

原著

和文題名：食道扁平上皮癌における KLF4 発現に関する臨床病理学的検討

ランニングタイトル：食道扁平上皮癌と KLF4 発現

著者：

北島 徹也^{1),2)}, 楯 玄秀¹⁾, 南雲 佑¹⁾, 三浦 咲子¹⁾, 本間 まゆみ¹⁾, 塩沢 英輔¹⁾,
村上 雅彦²⁾, 瀧本 雅文¹⁾, 矢持 淑子¹⁾

所属：

¹⁾昭和大学医学部臨床病理診断学講座

²⁾昭和大学医学部外科学講座消化器・一般外科学部門

連絡先：

第1連絡先：北島 徹也。昭和大学医学部外科学講座消化器・一般外科学部門

e-mail: t.kitajima@med.showa-u.ac.jp

第2連絡先：楯 玄秀。昭和大学医学部臨床病理診断学講座

e-mail: gentate@yahoo.co.jp

文字サイズ：11 point

抄録：Kruppel-like factor 4 (KLF4) は腸管や皮膚をはじめとする生体内の様々な組織で発現する転写因子であり、癌においては、細胞周期の抑制という点から癌抑制遺伝子として、アポトーシスの抑制という点から癌遺伝子として働く二面性が知られている。今回、食道扁平上皮癌の病理組織検体を用いて、KLF4 の発現とその組織学的悪性度との関係性について検討した。昭和大学病院において食道扁平上皮癌と診断された患者に対し、外科的に切除された 88 症例を対象とした。切除検体を用いて KLF4 と p53 の免疫染色を行い、その発現率と臨床病理学的特徴(腫瘍径, 分化度, 深達度, リンパ管・静脈侵襲, リンパ節転移の有無, 進行度)について比較した。食道扁平上皮癌組織での KLF4 の発現率は 51. 1%(45/88)であり、正常食道粘膜組織での発現率 88. 6%(78/88)と比較すると、その発現率は低い傾向にあった。また、浸潤癌やリンパ節転移症例では、有意差をもって KLF4 の発現率の低下がみられた ($P < 0. 05$)。一方で、食道扁平上皮癌組織での p53 の発現率は 82. 9%(73/88)であったが、臨床病理学的特徴との有意な相関関係はみられなかった。今回の検討では、食道扁平上皮癌における KLF4 の発現と悪性度との間に相関がみられた。即ち、進行した食道扁平上皮癌組織では有意に KLF4 発現量が低下しており、食道においては、KLF4 の癌抑制因子としての側面が見いだされた。

キーワード：Kruppel-like factor 4 (KLF4), 食道扁平上皮癌, 癌抑制因子

緒 言

Kruppel-like factor 4 (KLF4) は腸管や皮膚をはじめとする生体内の様々な組織で発現する転写因子の 1 つであり, 増殖, 分化, アポトーシスといった多くの生命現象に関与することが知られている¹⁻⁶⁾. また, 癌においては発現する組織や細胞の状態により異なる働きがあるとされ, 細胞周期の抑制という点から癌抑制遺伝子として, アポトーシスの抑制という点から癌遺伝子として働くという, 腫瘍化に対する二面性についていくつかが報告されている⁷⁻¹⁰⁾. しかし, 食道扁平上皮癌についての報告は少なく, 一定した見解は得られていない¹¹⁾. また, 癌抑制遺伝子として知られる p53 の異常はヒト諸臓器における悪性腫瘍の発生に重要な役割を果たしていると言われており, 一部の癌では生物学的悪性度の指標になることが報告されている¹²⁾. 今回われわれは, 昭和大学病院において外科的に切除された食道扁平上皮癌症例の病理組織検体を用いて, KLF4 と p53 蛋白の発現を免疫組織化学的 (免疫染色) に評価し, その組織学的悪性度との関係性について検討し, KLF4 の発現低下と食道扁平上皮癌の進行度が相関することを明らかにした.

