

学 位 論 文 題 名

Immunostained Cathepsins B and L Correlate
with Depth of Invasion and Different Metastatic
Pathways in Early Stage Gastric Carcinoma

(免疫染色法によるカテプシンBおよびLの発現と、
早期の胃癌における深達度及び転移経路との関連)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】近年鏡視下治療の進歩などに伴い、胃癌に対して低侵襲手術が行われるようになってきている。しかしながら早期の段階で治療しても経過観察中に転移を認める症例もあり、治療法選択のためにも癌の浸潤転移に関する予測因子の検索がますます重要となってきた。癌の進行過程において、細胞外マトリックス、基底膜、血管壁等の周囲組織の破壊に種々の蛋白分解酵素が関与している。カテプシンBとカテプシンLはともにシステインプロテアーゼに分類され、生理的にはライソゾーム内で細胞内蛋白の異化に加担しているが、細胞の腫瘍化と共に細胞外に分泌され、周囲組織の破壊に関与していることが知られている。これまでいくつかのヒト腫瘍組織でその産生、分泌が亢進していることが報告されており、さらにカテプシンBに関してはその発現が大腸癌や肺癌の予後に影響するとの報告もある。また乳癌において、カテプシンB, Lと同様なライソゾーム酵素に含まれるカテプシンDは予後因子の一つと考えられてきている。胃癌についてもカテプシンB, Lの発現亢進が報告されているものの、進行症例を中心とした検討が多く、その臨床的意義についても明らかにはなっていない。そこで比較的早期の胃癌におけるカテプシンB, Lの発現における臨床的意義を検討することにより、カテプシンB, Lの発現が予後因子となりうるか否かを検討した。

【対象・方法】北海道大学医学部附属病院第1外科にて切除された胃癌51症例51病変を対象とした。癌の浸潤範囲は粘膜下層まで達するもの(sm癌)38病変、固有筋層まで達するもの(mp癌)13病変であり、全症例手術時には遠隔転移は認めず、UICC分類でstage IIまでの比較的早期の病変である。これら51病変の、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、ABC法で免疫染色を行なった。1次抗体はカテプシンB、カテプシンLともに抗ヒトのポリクローナル抗体を使用し、DABで発色した。染色強度の判定方法は、ランダムに癌細胞を1,000個カウントし、その中の染色陽性細胞の比率により、カテプシンB、カテプシンLについて各群17例ずつ均等にそれぞれ、陰性、弱陽性、強陽性の3群に分類した。染色の強度すなわち各カテプシンの発現レベルと、胃癌の組織型、深達度、リンパ管浸襲、静脈侵襲及びリンパ節転移の有無との関係を検討した。統計はMann-Whitney Uテストを用い、P値0.05未満を有意とした。

【結果】1) カテプシンB, Lともに周囲の正常組織はほとんど染色されず、主に腫瘍組織

に染色を認めた。さらに腫瘍内部でもリンパ球など正常細胞の染色頻度は低かった。癌細胞の各群での染色陽性比率は、カテプシン B では陰性群が 0-48%，弱陽性群が 51-87%，強陽性群が 88-100%であり、カテプシン L では各々 0-33%，35-71%，73-100%であった。2) 胃癌組織でのカテプシン B の発現と、組織型、静脈侵襲、リンパ節転移との関係は認めなかったが、深達度に関しては sm 癌より mp 癌でより強い発現を認め(p<0.05)，またリンパ管侵襲に関しても、侵襲陰性例(34 例)より侵襲陽性例(17 例)で強い発現を認めた(p<0.05)。3) カテプシン L は、組織型、リンパ管侵襲、リンパ節転移との関係は認めなかったが、深達度に関して、カテプシン B と同様に sm 癌より mp 癌に強い発現を認めた(p<0.05)。さらに静脈侵襲に関して侵襲陰性例(46 例)より侵襲陽性例(5 例)で強い発現を認めた(p<0.05)。

