

学位論文題名

Expression of Pigment Epithelium-Derived Factor Decreases Liver Metastasis and Correlates with Favorable Prognosis for Patients with Ductal Pancreatic Adenocarcinoma

(膵管状腺癌における Pigment Epithelium-Derived Factor 発現は、肝転移を減少させ予後を改善する)

学位論文内容の要旨

背景と目的

膵管癌は難治性癌として知られており、診断時に切除可能な症例は全体の 9-36% に過ぎず、しかも切除可能症例の 5 年生存率は 10% に留まっている。

各種固形癌の生育には血管新生が不可欠とされ、中でも腫瘍内血管新生密度の高い症例は癌の悪性度が高く予後不良とされている。膵管癌においても腫瘍内新生血管密度の高い症例は肝転移の頻度が高く、予後不良と報告されている。

一方、Pigment epithelium-derived factor (PEDF) は網膜色素上皮細胞において発現が確認された遺伝子産物であり、強力な血管新生阻害物質であることが知られているが、最近、膵臓をはじめとする他臓器での発現も確認された。また、PEDF ノックアウトマウスにおいては膵臓の体積と新生血管密度の増大が確認され、PEDF が正常膵組織の過剰な増殖を抑制している可能性が示唆された。ことから申請者は、膵管癌においても同様の現象が認められるか否かに着目し、発現の有無、予後との相関を知る目的で以下の実験を行った。

対象および方法

北海道大学腫瘍外科および関連 2 施設において、1992 年から 1999 年に切除された膵管状腺癌 80 例を対象とした。男性 45 例、女性 35 例、平均年齢は 62 歳 (31-83 歳) であった。平均観察期間は 95.2 ヶ月 (50.0-141.7 ヶ月) であり、観察期間終了時の生存例は 9 例 (11.2%) であった。65 例に再発を認め、15 例は無再発であった。再発部位が判明したのは 48 例で、肝転移 24 例、腹膜再発 12 例、リンパ節再発 10 例、その他の部位での再発が 2 例であった。

全 80 例に対し抗 PEDF モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。切除検体のパラフィン包埋切片を用い、抗 PEDF 抗体を一次抗体とし、SAB 法を用いて染色した。濃染される癌細胞が 10% 以上の症例を高発現群、他を低発現群として分類し、予後及び各臨床病理学的因子との相関につき検討した。

同様の方法で、新生血管に特異的な抗 CD34 モノクローナル抗体を用いた免疫染

色を行い、腫瘍内新生血管密度を計算し、PEDF 発現との相関を求めた。

相関は $\chi^2$ 検定を用いて計算し、生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し Log rank 法にて比較検討した。さらに Cox 比例ハザードモデルを用い、PEDF の発現が予後に及ぼす影響を検討した。各群間における腫瘍内新生血管密度の比較は Mann-Whitney U test を用いて計算した。

## 結 果

PEDF 染色は細胞質において確認された。濃染される癌細胞が 10%以上である高発現群は 22 例 (27.5%)であり、低発現群は 58 例 (72.5%)であった。PEDF 発現と症例の性別、年齢との間に有意な相関は認めなかった。他の臨床病理学的因子については、PEDF の発現と pathological stage (p-stage)および肝転移との間に有意な相関を認めた。p-stage II 症例では 8/17 例 (47.1%)に PEDF が高発現であったのに対し、p-stage III 及び IVA では 14/63 例 (22.2%)でのみであり、p-stage が進行するに従って有意に PEDF 発現の低下がみられた ( $p = 0.0418$ )。また、肝転移の有無が明らかである 63 例において、PEDF 低発現群では 21/46 例 (45.7%)に肝転移を認めたのに対し、高発現群においては 3/17 例 (17.6%)に認めたのみであり、PEDF 低発現群では高発現群に比較して有意に肝転移の率が増加していた ( $p = 0.0422$ )。

全症例の平均腫瘍内新生血管密度は 1 視野あたり 27.7 個 (5-59 個)であった。PEDF 高発現群での平均は 19.3 個/視野、低発現群では 31.1 個/視野であり、PEDF の発現と新生血管密度の間には有意な負の相関を認めた ( $p = 0.0003$ )。

生存分析においては、PEDF 低発現群は高発現群に比べて有意に予後不良であり ( $P = 0.0026$ )、また進行癌である p-stage III 及び IVA の 63 例のみに限ったの検討でも同様に、PEDF 低発現群は高発現群に比べて有意に予後不良であった。 ( $p = 0.0107$ )。

多変量解析では、PEDF 高発現 (risk ratio, 0.394;  $p = 0.0016$ )は、リンパ節転移 (risk ratio, 2.553;  $p = 0.0017$ )、静脈浸潤 (risk ratio, 1.801;  $p = 0.0212$ )、腫瘍径 (risk ratio, 1.704;  $p = 0.0414$ )と共に独立予後因子であった。(Cox の比例ハザードモデル生存分析)

## まとめ

膵癌における PEDF 発現は腫瘍内新生血管密度を低下させることにより、肝転移頻度を低下させ、ひいては予後を良好にする要因となっている可能性が示唆された。

## 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 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

### Expression of Pigment Epithelium-Derived Factor Decreases Liver Metastasis and Correlates with Favorable Prognosis for Patients with Ductal Pancreatic Adenocarcinoma

