めなかった。

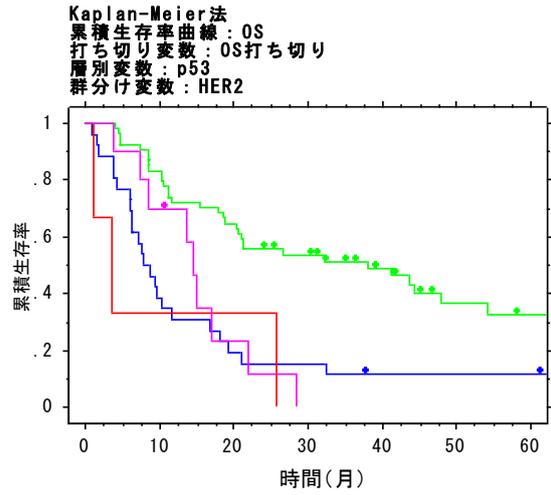
8.3 考察

免疫染色でのバイオマーカーの発現状況の相関を検討すると、HER-2 と CLDN-5 に有意な相関を認めた ($p = 0.006$)。HER-2 は研究 1 で、CLDN-5 は研究 2 で、いずれも予後との相関が示唆されたバイオマーカーである。HER-2 と CLDN-5 自体が相関しているために、いずれも予後因子となった可能性がある。HER-2 および CLDN-5 が相関している分子学的機序は不明であり、過去の報告でも、HER-2 と CLDN-5 を同一症例で解析した報告はない (2013 年 2 月現在)。今後、これらのバイオマーカーの関わりや機序について検討されるべきと考えられる。

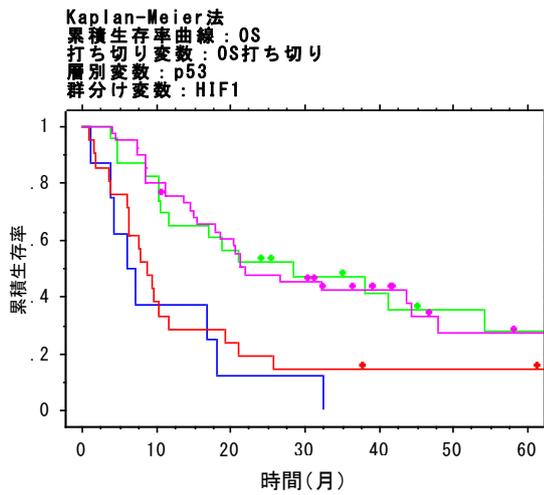
一方、生存解析においては、すでに単独で予後との相関が認められている p53 陽性かつ HER-2 陰性で有意な相関を認めたのみであった。今回のサブグループ解析によって、研究 1 および研究 2 では有意差がでなかったが組み合わせによって予後因子となりうるような組み合わせは認められなかった。



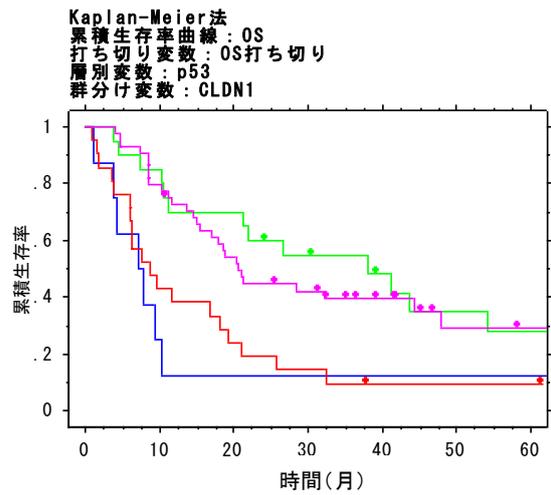
$p = 0.67$	MIB-1		
	(+)	(-)	
p53	(+)	31% (+/-10%)	32% (+/-9%)
	(-)	17% (+/-9%)	0%



$p = 0.006$	HER-2		
	(+)	(-)	
p53	(+)	0%	36% (+/-8%)
	(-)	0%	12% (+/-6%)



$p = 0.53$	HIF-1		
	(+)	(-)	
p53	(+)	28% (+/-9%)	35% (+/-11%)
	(-)	14% (+/-8%)	0%

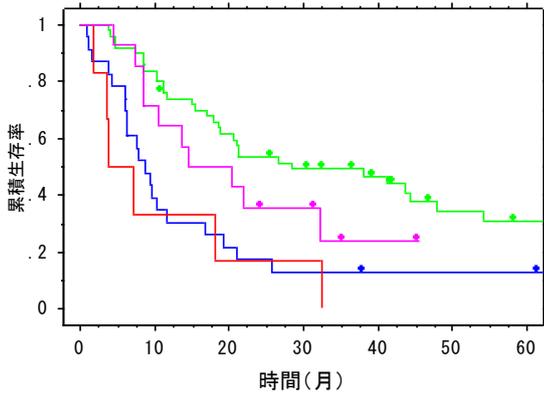


$p = 0.90$	CLDN1		
	(+)	(-)	
p53	(+)	29% (+/-8%)	35% (+/-12%)
	(-)	10% (+/-6%)	13% (+/-12%)

- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- ◆ 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- ◆ 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- ◆ 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陽性)
- ◆ 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陽性)

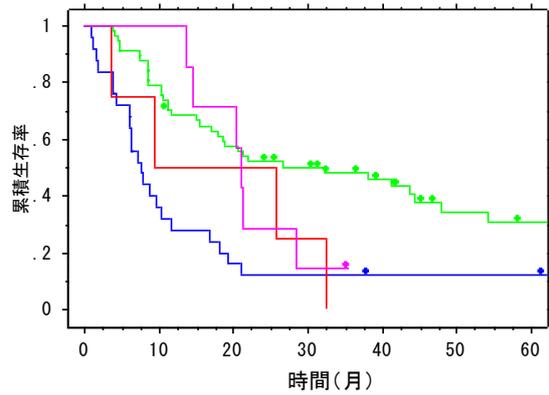
図 43. 各バイオマーカーの発現状況の組み合わせごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線
 図下の表にログランク検定による p 値と、4 年生存率を示す。

