

胆嚢癌の生物学的悪性度とその臨床的意義

三重大学第1外科

田端 正己 小倉 嘉文 井戸 政佳 高橋 幸二
野口 孝 川原田嘉文 水本 龍二

胆嚢癌切除72例の主病巣のホルマリン固定後パラフィン包埋切片を用いて、癌細胞核 DNA 量を flow cytometry にて測定するとともに、増殖細胞核抗原 (PCNA), c-erbB-2, c-myc, K-ras, p53, fibronectin (FN), laminin (LN), tenascin (TN) をそれぞれ ABC 法にて免疫組織化学的に染色し、これら各種分子生物学的パラメーターの臨床的意義や予後因子としての有用性について検討した。Aneuploid や K-ras 陽性例は進行例に多く、累積生存率も Diploid や K-ras 陰性例に比し有意に不良であって、特に K-ras は従来の組織学的因子では困難であった癌深達度 ss 以上の進行胆嚢癌の予後判定に有用であった。また Aneuploid かつ PCNA 陽性例, c-myc と p53 の同時陽性例, あるいは TN 陽性かつ FN 陰性例は極めて生物学的悪性度が高く、いずれも切除後 2 年以内に死亡していた。さらにこれらの因子のうち、PCNA 標識率や細胞外マトリックスは相対非治癒以上の切除後の再発時期や再発様式の判定にも有用であった。

Key words: gallbladder carcinoma, molecular biological degree of tumor malignancy, prognostic factor

はじめに

近年、細胞工学や遺伝子工学の手法を応用することにより、腫瘍の持つ生物学的悪性度の評価が可能となり、消化器癌においても癌細胞核 DNA 量や増殖因子、癌遺伝子や癌抑制遺伝子、さらには細胞外マトリックスなどが検索され、多くの知見が集積されつつある。しかるに胆嚢癌は消化器癌のなかでも最も予後不良の疾患であるにもかかわらず、いまだこの分野での研究はほとんど行われていない。

そこで、今回われわれは胆嚢癌切除例を用いて種々の生物学的悪性度の指標を検索し、これらと従来の病理組織学的因子との相関関係や、その予後因子としての有用性について検討したので報告する。

I. 対象と方法

教室ならびに関連施設で経験した胆嚢癌切除例のうち、病理組織学的所見や遠隔成績の検索を詳細に行うことができた72例を対象とし、これらの主病巣のホルマリン固定後パラフィン包埋切片を用いて以下の検討を行った。

1. 病理組織学的検索

胆嚢癌の組織型、癌深達度、リンパ節転移 (n)、リンパ管浸潤 (ly)、静脈浸潤 (v)、神経周囲浸潤 (pn) の6項目について H.E. 染色による組織標本にて検索し、その記載は「胆道癌取扱い規約」¹⁾に従った。なお組織型のうち pap, tub₁ を高分化、それ以外のものは低分化と規定した。

2. 分子生物学的因子の検索

核の増殖能の指標としては癌細胞核 DNA 量、増殖細胞核抗原 (PCNA) を、癌遺伝子・抑制遺伝子としては c-erbB-2, K-ras, c-myc, p53 を、さらに細胞外マトリックスとしては Fibronectin (FN), Laminin (LN), Tenascin (TN) の計9項目を検索した。癌細胞核 DNA 量は Hedley ら²⁾の方法に準じて flow cytometry にて測定し、G₀G₁ピークが正常リンパ球のそれとほぼ等しく単一なものを Diploid (Dp)、それ以外のものを Aneuploid (Ap) と判定した。他の各因子はいずれもモノクローナル抗体としてそれぞれ抗 PCNA 抗体 (Novocastra), 抗 c-erbB-2 抗体 (Cambridge Reserch Biochemicals), 抗 K-ras 抗体 (Oncogene Science), 抗 c-myc 抗体 (Cambridge Reserch Biochemicals), 抗 p53 抗体 (Novocastra), 抗 Fibronectin 抗体 (Biomedical Technologies), 抗

* 第41回日消外会総会シンポ1・消化器癌の新しい予後因子—細胞生物学的並びに分子生物学的アプローチ <1993年6月14日受理> 別刷請求先: 田端 正己
〒514 津市江戸橋2-174 三重大学医学部第1外科

