

学位論文題名

RCAS1 Expression as a Prognostic Factor after
Curative Surgery for Extrahepatic Bile Duct Carcinoma

(肝外胆管癌根治切除後予後因子としての RCAS1 の発現)

学位論文内容の要旨

目的

RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells)はヒト癌細胞の細胞膜に存在する腫瘍関連抗原で、正常免疫系細胞に発現しているレセプターを介して、アポトーシスを誘導することで、腫瘍細胞の免疫回避に関与していると考えられている。現在までにいくつかの癌の予後が RCAS1 の発現と相関していると報告されているが、肝外胆管癌における発現やその意義についての報告はなく、本研究では、肝外胆管癌根治切除症例における臨床病理学的因子および予後との関連を検討し、RCAS1 発現の役割と意義を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 材料

1992年から1999年までに根治切除がなされた肝外胆管癌症例60症例(男性46例, 女性14例; 平均年齢66.2歳)を対象とした。今回の検討では切除断端陽性例および姑息手術症例は除外した。すべての標本は10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋した。腫瘍最大径を含む4 μ m切片を作成し免疫組織染色を行った。腫瘍の分類と臨床病期分類はUICCのTNM分類を用いた。

2. 免疫組織染色

免疫組織反応はストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンプレックス法で施行した。パラフィン包埋切片ブロックから作成した組織切片をキシレンで脱パラフィンした後、3%過酸化水素溶液で内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。10%正常ヤギ血清で飽和させた後、一次抗体として500倍に希釈した抗RCAS1抗体(anti-RCAS1 mouse IgM monoclonal antibody, Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan)を使用した。二次抗体はHistofine SAB-PO kit (Nichirei Corporation, Tokyo, Japan)を使用し、発色には3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (Histofine SAB-PO kit, Nichirei Corporation, Tokyo, Japan)を用いた。Hematoxylinで核染色した後、封入し検鏡した。RCAS1発現の判定は癌細胞のうちびまん性に染色された細胞が5%未満のものを陰性、5-25%を弱陽性、25-50%を中等度陽性、50%以上のものを強陽性とし、陰性、弱陽性例を低発現群、中等度陽性、強陽性例を高発現群の2群に分類した。

3. 統計解析

χ^2 検定, Fisher 直接検定, log-rank 検定, Cox 検定を適宜行った. P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した.

結果

RCAS1 の発現は癌細胞の細胞質および細胞膜上に認められ, 正常の胆管上皮細胞にはその発現が認められなかった. 肝外胆管癌 60 例中, 8 例が陰性, 6 例が弱陽性, 6 例が中等度陽性, 40 例が強陽性であった. 陽性率は 86.7%で, すべての病期において RCAS1 は高率に発現していた (stage0 50.0%, stageI 83.3%, stageII 75.0%, stageIII 100%, stageIVA 91.3%, stageIVB 100%). 臨床病理学的因子 (年齢, 性別, 腫瘍分化度, T 因子, N 因子, M 因子, 静脈侵襲, リンパ管侵襲, 神経浸潤, 病期) との比較検討では, RCAS1 の発現と臨床病理学的因子との間に有意な相関は認められなかったが, 予後に関する検討では, log-rank 検定で p 値が $p=0.0221$ であり, RCAS1 高発現群で有意に予後不良であった. さらに, 多変量解析の結果, RCAS1 の発現はリンパ節転移, 神経浸潤と共に独立した予後規定因子であることが判明した ($p=0.0324$).

考察

腫瘍細胞が存続, 進展するためには生体内の免疫監視機構から逃れる必要がある. 癌細胞に発現した RCAS1 は ligand として作用し, 免疫担当細胞がもつ receptor に結合して apoptosis を誘導すると考えられている. RCAS1 を強発現している肺癌組織では, 腫瘍に浸潤するリンパ球の apoptosis の増加が認められており, この仮説を支持している.

本研究において, 肝外胆管癌での RCAS1 の発現は全体で 86.7%であり, stage I 症例に限ってみても 83.3%と高率に認められた. また, その発現は腫瘍特異的であった. これらの結果から, RCAS1 の発現は肝外胆管癌の発癌の過程において, 比較的早い段階で起こっていることが推測された.

本研究において, RCAS1 の発現は臨床病理学的因子との間に有意な相関が認められなかったが, 子宮癌や非小細胞肺癌と同様に肝外胆管癌の独立した予後規定因子であることが示された. この結果から RCAS1 発現による免疫回避能が肝外胆管癌の予後の決定に重要な役割を果たしていると考えられた.