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線: OS
 打ち切り変数: OS打ち切り
 層別変数: p53
 群分け変数: CLDN4



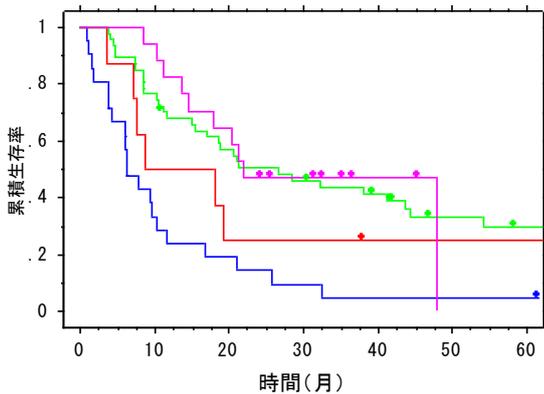
$\rho = 0.14$		CLDN4	
		(+)	(-)
p53	(+)	24% (+/-13%)	34% (+/-8%)
	(-)	0%	13% (+/-7%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線: OS
 打ち切り変数: OS打ち切り
 層別変数: p53
 群分け変数: CLDN5



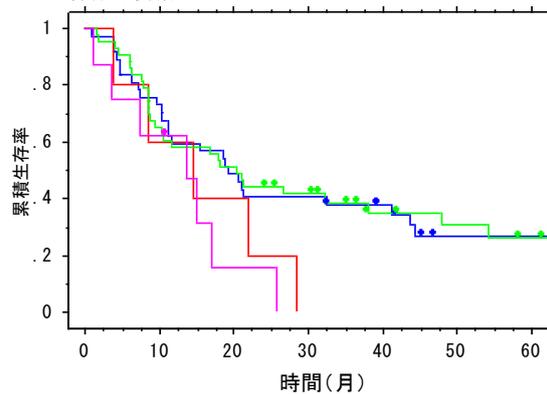
$\rho = 0.75$		CLDN5	
		(+)	(-)
p53	(+)	14% (+/-13%)	34% (+/-7%)
	(-)	0%	12% (+/-7%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線: OS
 打ち切り変数: OS打ち切り
 層別変数: p53
 群分け変数: CLDN7



$\rho = 0.29$		CLDN7	
		(+)	(-)
p53	(+)	0%	33% (+/-7%)
	(-)	25% (+/-15%)	5% (+/-5%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線: OS
 打ち切り変数: OS打ち切り
 層別変数: MIB1
 群分け変数: HER2



$\rho = 0.20$		HER-2	
		(+)	(-)
MIB-1	(+)	0%	31% (+/-8%)
	(-)	0%	27% (+/-8%)

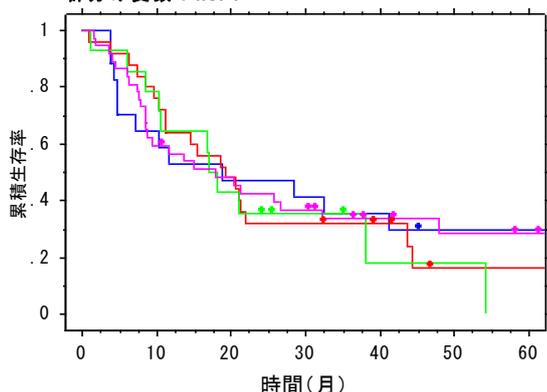
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- ◆ 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- ◆ 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- ◆ 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陽性)
- ◆ 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陽性)

図 43. (続き)

各バイオマーカーの発現状況の組み合わせごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線

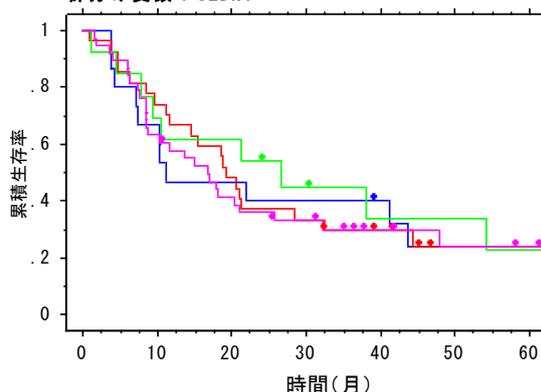
図下の表にログランク検定による p 値と、4 年生存率を示す。

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：MIB1
 群分け変数：HIF1



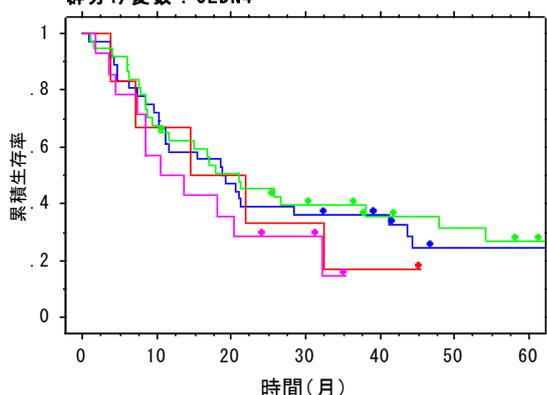
$\rho = 0.91$		HIF-1	
		(+)	(-)
MIB-1	(+)	29% (+/-8%)	18% (+/-14%)
	(-)	16% (+/-9%)	29% (+/-11%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：MIB1
 群分け変数：CLDN1



