

## 78. 消化器癌における補体発現と Wnt 系分子異常の解析

中島 政信

獨協医科大学 第一外科学講座

Key words : C1q, C4d, Wnt シグナル伝達系, 食道癌

### 緒言

Wnt シグナル伝達系は細胞の増殖、分化、形態発生を制御する生体にとって極めて重要な役割を担っているシグナル伝達経路であり、これまで多くの研究によって  $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、APC、Tcf など多くの Wnt 系遺伝子の異常が癌化にかかわることが証明されている。我々は、過去に Wnt シグナル伝達系の scaffold protein である Axin の異常が食道癌の進展に関わることを報告してきた<sup>1)</sup>。一方、異物に対する免疫を担う第一捕体である C1 は C1q、C1r、C1s の3つの成分で構成されている複合体であるが、このうち C1q が Wnt レセプターである Frizzled に結合することによって Wnt シグナル伝達系を活性化し、老化にかかわることが最近になって証明され、老化に関連する腫瘍発生にも関係する可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。現在までのところ Barrett 食道癌及び食道腺癌での C1q 発現に関する報告を認めるものの、C1q の発現減弱が Barrett 上皮の形成から腺癌の形成にかかわるといふものであり、Wnt シグナル伝達系との関係については明らかにされていない。それ以外の消化管癌における補体の関与に関する報告は皆無である。しかし、消化管癌が悪性新生物に占める割合は高く、更なる治療成績の改善が必要とされる疾患である。この領域では Wnt シグナル伝達系の異常に関する報告も多く、この経路に関する治療法が開発されれば、飛躍的に治療成績が向上する可能性を秘めている。本研究では、消化器癌のうち、新規治療薬の開発面でやや遅れをとっている食道癌において、補体が腫瘍に及ぼす影響を調べるため、組織標本および血液検体を用いた研究を行ったので報告する。

### 方法および結果

#### 1. C1q の発現と発癌および進展について

C1q は、C1qrs 複合体を形成すると古典的経路の活性化とは別の独立した経路で Wnt シグナル伝達系を活性化し発癌に関わるとされている。食道癌組織中における C1q の発現を免疫組織染色により検討し、臨床病理学的因子および予後等との相関を検討した。

術前化学療法あるいは化学放射線療法を施行されていない食道癌（扁平上皮癌）症例 95 例を対象とした。性別は男性：女性 = 79 例：17 例で、年齢中央値は 69 歳（40–86 歳）であった。臨床病理学的各因子は、pT1：2：3：4 = 42 例：11 例：38 例：4 例であり、pN0：1 または 2 = 59 例：36 例、pM0 = 95 例、pStage0：I：II：III = 3 例：43 例：19 例：30 例であった。免疫組織染色では主に間質が染色された（図 1）。

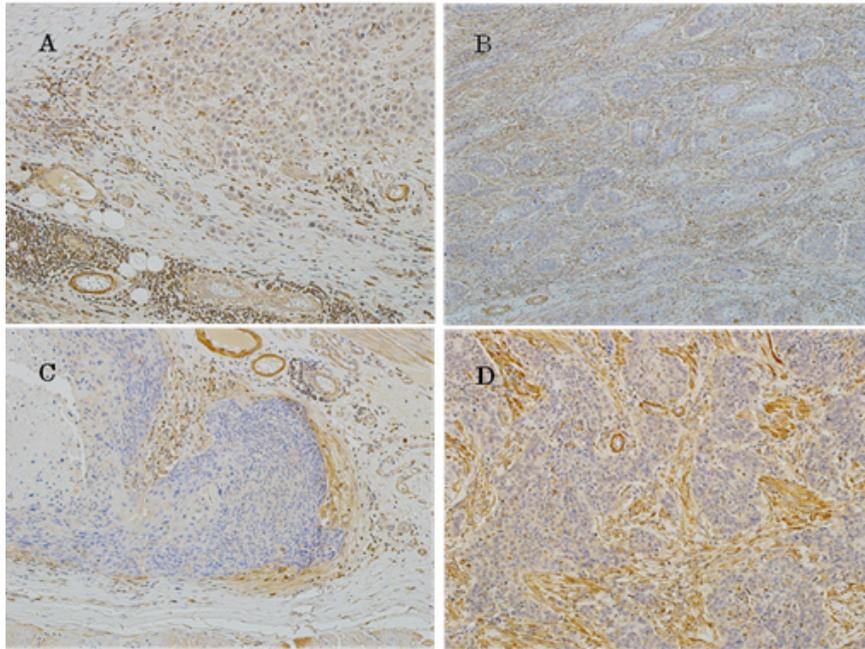


図1. 食道癌組織における C1q 発現の免疫染色画像

A) 0: 染色が全く認められないもの、B) 1: 薄く染色を呈するもの、C) 2: 1 または 3 に当てはまらず、1 以上に濃く染色されるもの、D) 3: 血管内皮細胞と同程度の染色を呈するもの。  
(ABCD すべて×100)。

