

食道癌根治的化学放射線療法 (CRT) 後遺残・再発腫瘍に関する臨床病理学的検討

岩間 密¹ 安田卓司¹ 今野元博^{1,2} 中森康浩¹ 西山厚子¹
 武本智樹¹ 白石 治¹ 安田 篤¹ 彭 英峰¹ 新海政幸¹
 平井紀彦¹ 今本治彦¹ 塩崎 均¹

¹近畿大学医学部外科学教室 ²近畿大学医学部附属病院通院治療センター

抄 録

[目的] 食道癌根治的化学放射線療法 (CRT) 後遺残・再発腫瘍の特性を臨床病理学的に検討する。[対象] salvage (S) 群28例, 術前無治療 (U) 群31例。[方法] 免疫染色 (HIF-1 α , GLUT-1, VEGF, CD34, CD105, Ki-67, E-Cadherin; E-CD), および形態学的検討。[結果] 細胞活性 (Ki-67) および浸潤能 (E-CD) に差は認めなかった ($p=0.89$, $p=0.38$)。S 群では腫瘍密度の減少を認めた ($p<0.001$)。低酸素の指標である HIF-1 α および GLUT-1, 血管新生促進因子の VEGF では S 群で発現亢進を認めた ($p<0.001$, $p<0.005$, $p<0.001$)。CD34 による微小血管密度 (MVD) では両群間に差は認めなかったが ($p=0.19$)。腫瘍増殖に特異的な CD105 の MVD では S 群の新生血管の減少を認めた ($p<0.001$)。腫瘍潰瘍底の深さは S 群が深かった ($p<0.001$)。[考察] 根治的 CRT 後遺残・再発腫瘍は, 増殖・浸潤能は術前未治療群と同等だが, HIF-1 α , GLUT-1, VEGF の発現増強により CRT 後の低酸素環境へ適応し増殖する。しかし血管新生は抑制され, 食道壁内の遺残細胞は内部壊死を伴って深い潰瘍を形成し, 潰瘍底である先進部を中心に増殖することで容易に周囲へ浸潤・穿孔し, 高い悪性度を示すと考えられた。

Key words: 食道癌, 根治的化学放射線療法 (CRT), salvage 手術, 遺残・再発腫瘍, GLUT-1, HIF-1 α , VEGF, CD34, CD105, Ki-67, E-Cadherin

緒 言

近年, 食道癌に対する根治的化学放射線療法 (chemoradiotherapy; CRT) の高い奏功率および完全奏功 (clinical complete response: clinical CR) 率が報告される^{1,2}, 食道癌に対する根治的治療として CRT は急速に普及した^{1,3-5}。しかし, 根治的 CRT により pathological CR (pCR) となり, 食道温存が可能となるのは半数にみならず^{3,6}, 非奏効例における腫瘍遺残例や clinical CR 後の局所再発など salvage 手術の対象は増加している⁷。また, salvage 手術は CRT 後の癒着化, 臓器・組織に対する放射線障害や免疫力低下などにより, 依然として手技的に困難でリスクの高い治療法ではあるが⁸, 術式や術後管理の改善により合併症の発生率は改善してきている⁹。しかし, 術前に切除可能と判断しても短

期間に急速に増大し, 予想以上の周囲浸潤や穿孔・瘻孔形成から切除困難あるいは切除不能となる症例が少なくない。根治的 CRT 後遺残・再発腫瘍は, 通常腫瘍とは性質を異にし, 腫瘍活性, 増殖能および浸潤能が高く, 臨床的に非常に悪性度が高いと考えられる。しかし, 未だその詳細な病態は把握されておらず, その臨床病理学的特徴を検討し, 今後の治療に反映させる必要がある。

今回我々は, salvage 手術で切除された根治的 CRT 後の遺残・再発腫瘍を対象に, 免疫組織学的および腫瘍形態学的評価を加え, その高い悪性度について検討した。

対象・方法

対象症例

2001年1月から2008年3月までの間に近畿大学医

学部附属病院外科学教室において、根治目的で50 Gy以上のCRTを施行するも遺残或いは局所再発のためにsalvage手術¹⁰を施行した34例のうち、摘出標本に扁平上皮癌(squamous cell carcinoma; SCC)を認めた28例をsalvage群(S群)として検討を行った。2007年1月から2007年12月までに根治的手術を施行した術前無治療群31例をUntreated群(U群)として対照とし、両群を比較することでS群の臨床病理学的特徴を検討した。全例、初回治療前に内視鏡およびcomputed tomography(CT)により進行度診断を施行しており、生検でSCCの確定診断が得られている。また、切除標本における臨床病理学的因子および病期は食道癌取扱い規約第10版¹⁰に従って分類した。

いずれの症例においても切除標本の研究目的の利用について術前に説明し承認を得ている。

根治的放射線療法

放射線治療は対向2門, 2 Gy/day, 10-MV linear acceleratorにて主病巣を含む食道と2群リンパ節を含む範囲を照射野として施行した。6例は放射線治療単独であったが、残る22例は化学療法の同時投与を伴うCRTを施行した。併用化学療法は、5-fluorouracil(5-FU)とcisplatin(CDDP)を用いたhigh dose FP症例(5-FU: 700 mg/m²/day: day1-5, CDDP: 70 mg/m²/day1: day1, 2コース)が10例, low dose FP症例(5-FU: 350 mg/m²/day: day1-5, CDDP: 7 mg/m²/day: day1-5, 4コース)11例, FP+paclitaxel(TXL)症例(5-FU: 350 mg/m²/day1, CDDP: 40 mg/m²/day1, TXL: 80 mg/m²/day1, 2コース)が1例であった。症例によっては副作用の出現により投与量または投与回数を減量した。

手術

胸部食道癌症例は、右開胸による胸腔鏡補助下食道亜全摘術により腫瘍を切除した。頸部食道癌症例は、頸部食道切除が5例、食道全摘が1例で、喉頭温存手術が1例に施行可能であった。リンパ節郭清は、胸部食道癌では2領域郭清が43例(S群で18例, U群で25例)、3領域郭清が10例(S群で4例, U群で6例)で、頸部食道癌では原則として両側頸部郭清+上縦隔郭清を施行した。