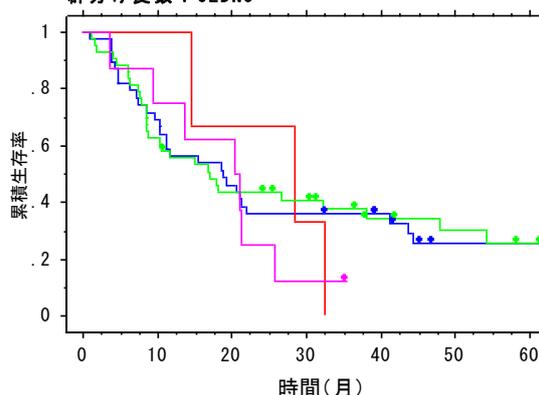
$\rho = 0.74$		CLDN1	
		(+)	(-)
MIB-1	(+)	24% (+/-8%)	34% (+/-14%)
	(-)	24% (+/-9%)	24% (+/-12%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：MIB1
 群分け変数：CLDN4



$\rho = 0.20$		CLDN4	
		(+)	(-)
MIB-1	(+)	14% (+/-12%)	31% (+/-8%)
	(-)	17% (+/-15%)	24% (+/-8%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：MIB1
 群分け変数：CLDN5



$\rho = 0.50$		CLDN5	
		(+)	(-)
MIB-1	(+)	13% (+/-12%)	30% (+/-8%)
	(-)	0%	25% (+/-8%)

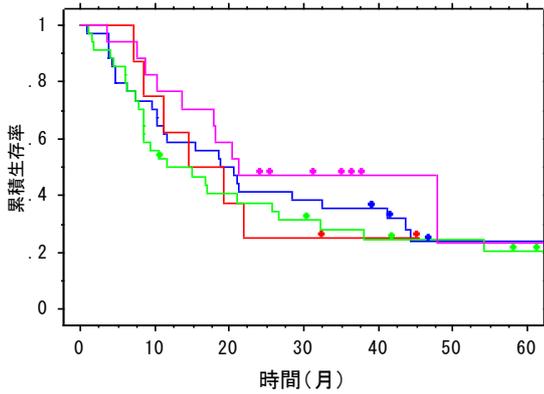
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陽性)

図 43. (続き)

各バイオマーカーの発現状況の組み合わせごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線

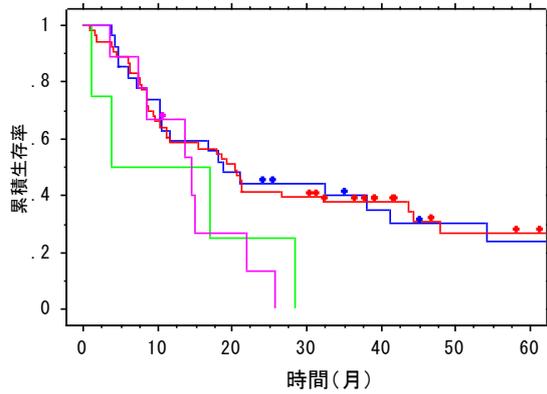
図下の表にログランク検定による p 値と、4 年生存率を示す。

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：MIB1
 群分け変数：CLDN7



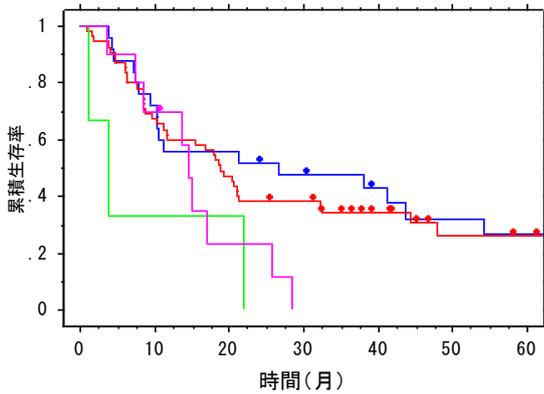
$\rho = 0.34$		CLDN7	
		(+)	(-)
MIB-1	(+)	24% (+/-18%)	24% (+/-8%)
	(-)	25% (+/-15%)	24% (+/-8%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：HER2
 群分け変数：HIF1



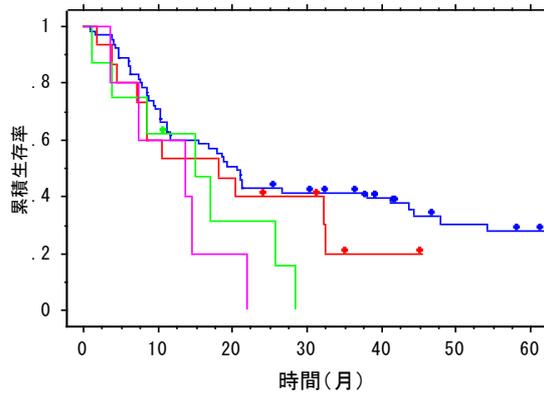
$\rho = 0.93$		HIF-1	
		(+)	(-)
HER-2	(+)	0%	0%
	(-)	27% (+/-7%)	30% (+/-9%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：HER2
 群分け変数：CLDN1



$\rho = 0.98$		CLDN1	
		(+)	(-)
HER-2	(+)	0%	0%
	(-)	26% (+/-7%)	32% (+/-10%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：HER2
 群分け変数：CLDN4



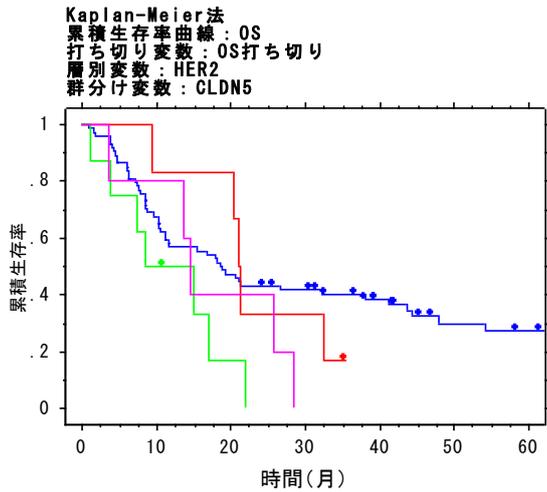
$\rho = 0.17$		CLDN4	
		(+)	(-)
HER-2	(+)	0%	0%
	(-)	20% (+/-12%)	30% (+/-6%)

- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陽性)