Laminin 抗体(Chemicon)および抗 Tenascin 抗体(理化学研究所, 坂倉照好博士より供与)を用いて ABC 法にて免疫組織化学的に検索した。なお, 染色性の判定は PCNA, c-erbB-2, K-ras, c-myc, p53, FN, LN は癌巢の30%以上の細胞が染色されたものを陽性, TN は癌巢の間質の30%以上が染色されたものを陽性と判定した。また PCNA については癌細胞500個あたりの陽性細胞数を計測して標識率(%)を算出した。

3. 統計学的検索

各因子間の相関関係や陽性率の比較は χ^2 検定で, 生存率は Kaplan-Meier 法による累積生存率によって算出し, 群間検定は generalized-Wilcoxon 法にて行い, いずれも $p < 0.05$ を有意と判定した。

II. 成績

1. 分子生物学的因子の陽性率ならびに病理組織学的因子との相関関係 (Table 1)

1) 腫瘍増殖能の指標

Ap(陽性率55.6%)では Dp に比し, 癌深達度 ss 以上の進行癌の頻度が有意に高率で, また n(+)をはじめ, ly, v, pn の陽性頻度がいずれも有意に高く, また PCNA 陽性例(陽性率37.5%)では陰性例に比し ly(+) と v(+) の頻度が有意に高率であった。

2) 癌遺伝子および癌抑制遺伝子

c-erbB-2陽性例(陽性率40.3%)では陰性例に比し, 組織型が高分化のものや, 癌深達度が m・pm の早期癌の頻度が有意に高率であったのに対し, K-ras 陽性例(陽性率25.0%)では陰性例に比して n(+) や ly(+) が有意に高率であった。一方, c-myc や癌抑制遺伝子 p53 の陽性率はそれぞれ37.5%, 13.9% であって, これらの発現の有無と各種病理組織学的因子との間には明らかな相関関係は認められなかった。

3) 細胞外マトリックス

FN の発現(陽性率30.6%)と病理組織学的因子との間には一定の傾向はなかったが, LN 陽性例(陽性率41.7%)では v(+) が, TN 陽性例(陽性率44.4%)では n(+) がそれぞれ陰性例に比し有意に高率に認められた。

2. 病理組織学的ならびに分子生物学的因子と遠隔成績

1) 病理組織学的因子と累積生存率

組織型を高分化と低分化, 癌深達度を m・pm と ss 以上, n, ly, v, pn は陽性例と陰性例とに分けて累積生存率を対比してみると, 組織型別では有意差はなかったが, 他の病理組織学的因子にはいずれも有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

2) 分子生物学的因子と累積生存率

前述した分子生物学的因子9項目のうち, 累積生存率に有意差が認められたものは DNA ploidy pattern の Ap と Dp ($p < 0.01$) (Fig. 1) および K-ras 発現の

Fig. 1 Cumulative survival rate in gallbladder carcinoma according to nuclear DNA ploidy pattern

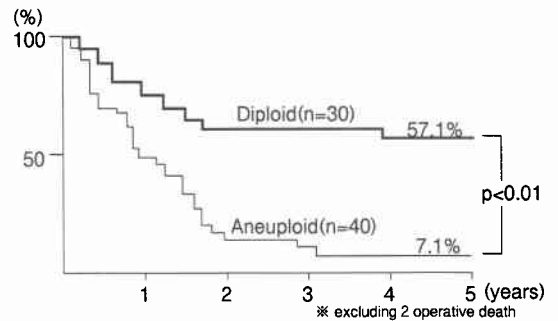


Fig. 2 Cumulative survival rate in gallbladder carcinoma according to expression of K-ras oncogene

