

食道上皮および食道表在癌における低親和性神経成長 因子受容体 p75^{NGFR} の発現

—食道上皮の再生維持, 発癌過程におけるその役割を巡って—

星 野 澄 人

東京医科大学外科学第三講座

(指導: 小柳泰久主任教授)

【要旨】 低親和性神経成長因子受容体 p75^{NGFR} の非神経組織での局在は未だ解明されていない。本研究では、食道上皮における p75^{NGFR} の発現を、食道表在癌 24 例を用いて免疫組織学的に観察し、食道上皮の再生維持および発癌過程におけるその役割を検討した。

正常食道上皮では 24 例全例で p75^{NGFR} 陽性細胞が観察され、その局在は基底層の一部に局限していた。食道上皮における p75^{NGFR} 陽性細胞は、Ki-67 陰性で、その一部は bcl-2 陽性の性質を合わせ持っており、食道上皮における幹細胞である可能性が示唆された。dysplasia でも基底層に p75^{NGFR} 陽性細胞が観察され、また癌部においても全例で p75^{NGFR} 陽性所見が観察されたが、癌の進行に伴いその発現は減弱する傾向にあった。

以上の結果、食道癌の発癌過程において、p75^{NGFR} 陽性細胞の観察は重要であると考えられた。

はじめに

上皮組織は、細胞死により失われた細胞がある一定の構造・機能を持った細胞で補充されることにより保持され、その再生維持の元となる細胞は、一応幹細胞と考えられている。幹細胞は組織の維持に必須である一方で、長期間生存し続ける性質から発癌刺激が蓄積しやすく、発癌の target cell としても重要と考えられている¹⁾。従って、組織中の幹細胞と目される細胞の観察は、正常の再生あるいは創傷治癒時の再生を含めた非腫瘍性の増殖を考える上で重要であるとともに、発癌母細胞を観察するという点からも重要と考えられる。

Kunimura ら²⁾ は、子宮頸部上皮に神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) の低親和性受容体である p75^{NGFR} を強く発現している細胞集団が、ある特定の領域に存在することを指摘している。また、

p75^{NGFR} 陽性細胞は、上皮組織基底層にまばらな細胞集団として局在し、Ki-67 陰性、bcl-2 蛋白陽性など幹細胞候補として種々の特性を備え、子宮頸部組織における幹細胞である可能性が示唆された、と報告している。

食道癌は、アルコール、煙草などといった外来因子との関連が指摘されているように、その多くは化学発癌と考えられている。従って、食道癌の発癌過程において、発癌刺激の target cell である幹細胞の性質を有する細胞の観察は極めて重要である。しかしながら、我々が調べる限りでは、食道上皮および食道癌における p75^{NGFR} に関する検討は、森田ら³⁾ の報告があるのみでその実態は未知である。このため本研究では、食道扁平上皮における p75^{NGFR} 陽性細胞の発現およびその局在分布を明らかにし、増殖細胞の分布との関連が子宮頸部扁平上皮領域の場合と同様であるかを観察し、p75^{NGFR} が食道上皮にお

2000年5月9日受付, 2000年6月20日受理

キーワード: p75^{NGFR}, 食道癌, Ki-67, bcl-2, 幹細胞

(別刷請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学外科学第三講座 星野澄人)

いて幹細胞の指標となり得るか否かを検討した。また同時に、癌部においても p75^{NGFR} 陽性細胞の発現およびその局在分布を観察し、食道癌発生過程での p75^{NGFR} 陽性細胞の役割を検討した。

対象および方法

1. 対象

1994年1月から1997年4月までの間に、神奈川県立がんセンター外科第1科において切除された術前未治療の食道表在癌24例を対象とした。性別は、男性22例、女性2例であり、平均年齢は61.2±7.2歳であった。食道癌の臨床病理学的因子は食道癌取扱規約第9版⁴⁾に基づいた。腫瘍占居部位は全例胸部食道で、組織型は全て扁平上皮癌であり、高分化型2例、中分化型17例、低分化型5例であった。深達度は、pT1a: 7例 (m2; 1例, m3; 6例), pT1b: 17例 (sm1; 4例, sm2; 5例, sm3; 8例) であった。

また、dysplasia は細胞・核異型および組織異型の両者より食道癌取扱規約に準じて判定し、24例中19例で、1病変以上の dysplasia が同定された。

2. 方法

全症例で、食道切除全割標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより各3μmの連続切片を作製し、抗 p75^{NGFR} 抗体 (DAKO 社製, 抗体50倍希釈), 抗 bcl-2 抗体 (DAKO 社製, 抗体40倍希釈), 抗 Ki-67 抗体 MIB-1 (Immunotech 社製, 抗体50倍希釈) の各マウスモノクローナル抗体を一次抗体とした免疫組織化学染色と、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とを行った。また、免疫組織化学染色で一次抗体以外の試薬および二次抗体等は、ヒストファイン SAB-PO (M) キット (株式会社ニチレイ製) を使用した。標本数は、それぞれ合計で610切片、1症例あたり平均25.4切片となった。

1) 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色には、streptavidin-biotin complex (SAB) 法を用いた。まず、パラフィン包埋ブロックの薄切標本をキシレンにて脱パラフィンし、アルコールを用い水になじませた後、流水で洗浄した。その後、純メタノール+30% H₂O₂の混合液にて室温で30分インキベートさせ、内因性ペルオキシターゼの不活性化を行った。PBSで洗浄後、抗原賦活のため、90度以上に加温した10mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中に一時間置いた。非特異反応の

ブロッキングはPBSで洗浄後、10%ウサギ正常血清を室温で15分間反応させて行った。その後、前述の各抗体を一次抗体として室温で一時間反応させ、0.5% Tween 20加PBSで洗浄後、ビオチン標識抗マウス IgG + IgA + IgM 抗体を二次抗体として用い室温で10分間反応させた。0.5% Tween 20加PBSにて洗浄した後、酵素試薬 (ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン) と室温で5分間反応させ、再び0.5% Tween 20加PBSにて洗浄し、H₂O₂加ジアミノベンチジン溶液を用いて発色させた。次に、マイヤーヘマトキシリン溶液にて単染色し、ヘマトキシリンの色出し後、型通りに透徹、封入した。