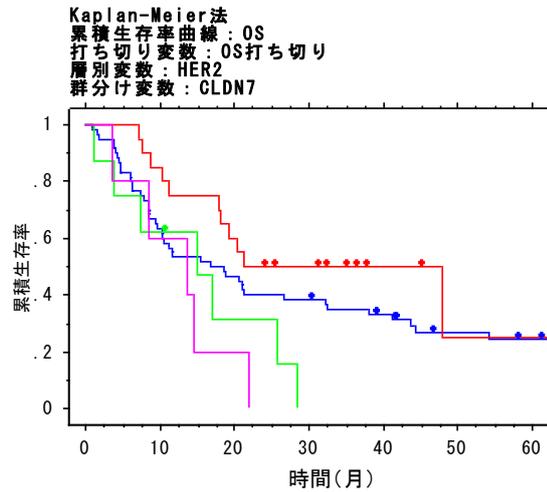
図 43. (続き)

各バイオマーカーの発現状況の組み合わせごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線

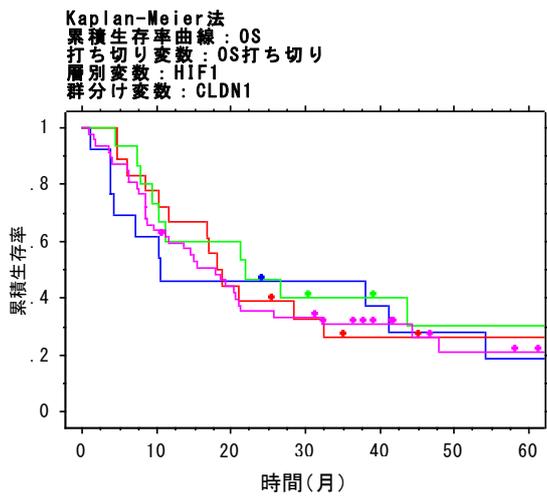
図下の表にログランク検定による p 値と、4 年生存率を示す。



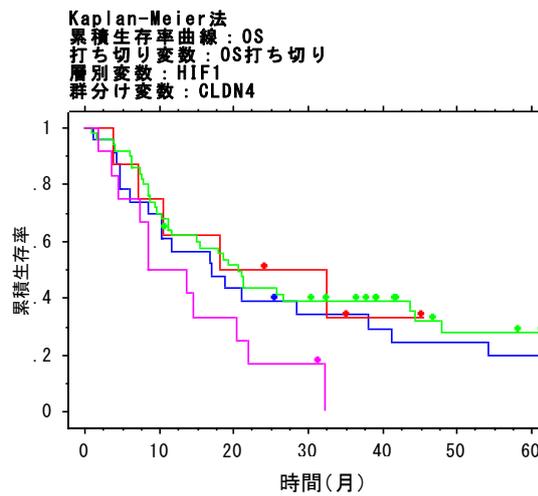
$\rho = 0.64$		CLDN5	
		(+)	(-)
HER-2	(+)	0%	0%
	(-)	17% (+/-15%)	30% (+/-6%)



$\rho = 0.41$		CLDN7	
		(+)	(-)
HER-2	(+)	0%	0%
	(-)	25% (+/-19%)	27% (+/-6%)



$\rho = 0.66$		CLDN1	
		(+)	(-)
HIF-1	(+)	21% (+/-7%)	30% (+/-13%)
	(-)	26% (+/-11%)	28% (+/-13%)



$\rho = 0.16$		CLDN4	
		(+)	(-)
HIF-1	(+)	0%	28% (+/-7%)
	(-)	33% (+/-18%)	25% (+/-9%)

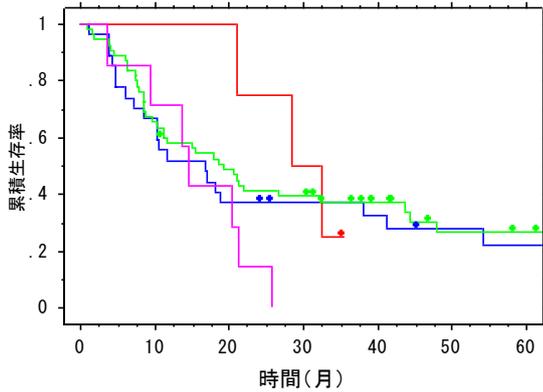
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陽性)

図 43. (続き)

各バイオマーカーの発現状況の組み合わせごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線

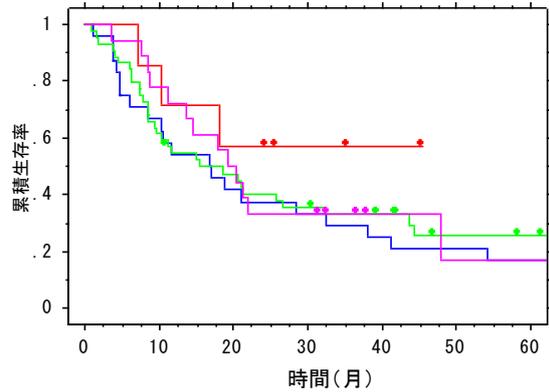
図下の表にログランク検定による ρ 値と、4 年生存率を示す。

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：HIF1
 群分け変数：CLDN5



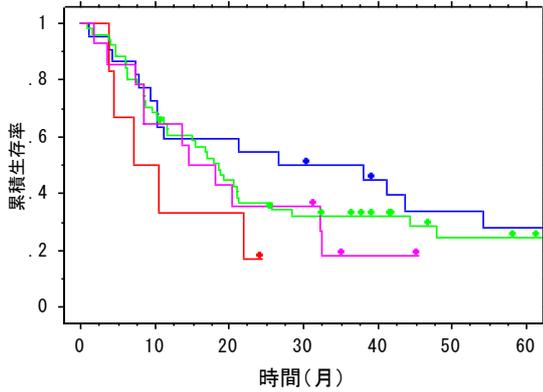
$\rho = 0.45$		CLDN5	
		(+)	(-)
HIF-1	(+)	0%	27% (+/-7%)
	(-)	25% (+/-22%)	28% (+/-9%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：HIF1
 群分け変数：CLDN7