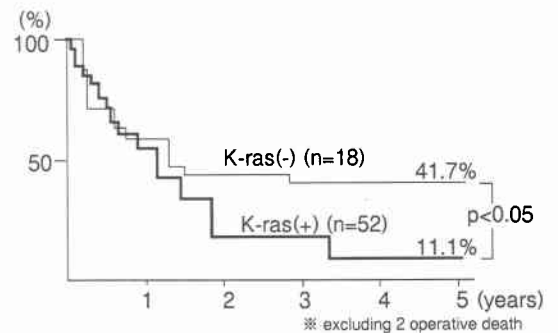


Table 1 Correlation between histopathological and molecular biological factors

| | Anaploid (%) | PCNA (%) | c-erbB-2 (%) | K-ras (%) | c-myc (%) | p53 (%) | Fibronectin (%) | Laminin (%) | Tenascin (%) |
|-------------------|--------------|----------|--------------|-----------|-----------|---------|-----------------|-------------|--------------|
| positive rate (%) | 55.6 | 37.5 | 40.3 | 25.0 | 37.5 | 13.9 | 30.6 | 41.7 | 44.4 |
| pap·tub: | | | ● | | | | | | |
| m·pm | | | ● | | | | | | |
| ss·se·si | ● | | | | | | | | |
| n(+) | ● | | | ● | | | | | ● |
| ly(+) | ● | ● | | ● | | | | | |
| v(+) | ● | ● | | | | | | ● | |
| pn(+) | ● | | | | | | | | |

● : significant correlation ($p < 0.05$)

有無 ($p < 0.05$) (Fig. 2) の2項目のみであった。なお、各種分子生物学的因子を組み合わせる累積生存率を検討したところ、ApでかつPCNA陽性例(16例)や、c-mycとp53の同時陽性例(5例)(Fig. 3)、あるいはTN陽性でかつFN陰性例(24例)はいずれも切除後2年以内に全例死亡していた。

3) 進行胆嚢癌の予後因子

前述の累積生存率の検討で、予後を左右する因子と

Fig. 3 Cumulative survival rate in c-myc-positive tumors according to expression of p53 anti-oncogene

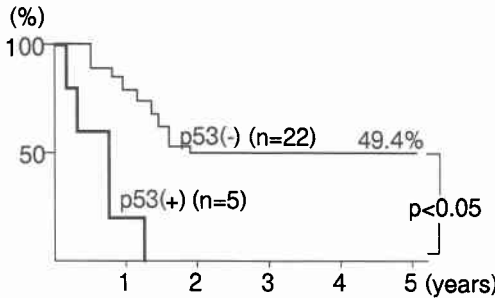
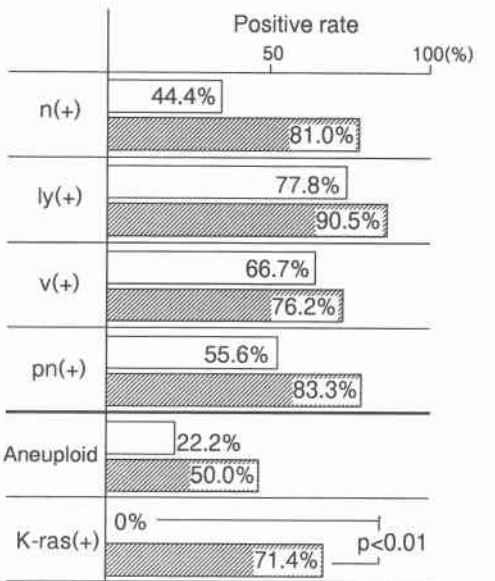


Fig. 4 Histopathological and molecular biological factors influencing survival after resection of gallbladder carcinoma with depth of cancer invasion of the subserosal layer or more



□ : survived more than 3 years (n=9)
 ▨ : died of tumor recurrence within 2 years (n=42)

して示された n, ly, v, pn の病理組織学的因子および癌細胞核 DNA 量ならびに K-ras の分子生物学的因子は m・pm ではいずれも陰性(癌細胞核 DNA 量は Dp)であった。

しかし、癌深達度が ss 以上の進行胆嚢癌をとりあげ、このうち切除後3年以上生存例9例(長期生存例)と2年未満癌死例42例(短期死亡例)との間で、これらの因子の陽性率を対比してみると、病理組織学的因子の陽性率や Ap の頻度には有意差はみられなかったが、K-ras 陽性率は長期生存例では 0%であったのに対し、短期死亡例では 71.4%と有意に ($p < 0.01$) 高率であった (Fig. 4)。

4) 再発時期や再発様式と分子生物学的因子との関係

相対非治癒以上の切除48例中、再発死亡例17例の再発までの期間と癌細胞核の増殖能との相関について検討した。癌細胞核 DNA 量により測定した S 期細胞比率や DNA index とはいずれも一定の関係は認められなかったが、PCNA 標識率と再発までの期間の間には $r = -0.52$ で有意の ($p < 0.05$) 負の相関を示しており、PCNA 標識率が 20%以上のものではほとんどが2年以内に再発していたが、20%未満の3例は3年以降に再発していた (Fig. 5)。また再発様式のうち特に頻

