

学位論文題名

肝門部胆管癌の増殖および予後因子に関する
免疫組織学的検討：特に bax 蛋白発現について

学位論文内容の要旨

背景と目的

胆管癌はきわめて予後不良な癌の一つである。近年の診断技術、治療技術の進歩により治療成績の向上がみられるものの、肝門部胆管癌の術後5年生存率は8-40%と中・下部胆管癌の成績に比べ不良である。その理由の一つとして肝門部胆管は門脈、肝動脈に5mm以内に隣接し、壁内の筋組織は非常に疎なことから、癌細胞が容易に深部へ浸潤しうるといった解剖学的特徴を持っているためと思われる。一方、細胞工学的、遺伝子工学的アプローチによって生物学的悪性度の評価が可能になるにつれ、胆管癌においても増殖進展因子や予後因子に関連した各種の遺伝子異常や過剰発現蛋白の解明が必要とされるようになった。本研究では肝門部胆管癌の分子生物学的検討を行い、予後予測因子を探ることを目的とした。

対象と方法

肝門部胆管癌の手術材料を用いて、免疫組織学的手法により種々の蛋白の発現の程度と臨床病理学的進展および予後との相関を検討した。1次抗体には癌の増殖関連因子としてp53, p27, MIB-1, cyclinD1を使用した。アポトーシス関連ではbcl-2, baxを用いた。MMPファミリーからはMMP-7(マトリライシン)を選択した。

材料には北海道大学腫瘍外科において1987~1996年の10年間に肝門部胆管癌と診断され、肝切除術を含めた胆管切除術が施行された34人の患者の手術材料をホルマリン固定したパラフィン包埋ブロックを用いた。対象患者の年齢は44歳から82歳(平均61.8歳)であった(男女比約2:1)。平均生存期間は632日で、長期生存例(1000日以上)が6例(18%)に認められた。5年生存率は14.9%であった。これらのパラフィン包埋したブロックを用いて免疫組織染色を行った。1次抗体には抗p53抗体、抗p27抗体、抗MIB-1抗体、抗cyclinD1抗体、抗bcl-2抗体、抗bax抗体および抗MMP-7抗体を用いた。染色はVENTANA automatic immunostainer (Ventana Medical Systems, Arizona)によりLSAB-peroxidase systemを使用した。染色評価はp53, p27, MIB-1, cyclin D1は核が染色されたもの、bcl-2, bax, MMP-7は細胞質が染色されたものについて行った。評価方法は染色された細胞の腫瘍細胞全体に占める割合が5%未満のものを0(negative), 5-10%のものを1+, 10-50%のものを2+, 50%以上のものを3+とし、2+もしくは3+と評価されたものを各蛋白の発現陽性と判定した。

これらの発現結果を基に組織型、深達度、病期(Stage I, II v. s. III, IV)および脈管侵襲の有無、

リンパ節転移の有無といった各病理組織学的因子別に染色陽性率の比較を行った。また各抗体の染色結果ごとの予後との相関を検討した。染色陽性率の有意差の判定はカイ 2 乗検定または Fisher's exact test にて行った。予後との相関は、生存率は Kaplan-Meier 法で算出し、Logrank test を用いて検定した。有意水準は $p < 0.05$ とした。なお、TMN 分類および組織学的分化度は UICC (1997) の基準に従った。

結果

p53 の発現陽性率は 56% (19/34) であった。組織型別や深達度別にみた陽性率の各群間での有意差はみられなかった。病期別 (Stage I, II v. s. III, IV) でも両者に差は認められなかった。脈管侵襲の有無、リンパ節転移の有無ごとの陽性率の比較では、いずれも有の側により多くの発現を認める傾向にあったが有意差はみられなかった。また p53 陽性例の 5 年生存率は 12.2%、陰性例は 18.8% で、両者に有意差はみられなかった。