肝外胆管癌での RCAS1 の発現は高頻度かつ腫瘍特異的に認められたが, 同様に膵癌, 胆嚢癌の検索結果でも, その発現は高頻度かつ腫瘍特異的であった. これらの結果から, RCAS1 は膵胆道系腫瘍における腫瘍マーカーとなり得るものと考えられる. さらには RCAS1 発現細胞にターゲットを絞った新しい治療法の発展に貢献する可能性が示唆された.

結語

肝外胆管癌において RCAS1 の発現は高頻度かつ腫瘍特異的に認められた. さらに, RCAS1 は切除可能な肝外胆管癌の独立した予後不良因子になり得ると考えられた.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

RCAS1 Expression as a Prognostic Factor after Curative Surgery for Extrahepatic Bile Duct Carcinoma

(肝外胆管癌根治切除後予後因子としての RCAS1 の発現)

RCAS1 はヒト癌細胞の細胞膜に存在する腫瘍関連抗原で、正常免疫系細胞に発現しているレセプターを介して、アポトーシスを誘導することで、腫瘍細胞の免疫回避に関与していると考えられている。現在までにいくつかの癌の予後が RCAS1 の発現と相関していると報告されているが、肝外胆管癌における発現やその意義についての報告はなく、本研究では、肝外胆管癌根治切除症例における臨床病理学的因子および予後との関連を検討し、RCAS1 発現の役割と意義を明らかにすることを目的とした。

1992 年から 1999 年までに根治切除がなされた肝外胆管癌症例 60 症例（男性 46 例、女性 14 例、平均年齢 66.2 歳）を対象とした。切除された肝外胆管癌組織における蛋白発現を調べるため、抗 RCAS1 抗体、HRP 標識二次抗体および DAB を用いて免疫染色した。RCAS1 発現の判定は癌細胞のうちびまん性に染色された細胞の割合が 5%未満を陰性、5%以上を陽性と判定し、陽性例については染色された細胞の割合が 5-25%を弱陽性、25-50%を中等度陽性、50%以上を強陽性の 3 段階に分類した。さらに陰性、弱陽性を低発現群、中等度陽性、強陽性を高発現群の 2 群に分類し、予後、臨床病理学的因子について比較検討を行った。統計解析には χ^2 検定、Fisher 直接検定、log-rank 検定、Cox 検定を適宜行い、P 値が 0.05 未満を有意差ありと判定した。

結果として、RCAS1 の発現は癌細胞の細胞質および細胞膜上に認められ、正常の胆管上皮細胞にはその発現が認められなかった。肝外胆管癌 60 例中、8 例が陰性、6 例が弱陽性、6 例が中等度陽性、40 例が強陽性であった。陽性率は 86.7%で、Stage I 症例に限ってみても陽性率は 83.3%と高率であった。臨床病理学的因子との比較検討では、RCAS1 の発現と臨床病理学的因子との間に有意な相関は認められなかったが、予後に関する検討では、log-rank 検定で p 値が $p = 0.0221$ であり、RCAS1 高発現群で有意に予後不良であった。さらに、多変量

解析の結果、RCAS1 の発現はリンパ節転移、神経浸潤と共に独立した予後規定因子であることが判明した。

本研究において、肝外胆管癌における RCAS1 の発現は腫瘍特異的で、またすべての病期で高頻度に発現していた。これらの結果から RCAS1 の発現は肝外胆管癌の発癌の過程において、比較的早い段階で起こっていることが推測された。また、RCAS1 の発現は臨床病理学的因子との間に有意な相関を認めなかったが、肝外胆管癌の独立した予後不良因子であることが示された。この結果から RCAS1 発現による免疫回避能が肝外胆管癌の予後の決定に重要な役割を果たしていると考えられた。肝外胆管癌での RCAS1 の発現は高頻度かつ腫瘍特異的に認められたが、同様に膵癌、胆嚢癌の検索結果でも、その発現は高頻度かつ腫瘍特異的であった。以上より、RCAS1 は膵胆道系腫瘍における腫瘍マーカーとなり得るものと考えられ、さらには RCAS1 発現細胞にターゲットを絞った新しい治療法の発展に貢献する可能性が示唆された。

口頭発表において、今村教授より半定量的な cut-off 値の妥当性、receptor の発現を中心に RCAS1 による免疫回避機構のメカニズムについて質問があった。ついで加藤教授より他の病理学的予後因子と相関がない理由、RCAS1 を利用した治療法の可能性について質問があった。また秋田教授より腫瘍浸潤リンパ球数との相関、RCAS1 がもつ免疫回避能以外の機能の可能性、胆嚢癌における検討結果との共通点と相違点について質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

肝外胆管癌における RCAS1 の発現を明らかにし、肝外胆管癌の予後の予測、遺伝子治療の可能性を示唆した本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。