研究方法

1) 研究対象

昭和大学病院において 2016 年から 2017 年に, 胸腔鏡下食道亜全摘術が施行された食道扁平上皮癌患者の病理組織検体 100 例を対象とし後方視的に解析した. 病理組織学的分類は日本食道学会の食道癌取扱規約 11 版に基づき診断されたものとした. ただし, 100 症例のうち, 内視鏡的切除 (Endoscopic submucosal dissection: ESD) 後の追加切除症例と術前放射線療法を施行した症例は除外し, 術前化学療法として 5-FU (fluorouracil) + CDDP (cisplatin) を施行した 88 症例を対象とした.

2) 病理組織学的検討

病理学的検討にはホルマリン固定パラフィン包埋切片 (手術標本) を用いた. 形態的観察は Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を用いた. 免疫染色は抗 KLF4 抗体 (ab215036, clone EPR19590, Abcam, Cambridge, UK. 2000 倍希釈), 抗 p53 抗体 (M7001, clone DO-7, Dako, Glostrup, Denmark. 50 倍希釈) を用いた. 各標本は高倍率 (対物 40 倍) で観察した. 病変部別に細胞 1000 個当たりの免疫染色陽性細胞数の割合を計算し, 統計学的検討に使用した. なお, 観察は病理医 2 名 (G, T. & M, T.) で行った. KLF4 発現の評価方法については, 免疫染色の程度をスコア化した. 染色の程度を染色なし

(score 0) , 淡黄色 (score 1) , 茶色 (score 2) , 茶褐色 (score 3) に分類し, それぞれの染色細胞数の割合について, 10%以下 (score 0) , 11%-25% (score 1) , 26%-50% (score 2) , 51%-75% (score 3) , 75%以上 (score 4) とスコア化した. 同一標本内でそれぞれのスコアの積を合計し, KLF4 染色スコアとした. この値が 0-3 は KLF4 陰性, 4 以上の場合を KLF4 発現ありと評価した. また, p53 の発現の評価には, 腫瘍先進部における腫瘍細胞 1000 個あたりの染色された核の割合を p53 labelling index (p53 LI) とし, p53 LI が 20%以上の場合を p53 発現ありとした. この免疫染色の発現の有無と臨床病理学的特徴 (腫瘍径, 分化度, 深達度, リンパ管・静脈侵襲, リンパ節転移の有無, 進行度) について比較検討した.

3) 統計解析

統計解析は JMP 12 Pro (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を使用し, 統計学的検定には t 検定を用いた. いずれも $P < 0.05$ を有意差ありとした.

本研究は昭和大学医学部の人を対象とする研究等に関する倫理委員会で承認されている (承認番号 2477) .

結果

1) 食道上皮における KLF4 および p53 発現の病理組織学的検討

正常食道重層扁平上皮 (HE 染色, Fig. 1A) を免疫染色で検討すると KLF4 陽性細胞は基底層の細胞で発現が弱く, 表層に分化する細胞で発現が増強されていた (Fig. 1B). KLF4 の発現とは対照的に p53 陽性細胞は基底層の細胞で発現が強く分化過程の細胞では発現が減弱していた (Fig. 1C). KLF4 と p53 は相互関係があるとされる既報の知見が組織学的にも確認された^{10, 13)}.

Fig. 2 には代表的な食道扁平上皮癌症例の HE 染色組織像 (A, x40; B, x200) と免疫染色所見 (C, D) を示した. 食道扁平上皮癌部位での KLF4 陽性細胞 (C) および p53 陽性細胞 (D) をカウントし. 前述の方法で陽性細胞をスコア化した.