2) 判定

染色の判定は光顕的に行った。組織標本上で、抗 p75^{NGFR} 抗体染色、抗 Ki-67 抗体 MIB-1 染色、抗 bcl-2 抗体染色のそれぞれについて、上皮あるいは癌細胞巢の20%以上の細胞が染色される場合を陽性とし、陽性細胞存在範囲を切除標本写真上に図示した。

各抗体において個々の陽性範囲の割合は、薄切標本上で正常上皮、dysplasia、癌部を個別に、各部の全体に対する陽性細胞存在範囲として、その二次元的な広がりをもとに症例ごとに百分率にて算出した。

結 果

1. 組織所見

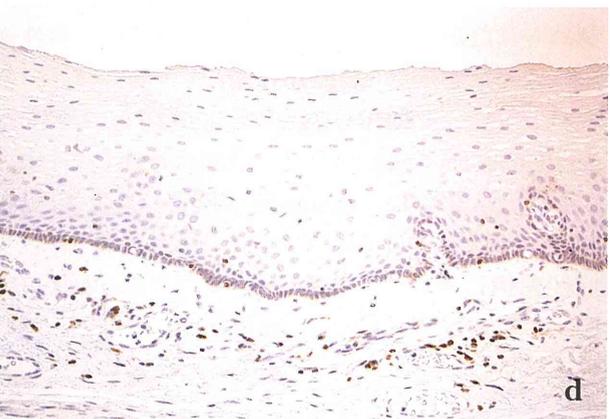
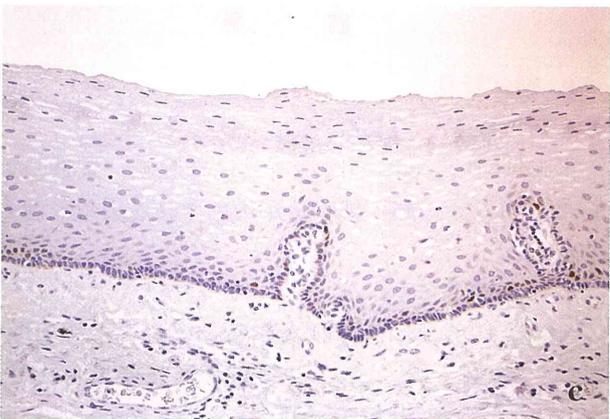
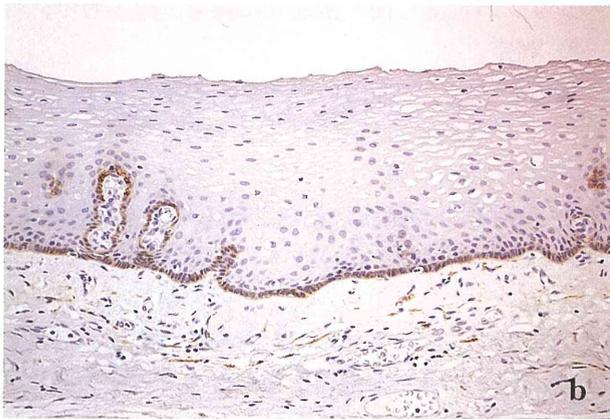
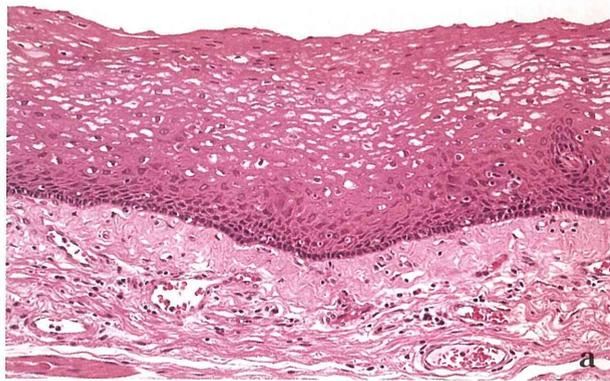
1) 抗 p75^{NGFR} 抗体染色

p75^{NGFR} 陽性細胞の陽性所見は細胞膜一致性の染色像であり、一部に細胞質が染色される細胞も認められた。

(1) 非癌部

食道癌切除標本における非癌上皮部 (正常上皮) では、24例全例に p75^{NGFR} 陽性の所見がみられた。p75^{NGFR} 陽性細胞は基底細胞および食道導管を形成する細胞に限局しており、まばらな細胞集団として認められたが、基底細胞より表層の細胞には陽性細胞は認めなかった (Fig. 1b)。p75^{NGFR} 陽性範囲の割合は、31.4 ± 22.6 %で、炎症が目立つ部位や papillomatosis の部位ではその発現は増強していた。

dysplasia 部では、dysplasia が観察された19例中14例 (73.7%) に p75^{NGFR} 陽性の所見を認めたが、同一症例に複数の dysplasia 病変が存在する場合、必ずしも全病変に p75^{NGFR} 陽性細胞が観察されるわけではなかった。p75^{NGFR} 陽性細胞は正常上皮と類似し基底層に局在しており、正常上皮のそれと比較



し強く発現する傾向にあった (Fig. 2b). また病変の一部で, p75^{NGFR} 陽性細胞が基底層に隣接して2~3層に観察される部分もあり, 基底層に1層のみ観察される正常上皮の場合と異なる点も見られた.

(2) 癌部

癌部における p75^{NGFR} 陽性細胞の発現は, 24例全例に認められた. 癌部における p75^{NGFR} 陽性範囲の割合は $41.6 \pm 18.4\%$ であり, 陽性細胞は正常粘膜との境界部付近に多くみられ, また同一病巣内における染色性は必ずしも一様とは限らなかった. p75^{NGFR} の染色態度は, 癌の深達度により変化が見られるものの, 組織学的分化度による変化は認めなかった.

pT1a 癌部における p75^{NGFR} 陽性所見は, m1あるいはm2 癌部では, 非癌上皮と同じく基底層にのみ強く発現している場合 (7例中5例, 71.4%) と (Fig. 3b), 癌粘膜の全層にわたりびまん性に認める場合 (7例中2例, 28.6%) とがあった (Fig. 4b).