形態学的検討

切除後の新鮮標本にて肉眼的に腫瘍の形態を検討した。また、潰瘍底の深さに関する検討では、Hematoxylin-Eosin(HE)標本の画像を取り込み最も潰瘍の深い部位において正常粘膜面を基準として潰瘍潰瘍底の深さを計測した。計測にはSigmaScan pro[®](Ver. 5; HULINKS), DS-L1(Nikon,

Tokyo, Japan)を用いた。

組織学的検討

全ての切除標本は10%緩衝ホルマリンにて24~48時間固定後、腫瘍最深部で長軸方向に4~5 mm幅の間隔で短冊切片を作製し、パラフィン包埋した。今回の検討にあたり、パラフィン包埋ブロックより4 μmの連続切片を作製し、組織学的検討用のプレパラートとした。

HE染色

各切片をキシレンにて脱パラフィンし、エタノールおよび蒸留水を用いて水和した。0.2%カラツィ・ヘマトキシレン液にて10分染色し水洗後、余剰なヘマトキシレンを1%塩酸アルコールで洗浄し、0.25%エオジンY液にて4分染色しHE染色を行った。

免疫染色

Hypoxia Inducible Factor-1α(HIF-1α)に対する免疫染色はビオチンフリータイラミドシグナル増幅システム(simplified catalyzed signal amplification system; CSA II[®], K1479; DAKO, Carpinteria, CA, USA)^{11,12}にて行った。一次抗体には抗ヒトHIF-1αマウスモノクローナル抗体(ab463; Abcam, Cambridge, UK)をTween含有抗体希釈液(S3022; DAKO)にて2000倍に希釈して用いた。各切片をキシレンにて脱パラフィンし、エタノールおよび蒸留水を用いて水和した。抗原賦活化としてTarget Retrieval Solution, pH 9(S1699; DAKO)とともにautoclave(120°C, 20分)処置を行った。水洗後、内因性ペルオキシダーゼ除去として3%過酸化水素水と5分間反応。非血清タンパクと5分間反応させ非特異反応を除去し、一次抗体と湿箱で4°C, over night反応させた。パーオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン, fluorescein isothiocyanate(FITC)標識タイラミドおよびパーオキシダーゼ標識抗FITC抗体とそれぞれ室温, 15分反応させた。水洗後および非特異タンパク除去後を除く各工程間は洗浄液(0.1% Tween20, 0.3 mol/L NaCl含有0.05 mol/L トリス塩酸緩衝液; TBST, pH 7.6, 10倍希釈, S3306; DAKO)にて洗浄を行った。発色は3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドクライド(DAB)基質溶液(DAB: TBST: 30%過酸化水素水=60 mg: 150 ml: 45 μl)と2分反応, 対比染色は0.2%カラツィ・ヘマトキシレン液にて1分染色した。

Ki-67抗原, E-Cadherin(E-CD), Glucose transporter-1(GLUT-1), Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF), CD34, CD105, に対する免疫染色はEnVision[™]+法¹³にて行った。一次抗体にはそれぞれ抗ヒトKi-67抗原(clone: MIB-1)マ

ウスモノクローナル抗体 (M7240; DAKO, 10倍希釈), 抗ヒトE-CDマウスモノクローナル抗体 (M106; Takara Biotechnology, Shiga, Japan, 10倍希釈), 抗ヒトGLUT-1ウサギポリクローナル抗体 (18901; Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan, 500倍希釈), 抗ヒトVEGFマウスモノクローナル抗体 (R11; Immuno-Biological Laboratories, 500倍希釈), 抗ヒトCD34 Class II血液前駆細胞 (clone: QBEnd10) マウスモノクローナル抗体/細胞培養上清由来 (M7165; DAKO, 50倍希釈), 抗ヒトCD105 Endoglin (clone: SN6h) マウスモノクローナル抗体 (M3527; DAKO, 10倍希釈) を用いた。抗体の希釈には抗体希釈用緩衝液 (S0809; DAKO) を用いた。抗原賦活化は GLUT-1 および VEGF では行わず, Ki-67 抗原では 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) とともに autoclave (120°C, 20分) 処置, CD34 および E-CD では 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) とともに microwave (5分, 3回) 処置, CD105 ではプロテナーゼ K (S3020; DAKO) と室温で 8分反応を行った。二次抗体反応は GLUT-1 では EnVision+ポリマー試薬 (K4003; DAKO), その他は EnVision+ポリマー試薬 (K4001; DAKO) を用いた。各標本を脱パラフィンし水和後, GLUT-1 と VEGF 以外では抗原賦活化を行い, 内因性ペルオキシダーゼ除去として 0.3% 過酸化水素水加エタノール (30%過酸化水素水: エタノール=1.5 ml: 150 ml) と室温で 30分反応させた。一次抗体反応はそれぞれ湿箱で 4°C, overnight 反応させた。二次抗体反応は室温で 60分反応させた。各工程間の洗浄には E-CD のみトリス塩酸緩衝液 (tris buffered saline; TBS, pH 7.4) を用い, その他は 0.01 M リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS, pH 7.4) を用いた。発色には DAB 基質溶液 (DAB: PBS: 30%過酸化水素水=60 mg: 150 ml: 45 µl) を用い, 反応時間はそれぞれ室温にて GLUT-1: 3分, VEGF: 2分, CD34: 10分, CD105: 15分, Ki-67 抗原: 12分, E-CD: 5分とした。対比染色は 0.2%カラツィ・ヘマトキシレン液を用いて 1分染色した。

染色の判定

染色の判定は光学顕微鏡にて行った。

Ki-67 の発現性は DAB により腫瘍細胞の核が茶褐色に染色されているものを陽性とした。hot spot を 4~6 視野選択し, 強拡大 (400倍) にて陽性腫瘍細胞を計測し, Ki-67 陽性細胞率 (Ki-67-positive cell index; Ki-67-PI) = 陽性腫瘍細胞数/全腫瘍細胞数 [%] を算出した^{14,15}。