p27 の発現は中分化型腺癌、未分化癌のわずか 2 例に数%程度 (1+) 認めるのみで、陽性と判定されたものはなかった。

MIB-1 は 1+ が 4 例、2+ が 3 例で全体の発現陽性率は 8.8% であった。各病理組織学的因子別の陽性率に差はみられなかった。

cyclinD1 は 6 例にわずかな発現をみるのみで、陽性例はなかった。

bcl-2 は未分化癌の 1 例が発現陽性 (2+) であった。また中分化型腺癌の 1 例に弱い発現 (1+) がみられた。

MMP-7 の全症例での発現陽性率は 76% (26/34) であった。病理組織学的因子ごとの陽性率の比較では、深達度別では se 以深の 89% が ss 以浅の 72% よりも高い傾向にあったが、有意差はみられなかった。生存率にも差を認めなかった。

bax の全症例での発現陽性率は 85% (29/34) と高値であった。病理組織学的因子ごとの陽性率の比較では、病期別にみた場合 Stage III+IV 症例の 100% が Stage I+II 症例の 71% よりも高かった ($p = 0.044$)。深達度別では se 以深が ss 以浅よりも高い傾向にあったが、有意差はみられなかった。生存率の比較では bax 陽性例と陰性例の間には差はみられなかったが、2+ 症例と 3+ 症例を比較したところ、3+ 症例の方が予後不良であった ($p = 0.044$)。また 2+ 症例と 3+ 症例の p53 陽性率はそれぞれ 61%、56% で、両者に差はみられなかった。

考察

近年、種々の臓器における悪性新生物の分子生物学的検索が行われるようになったが、胆管癌においても従来の分化度、深達度の病理組織学的検索のみならず、その生物学的悪性度の検討も行われている。しかしながら、肝門部胆管癌における各種蛋白の発現と予後との関係を検討した報告例は未だに少ないといえる。今回の検討では bcl-2 protein family の 1 つである bax の陽性率はより病期が進行している群に高く、50% 以上の高発現がみられた症例は 10-50% 発現の症例よりも予後不良であった。

現在、p53 によって転写活性化を受けアポトーシスとの関連が指摘されている分子としては、bax、IGF-BP3、fas が知られている。bax はアポトーシスの inhibitor である bcl-2 とヘテロダイマーを形成することにより bcl-2 の機能を抑制し、アポトーシスを promote するといわれている。

他臓器癌でも bax 発現に関する様々な検討がなされているが、Mrozek らによれば胃癌での bax

高発現は予後不良と相関するとされ、本研究と同様の結果であった。bax 蛋白の発現増加は mutation によって起こり得るとも考えられ、その場合過剰発現した bax は逆に apoptosis の inhibitor としての作用を持つ可能性があるとも考えられる。今後はこれらの予後不良群で実際に apoptosis が誘導されているかを確認し、遺伝子発現レベルを含めた更なる検討が必要と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 絃 之
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 岩 永 敏 彦

学 位 論 文 題 名

肝門部胆管癌の増殖および予後因子に関する 免疫組織学的検討：特に bax 蛋白発現について

胆管癌はきわめて予後不良な癌の一つである。近年の診断技術，治療技術の進歩により治療成績の向上がみられるものの，肝門部胆管癌の術後 5 年生存率は 8-40% と中・下部胆管癌の成績に比べ不良である。細胞工学的，遺伝子工学的アプローチによって生物学的悪性度の評価が可能になるにつれ，胆管癌においても増殖進展因子や予後因子と関連した各種の遺伝子異常や過剰発現蛋白の解明が必要とされるようになった。今回申請者は肝門部胆管癌の予後予測因子を探ることを目的とし，免疫組織学的手法を用いて検討を行った。