一方, m3 癌部の p75^{NGFR} の発現は m1, m2 癌部に比較して弱く, 癌先進部より表層の癌細胞に強く発現する傾向にあった. 癌先進部における p75^{NGFR} 陽性細胞はびまん性に, あるいは癌胞巣周辺部の細胞にのみ見られることが多く, その陽性所見は淡いものであった.

pT1b 癌部における p75^{NGFR} 陽性所見は表層部主体に, または表層部に限って認められ, 癌先進部では陰性化する傾向にあった. pT1b 癌先進部における癌胞巣の p75^{NGFR} 陽性細胞の発現はないか, あっても比較的弱く, m3 癌部と類似していた (Fig. 5b).

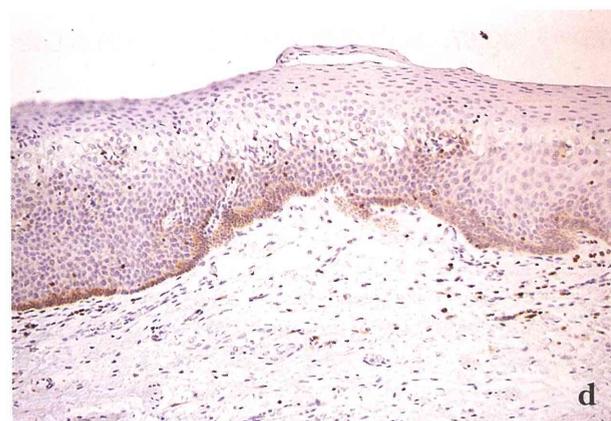
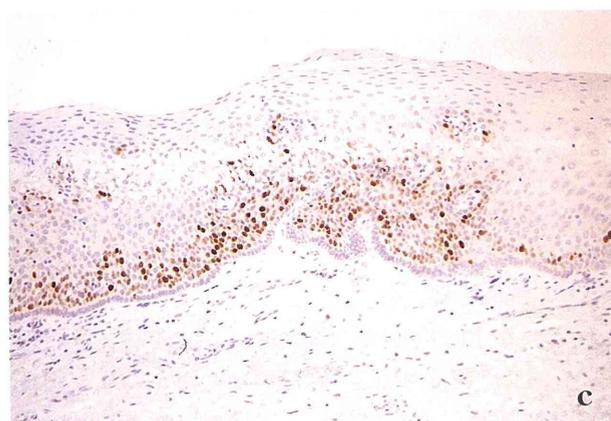
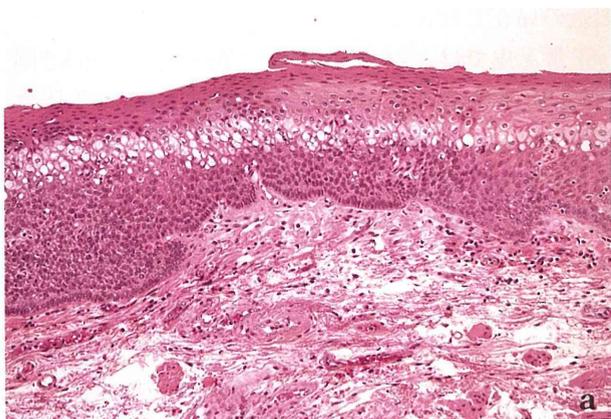
2) 抗 Ki-67 抗体 MIB-1 染色

抗 Ki-67 抗体 MIB-1 陽性細胞の染色像は, 細胞核一貫性に染色されるものであった.

(1) 非癌部

正常上皮では, 24例全例に Ki-67 陽性の所見がみ

Fig. 1 Normal esophageal epithelium (×200). (a) HE staining: Normal esophageal epithelium. (b) p75^{NGFR} immunological staining: The p75^{NGFR}-positive cell populations were segmentally localized in the basal layer of the esophageal epithelium. (c) Ki-67 immunological staining: Proliferative cells were observed in the parabasal layer, and no cells were positive in the basal layer. (d) bcl-2 immunological staining: Weak positivity was observed in the basal cells.



られた。Ki-67 陽性細胞は傍基底層主体に局在し、基底層には陽性細胞はみられず (Fig. 1c), p75^{NGFR} 陽性細胞の存在部位とは異なっていた。正常上皮における Ki-67 陽性範囲の割合は、 $30.7 \pm 19.1\%$ であり、炎症がある部位では Ki-67 陽性細胞の数が増加する傾向にあった。

dysplasia では、19 例中 14 例 (73.7%) で、少なくとも 1 病変以上に Ki-67 陽性所見を認めた。dysplasia における Ki-67 陽性細胞の存在部位は、傍基底層より表層で基底層には認められず、p75^{NGFR} 陽性細胞の場合と異なっており、その発現は正常上皮と比較してよりびまん性に認められた (Fig. 2c)。

(2) 癌部

癌部では 24 例全例で、Ki-67 陽性像が認められた。癌部全体の Ki-67 陽性範囲の割合は $46.4 \pm 16.6\%$ であった。

pT1a 癌部における Ki-67 陽性所見は、粘膜全層あるいは癌巣全体にわたりびまん性に認められる場合と (Fig. 3c), 正常上皮における場合に類似して傍基底層に相当する部分主体に陽性細胞が観察される場合とがあった (Fig. 4c)。m3 癌部における Ki-67 陽性細胞は p75^{NGFR} の場合とは異なり、浸潤の先進部を主体にびまん性に観察された。

pT1b 癌部において Ki-67 陽性細胞は、病変の表層部、先進部で共に観察された。表層部では傍基底層主体に陽性細胞が観察されることが多く、癌先進部では p75^{NGFR} 陽性細胞の分布と比較し、よりびまん性に認められる傾向にあった (Fig. 5c)。