腫瘍組織中の E-CD 発現性は 正常食道上皮にお

ける細胞壁の染色性を基準とし, それと同等あるいはそれより強染色されたものを陽性として判定した¹⁶。HIF-1 α は核内で作用する転写因子として働くことから, その発現は腫瘍細胞の核が染色されているものを陽性とした。GLUT-1 発現は同一標本内の赤血球の染色を基準とし, 腫瘍細胞の細胞壁がそれと同等, あるいはそれより強染色されているものを陽性とし, GLUT-1(+): 発現率 \geq 50%, GLUT-1(-): 発現率 $<$ 50%と評価した^{14,17}。VEGF の発現は同一標本内の平滑筋の染色を基準とし, 腫瘍細胞の細胞質がそれと同等, あるいはそれより強染色されているものを陽性とした¹⁸。E-CD, HIF-1 α , VEGF, GLUT-1 の発現率は, hot spot を 3~6 視野選択し陽性細胞を計測し, 発現率 = 陽性細胞数/全腫瘍細胞数 [%] にて算出した。また, GLUT-1 染色標本を用いて 1 視野あたりの全腫瘍細胞数を計測し, 単位面積 (0.056 mm²) あたりの腫瘍細胞密度を算出した。

CD34 および CD105 によって標識された血管の評価は, それぞれまず弱拡大 (40倍) にて各標本の腫瘍全体を観察し強発現の 4 視野を選択し, 単位面積 (CD34: 0.054 mm², CD105: 0.86 mm²) 当たりの微小血管密度 (micro vessel density; MVD) を算出した¹⁹⁻²¹。

各標本における細胞数および標識血管数の計測には SigmaScan pro[®] (Ver. 5; HULINKS) を用いた。

統計学的処理

すべての統計学的処理は Microsoft Office Excel[®] (2007; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を用いて行った。群間検定には Mann-Whitney-U 検定および χ^2 二乗検定を行った。いずれの検定においても有意確率 (p) $<$ 0.05 を有意差ありとした。

結 果

患者背景

本研究における対象症例の患者背景を表 1 に示す。S 群は 28 例, U 群は 31 例で, S 群に対する総照射線量は平均 60.39 Gy であった。主病巣の占居部位では, 頸部食道癌症例が根治性向上と喉頭温存を目指して術前化学放射線療法を施行している関係上, U 群には 1 例も認められず, S 群にのみ 6 例であった。また, S 群における CRT の効果判定からみた salvage 手術の施行理由は, CR 後の局所再発が 17 例, non-CR での遺残が 11 例であった。壁深達度, 進行度の両因子において U 群は T1b 以下および Stage I 以下の症例が多く, S 群で進行例が多く認

表1 患者背景

		S群 (n=28)	U群 (n=31)	p
性別	male/female	27/1	26/5	0.12**
年齢		65.43±7.40	67.29±6.15	0.3**
占居部位	Ce/Ut/Mt/Lt/Ae	6/3/15/4/0	0/9/15/6/1	0.036*
術前治療効果	CR/no-CR	17/11		
組織型	well/mod/poor	4/17/7	4/19/8	0.97**
壁進達度 (pT)	1a/1b/2/3/4	1/1/5/18/3	3/10/5/12/1	0.034*
リンパ節転移 (pN)	0/1/2/3/4	19/1/5/2/1	17/7/5/2/0	0.24**
遠隔転移 (M)	0/1	24/4	31/0	0.045*
進行度 (pStage)	0/ I / II/III/IV a/IV b	0/1/15/7/1/4	3/8/9/10/1/0	0.013*
INF	a/b/c	3/23/2	5/24/2	0.83**
癌遺残度	R0/R1/R2	19/6/3	29/1/1	0.038*

Ce : cervical esophagus
 Mt : middle thoracic esophagus
 Ae : abdominal esophagus
 wel : well differentiated
 INF : infiltrative growth pattern
 Ut : upper thoracic esophagus
 Lt : lower thoracic esophagus
 mod : moderately differentiated
 poor : poorly differentiated
 CR : complete response

*p<0.05

**not significant

表2 増殖能・浸潤能の検討

		S群 (n=28)	U群 (n=31)	p
Ki-67	Ki-67-PI [%]	60.11±13.28	60.53±8.79	0.89*
E-Cadherin	positive rate [%]	12.89±17.01	17.71±24.10	0.38*

PI : positive index

*not significant

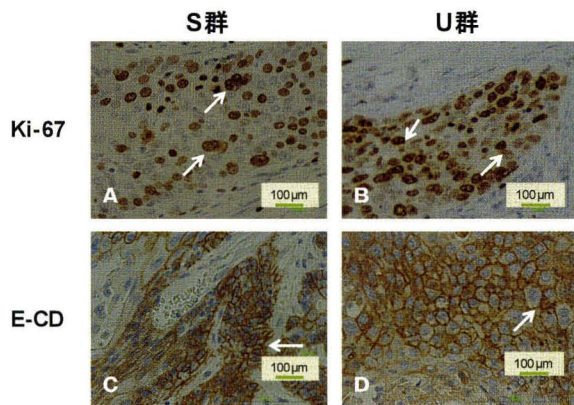


図1 増殖能・浸潤能の検討

免疫化学染色による評価を行った。A, B : Ki-67 抗原の発現 (A : S群, B : U群 ; 400倍)。両群ともに腫瘍細胞の核に発現を認めた。腫瘍細胞の核の染色をもって陽性 (白矢印) とした。C, D : E-Cadherin 発現 (C : S群, D : U群 ; 400倍)。両群とも、腫瘍細胞では正常食道上皮と同様に、細胞壁に発現を認めた。非腫瘍部食道上皮の染色性を陽性基準とし、それと同等以上の染色を示す腫瘍細胞を陽性 (白矢印) とした。