同一プレパラート内の血管内皮細胞を positive control とし、腫瘍細胞周囲の間質の染色強度を、0: 染色が全く認められないもの、1: 薄く染色を呈するもの、2: 1 または 3 に当てはまらず、1 以上に濃く染色されるもの、3: 血管内皮細胞と同程度の染色を呈するもの、の 4 段階に分類した。さらに、0 または 1 を染色 negative、2 または 3 を染色 positive として統計学的検討を行った。しかしながら、C1q 発現状況と深達度、リンパ節転移状況、脈管侵襲の程度、進行度などの臨床病理学的因子との相関は認められなかった。

ELISA 法にて食道癌患者 40 例の血清中の C1q 濃度の測定を施行し、ROC 曲線を作成して cut off 値 (2.2 ng/ml) を設定し、臨床病理学的各因子との統計学的検討を行った (表 1)。この検討の結果では、血中 C1q 濃度と静脈侵襲に統計学的有意差が認められた ( $p = 0.011$ )。

表 1. 食道癌患者の血清 C1q 濃度と臨床病理学的因子の関係

Factor	Serum C1q concentration, n		p-value
	Low (<2.2ng/ml) n=21	High (≥2.2ng/ml) n=19	
Age (years)	67.1±9.26	68.5±8.87	0.502
Gender			0.039
Male	20	13	
Female	1	6	
Depth			0.397
T1	6	8	
T2	2	5	
T3	12	5	
T4	1	1	
Lymph node metastasis			0.133
Absent	14	17	
Present	7	2	
Lymphatic invasion			0.445
Absent	12	14	
Present	9	5	
Venous invasion			0.011
Absent	4	12	
Present	17	7	
Stage			0.338
0	0	2	
I	6	6	
II	10	3	
III	5	8	

Chi square test および Unpaired Student's t-test を使用

## 2. 補体活性の分解産物である C4d の発現と発癌および進展について

C1q の検討では有意な結果を得るには至らなかったが、次に補体活性後の分解産物である C4d について検討を行った。補体は、古典的経路、マンノース結合レクチン経路、副経路の 3 経路で活性化され、C3 に収束して膜侵襲複合体 (Membrane Attack Complex ; MAC) を形成して異物を攻撃する。補体 C4b は、I 因子による分割で生成される不活性化フラグメントであり、C1qrs 複合体から始まった補体活性化に伴い、C4d へと分解される。C4d は周囲組織とチオエステル結合を形成して組織へ沈着し、他の補体および補体分解産物に比べて流出しにくく、組織中に長く定着する。そのため残存しやすく、補体活性および免疫複合体の免疫学的証拠として有用であるとされている。

術前に化学療法または化学放射線療法を施行していない食道切除症例 114 例 (食道扁平上皮癌) を対象とした。手術摘出検体を用いて補体分子 C4d の免疫組織染色を行い、最深部を含む標本での癌細胞巢の C4d の発現の有無を評価し

た。同一切片内の、基底細胞層の染色強度と同等以上に染色されるものを染色陽性、それ以外のものを染色陰性とし、2群に分けて染色結果と臨床病理学的因子および予後について retrospective に検討を行った (図2)。