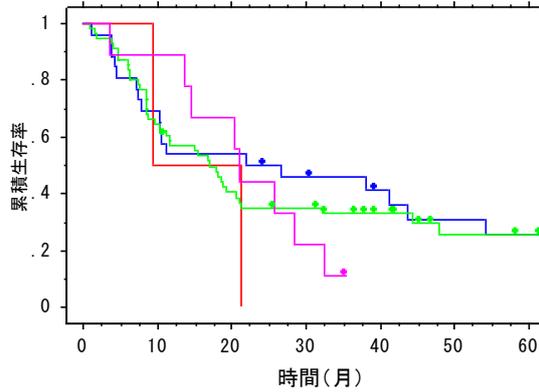
$\rho = 0.45$		CLDN7	
		(+)	(-)
HIF-1	(+)	17% (+/-13%)	26% (+/-7%)
	(-)	57% (+/-19%)	21% (+/-8%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：CLDN1
 群分け変数：CLDN4



$\rho = 0.19$		CLDN4	
		(+)	(-)
CLDN1	(+)	18% (+/-11%)	25% (+/-7%)
	(-)	17% (+/-15%)	34% (+/-11%)

Kaplan-Meier法
 累積生存率曲線：OS
 打ち切り変数：OS打ち切り
 層別変数：CLDN1
 群分け変数：CLDN5



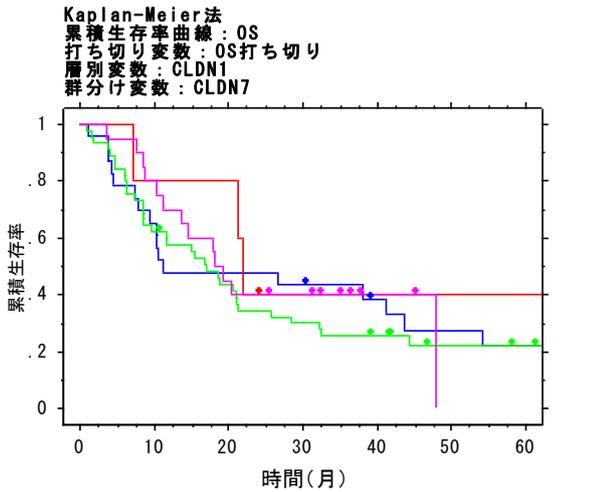
$\rho = 0.56$		CLDN5	
		(+)	(-)
CLDN1	(+)	11% (+/-11%)	25% (+/-7%)
	(-)	0%	31% (+/-10%)

- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陽性)

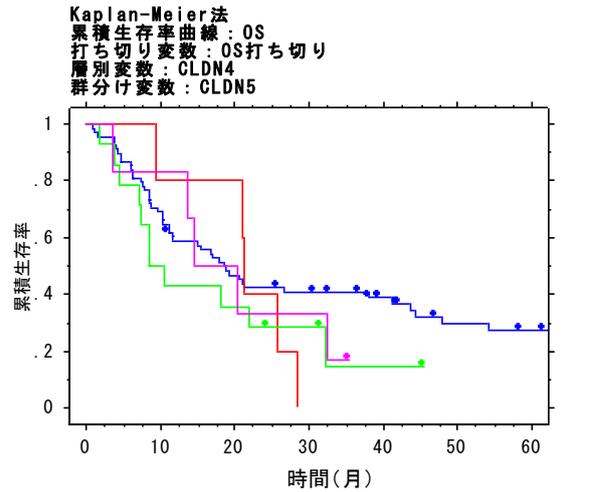
図 43. (続き)

各バイオマーカーの発現状況の組み合わせごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線

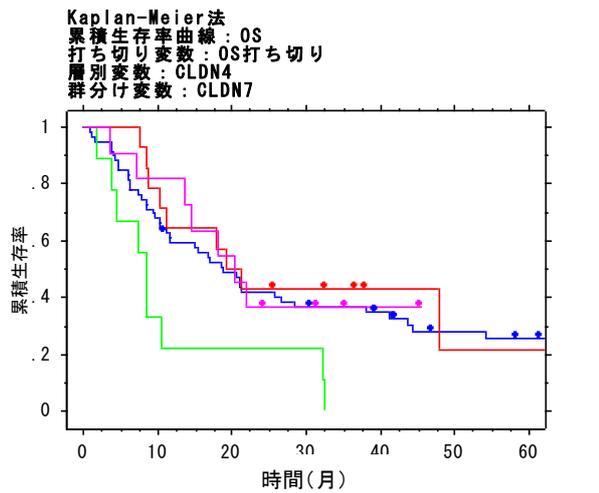
図下の表にログランク検定による p 値と、4 年生存率を示す。



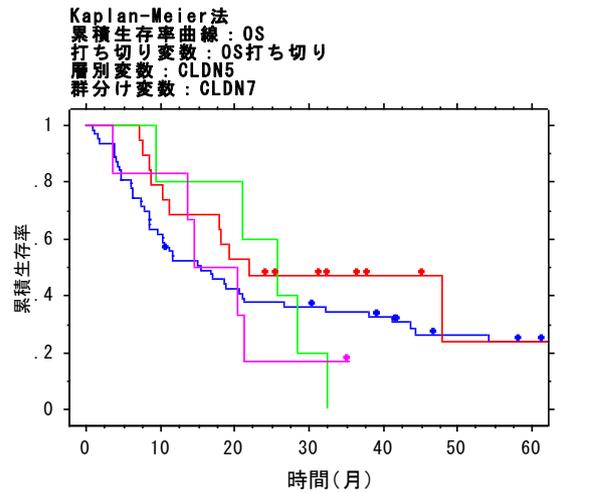
$p = 0.30$		CLDN7	
		(+)	(-)
CLDN1	(+)	0%	22% (+/-7%)
	(-)	40% (+/-22%)	28% (+/-10%)