2) 研究対象とした食道扁平上皮癌症例の臨床病理学的特徴

Table 1 に症例の年齢, 性別, 腫瘍の長径, 深達度, 分化度, リンパ節転移の程度, リンパ管・静脈侵襲, 最終病期の内訳を示した. 食道扁平上皮癌患者の年齢は平均 67.8 歳 (範囲 51~88 歳), 性別は男性 74 例, 女性 14 例であった. 腫瘍の長径は平均 33.1mm であった. 深達度は pT0/1a/1b の早期・表在癌と pT2/3/4 の進行癌がそれぞれ 44 例で

あり,分化度は中分化型扁平上皮癌が 66 例と最も多かった。リンパ節転移は 41 例であり,リンパ管侵襲と静脈侵襲はそれぞれ 29 例にみられた。最終病期は StageⅢが 29 例と最も多かった。

3) KLF4 および p53 発現と食道扁平上皮癌症例の臨床病理学的解析

Table 2 に KLF4 と p53 の発現と臨床病理学的因子の単変量解析の結果を示した。食道扁平上皮癌組織での KLF4 の発現率は 51.1%(45/88)であり,正常食道粘膜組織での発現率 88.6%(78/88)と比較すると,その発現率は低い傾向であった。また, KLF4 の発現が陰性の症例は,進行癌が多く (P=0.0056),リンパ節転移症例がみられ (P=0.0338),有意な関連がみられた。また, KLF4 の発現の有無は最終病期や静脈侵襲の有無と関連がある傾向 (P=0.0855, P=0.0823) がみられたが,年齢,性別,腫瘍の長径,分化度,リンパ管侵襲とは有意な関連はみられなかった。一方で,食道扁平上皮癌組織での p53 の発現率は 82.9%(73/88)であったが,臨床病理学因子との有意な関連はみられなかった。

4) KLF4 および p53 発現と食道扁平上皮癌進達度の検討

Table 3 に KLF4 と p53 の深達度別の発現率を示した。KLF4 は深達度が進むにつれ発現が低下する傾向であるが, P53 は深達度に関係なく, KLF4 と比較しその発現率が高く,扁平上皮癌に対する染色性の感度が高い傾向がみられた。

5) KLF4 発現と食道扁平上皮癌 T3 の検討

深達度 T3 (AD) の 33 症例において,同一標本内で,粘膜下層までの癌細胞の KLF4 染色スコアと固有筋層以深の KLF4 染色スコアを比較したところ,有意差はないものの,同一検体内でも深部にある癌細胞の KLF4 染色スコアが低い傾向であった (Table 4)。

考 察

食道癌は,リンパ節転移や壁内転移を伴うことが多く,診断・治療の進歩した現在でも依然として予後不良の悪性腫瘍である。p53 遺伝子については,その遺伝子異常が発癌の初期の過程で重要や役割を果たしており,食道癌においても生物学的悪性度の指標としていくつかの報告があるが,臨床病理学的因子との関連には一定の結論がない。KLF4 発現と癌の予後に関しては担癌臓器により異なった報告がなされている。Tai らは KLF4 が高発現する頭頸部の扁平上皮癌の予後は不良であったと報告している¹⁴⁾。しかし,乳癌では KLF4 の高発現は予後良好の指標であり,胃癌においては KLF4 の低発現

は予後不良と評価されている^{15,16)}。また、2017年にHuらが報告したメタ解析（癌患者2118例を含む17件の研究）や2018年にYuらが報告したメタ解析（癌患者2988例を含む22件の研究）では、消化管発生の癌ではKLF4の低発現あるいは発現消失は予後不良とされるが^{17,18)}、食道癌では十分には解析されておらず^{11,17,18)}本邦からの報告はみられない。

今回のわれわれの検討では、食道扁平上皮癌症例において、KLF4は腫瘍の分化度や病期よりも深達度やリンパ節転移の有無と強い相関が認められた。これまで報告された食道扁平上皮癌におけるKLF4と臨床病理学的因子との検討では、リンパ節転移と臨床病期で有意な関連があるものがみられたが、今回のように深達度との関連を示したものは少ない。また、有意差はでなかったものの、同一標本内において腫瘍深部の癌細胞ほどKLF4発現が低下する傾向みられ、組織学的悪性度の評価の一助となる可能性はある。一方で、病理組織検体におけるp53の免疫染色の発現率は82.9%(73/88)であり、KLF4と比較しその発現率が高く、扁平上皮癌に対する染色性の感度が高い傾向がみられたが、臨床病理学的因子との相関はみられなかった。