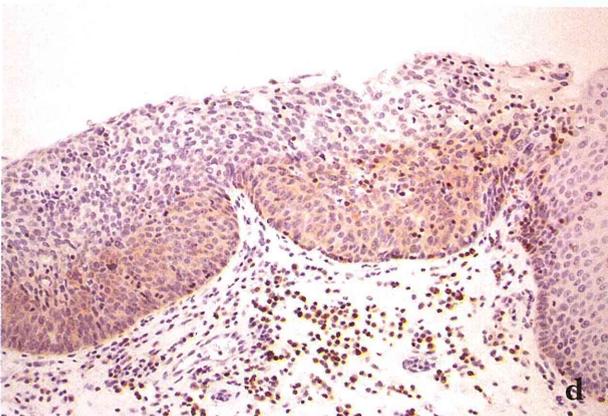
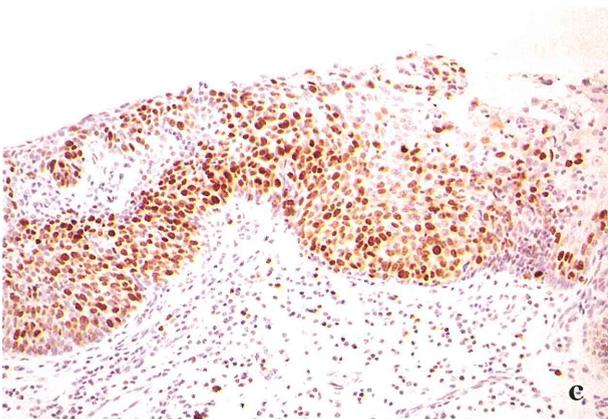
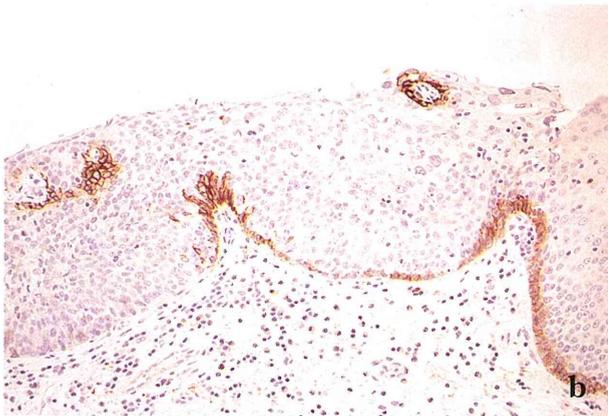
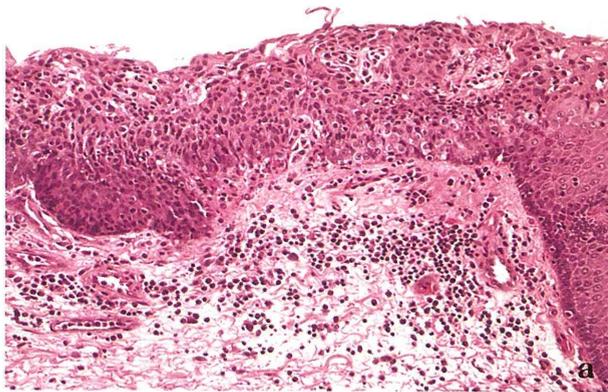
3) 抗 bcl-2 抗体染色

抗 bcl-2 抗体陽性細胞所見は、細胞膜が染色されるものであり、一部で細胞質染色像も認めた。

(1) 非癌部

非癌部での bcl-2 陽性細胞の局在は、p75^{NGFR} 陽性

Fig. 2 Esophageal dysplasia ($\times 150$). (a) HE staining: Esophageal dysplasia (b) p75^{NGFR} immunological staining: p75^{NGFR}-positive cells were similar to normal esophageal epithelium and were localized in the basal layer. In some lesions, two or three layers of p75^{NGFR}-positive cells adjacent to the basal layer were observed. (c) Ki-67 immunological staining: Ki-67-positive cells were more diffusely localized, mainly in the parabasal layer. (d) bcl-2 immunological staining: bcl-2-positivity was detected in the basal layer, which was the same location as p75^{NGFR}-positive cells.



細胞の局在と類似していた。

正常上皮では、24例中17例(70.8%)に bcl-2 陽性の所見がみられた。bcl-2 陽性細胞は p75^{NGFR} 陽性細胞と同様、基底層にのみ限局して観察され、基底層より表層の細胞に陽性細胞は認めなかった (Fig. 1d)。正常上皮における bcl-2 陽性所見は、淡い染色像を呈しているものが多く、その陽性細胞集団の存在範囲の割合はおおむね10%以下であった。

dysplasia 19例中、少なくとも1病変以上に bcl-2 陽性所見を認めた症例は7例(36.8%)であった。dysplasia における bcl-2 陽性細胞は正常上皮と同様に基底層に認められ、正常上皮のそれと比較して強く認められる傾向にあり、p75^{NGFR} 陽性細胞の場合と類似していた (Fig. 2d)。

(2) 癌部

癌部では24例中21例(87.5%)に bcl-2 陽性像が認められ、癌部全体に対する bcl-2 陽性範囲の割合は、20.5 ± 18.7%であった。bcl-2 陽性細胞の局在は、癌部では p75^{NGFR} 陽性像と必ずしも類似せず、癌浸潤の程度に従い異なる傾向にあった。

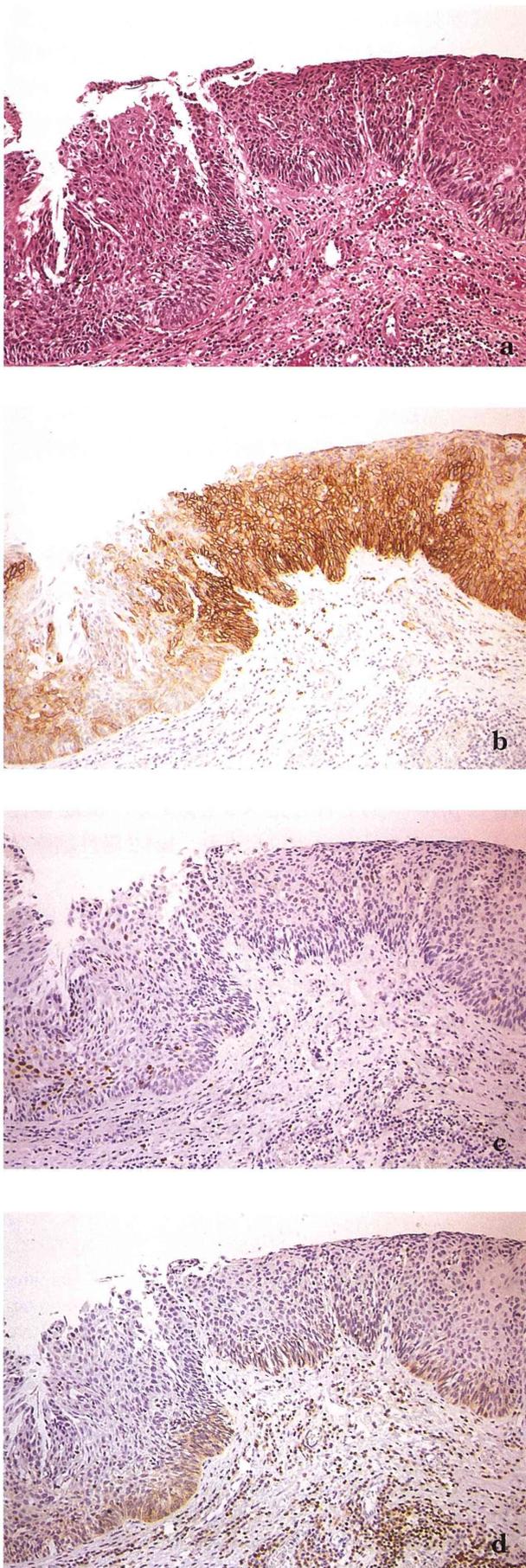
pT1a 癌部における bcl-2 陽性所見は、正常上皮と同様に基底層にのみ淡く陽性細胞が観察されることが多く (Fig. 4d)、びまん性に陽性所見を呈する場合は、癌の表層に比べ浸潤の先進部に局在していた (Fig. 3d)。