(膵管状腺癌における Pigment Epithelium-Derived Factor 発現は、肝転移を減少させ予後を改善する)

Pigment epithelium-derived factor (PEDF)は網膜色素上皮細胞において発現が確認された遺伝子産物であり、強力な血管新生阻害物質であることが知られているが、最近、膵臓をはじめとする他臓器での発現も確認された。また、PEDF ノックアウトマウスにおいては膵臓の体積と新生血管密度の増大が確認され、PEDF が正常膵組織の過剰な増殖を抑制している可能性が示唆された。ことから申請者は、膵管癌においても同様の現象が認められるか否かに着目し、発現の有無、予後との相関を知る目的で以下の実験を行った。

北海道大学腫瘍外科および関連 2 施設において、1992 年から 1999 年に切除された膵管状腺癌 80 例を対象とした。男性 45 例、女性 35 例、平均年齢は 62 歳 (31-83 歳)であった。平均観察期間は 95.2 ヶ月 (50.0-141.7 ヶ月)であり、観察期間終了時の生存例は 9 例 (11.2%)であった。65 例に再発を認め、15 例は無再発であった。再発部位が判明したのは 48 例で、肝転移 24 例、腹膜再発 12 例、リンパ節再発 10 例、その他の部位での再発が 2 例であった。全 80 例に対し抗 PEDF モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。切除検体のパラフィン包埋切片を用い、抗 PEDF 抗体を一次抗体とし、SAB 法を用いて染色した。濃染される癌細胞が 10%以上の症例を高発現群、他を低発現群として分類し、予後及び各臨床病理学的因子との相関につき検討した。同様の方法で、新生血管に特異的な抗 CD34 モノクローナル抗体を用いた免疫染色を行い、腫瘍内新生血管密度を計算し、PEDF 発現との相関を求めた。相関は  $\chi^2$  検定を用いて計算し、生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し Log rank 法にて比較検討した。さらに Cox 比例ハザードモデルを用い、PEDF の発現が予後に及ぼす影響を検討した。各群間における腫瘍内新生血管密度の比較は Mann-Whitney U test を用いて計算した。

PEDF 染色は細胞質において確認された。濃染される癌細胞が 10%以上である高発現群は 22 例 (27.5%)であり、低発現群は 58 例 (72.5%)であった。PEDF 発現と症例の性別、年齢との間に有意な相関は認めなかった。他の臨床病理学的因子については、PEDF の発現と pathological stage (p-stage)および肝転移再発との間に有意な相関を認めた。p-stage II 症例では 8/17 例 (47.1%)に PEDF が高発現であったのに対し、p-stage III 及び IVA では 14/63 例 (22.2%)でのみであり、p-stage が進行するに従って有意に PEDF 発現の低下がみられた ( $p = 0.0418$ )。また、肝転移再発の有無が明らかである 63 例において、PEDF 低発現群では 21/46 例 (45.7%)に肝転移再発を認めたのに対し、高発現群においては 3/17 例 (17.6%)に認めたのみであり、PEDF 低発現群では高発現群に比較して有意に肝転移再発の率が増加していた ( $p=0.0422$ )。

全症例の平均腫瘍内新生血管密度は 1 視野あたり 27.7 個 (5-59 個)であった。PEDF 高発現群での平均は 19.3 個/視野、低発現群では 31.1 個/視野であり、PEDF の発現と新生血管密度の間には有意な負の相関を認めた ( $p=0.0003$ )。

生存分析においては、PEDF 低発現群は高発現群に比べて有意に予後不良であり ( $P=0.0026$ )、また進行癌である p-stage III 及び IVA の 63 例のみに限ったの検討でも同様に、PEDF 低発現群は高発現群に比べて有意に予後不良であった ( $p = 0.0107$ )。

多変量解析では、PEDF 高発現 (risk ratio, 0.394;  $p = 0.0016$ )は、リンパ節転移 (risk ratio, 2.553;  $p = 0.0017$ )、静脈浸潤 (risk ratio, 1.801;  $p = 0.0212$ )、腫瘍径 (risk ratio, 1.704;  $p = 0.0414$ )と共に独立予後因子であった (Cox の比例ハザードモデル生存分析)。

膵癌における PEDF 発現は腫瘍内新生血管密度を低下させることにより、肝転移頻度を低下させ、ひいては予後を良好にする要因となっている可能性が示唆された。

口頭発表において今村雅寛教授より①腫瘍での発現が確認された PEDF の血中濃度の測定について②血管新生阻害因子の発現により肝転移率が低下する機序に関して③PEDF と腫瘍径との相関が認められないことの原因についての質問があった。続いて近藤 哲教授より PEDF 発現と stage の関係について②発現を 2 群に分類する cut off 値を 10%とした理由について③正常組織での PEDF 発現の意義に関して④PEDF と他の血管新生に関わる因子との関係についての質問があった。最後に秋田弘俊教授より、①細胞質での染色の局在について②PEDF の癌細胞への直接の作用に関して③今後の臨床応用についての質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえ誠意ある回答をした。

膵管癌の術後肝転移再発に関する本研究の意義は大きく、また PEDF の新しいバイオマーカーとしての臨床的有用性も高く、審査員一同協議の結果、申請者が博士 (医学) の学位授与に値するものと判定した。