$p = 0.93$		CLDN5	
		(+)	(-)
CLDN4	(+)	17% (+/-15%)	14% (+/-12%)
	(-)	0%	30% (+/-6%)



$p = 0.14$		CLDN7	
		(+)	(-)
CLDN4	(+)	36% (+/-15%)	0%
	(-)	21% (+/-17%)	28% (+/-6%)



$p = 0.34$		CLDN7	
		(+)	(-)
CLDN5	(+)	17% (+/-15%)	0%
	(-)	24% (+/-18%)	26% (+/-6%)

- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陰性/群分け変数陽性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陰性)
- 累積生存率 (層別変数陽性/群分け変数陽性)
- 打ち切り例 (層別変数陽性/群分け変数陽性)

図 43. (続き)

各バイオマーカーの発現状況の組み合わせごとの全生存率のカプラン・マイヤー曲線

図下の表にログランク検定による p 値と、4年生存率を示す。

9. 謝辞

この研究にあたり、常に包括的な姿勢での確なご指導を賜りました指導教官の中川恵一准教授に深く感謝申し上げます。また、放射線治療の臨床と研究全般、論文作成にいたるまで、基礎の基礎から辛抱強く丁寧にご指導いただいた山下英臣助教に、心より御礼申し上げます。そして、東京大学医学部附属病院人体病理学教室の松坂恵介先生には、病理標本すべてに目を通していただき、さらに必要に応じて異なる日に判定のチェックをするなど、免疫染色の判定および抗体染色の方針づけについて、多大なるご協力を賜りました。深く感謝申し上げます。免疫染色の実際については、東京大学医学部医学系研究科の佐久間慶技師に全面的にご協力いただき、免疫染色の基礎から備品の使い方まで、丁寧にご指導いただきました。最初に病理学的観点についてご相談させていただき、導いてくださった現在は帝京大学医学部病理学講座の宇於崎宏教授、さらに教室の先生方のご協力や研究室の提供を快諾くださった東京大学医学部附属病院人体病理学教室の深山正久教授に心より御礼申し上げます。東京大学医学部附属病院放射線治療部の皆様には、研究と臨床を往復する私を力強くサポートいただきました。皆様のご支援なくして本研究を完成させることはできなかったと思います。最後に、大学院在籍中の結婚・出産とそれに続く育児に際し、多大な苦勞をかけてしまったにもかかわらず、終始あたたかく受け止め、支え、応援してくれた、父母と姉と夫と、長男の健に心より感謝します。

参考文献

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90,2011
2. American Cancer Society: *Cancer Facts and Figures 2012*. Atlanta: American Cancer Society,2012
3. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr: Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 83:2049-2053,1998
4. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O: Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 340:825-831,1999
5. 厚生労働省大臣官房統計情報部 編: 平成 21 年人口動態統計,2009
6. The American Joint Committee for Cancer: *Staging and End Results Reporting 2007 Staging System*,2007
7. 日本食道学会編: 臨床・病理食道癌取扱い規約第 10 版.
8. The Japan Esophageal Society: *Comprehensive Registry of Esophageal Cancer in Japan*, 3rd Edition (1998,1999),2002
9. Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TP: A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 335:462-467,1996
10. Tietjen TG, Pasricha PJ, Kalloo AN: Management of malignant esophageal stricture with esophageal dilation and esophageal stents. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 4:851-862,1994
11. Cooper JS, Guo MD, Herskovic A, Macdonald JS, Martenson JA Jr, Al-Sarraf M,

Byhardt R, Russell AH, Beitler JJ, Spencer S, Asbell SO, Graham MV, Leichman LL: Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG 85-01). Radiation Therapy Oncology Group. JAMA 281:1623-1627,1999

12. Smith TJ, Ryan LM, Douglass HO Jr, Haller DG, Dayal Y, Kirkwood J, Tormey DC, Schutt AJ, Hinson J, Sischy B: Combined chemoradiotherapy vs. radiotherapy alone for early stage squamous cell carcinoma of the esophagus: a study of the Eastern Cooperative Oncology Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys 42:269-276,1998

13. Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, Pisansky TM, Martenson J, Komaki R, Okawara G, Rosenthal SA, Kelsen DP: INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy. J Clin Oncol 20:1167-1174,2002

14. Ajani JA, Winter K, Komaki R, Kelsen DP, Minsky BD, Liao Z, Bradley J, Fromm M, Hornback D, Willett CG: Phase II randomized trial of two nonoperative regimens of induction chemotherapy followed by chemoradiation in patients with localized carcinoma of the esophagus: RTOG 0113. J Clin Oncol 26:4551-4556,2008

15. Bosset JF, Gignoux M, Triboulet JP, Tiret E, Manton G, Elias D, Lozach P, Ollier JC, Pavy JJ, Mercier M, Sahmoud T: Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus. N Engl J Med 337:161-167,1997

16. Urba SG, Orringer MB, Turrisi A, Iannettoni M, Forastiere A, Strawderman M: Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients with locoregional esophageal carcinoma. J Clin Oncol 19:305-313,2001

17. Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, Kiel K,

Willett C, Sugarbaker D, Mayer R: Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol* 26:1086-1092,2008

18. Murakami M, Kuroda Y, Nakajima T, Okamoto Y, Mizowaki T, Kusumi F, Hajiro K, Nishimura S, Matsusue S, Takeda H: Comparison between chemoradiation protocol intended for organ preservation and conventional surgery for clinical T1-T2 esophageal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45:277-284,1999

19. Nishimura Y, Okuno Y, Ono K, Mitsumori M, Nagata Y, Hiraoka M: External beam radiation therapy with or without high-dose-rate intraluminal brachytherapy for patients with superficial esophageal carcinoma. *Cancer* 86:220-228,1999

20. Sai H, Mitsumori M, Araki N, Mizowaki T, Nagata Y, Nishimura Y, Hiraoka M: Long-term results of definitive radiotherapy for stage I esophageal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:1339-1344,2005