pT1b 癌部における bcl-2 陽性細胞は、浸潤の先進部にびまん性に観察されることが多く、癌の表層部に強い発現を認めることは少なかった (Fig. 5d)。

2. 各抗体の局在分布

代表的な T1a 癌症例の各抗体における局在分布図を提示する (Fig. 6)。a~e は順に、ホルマリン固定標本肉眼所見、ホルマリン固定標本写真上に対応する HE 染色所見を図示したもの、同シェーマ上に p75^{NGFR}、Ki-67、bcl-2 陽性部位をそれぞれ図示した

Fig. 3 Esophageal carcinoma (T1a) (×200). (a) HE staining: Cancerous lesion (T1a). (b) p75^{NGFR} immunological staining: Positive staining was observed only in the basal layer of the mucosa in the cancerous lesion, as was the case in the epithelium in non-cancerous regions. (c) Ki-67 immunological staining: Unlike staining with p75^{NGFR}, proliferative cells were observed in all layers. (d) bcl-2 immunological staining: Positivity was detected mainly in the area of deepest cancer invasion.



ものである。

正常上皮において、bcl-2 陽性部位は p75^{NGFR} 陽性部位に含まれることが多く、陽性細胞はともに基底細胞に限局して観察された。一方、Ki-67 陽性細胞は傍基底層主体に認められた。

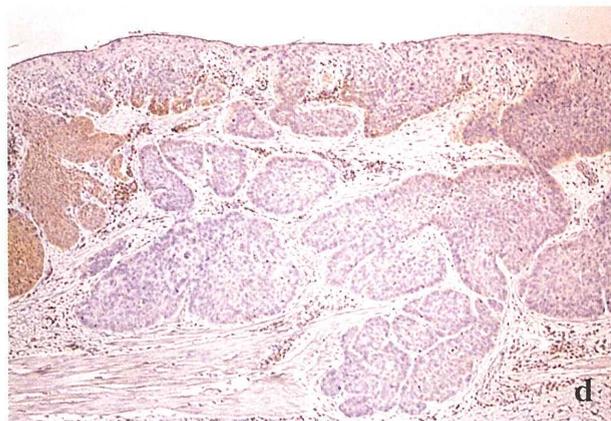
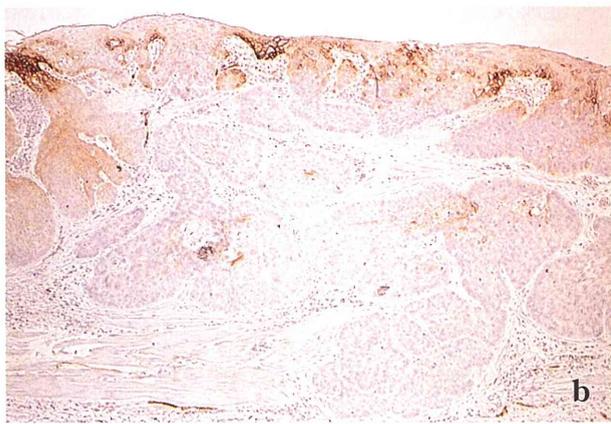
癌部における陽性細胞の分布は、各抗体で必ずしも類似せず前述のごとくであり、陽性範囲の割合は Ki-67 が最も高く、次いで p75^{NGFR}、bcl-2 の順であった。

考 察

神経成長因子 (NGF) は、末梢交感神経、末梢知覚神経および前脳基底核細胞の生存維持と細胞分化に欠かせない栄養因子であり、neurotrophin (NT) ファミリーのうちのひとつである⁵⁾。NT ファミリーは、NGF の他、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF)、NT-3、NT-4/5、NT-6 から構成され^{6,7)}、その作用を発現するにはおのおの親和性を示す受容体と結合することが必要となってくる。NT ファミリーに対する受容体として、高親和性受容体と低親和性受容体とが報告されている。高親和性受容体はこれまでに p140trkA、p145trkB、p140trkC の3種類が報告され^{8~10)}、NGF をはじめとする NT ファミリーの効果発現には欠くことができないとされている。一方、低親和性受容体である p75^{NGFR} は、NT ファミリー共通の受容体として存在しているが⁹⁾、その役割は未だ完全には解明されていない。また、非神経組織における存在およびその局在も明らかにされていない部分も多い。

NT 受容体は、主に神経組織に分布するが、最近、非神経組織においても高親和性受容体である trk ファミリーの存在が確認されており¹¹⁾、森田ら³⁾ は正常食道扁平上皮の基底細胞および傍基底細胞に trkA の発現を認め、また食道癌組織においても同発現がみられた、と報告している。また同報告では、低親和性受容体である p75^{NGFR} の発現は、正常食道上皮

Fig. 4 Esophageal carcinoma (T1a) (×150). (a) HE staining: Cancerous lesion (T1a). (b) p75^{NGFR} immunological staining: Almost all layers of the cancerous region were positive. (c) Ki-67 immunological staining: Few Ki-67-positive cells were observed, mainly in the parabasal layers. (d) bcl-2 immunological staining: Weak positive staining was detected in the basal layer.