められたが(p<0.05), 両群間において性別, 年齢, 組織型, リンパ節転移, infiltrately growth pattern

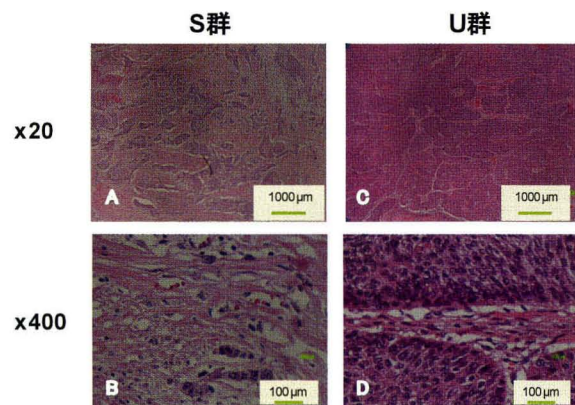


図2 腫瘍間質の線維化の比較

A (20倍)・B (400倍) : S群, C (20倍)・D (400倍) : U群。S群ではU群に比し、腫瘍間質の著明な線維化を認めた。

(INF) に関しては有意差を認めなかった。癌遺残度では, S群で3例, U群で1例のR2症例を認めた(p<0.05)。

検討1 : 腫瘍増殖能および浸潤能に関する評価

CRT後の遺残・再発腫瘍の増殖性をKi-67抗原, 浸潤性を細胞間接着の解離という点からE-CDに対する免疫染色により検討した(図1および表2)。

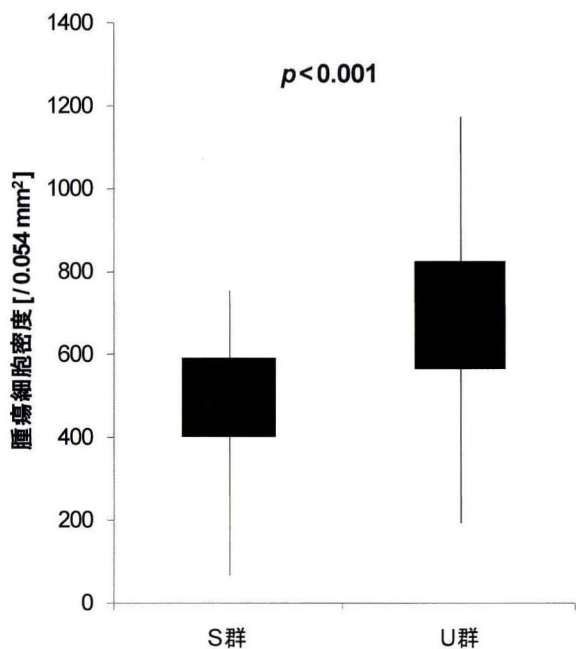


図3 腫瘍細胞密度の比較
 GLUT-1 免疫染色標本を用いて算出した。単位面積 (0.054 mm²) あたりの腫瘍細胞数は S 群：473.31±168.38個，U 群：699.46±226.51個 (p=0.00005)。S 群の腫瘍細胞密度は U 群に比し著明に低かった。

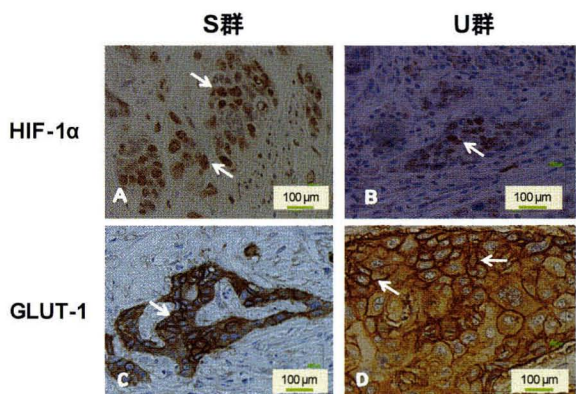


図4 低酸素状態に関する検討
 免疫染色による評価を行った。A, B：HIF-1 α 発現 (A：S 群，B：U 群；400倍)。蛋白発現は細胞質および核内に局在を認めた。核の染色 (白矢印) をもって陽性とした。C, D：GLUT-1 発現 (C：S 群，D：U 群；400倍)。両群とも腫瘍細胞の細胞壁に発現を認めた。同一標本内の赤血球の染色を基準とし、それと同等以上の細胞壁の染色 (白矢印) をもって陽性とした。

Ki-67 抗原は全標本の核に発現を認めた (図 1 A, B)。Ki-67-PI は S 群：60.11±13.28，U 群：60.53±8.79 (p=0.89) で、両群間に有意差を認めなかった (表 2)。E-CD の発現は正常上皮細胞と同様に腫瘍細胞の細胞間に局在を認めたが (図 1 C, D)，E-CD 陽性率も S 群：12.89±17.01，U 群：17.71±24.1 (p=0.38) で両群間に有意差を認めなかった (表 2)。

検討 2：腫瘍細胞環境に関する評価

放射線治療後は血管の破綻や線維化により腫瘍細胞環境は低酸素に陥り^{22,23}，その環境は腫瘍の悪性度にも影響を及ぼす^{19,24-27}。そこで、腫瘍の細胞環境を評価するため、まずは細胞密度を比較し、次いで免疫組織学的に低酸素状態の指標として HIF-1 α および GLUT-1 の発現、血管増生の指標として VEGF の発現を検討、さらに血管密度に関して

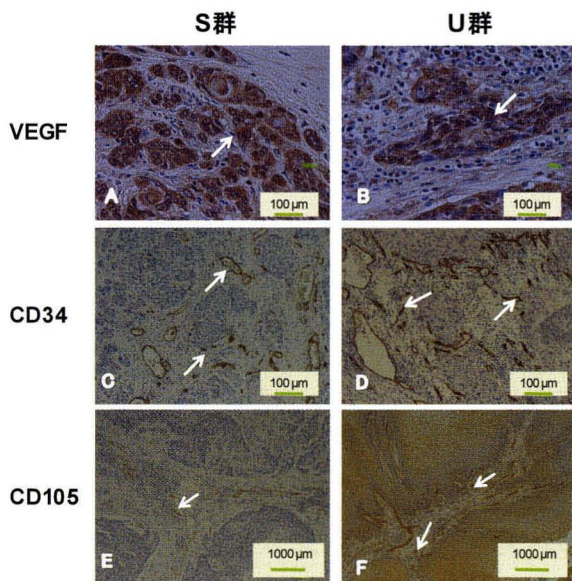


図5 血管新生に関する検討
 免疫染色による評価を行った。A, B：VEGF 発現 (A：S 群，B：U 群；400倍)。腫瘍部の細胞質に発現を認めた。細胞質の染色 (白矢印) をもって陽性とした。C, D：CD34 により標識された血管 (白矢印)。腫瘍内および腫瘍周囲の間質に発現を認めた (C：S 群，D：U 群；400倍)。E, F：CD105 により標識された腫瘍増殖に伴う新生血管 (白矢印) (E：S 群，F：U 群；100倍)。腫瘍内および腫瘍周囲の間質に発現を認めた。