21. Nemoto K, Matsumoto Y, Yamakawa M, Jo S, Ito Y, Oguchi M, Kokubo N, Nishimura Y, Yamada S, Okawa T: Treatment of superficial esophageal cancer by external radiation therapy alone: results of a multi-institutional experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46:921-925,2000

22. Nemoto K, Yamada S, Hareyama M, Nagakura H, Hirokawa Y: Radiation therapy for superficial esophageal cancer: a comparison of radiotherapy methods. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50:639-644,2001

23. Nishimura Y, Suzuki M, Nakamatsu K, Kanamori S, Yagyu Y, Shigeoka H: Prospective trial of concurrent chemoradiotherapy with protracted infusion of 5-fluorouracil and cisplatin for T4 esophageal cancer with or without fistula. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53:134-139,2002

24. 日本放射線専門医会・医会, 日本放射線腫瘍学会, 日本医学放射線学会編集: 放射線治療計画ガイドライン・2008,2008
25. Ishikura S, Nihei K, Ohtsu A, Boku N, Hironaka S, Mera K, Muto M, Ogino T, Yoshida S: Long-term toxicity after definitive chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus. J Clin Oncol 21:2697-2702,2003
26. Lin SH, Wang L, Myles B, Thall PF, Hofstetter WL, Swisher SG, Ajani JA, Cox JD, Komaki R, Liao Z: Propensity Score-based Comparison of Long-term Outcomes With 3-Dimensional Conformal Radiotherapy vs Intensity-Modulated Radiotherapy for Esophageal Cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2012
27. Nishimura Y, Koike R: [IMRT for esophageal neoplasms]. Gan To Kagaku Ryoho 38:1421-1423,2011
28. Ohtsu A, Boku N, Muro K, Chin K, Muto M, Yoshida S, Satake M, Ishikura S, Ogino T, Miyata Y, Seki S, Kaneko K, Nakamura A: Definitive chemoradiotherapy for T4 and/or M1 lymph node squamous cell carcinoma of the esophagus. J Clin Oncol 17:2915-2921,1999
29. Gillham CM, Reynolds J, Hollywood D: Predicting the response of localised oesophageal cancer to neo-adjuvant chemoradiation. World J Surg Oncol 5:97,2007
30. 編 イアン F.タノック, リチャード P.ヒル, ロバート G.ブリストウ, リーハリントン, 訳 谷口 直之ら: がんのベーシックサイエンス第3版. メディカル・サイエンス・インターナショナル,2006
31. Ward JF: The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. Int J Radiat Biol 66:427-432,1994
32. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. Science

266:1821-1828,1994

33. Fei P, El-Deiry WS: P53 and radiation responses. *Oncogene* 22:5774-5783,2003
34. Cuddihy AR, Bristow RG: The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no?. *Cancer Metastasis Rev* 23:237-257,2004
35. Joyce JA, Pollard JW: Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9:239-252,2009
36. Shah MA, Ramanathan RK, Ilson DH, Levnor A, D'Adamo D, O'Reilly E, Tse A, Trocola R, Schwartz L, Capanu M, Schwartz GK, Kelsen DP: Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 24:5201-5206,2006
37. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70,2000
38. Lane DP: Cancer. A death in the life of p53. *Nature* 362:786-787,1993
39. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704,1993
40. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54:1169-1174,1994
41. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW: Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108:153-164,2002
42. Sarbia M, Stahl M, Fink U, Willers R, Seeber S, Gabbert HE: Expression of apoptosis-regulating proteins and outcome of esophageal cancer patients treated by combined therapy modalities. *Clin Cancer Res* 4:2991-2997,1998
43. Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M: Cell-cycle regulators and the Ki-67 labeling index can predict the response to chemoradiotherapy and

the survival of patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus.

Ann Surg Oncol 10:792-800,2003

44. Makino T, Yamasaki M, Miyata H, Yoshioka S, Takiguchi S, Fujiwara Y, Nakajima K, Nishida T, Mori M, Doki Y: p53 Mutation status predicts pathological response to chemoradiotherapy in locally advanced esophageal cancer. Ann Surg Oncol 17:804-811,2010

45. Ishida M, Morita M, Saeki H, Ohga T, Sadanaga N, Watanabe M, Kakeji Y, Maehara Y: Expression of p53 and p21 and the clinical response for hyperthermochemoradiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. Anticancer Res 27:3501-3506,2007

46. Ressiot E, Dahan L, Liprandi A, Giorgi R, Djourno XB, Padovani L, Alibert S, Ries P, Laquiere A, Laugier R, Thomas P, Seitz JF: Predictive factors of the response to chemoradiotherapy in esophageal cancer. Gastroenterol Clin Biol 32:567-577,2008

47. Malik SM, Nevin DT, Cohen S, Hunt JL, Palazzo JP: Assessment of immunohistochemistry for p16INK4 and high-risk HPV DNA by in situ hybridization in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Surg Pathol 19:31-34,2011

48. Sarbia M, Stahl M, Fink U, Heep H, Dutkowski P, Willers R, Seeber S, Gabbert HE: Prognostic significance of cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with surgery alone or combined therapy modalities. Int J Cancer 84:86-91,1999

49. Research Committee on Malignancy of Esophageal Cancer, Japanese Society for Esophageal Diseases: Prognostic significance of CyclinD1 and E-Cadherin in patients with esophageal squamous cell carcinoma: multiinstitutional retrospective analysis. J Am Coll Surg 192:708-718,2001

50. Kuwahara A, Yamamori M, Fujita M, Okuno T, Tamura T, Kadoyama K,

Okamura N, Nakamura T, Sakaeda T: TNFRSF1B A1466G genotype is predictive of clinical efficacy after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 29:100,2010

51. Izzo JG, Correa AM, Wu TT, Malhotra U, Chao CK, Luthra R, Ensor J, Dekovich A, Liao Z, Hittelman WN, Aggarwal BB, Ajani JA: Pretherapy nuclear factor-kappaB status, chemoradiation resistance, and metastatic progression in esophageal carcinoma. *Mol Cancer Ther* 5:2844-2850,2006