の基底細胞に認められるものの、食道癌組織では消失していた、としている。食道上皮における低親和性受容体 $p75^{NGFR}$ の観察は上記の報告のみで、その局在、存在意義は現段階においてほとんど研究されておらず、未解明のままである。また、食道癌組織での発現は確認されていない。

本研究では $p75^{NGFR}$ に着目し、まず、食道癌切除全割標本での非癌食道上皮部（正常扁平上皮）における発現と陽性細胞の局在を明らかにし、 $p75^{NGFR}$ は子宮頸部上皮の場合と同様に、食道上皮における幹細胞の指標になり得るか否かを検討した。また、食道表在癌症例の癌部におけるその発現と局在、食道癌発癌過程での $p75^{NGFR}$ 陽性細胞の役割も同時に検討した。

1. 非癌食道上皮部（正常上皮）における検討

正常上皮において $p75^{NGFR}$ 陽性細胞集団の局在は上皮の基底層のみに限局し、傍基底層より表層の細胞にはその発現は認められなかった。

また、apoptosis 抑制蛋白とされる $bcl-2$ 蛋白¹²⁾ の正常上皮における発現は、 $p75^{NGFR}$ の場合と同様に食道上皮の基底細胞のみに限局された。陽性範囲の割合は $p75^{NGFR}$ のそれと比べると低いが、 $bcl-2$ 陽性部は $p75^{NGFR}$ 陽性部の中に含まれ、 $bcl-2$ 陽性細胞の多くは $p75^{NGFR}$ 陽性も同時に認められた。

一方、増殖細胞のマーカーとされる^{13, 14)} 抗 Ki-67 抗体 MIB-1 陽性を呈する細胞の局在は傍基底層が主体で、基底層より表層の細胞であり、 $p75^{NGFR}$ 陽性細胞集団とは異なる細胞集団であった。

Kunimura ら²⁾ による子宮頸部組織における $p75^{NGFR}$ 陽性細胞は、Jones^{15, 16)} らによる幹細胞のマーカーである $integrin \beta 1$ 陽性の細胞集団とは異なり、(1) 上皮組織基底層にまばらな細胞集団として

Fig. 5 Esophageal carcinoma (T1b) ($\times 80$). (a) HE staining: Cancerous lesion (T1b). (b) $p75^{NGFR}$ immunological staining: In the T1b lesion, $p75^{NGFR}$ -positive cells were observed mainly in, or only in the surface layer in many cases, and the area of deepest cancer invasion had become negative. (c) Ki-67 immunological staining: Positive cells were observed in both the surface layer and the area of deepest cancer invasion, and the localization was more diffuse. (d) $bcl-2$ immunological staining: Positive cells were localized mainly in the advanced region of the tumor.

局在し、(2) 通常上皮構成細胞集団の 10% 以下をしめる少数細胞サブセットであった、(3) 増殖は不活発でおそらく G0 期に止まっている (細胞増殖の指標とされる Ki-67 は陰性)、(4) 不等分裂の可能性が示唆された、(5) apoptosis 抵抗性をもたらす蛋白である bcl-2 蛋白の発現があり、(6) 細胞接着レセプター分子 integrin $\beta 1$ の発現が全くないか、極めて低い値である、(7) 基底膜上への基質接着分子として integrin $\beta 4$ の発現が認められた、(8) この細胞サブセットは培養条件下で分裂できるが、同じ表現形質を備えた集団として増幅させることが困難であった、といった幹細胞候補としての種々の特性を備えており、幹細胞である可能性が示唆されている。本研究での観察結果から食道上皮において p75^{NGFR} 陽性細胞の存在が確認され、その細胞集団は上皮の基底層に限局し、Ki-67 陰性であり、一部は同時に bcl-2 陽性を呈することが示された。これらの点において Kunimura らの報告と一致しており、食道上皮における p75^{NGFR} 陽性細胞は子宮頸部組織の場合と同様、その一部が食道上皮における幹細胞である可能性が示唆された。また、p75^{NGFR} は、食道上皮においても幹細胞の指標として有用であると考えられた。

2. dysplasia 部および癌部における検討

dysplasia 部における p75^{NGFR} 陽性細胞は、正常上皮における局在に類似し基底層に局在を見たが、一部で p75^{NGFR} 陽性細胞が基底層を含めた 2~3 層に観察される箇所も認められた。また、bcl-2 陽性細胞の局在も p75^{NGFR} 陽性細胞のそれと類似しており、共に正常上皮に比し強い発現が認められた。一方 Ki-67 陽性細胞は、当教室の林の報告¹⁷⁾ にもあるように、dysplasia 上皮の基底層側約 1/2 を主体にびまん性に分布していた。

癌部においては、p75^{NGFR} の発現は消失していたとの報告もある³⁾ が、本研究における観察では、24 例全例で癌部において p75^{NGFR} の発現がみられ、その局在は、癌の深達度により変化が認められた。pT1a 癌の m1 あるいは m2 癌部では、非癌上皮と同じく基底層にのみ強く発現している場合と、癌粘膜の全層にわたりびまん性に p75^{NGFR} 陽性を呈する場合とがあった。また m3、pT1b 癌部の p75^{NGFR} の発現は m1、m2 癌部に比較して弱く、癌先進部より表層の腫瘍細胞に強く発現する傾向にあった。癌先進

部における p75^{NGFR} 陽性細胞はびまん性に、あるいは癌巣周辺部の細胞にのみ見られたが、その陽性所見は淡く、癌先進部では陰性化する傾向にあった。

以上のことは、癌発生の初期には p75^{NGFR} 陽性の細胞が増殖して癌組織の広範囲をしめるが、癌の進展に伴って p75^{NGFR} 陰性の癌細胞の増殖が盛んとなっていく可能性を示唆するものと考えられた。