表3 低酸素状態の検討

		S 群 (n=28)	U 群 (n=31)	p
HIF-1 α	positive rate [%]	40.11±27.46	11.50±13.10	0.000018*
GLUT-1	positive/negative	24/4	17/14	0.01**

*p<0.001

**p<0.05

表4 血管新生の検討

		S群 (n=28)	U群 (n=31)	p
VEGF	positive rate [%]	55.29±26.09	18.23±16.51	0.00000069*
CD34	MVD [/0.054 mm ²]	83.0±16.97	91.26±30.05	0.19**
CD105	MVD [/0.86 mm ²]	20.15±7.43	39.18±18.14	0.0000035*

MVD: micro vessel density

* $p < 0.001$

**not significant

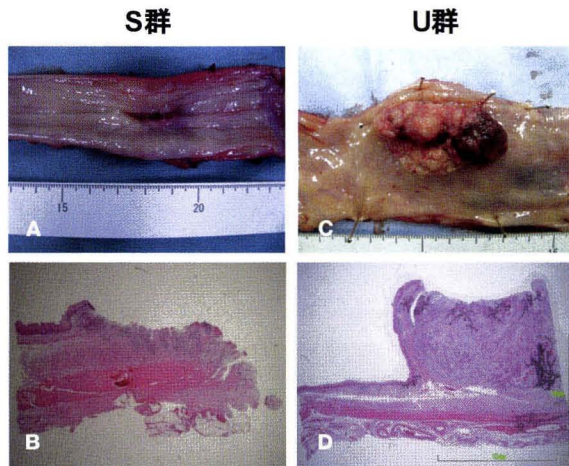


図6 腫瘍の形態学的検討

A, C: 摘出標本 (A: S群, C: U群). B, D: HE 標本 (B: S群, D: U群). S群の切除標本では隆起型の腫瘍を形成するものは少なく, 28例中23例が粘膜面から深部方向への深掘れ潰瘍を形成していた. U群の腫瘍は粘膜面から隆起する部分を有するものが多く, 潰瘍を形成していても潰瘍底が粘膜面よりも高いものが31例中24例であった.

CD34 に対する免疫染色と, 腫瘍増殖に伴う新生血管に対しより特異的指標とされる CD105 に対する免疫染色を用いて検討した^{20,21,28}.

1. 細胞密度の検討

CRT 後の S 群では間質の著明な線維化が認められた (図 2). 単位面積 (0.054 mm²) あたりの腫瘍細胞数は S 群: 473.31±168.38個, U 群: 699.46±226.51個であり, S 群では細胞密度が有意に低かった ($p < 0.001$) (図 3).

2. 低酸素状態の検討

HIF-1 α 発現は腫瘍細胞の核および細胞質に局在を認めた (図 4 A, B). 陽性率は S 群: 40.11±27.46, U 群: 11.5±13.1であり, S 群で HIF-1 α の有意な発現の増強を認めた ($p < 0.001$) (表 3).

GLUT-1 の発現は細胞膜に局在して認められ (図 4 C, D), その陽性率は S 群で28例中24例 (85.7%), U 群では31例中17例 (54.8%) で, S 群で GLUT-1 発現が有意に増強していた ($p < 0.05$) (表 3).

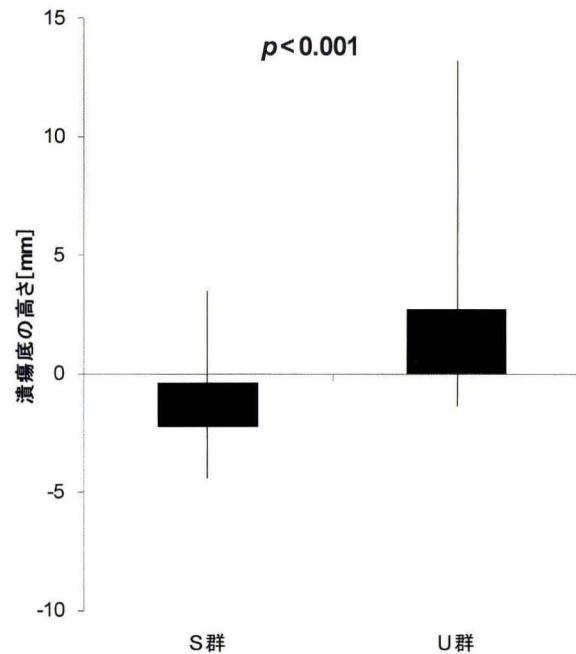


図7 腫瘍潰瘍底の深さの検討

切除標本の HE 標本を用いて, 正常粘膜面からの腫瘍潰瘍底の深さを検討した. S 群: -1.12 ± 1.81 , U 群: 1.67 ± 2.84 ($p = 0.00003$). S 群の腫瘍潰瘍底は U 群に比し深部に位置していた.

3. 血管新生に関する検討

VEGF 発現は細胞質に局在を認めた (図 5 A, B). 陽性率は S 群: 55.29±26.09, U 群: 18.23±16.51であり, S 群で血管新生促進因子である VEGF の発現が有意に増強していた ($p < 0.001$) (表 4).