Fig. 5 Correlation between PCNA labeling index and time of tumor recurrence after radical resection

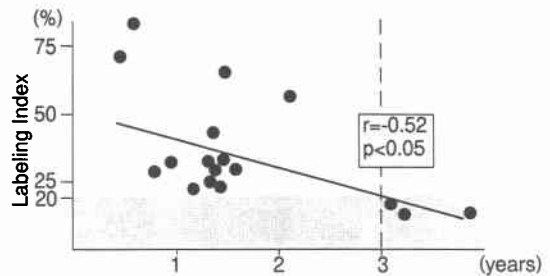
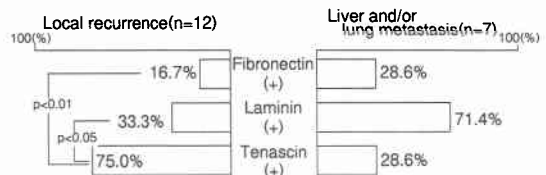


Fig. 6 Correlation between expression of extracellular matrix and mode of tumor recurrence after radical resection



度の高かった局所再発や肝肺転移再発と細胞外マトリックスの陽性率との関係を見ると、局所再発例ではTNの陽性率が75.0%とLN(33.3%)やFN(16.7%)の陽性率に比し、有意に高率であった。なお肝肺転移再発例では有意差はないもののLNの陽性率が高率であった(Fig. 6)。

III. 考 察

近年の分子生物学的研究の進歩に伴い、消化器癌の領域においても種々の分子生物学的パラメーターが検索され、個々の腫瘍の持つ生物学的特性が次第に明らかになりつつある。なかでも癌細胞核DNA量の解析はflow cytometryの普及に伴って最も進んでおり、胆嚢癌においても後藤ら⁹⁾のFeulgen染色による検討以来、報告が増加している。すなわちYamamotoら⁴⁾はDpの症例は早期癌に比較的多かったが、ploidy patternは組織型や予後とは関連しなかったと報告している。一方、佐藤ら⁵⁾はApは組織型ではpor、癌深達度ではss以上の進行癌、あるいは脈管・神経浸潤やリンパ節転移陽性例に高頻度に認められ、予後もDpに比べて有意に不良であったと述べており、今回のわれわれの検討でもほぼ同様の結果であった。

また、最近では癌細胞核DNA量とは別にKi67, BrdU, PCNAなどの増殖関連核抗原を免疫組織学的に染色し、核の増殖能を評価する試みが盛んに行われているが、胆嚢癌における検討は少なく、黒崎ら⁶⁾が高異型度癌では低異型度癌に比しBrdUやPCNAの標識率が高率であったと報告しているにすぎない。われわれの検討ではPCNAはlyおよびvと有意に関連しており、またApのなかでもPCNA陽性例は特に生物学的悪性度が高く予後不良であって、さらにその標識率は癌再発時期の予測に有用であった。

胆嚢癌における癌遺伝子の発現については多田ら⁷⁾はpolymerase chain reactionにて9例で検索したところ、K-rasのpoint mutationは全く認められなかったと報告しているのに対し、元島⁸⁾は免疫組織学的検討の結果、27例中21例(78%)の高率にK-rasの発現が認められ、さらにstageが高度なものやリンパ節転移陽性例でその陽性率が高かったと報告している。また武藤ら⁹⁾はc-myc, c-fosおよびc-Ha-rasを免疫染色したところ、その陽性率は68~84%と高率であったが、進行度との間には一定の傾向は認められなかったと述べている。われわれの検索ではc-mycは武藤らと同様の結果であったが、c-erbB2は早期癌で、逆にK-rasは進行例で陽性率が高く、癌の進行度により発現

する癌遺伝子の種類が異なっていた。またK-rasは従来の病理組織学的因子では予測困難であった癌深達度ss以上の進行癌の予後の指標として有用であった。一方、胆嚢癌における癌抑制遺伝子については検索したかぎりでは報告はなく、われわれのp53の検討では、その陽性率は13.9%と低率であったが、同じく核内タンパクをコードする癌遺伝子c-mycとの同時陽性例では全例2年以内に死亡していたという興味深い結果が得られており、癌遺伝子と癌抑制遺伝子相互の関連性について、今後は定量的な解析の必要性が指摘された。