一方、bcl-2 陽性細胞は、m1、m2 癌部では p75^{NGFR} 陽性細胞の局在と一致する傾向にあったが、m3、T1b 癌部では、表層部に比し癌先進部で陽性になることが多く、Koide ら¹⁸⁾ における報告と同様、癌巣の周辺部の細胞あるいは癌巣全体にびまん性に陽性所見を認め、p75^{NGFR} 陽性細胞の局在とは異なっていた。また、Ki-67 陽性細胞は、T1a、T1b 癌部ともに、比較的びまん性に認める傾向にあった。

これらの観察は、dysplasia 部、m1、m2 癌部では、p75^{NGFR} 陽性細胞集団が bcl-2 陽性、Ki-67 陰性という性質を正常上皮の場合と同様に合わせ持っていることを示している。しかし、m3、T1b 癌と癌が進行するにつれ、その性質は減弱していくという可能性を示唆している。

以上の結果より、p75^{NGFR} 陽性細胞の食道癌発生過程における役割は以下のように考えられる。つまり、幹細胞候補細胞である p75^{NGFR} 陽性細胞は発癌刺激を蓄積した後、異型を呈して増殖し異型上皮を形成するようになり、やがて発癌を迎える。発生初期の癌細胞は、未だ幹細胞としての p75^{NGFR} 陽性という性質を維持し増生しているが、癌の進行、浸潤とともにその性質を失っていくという可能性である。このことは、dysplasia 部、および癌部における bcl-2 陽性細胞の観察からも裏付けられると考えられた。

食道癌の進展に際し m3 以深の病変では、リンパ節転移率が上昇し、予後悪化につながる事が知られている。粘膜固有層および粘膜下層のリンパ流の存在も考慮しなければならないが、m3 以深の病変で p75^{NGFR} が陰転化するという本研究における観察結果は興味深いところであり、今後さらに進行癌を含め、検討が必要であると考えられた。

本研究の結果は、p75^{NGFR} が子宮頸部組織と同様、食道粘膜の再生維持に関わる幹細胞の指標になるとする、細胞生物学的および分子遺伝学的検索から得

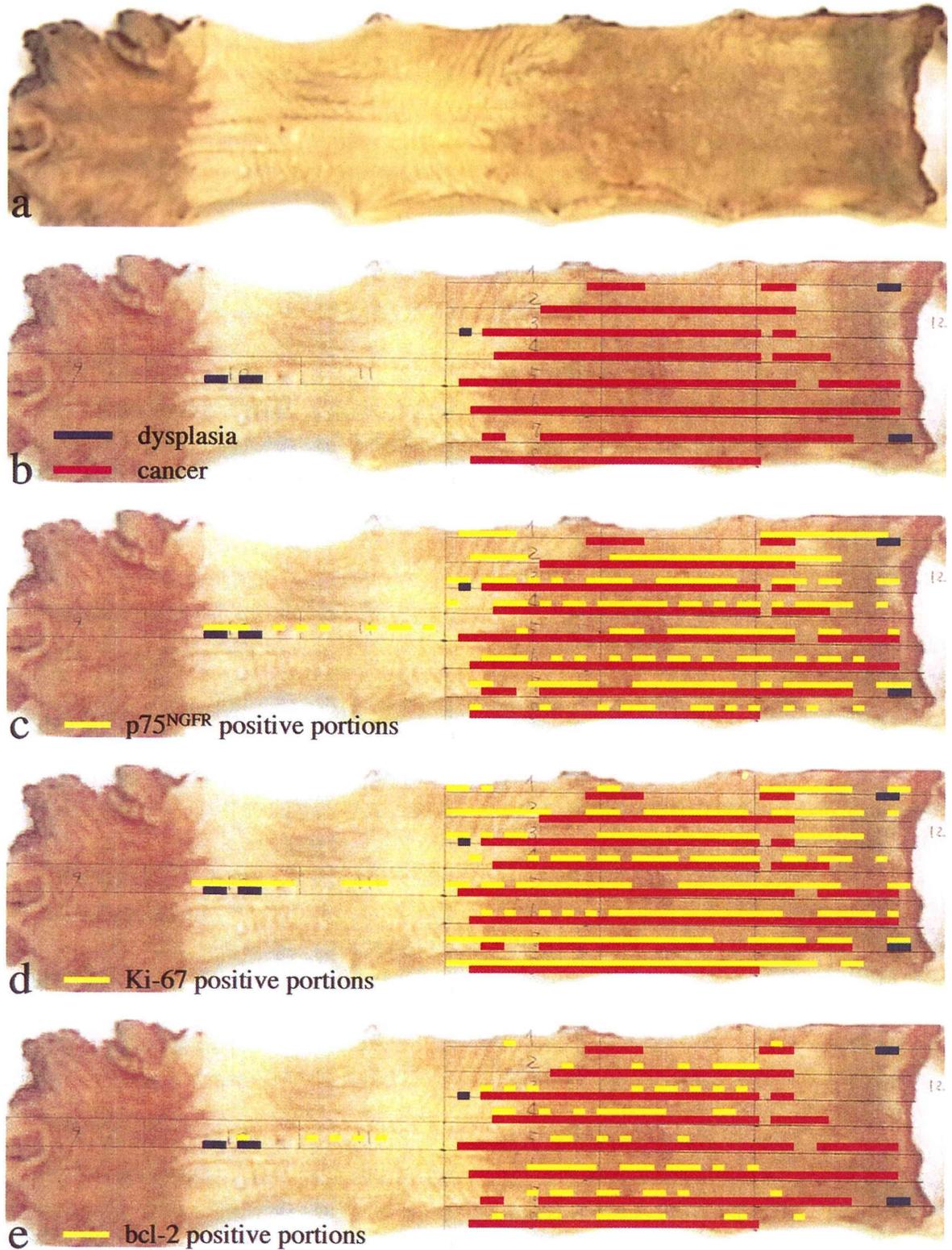


Fig. 6 Localization of each antibody-staining in esophageal carcinoma. (a) Macroscopic observation of formalin-fixed preparation. (b) Illustration of a HE-stained preparation corresponding to the photograph of formalin-fixed preparation. (c) p75^{NGFR}-positive portions. (d) Ki-67-positive portions. (e) bcl-2-positive portions.