今回の統計学的な検討では、KLF4とp53の発現について有意な関連はみられなかったが、Fig. 2では、同一の扁平上皮癌胞巣の中心側にKLF4の発現が強くみられ、胞巣外側で正常上皮では基底側に相当する癌細胞では発現が弱かった。この知見とは対照的にp53の発現は中心側に弱く、胞巣外側で強い発現が観察された。この染色性の相違は、高分化型扁平上皮癌症例の一部分にみられたが、正常食道上皮では基底側でp53の発現が強く、表層に分化するにつれp53の発現が減少し、KLF4はp53とは逆の発現様式で、基底側で弱く、分化するにつれ発現が増強するという食道重層扁平上皮細胞の特性が癌化しても保持されていることを示唆していた。組織学的にもKLF4とp53の発現について相互関係がある可能性を示唆する所見であった¹³⁾。

本邦では、術前化学療法が食道癌治療の標準となっており、本検討症例は全て術前化学療法を施行している。本研究では、化学療法とKLF4の発現の関係は検討していないが、化学療法の前後での組織検体の採取により、化学療法のKLF4の発現への影響や発現の程度による化学療法の効果予測ができる可能性がある。さらに、今後術前未治療群を検討し予後因子としてKLF4が有用か否かの評価が必要と考えられる。

結 語

今回の検討では, 食道扁平上皮癌における KLF4 の発現と組織学的悪性度との間に相関がみられ, KLF4 低発現が癌の進行と関連していることから食道においては, KLF4 の癌抑制因子としての側面が見いだされた。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Miller KA, Eklund EA, Peddinghaus ML, *et al.* Kruppel-like factor 4 regulates laminin alpha 3A expression in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276:42863-42868.
- 2) Zhou G, Hamik A, Nayak L, *et al.* Endothelial Kruppel-like factor 4 protects against atherothrombosis in mice. *J Clin Invest.* 2012;122:4727-4731.
- 3) Shin SH, Kwon YW, Heo SC, *et al.* Kruppel-like factor 4 mediates lysophosphatidic acid-stimulated migration and proliferation of PC3M prostate cancer cells. *Exp Mol Med.* 2014;46:e104. (accessed 2020 Feb17) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4119209/pdf/emm201434a.pdf>
- 4) Cowan CE, Kohler EE, Dugan TA, *et al.* Kruppel-like factor-4 transcriptionally regulates VE-cadherin expression and endothelial barrier function. *Circ Res.* 2010;107:959-966.
- 5) Kaushik DK, Gupta M, Das S, *et al.* Kruppel-like factor 4, a novel transcription factor regulates microglial activation and subsequent neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2010;7:68. (accessed 2020 Feb17) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965135/pdf/1742-2094-7-68.pdf>
- 6) Yu T, Chen X, Zhang W, *et al.* Kruppel-like factor 4 regulates intestinal epithelial cell morphology and polarity. *PLoS One.* 2012;7:e32492. (accessed

2020 Feb17)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3286469/pdf/pone.0032492.pdf>

7) Abrigo M, Alvarez R, Paparella ML, *et al.* Impairing squamous differentiation by Klf4 deletion is sufficient to initiate tongue carcinoma development upon K-Ras activation in mice. *Carcinogenesis*. 2014;35:662-669.

8) Leng Z, Tao K, Xia Q, *et al.* Kruppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells. *PLoS One*. 2013;8:e56082.

(accessed 2020 Feb17)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3572033/pdf/pone.0056082.pdf>

9) Wei D, Kanai M, Huang S, *et al.* Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*. 2006;27:23-31.

10) Ghaleb AM, Yang VW. Kruppel-like factor 4 (KLF4): what we currently know. *Gene*. 2017;611:27-37.

11) Ma MQ, Zhang HD, Tang P, *et al.* Association of Kruppel-like factor 4 expression with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:6679-6685.

12) Straoquadanio G, Wang X, Wallace MD, *et al.* The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:251-265.

