

学位論文題名

ヒト正常膵組織および膵癌組織における  
GDNF(Glial cell line-derived neurotrophic factor)  
および Ret の発現

学位論文内容の要旨

緒言

膵癌は様々な治療法の改善にもかかわらず予後不良な悪性腫瘍のひとつである。その理由として、膵癌では、他臓器転移をはじめ、後腹膜、周囲臓器、主要血管、膵外神経叢への癌進展が高度であることが挙げられる。特に神経浸潤が特徴的であり、神経浸潤の先端部が腫瘍の外側へ伸びるため、原発腫瘍を除去しても癌が遺残し、局所再発につながり予後を不良にしている可能性が高い。

膵癌が神経に沿って浸潤していく特徴を持つ理由はいまだ不明であるが申請者は、中脳ドーパミン作動性神経細胞を培養した際、培養細胞を死滅させない神経栄養因子 GDNF(Glial cell line-derived neurotrophic factor)に注目した。この因子は TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ )スーパーファミリーの一つで、その Receptor Component Ret(proto-oncogene c-ret の遺伝子産物)を介してその効果を発揮する。申請者は、正常膵組織と膵癌組織における GDNF および Ret の存在および局在と分布を調べ、さらに膵癌において両者が好神経浸潤性に関与しているか否かを知るべく免疫組織化学的手法を用いて検討を行った。

材料と方法

正常膵臓 7 例および 1996 年から 1998 年まで手術された膵癌 33 例を対象とした。また、比較検討対象として大腸癌 7 例、および胃癌 3 例を用いた。

以上の材料を抗 GDNF 抗体、および抗 Ret 抗体(rabbit IgG polyclonal antibody Santa Cruz 社製)を用いて免疫組織化学的に染色した。大腸 10 例および胃癌 10 例を比較対象群として用いた。

膵癌組織では膵内神経浸潤の程度、および膵外神経叢への浸潤の有無別に分類し、腫瘍本体(非神経浸潤部位)の癌細胞、神経浸潤部位の癌細胞、および膵内神経の GDNF、Ret 発現の程度を解析した。各群の陽性率を  $\chi^2$  検定を用いて検索し、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結果

### 1 正常膵組織の免疫染色結果

GDNF では全例、腺房中心細胞、およびすべての導管系の上皮細胞、すなわち介在部導管、小葉内導管、小葉間導管の上皮細胞が陽性反応を示した。膵内の神経は7例全てが陰性であった。

Ret では全例、腺房中心細胞、およびすべての導管系の上皮細胞が陽性であった。膵内の神経はすべて陰性であった。

### 2.膵癌組織の免疫染色結果

膵癌症例では全例に神経浸潤がみられた。膵内神経浸潤の程度は軽度1例、中等度14例、高度7例であった。また、膵外神経叢への浸潤は陽性例18例、陰性例15例であった。

GDNF 染色：腫瘍本体（非神経浸潤部位）の癌細胞では29例(88%)で陽性を示した。神経浸潤の認められた癌細胞も28例(85%)で同様に陽性であった。神経線維束ではシュワン細胞の胞体が陽性を示した。また、神経繊維は神経内の癌細胞の有無に関わらず28例(85%)が陽性であった。これらの所見は、膵内神経浸潤の程度および膵外神経叢への浸潤の有無に関わらず同様であった。

Ret 染色：腫瘍本体（非神経浸潤部位）の癌細胞では28例(85%)で陽性であった。神経浸潤の認められた癌細胞は27例(82%)が陽性であった。神経繊維は25例(76%)が陽性であった。またこの所見は、膵内神経浸潤の程度および膵外神経叢への浸潤の有無に関わらず同様であった。

### 3.大腸癌・胃癌

大腸癌および胃癌組織では全症例で神経浸潤はみられなかった。癌細胞は全ての症例でGDNF および Ret 陰性であった(0/10,0/10)。また神経束も全例陰性であった。