られた仮説と矛盾せず、同時に p75^{NGFR} 陽性細胞が発癌の初期に重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。また、食道癌発生過程における幹細胞の重要性も同時に示唆された。

結 語

1. 食道表在癌手術例 24 例の全割標本を用い、p75^{NGFR}, Ki-67, bcl-2 おおのの正常食道上皮、および癌部組織における局在を観察し、検討した。

2. 正常食道上皮における p75^{NGFR} 陽性細胞は、上皮の基底層に限局するまばらな細胞集団として観察され、その一部は同時に、bcl-2 陽性、Ki-67 陰性の性質を有していた。

3. 正常食道上皮における p75^{NGFR} 陽性細胞の局在および性質は、子宮頸部組織の場合と類似し、p75^{NGFR} 陽性細胞の一部は、食道上皮における幹細胞である可能性が示唆された。

4. 癌部組織では p75^{NGFR}, Ki-67, bcl-2 の各所見は正常上皮の場合と一致せず、癌が進行するにつれ変化が見られた。

5. m1, m2 癌部での p75^{NGFR} 陽性所見は、正常上皮部に比べ強く認められたが、m3, T1b 癌部組織においては p75^{NGFR} の発現は減弱し、浸潤の先進部で陰性化する傾向にあった。

6. 幹細胞候補細胞である p75^{NGFR} 陽性細胞は、発癌刺激を蓄積した後に発癌を迎え、癌発生初期は未だ幹細胞としての性質を維持し増生しているが、癌の進行、浸潤とともにその性質を失っていく可能性が示唆された。

7. 食道上皮において幹細胞の可能性を有する p75^{NGFR} 陽性細胞の観察は、食道癌発生過程において重要であると考えられた。

謝 辞

稿を終わるに臨み御教示、御校閲を賜りました東京医科大学外科学教室第三講座小柳泰久教授並びに、神奈川県立がんセンター研究所清水昭男博士に深甚なる謝意を表します。さらに本研究の機会を与えて頂きました神奈川県立がんセンター所長小泉博義博士、同外科第1科部長青山法夫博士、並びに御協力頂いた東京医科大学外科学教室第三講座の教職員各位に心より感謝いたします。

(本文の要旨は第100回日本外科学会総会で報告

した。)

文 献

- 1) Miller SJ, Lavker RM, Sun Tung-Tien : Keratinocyte stem cells of cornea, skin and hair follicles. *Stem Cells*. (Eds) Potten CS, Academic Press, London, 331~362, 1997
- 2) Kunimura C, Kikuchi K, Ahmed N, Shimizu A, Yasumoto S : Telomerase activity in a specific cell subset co-expressing integrin β 1/EGFR but not p75^{NGFR}/bcl-2/integrin β 4 in normal epithelial cells. *Oncogene* **17** : 187~197, 1998
- 3) 森田幹太, 小泉宏隆 : 食道癌における高親和性神経成長因子レセプター TrkA の発現. *聖マ医大誌* **24** : 576~583, 1996
- 4) 日本食道疾患研究会編 : 臨床・病理 食道癌取扱い規約 第9版, 金原出版, 東京, 1999
- 5) 高橋秀夫 : 神経成長因子 (NGF). *日大医誌* **53** : 693~699, 1994
- 6) Maness LM, Kastin AJ, Weber JT, Banks WA, Beckman BS, Zadina JE : The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* **18** : 143~159, 1994
- 7) Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharltl M, Thoenen H : Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* **372** : 266~269, 1994
- 8) Chao MV : Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* **9** : 583~593, 1992
- 9) Eide FF, Lowenstein DH, Reichardt LF : Neurotrophins and their receptors: current concepts and implications for neurologic disease. *Exp Neurol* **121** : 200~214, 1993
- 10) Kaplan DR, Stephens RM : Neurotrophin signal transduction by the trk receptor. *J Neurobiol* **25** : 1404~1417, 1994
- 11) Shibayama E, Koizumi H : Cellular localization of the trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* **148** : 1807~1818, 1996
- 12) Vaux DL, Cory S, Adams JM : Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335** : 440~442, 1988
- 13) Gerdes J, Lemke H, Wacker HH, Schwab U, Stein H : Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133** : 1710~1715, 1984
- 14) Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M,

- Schluter C, Flad HD, Gerdes J : New Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* **68** : 629~636, 1993
- 15) Jones PH, Watt FM : Separation of Human epidermal stem cells from transit amplifying cells on basis of differences in integrin function and expression. *Cell* **73** : 713~724, 1993
- 16) Jones PH, Harper S, Watt FM : Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* **80** : 83~93, 1995
- 17) 林 幹也 : 食道 m・sm 癌における p53 変異蛋白の発現の検討, 特に前癌病変としての Dysplasia の意味付けについて. *東医大誌* **56** : 169~181, 1998
- 18) Koide N, Koike S, Adachi W, Mano J, Usuda N, Nagata T : Immunohistochemical expression of bcl-2 protein in squamous cell carcinoma and basaloid carcinoma of the esophagus. *Jpn J Surg* **27** : 685~691, 1997

Expression of low affinity nerve growth factor receptor p75^{NGFR} in esophageal epithelium and esophageal mucosal-submucosal carcinoma and its role in the maintenance of regeneration and carcinogenesis of esophageal epithelium

Sumito HOSHINO

Department of Surgery, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan
(Director: Prof. Yasuhisa KOYANAGI)

Summary

The localization of low affinity nerve growth factor receptor p75^{NGFR} in non-neural tissue has not yet been elucidated. In this study, the expression of p75^{NGFR} in esophageal epithelium was immunohistologically examined in 24 patients with esophageal mucosal or submucosal carcinoma, and its role in the maintenance of regeneration and carcinogenesis of esophageal epithelium were investigated.

p75^{NGFR}-positive cells were observed in normal esophageal epithelium all of 24 patients. It was recognized in the basal layer. p75^{NGFR}-positive cells in the esophageal epithelium were Ki-67-negative, and some cells were also bcl-2-positive. These findings suggested that these cells are stem cells in the esophageal epithelium. In dysplasia, p75^{NGFR}-positive cells were also localized in the basal layer. In malignant lesions, p75^{NGFR}-positive features were also observed in all patients, but its expression tended to decrease with advance of malignant disease.

Therefore, it seems that p75^{NGFR}-positive cells are involved in the carcinogenesis of esophageal carcinoma.

〈Key words〉 p75^{NGFR}, Esophageal carcinoma, Ki-67, bcl-2, Stem cell