13) Jain AK, Allton K, Iacovino M, *et al.* p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS Biol*. 2012;10:e1001268. (accessed 2020 Feb17)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3289600/pdf/pbio.1001268.pdf>

14) Tai SK, Yang MH, Chang SY, *et al.* Persistent Kruppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2011;102:895-902.

15) Nagata T, Shimada Y, Sekine S, *et al.* KLF4 and NANOG are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2017;24:326-335.

16) Hashimoto I, Nagata T, Sekine S, *et al.* Prognostic significance of KLF4 expression in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2017;13:819-826.

17) Hu J, Li H, Wu C, *et al.* The prognostic value of decreased KLF4 in digestive system cancers: A meta-analysis from 17 studies. *Dis Markers*. 2017;3064246. (accessed 2020 Feb17)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618782/pdf/DM2017-3064246.pdf>

18) Yu M, Hao B, Zhan Y, *et al.* Kruppel-like factor 4 expression in solid tumor prognosis: a meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2018;485:50-59.

Legends for Figures/Figure legends (図の説明)

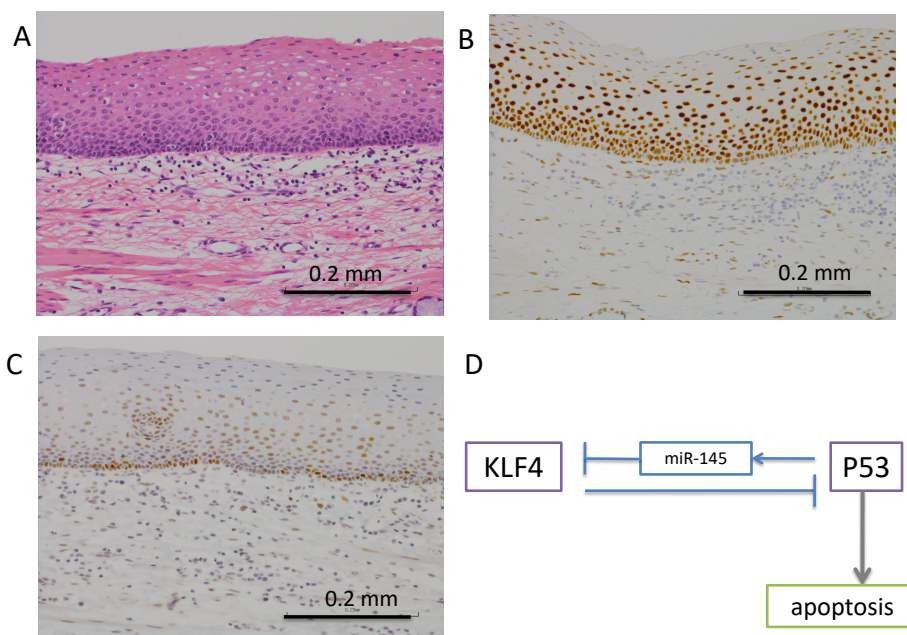


Figure 1. Immunohistochemical analyses of Kruppel-like factor 4 (KLF4) and p53 expression in the normal esophageal mucosal tissue. (A) Histopathology of the normal esophageal tissue in Hematoxylin-eosin (HE) stain (magnification, x200). Normal squamous epithelium showed positive KLF4 expression in B (magnification, x200). KLF4 stain was weaker at basal layer but stronger at spinous layer. In contrast, p53 expression was limited to the basal layer (C, magnification, x200). Each bar indicated 0.2 mm. Inhibitory role between p53 and KLF4 is schematically indicated in D.