## 考察とまとめ

今回の研究ではまず正常膵組織においてGDNF および Ret の局在と分布を明らかにした。膵癌細胞の胞体にはGDNF および Ret が存在したが、発生母地が膵管上皮であることを考えると、膵管上皮が癌化しても、癌細胞がこれら二つの物質を発現させる形質を残しているものと考えられた。

また正常膵組織の神経内にGDNF および Ret は発現していなかったが、神経浸潤陽性膵癌症例の膵内神経には発現していることが判明した。さらにシュワン細胞がGDNF 陽性でありその陽性率は癌細胞による神経浸潤の程度によらず約85%であった。膵内の神経は、癌細胞浸潤による損傷を受けたためGDNF が発現したのか、あるいは何らかの他の因子の存在下で発現したのかは不明である。しかし、胃癌、大腸癌症例のように神経浸潤がない症例では、神経内にGDNF を発現していないことから、膵癌の好神経浸潤性とGDNF の発現の特異的関連性が示唆された。本来、GDNF は神経栄養因子としての効果を持つので、膵癌症例においては障害を受けた神経を機能的に保つため、あるいは修復するために膵内神経にGDNF が発現した可能性がある。

Tomac らは末梢のシュワン細胞で産生されたGDNF が軸索突起に取り込まれ、逆行性

の神経軸索流によって中枢側に運ばれていくと報告しているが膵癌組織中においていずれかの部位で神経が浸潤され、神経内に GDNF が発現すると軸索流により中枢方向へ運ばれる可能性がある。このことは浸潤を受けている膵癌組織で神経内の癌細胞の有無にかかわらず GDNF が陽性であったことを説明するかもしれない。また、膵癌の神経浸潤は神経周膜腔内で神経束に沿って連続的に進展するのが特徴であり、GDNF が膵内神経の中枢である膵頭神経叢、および腹腔神経叢へ向かって運ばれていくとすれば、神経内の GDNF に栄養されながら増殖する膵癌細胞が腹腔神経叢へ向かって浸潤していく機序の一つと考えることができるものと思われた。

今後 GDNF のより詳細な検索により膵癌神経叢浸潤の機序がさらに明確になり、治療への展望をも開くことが期待される。

# 学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

## ヒト正常膵組織および膵癌組織における

GDNF(Glial cell line-derived neurotrophic factor)

## および Ret の発現

膵癌は予後不良な悪性腫瘍のひとつである。その理由の一つとして、膵癌では、特に神経浸潤が特徴的であり、神経浸潤の先端部が腫瘍の外側へ伸びるため、原発腫瘍を除去しても癌が遺残し、局所再発につながり予後を不良にしている可能性が高い。

膵癌が神経に沿って浸潤していく特徴を持つ理由はいまだ不明であるが申請者は、神経栄養因子 GDNF(Glial cell line-derived neurotrophic factor)に注目した。この因子は TGF $\beta$  (Trans-forming Growth Factor  $\beta$ )スーパーファミリーの一つで、その Receptor Component RET (proto-oncogene c-ret の遺伝子産物)を介してその効果を発揮する。申請者は、正常膵組織と膵癌組織における GDNF および RET の存在および局在と分布を調べ、さらに膵癌において両者が好神経浸潤性に関与しているか否かを知るべく免疫組織化学的手法を用いて検討を行った。

正常膵臓 7 例および 1996 年から 1998 年まで手術された膵癌 33 例を対象とした。また、比較検討対象として大腸癌 7 例、および胃癌 3 例を用いた。

以上の材料を抗 GDNF 抗体、および抗 RET 抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。膵癌組織では膵内神経浸潤の程度、および膵外神経叢への浸潤の有無別に分類し、腫瘍本体（非神経浸潤部位）の癌細胞、神経浸潤部位の癌細胞、および膵内神経の GDNF、RET 発現の程度を解析した。各群の陽性率を  $\chi^2$  検定を用いて検索し、 $p < 0.05$  を有意差水準とした。