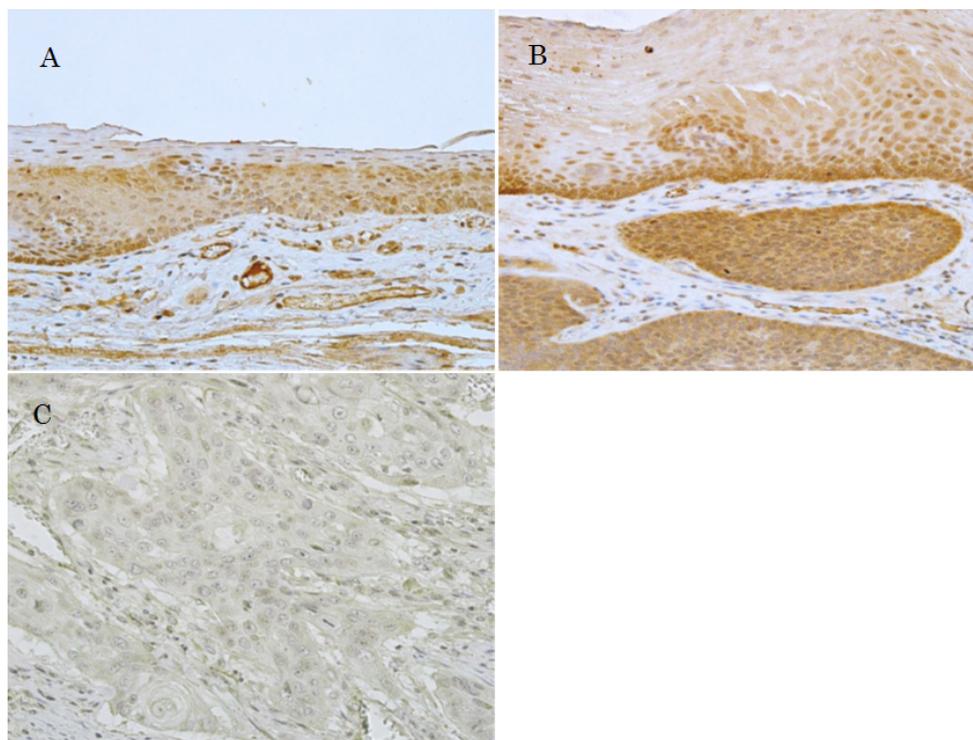


図2. 食道癌組織における C4d 発現の免疫染色画像

A) 正常組織における C4d 発現状況、B) 癌組織における染色陽性例、C) 癌組織における染色陰性例。

(ABC すべて  $\times 100$ )。

性別は男性：女性 = 97 例：17 例であった。年齢中央値は 69 歳 (40–86 歳)。臨床病理学的各因子は、pT1：2：3：4 = 52 例：11 例：45 例：6 例、pN (-)：(+) = 69 例：45 例、pM0 = 114 例、pStage0：I：II：III = 4 例：49 例：22 例：39 例であった。統計学的検討では、C4d の発現が弱い群で深達度 ( $p = 0.0001$ )、リンパ節転移 ( $p = 0.011$ )、リンパ管侵襲 ( $p = 0.033$ )、進行度 ( $p = 0.0021$ ) が有意に高度であった。その他の臨床病理学的因子との相関は認められなかった (表2)。また、C4d の発現陰性は予後が悪くなる傾向はあるものの、有意差は認められなかった<sup>3)</sup>。

表 2. 食道扁平上皮癌組織中の C4d 発現と臨床病理学的因子

Factor	C4d expression, n		p-value
	Negative n=44	Positive n=70	
Age (years)	67.6±7.75	68.3±9.03	0.688
Gender			0.795
Male	37	60	
Female	7	10	
Location			0.001
Upper	0	11	
Middle	19	38	
Lower	25	21	
Depth			0.0001
T1	9	43	
T2	7	4	
T3	24	21	
T4	4	2	
Lymph node metastasis			0.011
Absent	20	49	
Present	24	21	
Lymphatic invasion			0.033
Absent	18	44	
Present	26	26	
Venous invasion			0.077
Absent	12	31	
Present	32	39	
Stage			0.0021
0	0	4	
I	11	38	
II	12	10	
III	21	18	

Chi square test および Unpaired Student's t-test を使用

## 考 察

これまで Wnt シグナル伝達系の異常が様々な癌に関与することが解明されてきたが、近年になり Wnt 系の異常に補体 C1q がかわる可能性が指摘されたため、本研究を施行した。本研究からは、食道癌において C1q 発現と腫瘍の進展について有意な結果は得られなかった。しかしながらその補体活性の分解産物である C4d について検討を行ったところ C4d が高発現な群では癌の進展が比較的軽度であった。これらの結果からは、C1q の Wnt 系を介しての癌の進展への関与は明らかとはならなかった。しかしながらそれ以前の発生の段階にかかわる可能性については否定できない

ものと思われた。また C4d の癌への関与は C1q とは異なる経路を介している可能性が示唆されたが、確信を得るに至らず、現在は C1q の発癌へのかかわり、Wnt 系分子とのかかわりについて引き続き検討中である。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、獨協医科大学第一外科の加藤広行教授および菊池真維子である。本稿を終えるにあたり、本研究に多大なるご支援を頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H. Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;88(11): 1734-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6600941. PubMed PMID: 12771989
- 2) Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, et al. Complement C1q Activates Canonical Wnt Signaling and Promotes Aging-Related Phenotypes. *Cell*. 2012;149(6):1298-313. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.047. PubMed PMID: 22682250
- 3) Kikuchi M, Nakajima M, Muroi H, Takahashi M, Itoh J, Yamaguchi S, Sasaki K, Kato H. Significance of Expression of Complement C4d in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2016 Sep;36(9): 4553-7. doi: 10.21873/anticancerres.11003. PubMed PMID: 27630295