また、最近では癌実質細胞の動態のみならず、癌細胞近傍の間質や基底膜成分である細胞外マトリックスの役割が注目されている。柿田ら¹⁰⁾は胆嚢癌ではFNの染色性は癌深達度にかかわらずほぼ同様であったと報告しているが、今回のわれわれの検討でもFNに関しては一定の傾向は認められなかった。一方、TNの発現は局所再発と、LNの発現は肝肺転移再発と比較的密接に関連しており、またTNが陽性で、かつTNの作用に拮抗するとされるFN¹¹⁾が陰性のものは全例2年以内に死亡しているなど、胆嚢癌の浸潤・転移の進展過程において細胞外マトリックスが重要な役割を果たしているものと考えられた。

本研究の一部は平成4年度科学研究費補助金一般研究(C)(研究課題番号04670775)による。

文 献

- 1) 日本胆道外科研究会編：外科・病理 胆道癌取り扱い規約、第3版。金原出版、東京、1993
- 2) Hedley DW, Friedlander ML, Tayler IW: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31: 1333-1335, 1983.
- 3) 後藤浩志, 大内清昭, 大和田康夫ほか：胆嚢癌における核DNA patternの解析。日外会誌 89: 1843-1849, 1988
- 4) Yamamoto M, Oda N, Tahara E: DNA ploidy patterns in gallbladder adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 20: 83-86, 1990
- 5) 佐藤泰彦, 田中淳一, 吉岡 浩ほか：核DNA量および癌細胞分裂指数からみた胆嚢癌の悪性度。日外会誌 92: 46-51, 1991
- 6) 黒崎 功, 渡辺英伸, 大橋泰博ほか：胆嚢癌の核異型度からみたBrdU標識率およびBrdUとPCNA標識法の比較検討。肝・胆・膵 23: 683-690, 1991
- 7) 多田 稔, 小俣政男：膵胆道腫瘍のras遺伝子異常とその診断的意義。胆と膵 13: 253-257, 1992

- 8) 元島幸一：膵胆道癌の ras, myc の遺伝子産物の発現と予後. 胆と膵 13 : 263-267, 1992
- 9) 武藤良弘, 濱田雄志, 伊佐 勉ほか：癌遺伝子-胆道癌. 肝・胆・膵 23 : 729-735, 1991
- 10) 柿田 章, 上林正昭, 高橋雅俊ほか：胆嚢癌の進展様式に関する基礎的研究—CEA とフィブロネクチンの動態について—. 厚生省がん研究助成金「胆
- のう・胆管がんの治療成績向上をめざした集学的治療法の確立に関する研究班」(主任研究者 水本龍二) 昭和61年度研究報告書, 1987, p118-125
- 11) Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA et al: Tenascin interferes with fibronectin action. Cell 53 : 383-390, 1988

Molecular Biological Degree of Tumor Malignancy and Its Clinical Significance in Gallbladder Carcinoma

Masami Tabata, Yoshifumi Ogura, Masayoshi Ido, Koji Takahashi, Takashi Noguchi,
Yoshifumi Kawarada and Ryuji Mizumoto
First Department of Surgery, Mie University School of Medicine

The molecular biological degree of tumor malignancy and its clinical significance were examined in 72 resected cases of gallbladder carcinoma. The nuclear DNA ploidy pattern was measured using flow cytometry, and immunohistochemical staining of cancer cells was performed by the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method for the following factors: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), c-erbB-2, c-myc, K-ras, p53, fibronectin, laminin and tenascin. Patients with aneuploid and/or K-ras-positive tumors showed a significantly higher incidence of advanced carcinoma and a significantly lower survival rate than those with diploid and/or K-ras-negative tumors. In patients with depth of cancer invasion to the subserosal layer or more, expression of K-ras provided more significant prognostic information than histopathological factors. All patients who had tumors that were aneuploid and PCNA-positive, c-myc-positive and p53-positive, or tenascin-positive and fibronectin-negative died of tumor recurrence within 2 years. Moreover, the PCNA labeling index and the expression of extracellular matrix were considered to be valuable indicators of the time and mode of tumor recurrence after radical resection.

Reprint requests: Masami Tabata First Department of Surgery, Mie University School of Medicine
2-174 Edobashi, Tsu, 514 JAPAN