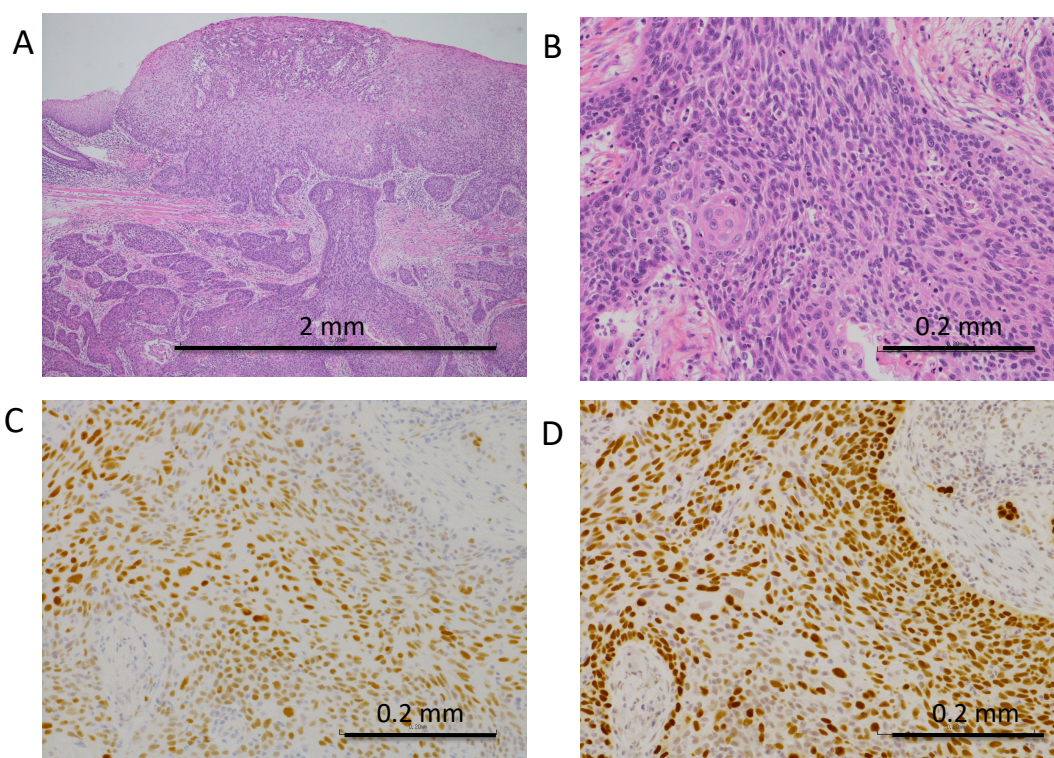


Figure 2. Representative examples of the expression levels of Kruppel-like factor 4 (KLF4) protein using clinical specimens (case 1) determined by immunohistochemistry. (A, B) Histopathologic features of the esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) were shown (HE stain, magnification, x40 in A and x200 in B). ESCC with positive KLF4 and p53 expression were indicated in (C) and (D), respectively (magnification, x200).

Table 1. Patient characteristics and clinicopathological parameters.

characteristic	n =88		characteristic	n =88
Age			T classification	
Mean value \pm SD	67.8 \pm 9.2		T0	0
Gender			T1a	23
Male	74		T1b	21
Female	14		T2	11
Tumor size (mm)			T3	33
Mean value \pm SD	33.1 \pm 26.8		T4	
Range	0-160		N classification	
Tumor differentiation			N0	47
Well	12		N1	21
Moderately	66		N2	14
Poorly	10		N3	4
Lymphatic invasion			N4	2
Present	29		Pathological stage	
Absent	59		0	22
Vascular invasion			I	15
Present	29		II	20
Absent	59		III	29
			IV	2

Table 2. Relationship between either KLF4 or p53 expression and clinicopathological features.