【考察】本研究はシステインプロテアーゼであるカテプシン B、カテプシン L の胃癌における臨床的意義を検討したものである。一般にプロテアーゼは不活性前駆体で細胞より分泌され、種々の蛋白分解酵素及び内因性酵素阻害物質による複雑なカスケードで酵素活性が調節されている。そのためシステインプロテアーゼの組織内での蛋白分解能の測定は困難と考えられている。今回の研究は、ポリクローナル抗体を使用した免疫染色法であるため、プロテアーゼの酵素活性を直接測定したのではなく、腫瘍細胞のプロテアーゼ産生能を評価したものであるといえる。これまでも過去に異なる評価法である酵素活性法及び ELISA により、胃癌組織でカテプシン B、L の発現が正常組織より亢進していることは報告されていた。今回施行した免疫染色法は半定量法ではあるが、これらの結果と一致した。またプロテアーゼの発現程度と癌の進行度との関係は、いまだ一定の見解が得られていない。今回の研究で、カテプシン B、L の発現程度は sm 癌の mp 癌への進展との間に正の相関を示し、早期の胃癌の進行に関係することが示された。さらにカテプシン B はリンパ管侵襲陰性例より陽性例で強い発現を認め、カテプシン L では静脈侵襲陰性例より陽性例で強い発現を認めたことより、カテプシン B はリンパ行性転移に、カテプシン L は血行性転移に関与する可能性が示唆される。血管壁にはその構成成分としてエラスチンからなる弾性繊維が含まれており、強固なバリアーを形成している。カテプシン L のエラスチン分解能がカテプシン B より 100 倍以上高いという基礎研究報告があり、この基質特異性の相違が転移様式の相違の原因になっている可能性が考えられる。これまで本研究のように特定のプロテアーゼの発現と転移様式との関係を示した報告はなく、今後腫瘍の発育進展におけるプロテアーゼそれぞれの意義について更なる研究が期待される。本邦では早期の胃癌に対して、胃切除及び所属リンパ節郭清術が標準的治療であったが、術後の生活の質等を考慮すると低侵襲の治療が望ましい。実際近年では早期の胃癌に対して鏡視下治療が行われるようになってきている。しかしながら縮小治療の適応決定のためには、これまで以上に転移に関与する因子の検索が重要となる。本研究の対象であるカテプシン B、L の発現も転移予測因子の一つとなる可能性があるものと考えられる。また術前、術中腫瘍組織のカテプシンの発現を調べることにより、縮小手術の適応を選択する要素となると共に、カテプシン L が強く発現している腫瘍には術後の化学療法を追加するといった、治療法選択の一助となる可能性についても示唆される。

【結語】カテプシン B、L とともに sm 癌より mp 癌で多く発現していることより、カテプシン B、L の発現は早期胃癌から進行胃癌への進展に関与している。またカテプシン B の発現はリンパ管侵襲と、カテプシン L の発現は静脈侵襲と相関することより、両者は異なるルートの転移に関与している可能性が示唆される。今後胃癌組織のカテプシンの発現検索は、治療法の選択因子の一つになりうるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

Immunostained Cathepsins B and L Correlate with Depth of Invasion and Different Metastatic Pathways in Early Stage Gastric Carcinoma

(免疫染色法によるカテプシンBおよびLの発現と、
早期の胃癌における深達度及び転移経路との関連)

近年胃癌に対して低侵襲手術が盛んに行われているが、早期の段階で治療しても転移のために死亡する例があり、治療法選択のためにも癌の浸潤転移に関する予測因子の検索がますます重要となっている。癌の進行の過程において、カテプシンを含め種々の蛋白分解酵素の関与が知られている。カテプシンBとカテプシンLはともに腫瘍化に伴い細胞外に分泌され、周囲組織の破壊に関与していることが知られている。ヒト腫瘍組織においても産生及び分泌が亢進していることが報告されているが、進行症例を対象としたものが多く、またその臨床的意義についても明らかではない。そこで申請者は、比較的早期の胃癌におけるカテプシンB及びLの発現の臨床病理学的意義を検討することにより、これらの発現が予後因子となりうるか否かを検討した。

