

学 位 論 文 題 名

胆道癌の神経周囲浸潤に関する検討：
特に GDNF, RET との関連について

学位論文内容の要旨

背景と目的

膵癌では病理組織学的に認識される神経周囲浸潤が局所再発の大きな要因となっており重要な予後因子の1つとして知られているが、胆道癌でも高率に胆管壁外の間質内に神経周囲浸潤をきたすことが知られている。中脳ドーパミン作動性神経細胞の生存に強力な効果を持つ神経栄養因子の一つである Grial cell line-derived neurotrophic factor (以下 GDNF)はパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)のような神経変性疾患においてその治療効果が期待されているが、一方で神経と癌細胞の親和性に関わる因子としても注目され、GDNF がそのレセプターRETを発現している癌細胞に対して浸潤誘導能をもたらすとの報告がある。RETは、GDNFファミリー分子をリガンドとし、GDNFレセプター α (以下 GFR α -1) と複合体を形成して生理的には神経の分化、腎の発生に関与することが知られている。またRET遺伝子はその活性型変異によって甲状腺髄様癌、副腎褐色細胞腫などを発症する多発性内分泌腫瘍症を、また不活性型変異によって Hirschsprung 病を発症するなど、複数の疾患の原因遺伝子であることが明らかとなっている。しかしながら胆道癌におけるGDNF、RET、GFR α -1の役割は明らかでない。今回申請者は胆道癌の神経周囲浸潤と予後との関係を検討し、さらに神経栄養因子の1つであるGDNFおよびそのレセプターであるRET、GFR α -1の発現と神経周囲浸潤との関係を検討した。

方法

対象は1990年より2001年までの間に北大第2外科で切除された胆道癌134症例(肝外胆管癌64症例、乳頭部癌12症例、胆嚢癌39症例、肝内胆管癌19症例)、および非癌胆道(正常胆道)組織4症例とし、胆道癌全体および肝外胆管癌、胆嚢癌の予後と神経周囲浸潤との関連をKaplan-meier(Log-rank)法を用い調べた。統計学的解析は $p<0.05$ をもって有意差ありとした。次に全症例のホルマリン固定標本を抗GDNF抗体、抗GFR α -1抗体、抗RET抗体を1次抗体として免疫組織化学的に染色し、胆道癌全体および胆道癌部位別のGDNF、GFR α -1、RETの

発現と神経周囲浸潤との関連を調べた。Fisher 検定法, Mann-Whitney の U 検定法を用い, 統計学的解析は $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

結果

胆道癌全体および肝外胆管癌, 胆嚢癌の予後と神経周囲浸潤との関連では肝外胆管癌, 胆嚢癌において有意差を認めた。胆道癌全体でも同様に有意差を認めた。GDNF, GFR α -1, RET の免疫組織化学的発現については GDNF, GFR α -1, RET のいずれもが正常胆管および胆嚢上皮細胞の胞体内に顆粒状の陽性所見を示し, いずれも強陽性であった。一方胆道癌においても GDNF, GFR α -1, RET の発現が認められたが, その強度は様々であった。GDNF, GFR α -1, RET の発現強度と神経周囲浸潤との関連については, GDNF に関しては肝外胆管癌にて染色の強度が強いほど神経周囲浸潤が有意に増した。GFR α -1 に関しては乳頭部癌にて染色の強度が強いほど神経周囲浸潤が有意に増した。RET に関しては肝外胆管癌, 胆嚢癌, 肝内胆管癌にて染色の強度が弱くなるほど神経周囲浸潤が有意に増した。胆道癌全体では RET に関して染色の強度が弱くなるほど神経周囲浸潤が有意に増した。

考察とまとめ

胆道癌の神経周囲浸潤と予後の検討において神経周囲浸潤が胆道癌の予後因子の一つであることが確認された。今回申請者は神経栄養因子の一つである GDNF, その受容体である GFR α -1, RET に注目し, これらが, 胆道癌における神経周囲浸潤に何らかの影響を与えているのではないかと考え免疫組織化学的検討を行った。正常例では GDNF, GFR α -1, RET はすべての胆管または胆嚢上皮細胞の胞体に局在し発現していた。胆道癌においては GDNF, GFR α -1, RET は発現を認めたが, その強度は様々であった。胆道癌はその組織型から発生母地が腺管上皮と考えられるが, 腺管上皮が癌化しても癌細胞が GDNF, GFR α -1, RET を発現させる形質を残しているものと考えられた。しかし免疫組織化学的解析の結果からみると特に RET においては神経周囲浸潤が進行した症例で有意にその発現が減弱していた。正常例ではすべての症例で RET の発現が強陽性であったことから推測すると, 癌化した細胞において RET を発現させる遺伝子が不活性型変異を起し, その変異により何らかの機序が加わり神経周囲浸潤が起こりやすくなることが示唆された。一方, GDNF に関しては肝外胆管癌にて染色の強度が強いほど神経周囲浸潤が有意に増したが, 正常組織の染色の強度がすべて強陽性であったことを考えると神経周囲浸潤を来した癌細胞には著明な変化は起こっていないものと思われた。GFR α -1 に関しては乳頭部癌にて染色の強度が強いほど神経周囲浸潤が有意に増し, GDNF と同様のことが考えられたが症例数が少なく今後の検討が必要である。

胆道癌の神経周囲浸潤には, 神経栄養因子のひとつである GDNF のレセプター RET が何らかの形で関与し, 胆道癌の予後に強く影響を与えていることが示唆された。