Characteristic	KLF4		p-value	p53		p-value
	Negative (n=43)	Positive (n=45)		Negative (n=15)	Positive (n=73)	
Age	68.1 \pm 9.4	67.4 \pm 9.1	0.7259	68.6 \pm 8.9	67.6 \pm 9.3	0.6864
Gender						
Male	38	36	0.2831	15	59	0.0643
Female	5	9		0	14	
Tumor size (mm)	34.2 \pm 26.0	32.1 \pm 27.8	0.3179	27.0 \pm 23.7	34.4 \pm 27.4	0.8241
Tumor differentiation						
Well	5	7	0.4514	3	9	0.4211
Moderately	31	35		11	55	
Poorly	7	3		1	9	
Induction therapy						
Present	39	42	0.6479	13	68	0.3980
Absent	4	3		2	5	
Lymphatic invasion						
Present	15	14	0.7067	13	68	0.5239
Absent	28	31		2	5	
Vascular invasion						
Present	18	11	0.0823	5	24	0.9727
Absent	25	34		10	49	
T classification						
T0, T1a, T1b	15	29	0.0056	7	37	0.7768
T2, T3, T4	28	16		8	36	
N classification						
N0	18	29	0.0338	7	40	0.5655
N1, N2, N3, N4	25	16		8	33	
Pathological stage						
0, I, II	24	33	0.0855	9	48	0.6709
III, IV	19	12		6	25	

KLF4,

Kruppel-like factor 4

Table 3. Positive rate of KLF4 and p53 expression in each infiltration depth.

	All cases (n=88)	EP, LPM, MM (n=23)	sm1, sm2, sm3 (n=21)	MP, AD (n=44)
KLF4	51.1% (45)	65.2% (15)	66.7% (14)	36.3% (16)
p53	82.9% (73)	78.3% (18)	90.5% (19)	81.8% (36)

KLF4, Kruppel-like factor 4; EP, epithelium; LPM, lamina propria; MM, muscularis mucosae; SM, submucosa; MP, muscularis propria; AD, adventitia.

Table 4. The number of KLF4 immunohistochemical staining scores in T3 cases.

compartment	Range	Mean \pm SD	Median	p-value
EP, LPM, MM, SM	1-8	4.16 \pm 0.33	4	0.0742
MP, AD	0-7	3.86 \pm 0.24	3	

P-value was estimated by the Wilcoxon test. KLF4, Kruppel-like factor 4; EP, epithelium; LPM, lamina propria; MM, muscularis mucosae; SM, submucosa; MP, muscularis propria; AD, adventitia.

Kruppel-like Factor 4 Expression and Clinical Outcomes in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Tetsuya KITAJIMA^{1, 2)}, Genshu TATE¹⁾, Tasuku NAGUMO¹⁾, Sakiko MIURA¹⁾, Mayumi HONMA¹⁾, Eisuke SHIOZAWA¹⁾, Masahiko MURAKAMI²⁾, Masafumi TAKIMOTO¹⁾, and Toshiko YAMOCHI¹⁾

¹⁾Department of Pathology and Laboratory Medicine, Showa University School of Medicine

²⁾Department of Surgery, Division of General and Gastroenterological Surgery, Showa University School of Medicine

Background

Kruppel-like factor 4 (KLF4) is a transcriptional factor that is widely found in various human tissues. In previous studies, the dual-purpose of KLF4 has been identified – it can function either as a tumor suppressor or as an oncogene in cancer, based on its cellular context. However, there are few reports on the relationship between KLF4 expression and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). In this study, we aimed to elucidate the role of KLF4 in the pathogenesis of ESCC.

Materials and methods

We included patients with ESCC who underwent subtotal esophagectomy between 2016 and 2017 at the Department of Surgery, Division of Gastroenterological Surgery, Showa University School of Medicine. We retrospectively analyzed the correlations between KLF4 or p53 expression and the patient's clinicopathological features.

Results

In this study, 88 patients were included. The proportion of KLF4-positive cells was high in the normal esophageal mucosa tissue and low in the ESCC tissue (88.6% [78/88] vs 51.1% [43/88]), and this difference in KLF4 expression was statistically significant. In patients with

lymphatic metastasis or invasive carcinoma, KLF4 expression levels were low and significantly lower than in those without lymphatic metastasis or invasive carcinoma. In contrast, there were no significant correlations between p53 expression levels and clinicopathological features.

Conclusions

In this study, we found several correlations between the expression of KLF4 and histological grade of ESCC; a low expression of KLF4 is associated with advanced ESCC. This suggests that KLF4 acts as a tumor suppressor in ESCC.

Keywords : Kruppel-like factor 4 (KLF4), esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), tumor suppressor