対象は遠隔転移は認めない胃癌 51 症例で、癌の浸潤が粘膜下層まで達するもの (sm 癌) が 38 例、固有筋層まで達するもの (mp 癌) が 13 例であった。これらのホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、ABC 法で免疫染色を行なった。1 次抗体はカテプシンB、カテプシンLともに抗ヒトのポリクローナル抗体を使用し、DAB で発色した。染色強度の判定方法は、無作為に癌細胞を 1,000 個カウントし、その中の染色陽性細胞の比率により、カテプシンB、カテプシンLについてそれぞれ、陰性、弱陽性、強陽性の 3 群に、各群均等に分類した。染色の強度すなわち各カテプシンの発現レベルと、胃癌の深達度、組織型、リンパ管浸襲、静脈侵襲及びリンパ節転移の有無との関係を検討した。

カテプシンB及びLともに周囲の正常組織はほとんど染色されず、主に腫瘍組織に染色を認めた。さらに腫瘍内部でも正常間質細胞の染色頻度は低かった。これまでも過去に異なる評価法である酵素活性法及び ELISA により、胃癌組織でカテプシンB及びLの発現が正常組織より亢進していることは報告されていた。今回施行した免疫染色法は半定量法ではあるが、これらの結果と一致した。

胃癌組織でのカテプシンBの発現と、組織型、静脈侵襲、リンパ節転移との関係は認めな

かったが、深達度に関してはsm癌よりmp癌でより強い発現を認め、またリンパ管侵襲に関しても、侵襲陰性例(34例)より侵襲陽性例(17例)で強い発現を認めた。また、カテプシンLは、組織型、リンパ管侵襲、リンパ節転移との関係は認めなかったが、深達度に関して、カテプシンBと同様にsm癌よりmp癌に強い発現を認めた。さらに静脈侵襲に関して侵襲陰性例(46例)より侵襲陽性例(5例)で強い発現を認めた。

プロテアーゼの発現程度と癌の進行度との関係は、いまだ一定の見解が得られていない。今回の研究でカテプシンB及びLともに、その発現程度はsm癌からmp癌への進展との間に正の相関を示し、早期胃癌から進行胃癌への進展に関与していることが示された。またさらにカテプシンBはリンパ管侵襲陰性例より陽性例で強い発現を認め、カテプシンLでは静脈侵襲陰性例より陽性例で強い発現を認めたことより、カテプシンBはリンパ行性転移に、カテプシンLは血行性転移に関与する可能性が示唆される。血管壁に含まれるエラスチンに対し、カテプシンLはカテプシンBより高い分解能を持ち、この基質特異性の相違が転移様式の相違の原因になっている可能性が考えられる。これまで本研究のように特定のプロテアーゼの発現と転移様式との差異を示唆する報告はなく、今後腫瘍の発育進展におけるプロテアーゼそれぞれの意義について更なる研究が期待される。

以上より、本研究の対象であるカテプシンB及びLの発現は、早期の胃癌における転移予測因子の一つとなるものと考えられる。また今後は術前、術中腫瘍組織のカテプシンの発現を調べることにより、縮小手術の適応を選択する要素となると共に、カテプシンBの発現が亢進している腫瘍はリンパ節郭清領域の拡大を、カテプシンLが強く発現している腫瘍には術後化学療法を追加するといった、治療法選択因子の一つになりうるものと期待される。

審査にあたり、副査浅香教授より1)カテプシンB及びLの抗体特異性について、2)粘膜内でのカテプシンの発現程度及び粘膜癌での検討について、3)転移巣でのカテプシン発現の有無について、4)性差など他の臨床的項目の検討について質問があり、副査吉木教授より1)リンパ管と静脈の鑑別に関して、2)リンパ管侵襲とリンパ節転移との一致率について、3)癌組織の管腔側と浸潤先端部での発現の差について、4)治療への応用について質問があった。主査西村教授からは1)カテプシンBとLの相関の有無について、2)免疫染色以外のプロテアーゼ評価法に関して質問があった。申請者は未発表データを中心に自己研究結果を詳細に説明し、過去の報告との相違点に関しての考察及び今後の臨床応用の具体的な可能性等、上記質問に対して適切な回答を行った。

審査員一同は本研究を、早期の胃癌におけるカテプシンB及びLの意義について検討した研究として高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。