対象は北海道大学腫瘍外科において 1987～1996 年の 10 年間に肝門部胆管癌と診断され，肝合併切除を含めた胆管切除術が施行された 34 例である。年齢は 44 歳から 82 歳（平均 61.8 歳）であった（男女比約 2:1）。平均生存期間は 632 日で，長期生存例（1000 日以上）が 6 例(18%)に認められた。5 年生存率は 14.9%であった。これらの手術材料をパラフィン包埋したブロックを用いて免疫組織染色を行った。1 次抗体には癌の増殖関連因子として p53, p27, MIB-1, cyclinD1 を使用した。アポトーシス関連では bcl-2, bax を用いた。MMP ファミリーからは MMP-7（マトリライシン）を選択した。染色は VENTANA automatic immunostainer (Ventana Medical Systems, Arisona) により LSAB-peroxidase system を使用した。染色評価は p53, p27, MIB-1, cyclin D1 は核が染色されたもの，bcl-2, bax, MMP-7 は細胞質が染色されたものについて行った。評価方法は染色された細胞の腫瘍細胞全体に占める割合が 5%未満のものを 0(negative), 5-10%のものを 1+, 10-50%のものを 2+, 50%以上のものを 3+とし，2+もしくは 3+と評価されたものを各蛋白の発現陽性と判定した。

これらの発現結果を基に組織型，深達度，病期および脈管侵襲の有無，リンパ節転

移の有無といった各病理組織学的因子別に染色陽性率の比較を行った。また各抗体の染色結果ごとの予後との相関を検討した。染色陽性率の有意差の判定はカイ 2 乗検定または Fisher's exact test にて行った。予後との相関は、生存率は Kaplan-Meier 法で算出し、Logrank test を用いて検定した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果は p27/Kip1, MIB-1, cyclinD1, bcl-2 の発現は、それぞれ 0%, 8.8%, 0%, 2.9% と低値であった。p53 の発現陽性率は 56%(19/34)であった。組織型別、深達度別および病期別の陽性率に差は認められなかった。脈管侵襲の有無、リンパ節転移の有無ごとの陽性率の比較では、いずれも有の側により多くの発現を認める傾向にあったが有意差はみられなかった。また陽性例の 5 年生存率は 12.2%, 陰性例は 18.8% で、両者に有意差はみられなかった。MMP-7 の全症例での発現陽性率は 76%(26/34)であった。病理組織学的因子ごとの陽性率の比較では、深達度別では se 以深の 89% が ss 以浅の 72% よりも高い傾向にあったが、有意差はみられなかった。累積生存率にも差を認めなかった。

bax の全症例での発現陽性率は 85%(29/34) と高値であった。病理組織学的因子ごとの陽性率の比較では、病期別にみた場合 Stage III+IV 症例の 100% が Stage I+II 症例の 71% よりも高かった ($p = 0.044$)。深達度別では se 以深が ss 以浅よりも高い傾向にあったが、有意差はみられなかった。生存率の比較では bax 陽性例と陰性例の間には差はみられなかったが、0, 1+, 2+ 症例と 3+ 症例を比較したところ、3+ 症例の方が予後不良であった ($p = 0.013$)。また p53 陽性率はそれぞれ 61%, 56% で、両者に差はみられなかった。

以上の結果から肝門部胆管癌の病期進行例 (Stage III, IV) の腫瘍細胞内における bax 蛋白の発現率は、Stage I, II 症例に比し有意に高く、bax 発現と病期との関連性が示唆された。また bax 染色率 50% 以上の高発現例の生存率は低発現例に比べ有意に低く、有用な予後予測因子となる可能性が示唆された。

口頭発表において、岩永教授より bax 蛋白発現定量化の方法、bax 発現部分と非発現部分との組織型の差異、H.E.染色による apoptosis の評価、細胞浸潤の中のマクロファージの検討について質問があった。次いで長嶋教授より bax 検索に至る経緯、bax 発現の有無による p53 発現の差異、p53 mutation との関連、bax と bcl-2 発現の差異、bax 発現と膵癌、肝内胆管癌との関連について質問があった、また最後に加藤教授より術前生検を用いた診断の可能性、治療への応用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。

胆管癌における bax 蛋白発現の臨床病理学的意義を検討し、有力な予後予測因子となり得る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、本論文は博士 (医学) の学位授与に値するものと判定した。