

胆管癌における転移抑制遺伝子産物 nm23/NDP kinase の免疫組織化学的検討

岩手医科大学第1外科

佐々木亮孝 菅野 千治 須藤 隆之 新田 浩幸
村上 雅彦 早川 善郎 島田 裕 川村 英伸
玉沢 佳之 斎藤 和好

胆管癌切除54例を対象とし nm23の2種類のアイソフォームの発現と各種臨床病理学的因子、予後および術後肝転移との関係について検討した。組織 nm23-H1の発現率は79.6%, H2 85.2%と高率であった。nm23の発現と各種臨床病理学的因子では、十二指腸浸潤陽性例で有意に nm23-H1の発現が低下していたが深達度、リンパ節転移、腭浸潤では有意の差を認めなかった。nm23の発現と予後との関係では、nm23-H1, H2ともに有意の差を認めなかった($p=0.79$, $p=0.63$)。nm23の発現と術後肝転移の関係では肝転移症例の nm23の発現は nm23-H1, H2ともに3年以上無再発健存例、5年以上無再発症例と比べ有意の差を認めなかった。以上より、胆管癌においては nm23の組織内発現はリンパ節転移、予後および肝転移とは明らかな関連はなく、転移予後の予測因子としては有用でない可能性が示唆された。

Key words: bile duct carcinoma, nm23, nucleoside diphosphate kinase, immunohistochemistry

はじめに

近年、癌転移の研究領域において、癌転移抑制遺伝子に大きな関心が寄せられている。nm23は Steeg ら¹⁾によりマウス melanoma 細胞の高転移株で発現低下がみられる新しい癌転移関連遺伝子として報告されて以来、乳癌ほかいくつかの癌で、癌組織内の nm23の発現の多寡が転移および予後に深く関与していることが明らかにされ、新しい予後因子としての有用性が期待されている^{2)~6)}。今回われわれは胆管癌においても nm23が乳癌などと同様に転移および予後の指標となりうるか否かを知る目的で、免疫組織学的に nm23の2種類のアイソフォームを同定し、各種病理組織学的因子、予後および肝転移との関連を検討したので報告する。

対象および方法

当科における胆管癌切除例54例を対象とした。材料はホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより厚さ4 μm の連続切片を作成した。脱パラフィン後0.3% H_2O_2 加メタノール液にて内因性ペルオキシダーゼを阻

害し免疫染色を行った。1次抗体はおのおの抗 nm23-H1および H2モノクローナル抗体(長崎大腫瘍医学、浦野 健先生供与)⁷⁾⁸⁾を用いて4°C一晩反応させ、酵素抗体 strepto-avidin-biotin (SAB)法にて免疫染色を行った。染色結果の判定は、腫瘍細胞の50%以上が褐色に染色されたものを陽性と判定した。染色結果の検討として、組織内発現率、各種臨床病理学的パラメーターとの関連、予後との関連および肝転移との関連について検討した。

各種臨床病理学的因子は、胆道癌取扱い規約⁹⁾に従い検討した。予後との関連の検討では、治癒切除例44例中直死2例および他病死3例を除いた39例について検討した。

遠隔成績における生存率はKaplan-Meier法にて算出し、統計学的有意差の検定には χ^2 検定を、生存率の差の検定にはlog rank testにより行い、いずれも危険率5%未満を有意とした。

結 果

1. 胆管癌における nm23の組織内発現率と局在様式

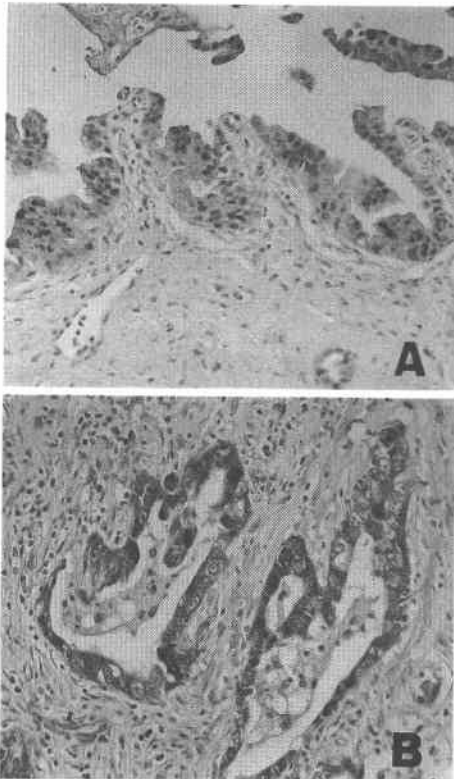
胆管癌54例における組織 nm23-H1の発現は43例(79.6%)、nm23-H2の発現は46例(85.2%)であった。