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

胆道癌の神経周囲浸潤に関する検討： 特に GDNF, RET との関連について

膵癌では病理組織学的に認識される神経周囲浸潤が局所再発の大きな要因となっており重要な予後因子の1つとして知られているが、胆道癌でも高率に胆管壁外の間質内に神経周囲浸潤をきたすことが知られている。中脳ドーパミン作動性神経細胞の生存に強力な効果を持つ神経栄養因子の一つである Grial cell line-derived neurotrophic factor (以下 GDNF)はパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)のような神経変性疾患においてその治療効果が期待されているが、一方で神経と癌細胞の親和性に関わる因子としても注目され、GDNF がそのレセプターRET を発現している癌細胞に対して浸潤誘導能をもたらすとの報告がある。RET は、GDNF ファミリー分子をリガンドとし、GDNF レセプター α (以下 GFR α -1) と複合体を形成して生理的には神経の分化、腎の発生に関与することが知られている。また RET 遺伝子はその活性型変異によって甲状腺髄様癌、副腎褐色細胞腫などを発症する多発性内分泌腫瘍症を、また不活性型変異によって Hirschsprung 病を発症するなど、複数の疾患の原因遺伝子であることが明らかとなっている。しかしながら胆道癌における GDNF, RET, GFR α -1 の役割は明らかでない。今回申請者は胆道癌の神経周囲浸潤と予後との関係を検討し、さらに神経栄養因子の1つである GDNF およびそのレセプターである RET, GFR α -1 の発現と神経周囲浸潤との関係を検討した。

対象は1990年より2001年までの間に北大第2外科で切除された胆道癌134症例(肝外胆管癌64症例、乳頭部癌12症例、胆嚢癌39症例、肝内胆管癌19症例)、および非癌胆道(正常胆道)組織4症例とし、胆道癌全体および肝外胆管癌、胆嚢癌の予後と神経周囲浸潤との関連をKaplan-meier (Log-rank)法を用い調べた。統計学的解析は $p<0.05$ をもって有意差ありとした。次に全症例のホルマリン固定標本を抗GDNF抗体、抗GFR α -1抗体、抗RET抗体を1次抗体として免疫組織化学的に染色し、胆道癌全体および胆道癌部位別のGDNF, GFR α -1, RETの発現と神経周囲浸潤との関連を調べた。Mann-WhitneyのU検定法を用い、統計学的解析は $p<0.05$ をもって有意差ありとした。

胆道癌全体および肝外胆管癌、胆嚢癌の予後と神経周囲浸潤との関連では肝外胆管癌、胆嚢癌において有意差を認めた。胆道癌全体でも同様に有意差を認めた。GDNF、GFR α -1、RETの免疫組織化学的発現についてはGDNF、GFR α -1、RETのいずれもが正常胆管および胆嚢上皮細胞の胞体内に顆粒状の陽性所見を示し、いずれも強陽性であった。一方胆道癌においてもGDNF、GFR α -1、RETの発現が認められたが、その強度は様々であった。GDNF、GFR α -1、RETの発現強度と神経周囲浸潤との関連については、RETに関しては肝外胆管癌、胆嚢癌、肝内胆管癌にて染色の強度が弱くなるほど神経周囲浸潤が有意に増した。胆道癌全体ではRETに関して染色の強度が弱くなるほど神経周囲浸潤が有意に増した。

胆道癌の神経周囲浸潤と予後の検討において神経周囲浸潤が胆道癌の予後因子の一つであることが確認された。今回申請者は神経栄養因子の一つであるGDNF、その受容体であるGFR α -1、RETに注目し、これらが、胆道癌における神経周囲浸潤に何らかの影響を与えているのではないかと考え免疫組織化学的検討を行った。正常例ではGDNF、GFR α -1、RETはすべての胆管または胆嚢上皮細胞の胞体に局在し発現していた。胆道癌においてはGDNF、GFR α -1、RETは発現を認めたが、その強度は様々であった。胆道癌はその組織型から発生母地が腺管上皮と考えられるが、腺管上皮が癌化しても癌細胞がGDNF、GFR α -1、RETを発現させる形質を残しているものと考えられた。しかし免疫組織化学的解析の結果からみると特にRETにおいては神経周囲浸潤が進行した症例で有意にその発現が減弱していた。正常例ではすべての症例でRETの発現が強陽性であったことから推測すると、癌化した細胞においてRETが低発現となり、それにより何らかの機序が加わり神経周囲浸潤が起りやすくなることが示唆された。

以上より胆道癌の神経周囲浸潤には、神経栄養因子のひとつであるGDNFのレセプターRETが何らかの形で関与し、胆道癌の予後に強く影響を与えていることが示唆された。

口頭発表にあたって岩永教授から腹腔神経節をpositive controlとしたときに染まる部位について、CSAキットの感度について、浸潤された神経束について、元来存在していたものなのか外から入って来た神経束なのかなどの質問がなされた。長嶋教授からは、GFR α -1、RETレセプターの違い、染色の違いについて、RETが胆管の付属腺で染まっていたがGDNFではどうであったか、SAB法とCSA法の違いはなにか、RETの低発現により神経周囲浸潤が多くなることの解釈についての質問がなされた。最後に加藤教授から今回の研究を通して外科的治療方針についての考えについて、今後の研究の展開についての質問がなされた。申請者はおおむね妥当な回答をした。

胆道癌の神経浸潤に関しRETとの関連を明らかにした上で予後の予測、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。