52. Puhringer-Oppermann F, Sarbia M, Ott N, Brucher BL: The predictive value of genes of the TGF-beta1 pathway in multimodally treated squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Colorectal Dis* 25:515-521,2010

53. Yamashita K, Mori M, Shiraishi T, Shibuta K, Sugimachi K: Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 6:1169-1174,2000

54. Takatori H, Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Ishigami S, Owaki T, Aikou T: Predictive value of COX-2 for the effect of chemoradiotherapy on esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 13:697-701,2005

55. Akutsu Y, Hanari N, Yusup G, Komatsu-Akimoto A, Ikeda N, Mori M, Yoneyama Y, Endo S, Miyazawa Y, Matsubara H: COX2 expression predicts resistance to chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 18:2946-2951,2011

56. Gotoh M, Takiuchi H, Kawabe S, Ohta S, Kii T, Kuwakado S, Katsu K: Epidermal growth factor receptor is a possible predictor of sensitivity to chemoradiotherapy in the primary lesion of esophageal squamous cell carcinoma. *Jpn J*

Clin Oncol 37:652-657,2007

57. Ogawa K, Chiba I, Morioka T, Shimoji H, Tamaki W, Takamatsu R, Nishimaki T, Yoshimi N, Murayama S: Clinical significance of HIF-1alpha expression in patients with esophageal cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. *Anticancer Res* 31:2351-2359,2011
58. The American Joint Committee for Cancer: Staging and End Results Reporting 1997 Staging System. 5th edition,1997
59. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC: Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 148:1567-1576,1996
60. Yamashita H, Nakagawa K, Tago M, Igaki H, Nakamura N, Shiraishi K, Sasano N, Ohtomo K: Radiation therapy combined with cis-diammine-glycolatoplatinum (nedaplatin) and 5-fluorouracil for Japanese stage II-IV esophageal cancer compared with cisplatin plus 5-fluorouracil regimen: a retrospective study. *Dis Esophagus* 19:15-19,2006
61. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71:587-597,1992
62. Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G: p53 and chemosensitivity. *Ann Oncol* 10:1011-1021,1999
63. Yang B, Eshleman JR, Berger NA, Markowitz SD: Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2:1649-1657,1996
64. Yang B, Stambrook PJ, Markowitz SD: Wild-type p53 demonstrates functional dominance in a human colon carcinoma cell line in which it induces reversible growth

arrest. *Clin Cancer Res* 2:1639-1647,1996

65. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, Triche TJ, Reynolds CP: Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 61:6185-6193,2001

66. Reed JC: Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1:111-121,2002

67. Brown JM, Wouters BG: Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 59:1391-1399,1999

68. Sampath D, Plunkett W: Design of new anticancer therapies targeting cell cycle checkpoint pathways. *Curr Opin Oncol* 13:484-490,2001

69. Yamasaki M, Miyata H, Fujiwara Y, Takiguchi S, Nakajima K, Nishida T, Yasuda T, Matsuyama J, Mori M, Doki Y: p53 genotype predicts response to chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol* 17:634-642,2010

70. Nibu KI, Yanagisawa A, Nakamizo M, Hoki K, Nigauri T, Kawabata K, Kamata SE: Clinical role of p53 and p21WAF1/CIP1 in squamous cell carcinoma of the pyriform sinus. *Acta Otolaryngol* 118:432-437,1998

71. Michel P, Magois K, Robert V, Chiron A, Lepessot F, Bodenant C, Roque I, Seng SK, Frebourg T, Paillot B: Prognostic value of TP53 transcriptional activity on p21 and bax in patients with esophageal squamous cell carcinomas treated by definitive chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54:379-385,2002

72. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR: Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211:90-98,1994

73. Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J: The prognostic significance of altered

cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 50:401-423,1999

74. Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, Nolden S, Kunze D, Shafizadeh ST, Schneider PM, Thiele J, Hoelscher AH, Dienes HP: Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 89:14-18,2000

75. Barnes DM: Cyclin D1 in mammary carcinoma. *J Pathol* 181:267-269,1997

76. Harari PM, Huang SM: Radiation response modification following molecular inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Semin Radiat Oncol* 11:281-289,2001

77. Harari PM, Huang SM: Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:427-433,2001

78. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792,2001

79. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Ruschhoff J, Kang YK: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376:687-697,2010

80. Mimura K, Kono K, Hanawa M, Mitsui F, Sugai H, Miyagawa N, Ooi A, Fujii H: Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 92:1253-1260,2005

81. 三村耕作ほか: 食道扁平上皮癌における HER2 を標的とした分子標的治療.

Biotherapy. 25(5): 791-797,2011

82. 松本俊治: 癌遺伝子過剰発現にもとづく食道扁平上皮癌化学・放射線療法の感受性予測と個別化治療への応用. 順天堂医学 53(4)m 576-580,2007
83. Hirohashi S: Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153:333-339,1998
84. Peifer M: Beta-catenin as oncogene: the smoking gun. *Science* 275:1752-1753,1997
85. Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P: Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 49:179-186,2004
86. Yamamoto H, Iku S, Itoh F, Tang X, Hosokawa M, Imai K: Association of trypsin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 91:1324-1331,2001
87. Moustakas A, Heldin CH: Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 98:1512-1520,2007
88. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871-890,2009
89. Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ: Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 65:7378-7385,2005
90. Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD: Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 115:1765-1776,2005
91. Harada H, Inoue M, Itasaka S, Hirota K, Morinibu A, Shinomiya K, Zeng L, Ou G,

Zhu Y, Yoshimura M, McKenna WG, Muschel RJ, Hiraoka M: Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nat Commun* 3:783,2012

92. Niibe Y, Watanabe J, Tsunoda S, Arai M, Arai T, Kawaguchi M, Matsuo K, Jobo T, Ono S, Numata A, Unno N, Hayakawa K: Concomitant expression of HER2 and HIF-1alpha is a predictor of poor prognosis in uterine cervical carcinoma treated with concurrent chemoradiotherapy: prospective analysis (KGROG0501). *Eur J Gynaecol Oncol* 31:491-496,2010