

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 新田 健雄

学 位 論 文 題 名

肝外胆管癌における Epithelial Mesenchymal Transition の臨床病理学的検討
(The clinicopathological study of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in
Extrahepatic Bile Duct Carcinoma)

【背景と目的】

胆管癌は難治性かつ予後不良の悪性腫瘍であり、その浸潤プロセスや進展機序については不明な点が多い。近年、癌の進展・浸潤メカニズムに EMT (epithelial-mesenchymal transition) という概念が提唱されている。上皮細胞がその上皮としての性質を喪失し、間葉系細胞の形質を獲得することによって浸潤転移能を得るとする理論であり、多くの悪性腫瘍（浸潤癌）において、腫瘍の進展・浸潤に関与することが報告されている。胆管癌の進展・浸潤にも EMT が関連することが注目され始めているが、報告例は極めて少なくその臨床病理学的意義についてはいまだ不明な点が多い。本研究では胆管癌腫瘍組織における EMT の発現状況を検討し、病理学的意義や臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

症例は、1995 年から 2006 年の 12 年間に、北海道大学消化器外科 II で切除された肝外胆管癌（浸潤癌）117 症例の手術切除標本を用いた。症例の内訳は、男性 92 例、女性 25 例であり、年齢の中央値は 71 歳（範囲：44-87 歳）であった。病理組織診断は主として UICC による TNM 分類（第 7 版）に準拠して検討を行った。TNM 分類による Staging では、Stage I / II / III / IV でそれぞれ 32 / 34 / 31 / 20 例の結果となった。EMT 関連タンパク質を標的とする免疫組織化学染色による検討を行うにあたり、組織マイクロアレイ（TMA）の作製を行った。本研究では TMA 作製にあたって、腫瘍の複数の部位から組織を採取した。免疫組織化学染色において使用した EMT 関連マーカー抗体は、EMT 誘導転写因子として Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2 の 5 種類、上皮系マーカーとして E-cadherin と Cytokeratin 19 の 2 種類、そして間葉系マーカーとして Vimentin, N-cadherin, S100A4, α -SMA, Fibronectin の 5 種類を選択し、計 12 種類の EMT 関連マーカー抗体を使用した。EMT 誘導転写因子マーカー抗体 5 種類（Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2）については、予め RT-PCR 解析により遺伝子発現レベルを確認した 7 種類の細胞株のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）セルブロック標本を用いて、その発現レベルを指標に免疫組織化学染色における抗体のバリデーションを行った。免疫組織化学染色のカットオフ値の設定には受信者動作特性（Receiver operating characteristic ; ROC）曲線を用いた。統計解析には χ^2 検定、フィッシャーの正確検定、および Mann-Whitney の U 検定を使用した。患者予後は、全生存率（Overall survival ; OS）にて検討を行った。単変量解析は Kaplan-Meier 法を用いた Log-rank 検定により行った。多変量解析は Cox の比例ハザードモデルにて検討した。検討する臨床病理学的因子としては、患者因子として年齢と性別、腫瘍因子として、腫瘍径、腫瘍占拠部位、肉眼型分類、深達度、肝動脈浸潤の有無、門脈浸潤の有無、リンパ管浸潤の有無、静脈浸潤の有無、神経浸潤の有無、表層拡大進展病変の有無、組織型、TNM 分類における T 因子、N 因子、Stage、そして腫瘍遺残度（Residual tumor ; R）の計 17 項目である。p 値は 0.05 未満をもって有意とした。

【結果】

EMT 誘導転写因子マーカー抗体のバリデーションとして、RT-PCR とセルブロックの免疫組織化学染色の結果はおおむね一致しており、染色の局在は過去の報告の他癌腫における検討と一致した。以上より本研究に使用する EMT 誘導転写因子マーカー抗体について RT-PCR, 免疫組織化学染色いずれにおいても抗体の特異性が確認された。

Log-rank 検定を用いた単変量解析にて、静脈浸潤、組織型、TNM 分類 T 因子、N 因子、腫瘍遺残度といった臨床病理学的因子 5 項目に加えて、E-cadherin, N-cadherin, S100A4, vimentin, および fibronectin の 5 つの EMT 関連タンパク質の発現が統計学的に有意に予後に影響を与えることが示された。また、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では、N 因子であるリンパ節転移に加えて、E-cadherin, N-cadherin, S100A4 の 3 つの EMT 関連タンパク質が、肝外胆管癌術後患者の独立した予後規定因子として検出された。E-cadherin と N-cadherin の発現パターンを組み合わせ、いわゆるカドヘリンスイッチが E-cadherin と N-cadherin 単独群よりも予後不良因子となり、かつ多変量解析にて肝外胆管癌術後患者の独立した予後規定因子であることが示された。

【考察】

E-cadherin は上皮細胞の接着結合を構成する代表的な接着分子であり、EMT 獲得に伴いその発現が抑制されることから EMT の指標として頻繁に用いられている。また、N-cadherin はある種の癌細胞で EMT に伴って異常発現し、腫瘍細胞の遊走能や浸潤能に関係しているとされる。癌細胞において E-cadherin の消失と N-cadherin の発現増強の両方を認める現象は、カドヘリンスイッチと呼ばれており、癌細胞の浸潤・進展にとって重要な役割を果たしていると考えられる。また、S100A4 は S100 タンパク質ファミリーのひとつであり、間葉系細胞とある種の上皮系腫瘍細胞の両方で発現している。肝外胆管癌における E-cadherin, N-cadherin, カドヘリンスイッチの発現、および S100A4 の発現と予後解析の報告例は極めて限られているが、E-cadherin, N-cadherin, カドヘリンスイッチ、および S100A4 の発現の有無が肝外胆管癌術後患者の予後を予測する重要な指標となりうるとの本研究の結論とほぼ一致している。本研究から得られた新たな知見としては、カドヘリンスイッチ陽性群が E-cadherin, N-cadherin の単独群と比較して統計学的有意に予後不良となり、カドヘリンスイッチが肝外胆管癌術後患者の独立した予後規定因子となる点が挙げられる。しかし、カドヘリンスイッチ陽性群が、E-cadherin, N-cadherin 単独群よりも悪性度の高い因子となる腫瘍学的機序は明確にはわかってはいない。カドヘリンと EGF, FGF といった各種増殖因子受容体シグナル経路 (Growth factor receptor signaling pathway) との関係性が考えられる。多くの癌腫において、EMT を制御する転写因子、いわゆる EMT 誘導転写因子の発現が予後の指標となると報告されているが、本研究の予後解析では、代表的な EMT 誘導転写因子である Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2 のいずれにおいても有意差を認めなかった。その原因として推測されるのは、E-cadherin を制御することが最近報告されている転写因子、Kruppel-like factor 8 (KLF8), Goosecoid, FoxC2 などの転写因子の関与が挙げられる。また、症例数、患者因子、検体の固定条件、および免疫組織化学染色のカットオフ値の設定法などの条件の相違が、既報告との結果の差異に影響を与えている可能性が考えられる。

【結論】

本研究において、われわれは E-cadherin, N-cadherin, S100A4 の 3 つの EMT マーカー、さらにカドヘリンスイッチが肝外胆管癌術後患者の予後を予測する独立した指標となることを明らかにした。これらの結果は、肝外胆管癌術後患者において、術後補助療法の適応の可否や術後サーベイランスの観点から有益な情報となりうる。また、肝外胆管癌の個別化治療の開発や症例層別化の発展にも寄与する可能性を秘めており、今後さらなる検討が必要と考えられた。