CD34 (図 5 C, D) および CD105 (図 5 E, F) により標識された血管は腫瘍内および腫瘍間質にその局在を認めた. CD34 免疫染色における単位面積 (0.056 mm²) あたりの MVD は S 群: 83.0±16.97, U 群: 91.26±30.05 ($p = 0.19$) であり, 両群に有意差は認めなかったが, 腫瘍増殖に伴う新生血管に特異的な CD105 免疫染色では, 単位面積 (0.86 mm²) あたりの MVD は S 群: 20.15±7.43, U 群: 39.18±18.14 ($p < 0.001$) であり, S 群では有意に新生血管の発現が減少していた (表 4).

検討3：腫瘍潰瘍底の深さに関する評価

CRT後の遺残・再発腫瘍がみせる高い浸潤性に関して形態学的に腫瘍の形成する潰瘍底の深さに関して検討した。

S群の切除標本では粘膜面から上に隆起する腫瘍部分は極めて少なく、28例中23例(82.1%)が粘膜面から下に掘れ、かつ周堤を伴わない深い潰瘍を形成していた(図6 A, B)。一方、U群の腫瘍は粘膜面から隆起する部分を有し、深い潰瘍を形成していても結果的に潰瘍底が粘膜面よりも高いものが31例中24例(77.4%)であった(図6 C, D)。切除標本における腫瘍潰瘍底の正常粘膜面からの高さはS群： -1.12 ± 1.81 mm, U群： 1.67 ± 2.84 mm ($p=0.00003$)であり、S群の潰瘍底はU群に比し有意に深部に位置し、しかも多くが粘膜面よりも低い位置にあった(図7)。

考 察

根治的CRTは、食道温存療法や切除不能進行症例に対する治療として有用かつ期待される治療法である。しかし、その恩恵は限定された症例にのみ認められ、治療抵抗性の遺残症例やCR後の局所再発症例に対しては可能であれば積極的にsalvage手術で救済する必要がある。salvage手術のリスクや困難性は周知のとおりで⁸、それはCRT後も生存し得た癌細胞が対象であることと、その周囲瘢痕組織の特殊な環境に要因があると考えられる。

根治的CRT後遺残・再発腫瘍の臨床的な易浸潤性と易穿孔性を考慮すると、当然癌細胞の増殖活性、浸潤能は高いと推測される。しかし、Ki-67-PIでみた増殖活性およびE-CDでみた細胞間の接着性では、いずれも無治療群に比し有意差を認めなかった($p=0.89$ および $p=0.38$)。諸家の報告でもKi-67-PIが高いとする報告は認められず^{14,29,30}、細胞分裂能に関しては通常の腫瘍と同等といえた。また、低酸素下ではCarbonic anhydrase IX (CA IX)を介しE-CDの発現が減弱するとの報告もあるが³¹、細胞の接着性に関してもCRT後で減弱するという事実は認めず、CRT後遺残・再発腫瘍においても増殖性と浸潤性に関しては通常の腫瘍よりも高いという事実は認められなかった。

癌組織における微小環境の特徴として低酸素、低pH、低栄養(低グルコース)、高乳酸などがある^{32,33}。癌細胞は無秩序に増殖し、腫瘍増殖に血管新生が追い付かず、癌組織内における不完全な血管網の発達に加え、間質増生に伴う組織内圧の上昇がoccurり、癌細胞巢の一部は低酸素状態となる。低酸素状態となるとHIF-1などのシグナル伝達系により低酸素

環境への適応能力を獲得する。HIF-1は転写因子の一種であり、HIF-1 α とHIF-1 β の二つのサブユニットから構成される。HIF-1 β は多くの細胞において恒常的に発現しているが、HIF-1 α は酸素濃度によりその蛋白量が厳密に調節されている²⁵。通常の酸素濃度下ではHIF-1 α はprolyl-hydroxylaseなどによる翻訳後修飾(水酸化)をうけ、癌抑制遺伝物質であるvon-Hippel Lindau (pVHL)と結合してユビキチン経路を介して分解される^{26,27}。低酸素環境下ではHIF-1 α は水酸化されずに安定化し、核内に移行してHIF-1 β と結合することで転写因子として働く。この働きによりGLUT-1などのグルコース輸送蛋白やVEGFなどの血管新生因子、嫌気性糖代謝機構に関与する解糖系酵素、血管拡張因子などの遺伝子群の活性化が促進され、低酸素に適応する機構が働き低酸素環境への適応性と治療抵抗性を獲得する^{19,24}。今回検討のCRT後の遺残・再発腫瘍では、腫瘍およびその周囲組織において動静脈および毛細血管の血管内皮の腫大、血管内腔の線維化と狭小化、間質の著明な線維化が更に加わり^{22,23}、より一層過酷な低酸素環境が形成されると考えられる。本研究においても、CRT後の遺残・再発腫瘍は、腫瘍間質の著明な線維化と細胞密度の低下($p=0.00005$)と共に、HIF-1 α の発現は平均で4倍近い著明な増強を認め($p=0.000018$)、同時にその下流遺伝子であるGLUT-1、VEGFは転写が促進され、その発現の増強を認めた($p=0.01$ および $p=0.000000069$)。このことからCRT後の遺残・再発腫瘍では、HIF-1 α やGLUT-1を高発現させてCRT後の低酸素環境に対する適応性を獲得し、腫瘍の周囲組織の一部に対してはVEGFを誘導することで少ないながらも血管新生を促進し、過酷な環境下でも増殖する能力を獲得していくと考えられた。

一方、腫瘍周囲環境の血管密度(MVD)に関する評価では、CRT後の遺残・再発腫瘍においては高いVEGFの発現にもかかわらず、血管の増生は認められなかった。CD34は腫瘍増殖に非特異的な新生血管や小型の毛細血管の指標として²⁰、CD105(Endoglin)は腫瘍増殖に特異的に新生した微小血管の標識として^{20,21,28}評価したが、CRT後遺残・再発腫瘍ではCD34によるMVDで両群間に有意差を認めず($p=0.19$)、CD105で標識される幼弱な新生血管数は著明に減少していた($p=0.0000035$)。放射線治療は腫瘍間質の動静脈および毛細血管の血管内皮の腫大や血管内腔の線維化と狭小化を惹起するとされ³⁴、Jangら³⁵は、陽子線により誘導された活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)による血管細胞障害により血管新生が抑制されたと報告してい