<1995年3月8日受理>別刷請求先: 佐々木亮孝
〒020 盛岡市内丸19-1 岩手医科大学医学部第1外科

局在様式では、nm23はおもに細胞質に染色されたが、一部では核内にも陽性像を示した (Fig. 1).

2. nm23の発現と各種病理組織学的パラメーターの検討

Fig. 1 Immunohistochemical staining of nm23. A: Brown positive images are seen mainly in the nuclei of the cancer cells (nm23-H1 staining, $\times 250$). B: Expression of nm23 are observed in the cytoplasm or the apical portion (nm23-H2 staining, $\times 250$).



nm23-H1の発現と各種病理組織学的パラメーターの検討では、組織型で、乳頭状腺癌が72.2% (18例中13例)、高分化型管状腺癌88.9% (9例中8例)、中分化型管状腺癌94.7% (19例中18例)、低分化型管状腺癌50.0% (6例中3例)、また、粘液癌の1例では発現がみられ、腺扁平上皮癌の1例では発現がみられなかった (Table 1)。他の病理組織学的パラメーターの検討では、十二指腸浸潤陰性例が85.4%、陽性例が33.3%と、陽性例では有意に nm23-H1の発現が低下していた (χ^2 検定, $p < 0.05$)。また、深達度で漿膜浸潤陽性例、リンパ節転移陽性例、膀胱浸潤陽性例でも組織 nm23-H1の発現は低下していたが有意の差を認めなかった (Table 2)。

nm23-H2は、組織型で乳頭状腺癌が77.8% (18例中14例)、高分化型管状腺癌66.7% (9例中6例)、中分化型管状腺癌100% (19例全例)、低分化型管状腺癌83.3% (6例中5例)、粘液癌、腺扁平上皮癌は各1例であったが発現が認められた。他の病理組織学的パラメーターの検討では、腫瘍長径の大きな症例および進行癌で高い陽性率を示したが有意の差を認めなかった。

3. nm23の発現と予後との関係

nm23-H1の発現と予後との関係では、nm23-H1陰性例の5生率は21.4%で、陽性例の5生率51.4%に比べ低かったが有意の差を認めなかった ($p = 0.79$) (Fig. 2)。

nm23-H2の発現と予後との関係では、nm23-H2陰性例の5生率は66.7%で、陽性例の5生率42.7%に比べ、nm23-H1とは逆に高かったが有意の差を認めなかった ($p = 0.63$) (Fig. 3)。

4. nm23の発現と肝転移との関係

術後経過観察中、肝転移が認められた症例は12例であった。また、3年以上無再発健存例は17例、うち5年以上無再発症例は10例であった。これらの nm23の

Table 1 Expression of nm23 and histological types

Histological type	No. of cases	nm23-H1		nm23-H2	
		No. of positive cases	(%)	No. of positive cases	(%)
papillary adenoca.	18	13	72.2	14	77.8
tubular adenoca.					
well differentiated	9	8	88.9	6	66.7
moderately differentiated	19	18	94.7	19	100
poorly differentiated	6	3	50.0	5	83.3
mucinous ca.	1	1	100	1	100
adenosquamous ca.	1	0	0	1	100
Total	54	43	79.6	46	85.2

