

学位論文題名

High Expression of Tumor-associated Antigen RCAS1 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma is an Unfavorable Prognostic Marker

(膵管腺癌において RCAS1 高発現は予後不良因子である)

学位論文内容の要旨

目的

RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells)はヒトの様々な癌細胞に存在する膜タンパクで、レセプターを発現している免疫担当細胞のアポトーシスを引き起こすと考えられている。現在までにいくつかの癌の予後因子として報告されているが、膵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、膵腺癌切除症例における RCAS1 発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子および予後との関連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膵腺癌80症例(男性45例,女性35例;平均年齢62歳)を対象とした。今回の検討では術前後に化学療法あるいは放射線療法を施行した症例は除外した。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。臨床病期はII期17例,III期37例,IV A期26例で、術後病理診断にて腫瘍切除断端陽性の症例は30例であった。

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。癌細胞のうちびまん性に染色された細胞が5%未満のものを陰性群、5-25%を1+群、25-50%を2+群、50%以上のものを3+群とした。

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

膵腺癌 80 例中 3 例が陰性、13 例が 1+、13 例が 2+、51 例が 3+ であった。RCAS1 陰性、1+を低発現群、2+、3+を強発現群とし、2 群間において、臨床病理学的因子（年齢、性別、T 因子、N 因子、腫瘍径、病期、腫瘍分化度、ly 因子、v 因子、腫瘍切除断端）との関係を分割表分析した。RCAS1 免疫染色性は N 因子 ($p=0.0608$)、病期 ($p=0.0934$) と有意ではないが相関傾向を認めた。予後に関する検討では、log-rank 検定で p 値が 0.0012 であり、RCAS1 強陽性の症例で有意に予後不良であった。さらに、多変量解析により RCAS1 は独立した予後因子であることが判明した ($p=0.023$)。

考察

腫瘍細胞は様々な方法を用いて宿主の免疫監視機構から逃れている。RCAS1 は癌細胞に存在するタンパクで、活性化された T リンパ球や NK 細胞などの免疫担当細胞に発現している receptor に対する ligand として働き、それらの免疫担当細胞の増殖を抑制し apoptosis を誘導すると考えられている。RCAS1 を強発現している癌細胞の周囲では、腫瘍に浸潤するリンパ球が高度に apoptosis を起こしているとの報告もあり、RCAS1 による腫瘍の免疫回避機構への関与が裏付けられている。

本研究において、RCAS1 は膵腺癌に非常に高頻度に発現しており (96%)、すでに報告されている他の癌と比較しても最も高率であった。また、RCAS1 と腫瘍化との関連についても子宮癌で報告されているが、本研究でも、正常膵管細胞では RCAS1 発現は認められなかったことから、膵腺癌においても RCAS1 発現が癌化に関与している可能性が示唆され、他の膵管内病変についても検討を要すると思われた。膵癌患者の予後は極めて悪いことが知られているが、RCAS1 の免疫回避機構から考えると、膵癌における RCAS1 発現率の高さがその原因の一つである可能性が示唆された。5 年生存率をみると、RCAS1 高発現群では 37.9%、低発現群では 9%であり、さらに、多変量解析において RCAS1 が有意な独立予後因子であったことを考え合わせると、RCAS1 は膵腺癌患者の予後を決定付ける重要な役割を担っていると考えられた。また、RCAS1 が分泌タンパクであることも報告されており、血清や膵液を用いた術前診断も有効であると考えられる。さらに、これまで様々な癌特異抗原が遺伝子治療の標的タンパクとして用いられてきたが、RCAS1 の膵腺癌における高い発現率、特異性を考えると、癌遺伝子治療における新しい標的となる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

High Expression of Tumor-associated Antigen RCAS1 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma is an Unfavorable Prognostic Marker

(膵管腺癌において RCAS1 高発現は予後不良因子である)