る。本研究でも、CRT 後の遺残・再発腫瘍は HIF-1 α と VEGF を発現し周囲環境を変えようとしているが、まったくそれに反応していない状況であり、VEGF receptor の発現低下や機能不全、あるいは癒痕による間質の mediator cell の欠落などの問題が推測される。詳細は今後の研究を待たなければならないが、CRT 後遺残・再発腫瘍は血管新生が抑制された環境下で発育、増殖していることが明らかとなった。

しかし、以上の検討でも、腫瘍細胞自体の悪性度の面から CRT 後遺残・再発腫瘍の臨床的な易浸潤性・易穿孔性を説明することはできない。CRT 後の切除標本を用いた検討では、腫瘍細胞は非奏効例では全層にわたり遺残し、奏効例では表面から正常粘膜が被覆し、多くは筋層や外膜といった深層に遺残する^{36,37}。通常の腫瘍は粘膜から発生して増殖するが、CRT 後の遺残・再発腫瘍は粘膜面ではなく、食道壁深層から発生するため、増殖中心は通常の腫瘍に比べ深部にあると考えられる。我々は正常粘膜面を基準に腫瘍潰瘍底の深さを比較したが、CRT 後遺残・再発腫瘍の潰瘍底は有意に深く ($p=0.00003$)、82.1%が粘膜面より低く、周堤を伴わない深掘れ潰瘍であった。CRT 後遺残・再発腫瘍では間質の著明な線維化と血管新生の抑制という環境下での増殖により、腫瘍の中心壊死から隆起型の腫瘍塊を形成し難く、深い潰瘍を形成する。腫瘍は増大と壊死を繰り返すことでさらに深い潰瘍を形成するが、腫瘍の内部壊死により増殖中心は常に食道壁深部の腫瘍先進部に位置する。先進部では、中心方向への増殖は壊死により脱落するため、主に外側方向への進展性を示し、周囲組織への浸潤速度は加速され、周囲組織・臓器へ容易に浸潤や穿孔を来すと考えられる。つまり、CRT 後遺残・再発腫瘍の易浸潤性・易穿孔性は、腫瘍自身の増殖活性や浸潤性の亢進によるものではなく、腫瘍増殖が食道壁深部から始まり、血管新生抑制による中心壊死により増殖中心が先進部へ移動し、外側に向かって増殖することにあると考えられる。

以上、根治的 CRT 後遺残・再発腫瘍は、線維性の低酸素状態で生残し、かつ増殖する能力を獲得するが、血管新生の抑制された環境下で腫瘍は中心の壊死・脱落を伴って深い潰瘍を形成しつつさらに深部へ浸潤する傾向があることが、臨床的に認識する高い悪性度の原因と考えられた。したがって、進行癌での壁深達度診断では、潰瘍底の主座と隣接する臓器との位置関係を考慮に入れ、周囲臓器と最も強く接している腫瘍部分が潰瘍底の主座と一致する場合には、画像所見以上に達達していると評価する必要

があり、一段階深く深達度を診断すべきと考える。しかし、現段階においては、その悪性度の高さが再認識されたにとどまり、CRT 後の遺残例、再発例いづれに対しても、判明次第、早急に外科適応を検討し、可能ならば可及的早急に salvage 手術を施行するのが最善と考える。根治的 CRT は食道温存治療を可能にすると期待が大きいが、一部の pCR 症例以外に対しては腫瘍の悪性度を高め、治癒切除の可能性を逸している場合もあることを認識しなければならない。我々は、今後さらにその病態を解明し、根治的 CRT の適応を含め、総合的に治療戦略を考えていく必要がある。

結 論

根治的 CRT 後遺残・再発腫瘍は、術前未治療の腫瘍細胞と比べ増殖活性および浸潤性に差はなかった。腫瘍周囲の環境は、CRT 後の癒痕化で新生血管の疎な低酸素下にある。このため HIF-1 α の発現やその安定化が促進され、VEGF や GLUT-1 の発現を促進することで低酸素環境への適応性と増殖能を獲得している。しかし、CRT により血管新生は抑制され、腫瘍増大とともに中心は壊死を来し、深い潰瘍を形成する。腫瘍は食道壁内の遺残細胞から増殖し、増大と壊死を繰り返して深い中心潰瘍を形成するため、増殖活性は常に腫瘍辺縁部の先進部に位置することになり、さらに増殖することで周囲への浸潤が加速され、穿孔に至ると考えられた。根治的 CRT 後遺残・再発腫瘍の易浸潤性に代表される高い悪性度は、腫瘍周囲の血管新生の抑制された環境と、腫瘍の増殖中心が食道壁深部にあることが大きな要因である可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究にご協力頂きました近畿大学医学部外科学教室の諸先生方、ならびに実験助手の鎌田房子女史に心より感謝致します。

本研究の要旨は平成20年10月、第67回日本癌学会学術総会(名古屋)で発表した。

文 献

1. Hironaka S, Ohtsu A, Boku N, Muto M, Nagashima F, Saito H, Yoshida S, Nishimura M, Haruno M, Ishikura S, Ogino T, Yamamoto S, Ochiai A (2003) Nonrandomized comparison between definitive chemoradiotherapy and radical surgery in patients with T(2-3) N(any) M(0) squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 425-433
2. Chan A, Wong A (1999) Is combined chemotherapy and radiation therapy equally effective as surgical resection in localized esophageal carcinoma? *Int J Radiat*