Table 2 Correlation between clinicopathological factors and the expression of *nm23*

factors	No. of cases	<i>nm23</i> -H1			<i>nm23</i> -H2		
		No. of positive cases	%	χ^2 test	No. of positive cases	%	χ^2 test
tumor length							
<2cm	24	19	79.2	N.S.	17	70.8	N.S.
2.1~4.0cm	22	19	79.2		23	95.8	
>4cm	6	5	83.3		6	100	
depth of invasion							
s(-)	25	21	84.0	N.S.	19	79.0	N.S.
s(+)	29	22	75.9		27	93.1	
LN metastasis							
n(-)	42	35	83.3	N.S.	34	81.0	N.S.
n(+)	12	8	66.7		12	100	
panc. invasion							
panc(-)	29	25	86.2	N.S.	22	75.9	N.S.
panc(+)	25	18	72.0		24	96.0	
duod. invasion							
d(-)	48	41	85.4	p<0.05	40	83.3	N.S.
d(+)	6	2	33.3		6	100	
stage							
I	6	4	66.7	N.S.	4	66.7	N.S.
II	20	18	90.0		58	75.0	
III	17	12	70.6		16	94.1	
IV	11	9	81.8		11	100	
Total	54	43	79.6		46	85.2	

Fig. 2 Survival curves in relation to the expression of *nm23*-H1

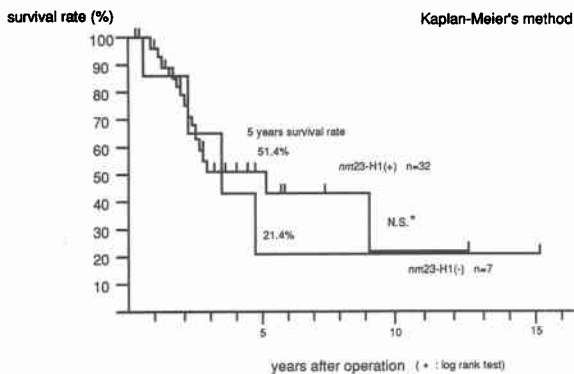
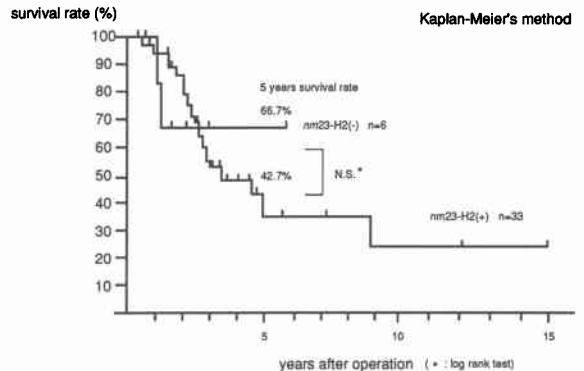


Fig. 3 Survival curves in relation to the expression of *nm23*-H2



発現につき検討した。肝転移症例の *nm23*-H1の発現率は12例中9例(75.0%)、3年以上無再発健存例は17例中14例(82.4%)、5年以上無再発健存例は10例中8例(80.0%)であり、有意の差を認めなかった。

nm23-H2でもおのおの100%, 88.2%, 90.0%と有意の差を認めなかった (Table 3)。

考 察

*nm23*遺伝子は1988年 Steegら¹¹⁾によりマウス melanoma K-1735細胞の高転移株で発現低下がみられる新しい癌転移関連遺伝子として報告されたものであ

る。1990年には *nm23*翻訳産物は nucleoside diphosphate (以下、NDP) kinase と同一であることが判明し¹⁰⁾、1991年 Leone らの *nm23*高転移性メラノーマに対する *nm23*遺伝子導入実験により、*nm23*に転移抑制作用があることが確認された¹¹⁾。また、Stahlら¹³⁾により *nm23*には2つのアイソフォームがあることが発見され、ヒト乳癌あるいはヒト乳癌由来癌細胞では2種類のアイソフォームのうち的一方 (*nm23*-H1) が転移能に関連して発現低下を示すと報告されている。

その後、種々の臓器の腫瘍において転移形質と

Table 3 Correlation between the expression of nm23 and liver metastasis after operation

	nm23-H1		
	(+)	(-)	
cases with liver metastasis n=12	9 (75.0%)	3	N.S.
cases with no recurrence over 3 years n=17	14 (82.4%)	3	
cases with no recurrence over 5 years n=10	8 (80.0%)	2	
χ^2 test			
	nm23-H1		
	(+)	(-)	
cases with liver metastasis n=12	12 (100%)	0	N.S.
cases with no recurrence over 3 years n=17	15 (88.2%)	2	
cases with no recurrence over 5 years n=10	9 (90.0%)	1	
χ^2 test			

nm23すなわち NDP kinase 発現との相関が検討され、とくに乳癌においてその発現が転移予後の判定の良い指標になることが報告されている^{2)~4)}。しかし消化器癌における検討はいまだ散見されるのみ⁵⁾⁶⁾で、胆管癌における検討もみられない。そこで今回われわれは胆管癌においても nm23 が乳癌などと同様に新しい予後因子となりうるか否かを知る目的で、免疫組織学的に nm23 の 2 種類のアイソフォームを同定し、各種病理組織学的因子、予後および肝転移との関連を検討した。