RCAS1(receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) は40kDaの膜タンパクで、様々なヒトの癌においてその発現が報告されている。活性化された正常免疫系細胞に発現しているレセプターに対するリガンドとして働き、それら免疫系細胞の増殖を抑制し、細胞死に陥らせると考えられている。RCAS1を強発現している癌細胞の周囲では、腫瘍に浸潤するリンパ球が高度に細胞死を起こしているとの報告もあり、RCAS1発現が腫瘍細胞の免疫回避能の獲得に関与していると考えられている。RCAS1は現在までにいくつかの癌の予後因子として報告されているが、膵癌における発現やその意義についての報告はない。本研究では、膵管癌切除組織におけるRCAS1発現状況を免疫染色を用いて検討し、その発現頻度、臨床病理学的因子および予後との関連を明らかにすることを目的とした。

1992年から1999年までに切除がなされた膵管癌80症例(男性45例、女性35例;平均年齢62歳)を対象とした。今回の検討では術前後に化学療法あるいは放射線療法を施行した症例、および術前検査により遠隔転移が認められた症例は除外した。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。病期分類はUICCのpTNM分類を用いた。病期はII期17例、III期37例、IVA期26例であった。また、慢性膵炎7症例も対象とした。免疫組織反応はstreptavidin-peroxidase-complex法で施行した。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クした。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。400倍視野で観察し、最も染色された細胞が認められる5視野においてRCAS1陽性細胞数を計測し、その平均値を用いて判定を行った。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-群、5-25%を1+群、25-50%を2+群、50%以上のものを3+群とした。統計解析に際し、RCAS1発現と臨床病理学的因子との相関は χ^2 検定を用いて行った。生存曲線はKaplan-Meier法を用いて作成し、生存率の解析にはlog-rank検定を行った。単変量解析、多変量解析にはCox比例ハザードモデルを用いた。p値0.05未満を有

意差ありと判定した。

結果として、膵管癌80例中77例(96%)においてRCAS1発現が認められた。また、正常膵管上皮、慢性膵炎症例の膵管上皮ではRCAS1発現はほとんど認められなかった(<5%)。いずれの臨床病理学的因子もRCAS1発現との間に有意な相関は認めなかったが、リンパ節転移($p=0.0608$)、臨床病期($p=0.0934$)と相関傾向を認めた。生存分析では、RCAS1高発現群の生存率は低発現群よりも有意に低かった($p=0.0012$)。5年生存率をみると、RCAS1低発現群では37.9%、高発現群では9%であった。病期III、IVA期症例に限定しても同様の結果であった($p=0.0124$)。単変量解析ではリンパ節転移陽性、腫瘍径(>3.5cm)、切除断端癌遺残陽性、RCAS1高発現が有意な予後不良因子であった。また、これらの因子における多変量解析ではいずれも有意な独立予後不良因子であった。

本研究ではRCAS1は膵管癌に非常に高頻度に発現していた。膵癌患者の予後は極めて悪いことが知られているが、RCAS1の発現による免疫回避能の獲得がその要因の一つである可能性が示唆された。生存分析においてRCAS1高発現群は低発現群よりも有意に予後不良であり、多変量解析においてもRCAS1が有意な予後不良因子であったことから、RCAS1は膵管癌患者の予後を決定付ける重要な役割を担っていると考えられた。また、本研究では免疫組織染色の結果よりRCAS1は癌細胞でのみ発現が認められ、正常上皮細胞では発現していなかった。RCAS1は分泌タンパクであることが既に報告されており、血清や膵液を用いた術前診断における有用なマーカーとなりうると考えられた。さらに、RCAS1の膵管癌における高い発現率、特異性を考えると、癌に対する分子標的治療の新しいターゲットとなる可能性が示唆された。

口頭発表において、秋田弘俊教授より膵腺腫でのRCAS1の発現の有無、腫瘍浸潤リンパ球との関連、RCAS1発現率の分類におけるcut-off値の妥当性、病期別のRCAS1の発現頻度、治療における展望についての質問があった。つづいて加藤紘之教授よりRCAS1の発現を4群に分類した場合の予後との相関、従来の予後因子との比較、手術適応における有用性についての質問があった。また今村雅寛教授よりRCAS1の発現を抑制することで得られる予後の改善、RCAS1レセプター発現の個体差、血清RCAS1と主病巣との相関、RCAS1の固形癌以外での発現に関する質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

膵管腺癌におけるRCAS1の発現状況と臨床・病理組織学的因子および予後との相関を明らかにし、新しい独立予後因子としての有用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本論文は博士(医学)の学位授与に値するものと判定した。