正常膵組織の免疫染色結果では全例、腺房中心細胞、およびすべての導管系の上皮細胞、すなわち介在部導管、小葉内導管、小葉間導管の上皮細胞がそれぞれ GDNF および RET に陽性反応を示した。膵内の神経は 7 例全てが両者に陰性であった。

膵癌症例では全例に神経浸潤がみられた。膵内神経浸潤の程度は軽度 12 例、中等度 14 例、高度 7 例であった。また、膵外神経叢への浸潤は陽性例 18 例、陰性例 15

例であった。

GDNF 染色：腫瘍本体（非神経浸潤部位）の癌細胞では 29 例(88%)で陽性を示した。神経浸潤してる癌細胞も 28 例(85%)で同様に陽性であった。神経繊維は神経内の癌細胞の有無に関わらず 28 例(85%)が陽性であった。これらの所見は、腓内神経浸潤の程度および腓外神経叢への浸潤の有無に関わらず同様であった。

RET 染色：腫瘍本体（非神経浸潤部位）の癌細胞では 28 例(85%)で陽性であった。神経浸潤している癌細胞は 27 例(82%)が陽性であった。神経繊維は 25 例(76%)が陽性であった。またこの所見は、腓内神経浸潤の程度および腓外神経叢への浸潤の有無に関わらず同様であった。

大腸癌および胃癌組織では全症例で神経浸潤はみられなかった。癌細胞は全ての症例で GDNF および RET 陰性であった(0/10,0/10)。また神経束も全例陰性であった。

今回の研究ではまず正常腓組織において GDNF および RET の局在と分布を明らかにした。腓癌細胞の胞体には GDNF および RET が存在したが、発生母地が腓管上皮であることを考えると、腓管上皮が癌化しても、癌細胞がこれら二つの物質を発現させる形質を残しているものと考えられた。

また正常腓組織の神経内に GDNF および RET は発現していなかったが、神経浸潤陽性腓癌症例の腓内神経には発現していることが判明した。さらにシュワン細胞が GDNF 陽性でありその陽性率は癌細胞による神経浸潤の程度によらず約 85 %であった。胃癌、大腸癌症例のように神経浸潤がない症例では、神経内に GDNF を発現していないことから、腓癌の好神経浸潤性と GDNF の発現の特異的関連性が示唆された。GDNF は逆行性の神経軸索流によって中枢側に運ばれていくという報告もあり、腓癌組織中においていずれかの部位で神経が浸潤され、神経内に GDNF が発現すると軸索流により中枢方向へ運ばれる可能性がある。腓癌の神経浸潤は神経周膜腔内で神経束に沿って連続的に進展するのが特徴であり、GDNF が腓内神経の中枢である腓頭神経叢、および腹腔神経叢へ向かって運ばれていくとすれば、神経内の GDNF に栄養されながら増殖する腓癌細胞が腹腔神経叢へ向かって浸潤していく機序の一つと考えることができるものと思われた。

今後 GDNF のより詳細な検索により腓癌神経叢浸潤の機序がさらに明確になり、治療への展望をも開くことが期待される。

口頭発表において、岩永教授より、ヒト腓臓における GDNF、RET の発現を他の検索方法で調べてみてはどうか、両者の発現は autocrine 的であるのかなどの質問があり、また神経浸潤の組織像の解釈についての質問があった。次に長嶋教授より RET の mutation について、胆管癌の神経浸潤との違いについて、また神経内の GDNF の発現の機序について質問があった。さらに腓管由来以外の腓癌についての質問があった。最後に加藤教授より、胃癌と腓癌の腫瘍悪性度の違いはどこに求めるかの質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は妥当な回答をした。正常腓組織、腓管癌、神経組織における GDNF、RET の発現を明らかにし、治療への応用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、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。