- Oncol Biol Phys Sep 45: 265-270
3. Kleinberg L, Gibson MK, Forastiere AA (2007) Chemoradiotherapy for localized esophageal cancer: regimen selection and molecular mechanisms of radiosensitization. *Nat Clin Pract Oncol* May 4: 282-294
 4. Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, Pisansky TM, Martenson J, Komaki R, Okawara G, Rosenthal SA, Kelsen DP (2002) 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* Mar 20: 1167-1174
 5. Murakami Y, Kenjo M, Uno T, Oguchi M, Shimada M, Teshima T and Cancer, Japanese Patterns of Care Study Working Subgroup for Esophageal (2007) Results of the 1999 2001 Japanese patterns of care study for patients receiving definitive radiation therapy without surgery for esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* Jul 37: 493-500
 6. Shinkai M, Yasuda T, Kiyokawa A, Takemoto T, Yasuda A, Hou H, Hirai N, Imano M, Imamoto H and Shiozaki H (2007) Indication and limit of salvage esophagectomy after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Jpn J Clin* 53: 605-610
 7. Fujita, H (2004) Present status of esophageal cancer and its treatment in Japan. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* Jun 10: 135-139
 8. Swisher SG, Wynn P, Putnam JB, Mosheim MB, Correa AM, Komaki RR, Ajani JA, Smythe WR, Vaporciyan AA, Roth JA, Walsh GL (2002) Salvage esophagectomy for recurrent tumors after definitive chemotherapy and radiotherapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* Jan 123: 175-183
 9. Nakamura T, Hayashi K, Ota M, Eguchi R, Ide H, Takasaki K, Mitsuhashi N (2004) Salvage esophagectomy after definitive chemotherapy and radiotherapy for advanced esophageal cancer. *Am J Surg* Sep 188: 261-266
 10. Japanese Society for Esophageal Diseases Guidelines for the Clinical and Pathologic Studies on Carcinoma of Esophagus. Tokyo: Japanese Society for Esophageal Diseases, 10th edn. (2007)
 11. Hasui K, Murata F (2005) A new simplified catalyzed signal amplification system for minimizing non-specific staining in tissues with supersensitive immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol* 68: 1-17
 12. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* Nov 59: 5830-5835
 13. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA (1998) The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. *Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. J Clin Pathol* Jul 51: 506-511
 14. Doki Y, Takachi K, Ishikawa O, Sasaki Y, Miyashiro I, Ohigashi H, Yano M, Ishihara R, Tsukamoto Y, Nishiyama K, Ishiguro S, Imaoka S (2005) Reduced tumor vessel density and high expression of glucose transporter 1 suggest tumor hypoxia of squamous cell carcinoma of the esophagus surviving after radiotherapy. *Surgery* May 137: 536-544
 15. Sakurai K, Hata S, Amano S, Fukuzawa M (1999) Immunohistochemical study of p16MTS1/INK4a and Ki-67 expression in esophageal squamous cell carcinomas. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* Jan 96: 8-13
 16. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M (1991) Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* Jul 139: 17-23
 17. Kato H, Takita J, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Ojima H, Tsukada K, Kuwano H, Oriuchi N, Endo K (2003) Correlation of 18-F-fluorodeoxyglucose (FDG) accumulation with glucose transporter (Glut-1) expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* Jul-Aug 23: 3263-3272
 18. Koide N, Nishio A, Kono T, Yazawa K, Igarashi J, Watanabe H, Nimura Y, Hanazaki K, Adachi W, Amano J (1999) Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 46: 952-958
 19. Kimura S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Hihara J, Yoshida K, Toge T, Chayama K (2004) Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha is associated with vascular endothelial growth factor expression and tumour angiogenesis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* Aug 40: 1904-1912
 20. Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF (2005) Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol* Sep 36: 955-961
 21. Ishimaru E, Imano M, Okuno K, Shiozaki H, Ohyanagi H (2007) Local Existence of Osteopontin Positive Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Cancer Stroma as Risk Factors of Postoperative Hepatic Metastasis. *Jpn J Gastroenterol Surg* 40: 695-704
 22. Sasai K (2005) Cancer treatment and tumor microenvironments, especially hypoxic condition. *Jpn J Cancer Clin* 51: 353-358
 23. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G (1994) Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. *Clinicopathologic correlations. Cancer* Jun 73: 2680-2686
 24. Fang J, Yan L, Shing Y, Moses MA (2001) HIF-1 alpha-mediated up-regulation of vascular endothelial

- growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res* Aug 61 : 5731-5735
25. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* Jan 12 : 149-162
26. Maynard MA, Ohh M (2007) The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cell Mol Life Sci* Aug 64 : 2170-2180
27. Mabeesh NJ, Amir S (2007) Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol* May 22 : 559-572
28. Bellone G, Solerio D, Chiusa L, Brondino G, Carbone A, Prati A, Scirelli T, Camandona M, Palestro G, Dei Poli M (2007) Transforming growth factor-beta binding receptor endoglin (CD105) expression in esophageal cancer and in adjacent nontumorous esophagus as prognostic predictor of recurrence. *Ann Surg Oncol* Nov 14 : 3232-3242
29. Imdahl A, Bogner G, Schulte-Mönting J, Schöffel U, Farthmann EH, Ihling C (2002) Predictive factors for response to neoadjuvant therapy in patients with oesophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* Apr 21 : 657-663
30. Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M (2003) 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* Aug 10 : 792-800
31. Svastová E, Zilka N, Zat'ovicová M, Gibadulinová A, Ciampor F, Pastorek J, Pastoreková S (2003) Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res* Nov 290 : 332-345
32. Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M (2003) Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci* Dec 94 : 1021-1028
33. Weinmann M, Belka C, Plasswilm L (2004) Tumor hypoxia: impact on biology, prognosis and treatment of solid malignant tumours. *Onkologie* Feb 27 : 83-90
34. 荻野 尚, 落合淳志 (2004) 放射線医学と病理学. 病理と臨 22 : 409-418
35. Jang GH, Ha JH, Huh TL, Lee YM (2008) Effect of proton beam on blood vessel formation in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Arch Pharm Res* Jun 31 : 779-785
36. Yamamoto M, Doki Y, Shiozaki H, Yano M, Miyata H, Tamura S, Fujiwara Y, Yasuda T, Tanaka E, Inoue T, Monden M (2000) Evaluation of the histologic effect of chemoradiation therapy for squamous cell carcinomas of the esophagus by assessing morphologic features of surgical specimens. *Dis Esophagus* 13 : 293-300
37. Yang Q, Cleary KR, Yao JC, Swisher SG, Roth JA, Lynch PM, Komaki R, Ajani JA, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT (2004) Significance of post-chemoradiation biopsy in predicting residual esophageal carcinoma in the surgical specimen. *Dis Esophagus* 17 : 38-43