陽性の判定基準であるが、nm23 の染色をみると、すべての症例で比較的多くの細胞で明瞭に褐色陽性像を示した。予後因子としての有用性をみるには症例数に極端な偏りがないように群分けするのが適当と思われる。一方、半分以上の細胞が陽性像を示す症例を陰性と判定するのも適当でないと判断し、50%を陽性、陰性の分かれ目とした。

nm23 の臓器別の発現率をみると、Hennesy ら²⁾は乳癌での nm23-mRNA の検討で 71 例中 31 例 (43.7%) と述べており、Higashiyama ら¹¹⁾は肺腺癌での免疫組織学的検討で 88 例中 39 例 (44%) が陽性と述べている。今回の胆管癌での検討では nm23-H1 79.6%、nm23-H2 85.2% であり、胆管癌では乳癌、肺癌より高率に nm23 が発現していた。

nm23 と病理組織学的パラメーターとの関連では、十

二指腸浸潤陽性例で nm23-H1 の発現が有意に低下していたのみで、深達度、リンパ節転移、腭浸潤など他の因子では有意の関連を認めなかった。今回の検討ではなぜ十二指腸浸潤でのみ nm23-H1 が有意に低下していたかの解釈は困難であるが、他の因子がすべて有意の関連がないことからみて nm23 の発現は胆管癌の浸潤増殖およびリンパ節転移に関与しないものと考えられた。

病理組織学的パラメーターおよび予後との関連について他の報告をみると、先の Hennesy ら²⁾は乳癌で組織学的に分化型の腫瘍で nm23-mRNA 発現が有意に高く、リンパ節転移と nm23-mRNA 発現との間には逆相関を認め、nm23-mRNA 発現症例の disease free survival, overall survival とともに長かったと報告している。一方、Higashiyama ら⁹⁾は肺腺癌では病理組織学的パラメーターとの明らかな関連はなく、また予後との関連もなく予後因子としての意味は持たないと報告しており臓器によって結果はまちまちである。われわれの胆管癌での検討では H1, H2 ともに有意の差を認めず、またリンパ節転移との関連もみられず胆管癌では nm23 は新しい予後因子としての有用性は期待できないと考えられた。

さらに nm23 の発現と術後再発との関連について、Hirayama ら³⁾は抗ラット NDP kinase 抗体を用いた免疫組織染色法によって染色強度と乳癌患者 24 例の 5 年生存率との相関を調べた結果、強陽性群では再発がみられないのに対し、弱陽性群では 7 例中 4 例に再発が観察されたと報告している。われわれは nm23 の発現と術後肝転移の関係について検討したが、術後肝転移症例の nm23 の発現は、3 年以上無再発健存例、5 年以上無再発症例と有意差を認めず、胆管癌においては再発の予知因子としても有用性は持たないと考えられた。

nm23 はとくに乳癌においてその発現低下が転移予後と逆相関し、優れた予後の指標となりうる事が国際的に受け入れられつつある^{2)~4)}。しかしながら、最近種々の臓器癌での検討で正の相関を示すもの⁵⁾⁶⁾や、相関が認められないもの⁹⁾が報告されている。われわれの胆管癌での検討でも予後および肝転移とは一定の関係を認めなかった。癌における nm23 の転移抑制のメカニズムは現在全く不明であるうえ、研究者により方法や用いた抗体、評価法がまちまちであり、転移予後の指標としての有用性については今後の検討が必要と思われる。

本論文の要旨は第94回日本外科学会総会(1994年3月,東京)にて発表した。

文 献

- 1) Steeg SP, Bevilacqua G, Kopper L et al: Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. J Natl Cancer Inst 80 : 200—204, 1988
- 2) Hennesy C, Henry JA, May FEB et al: Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: An association with good prognosis. J Natl Cancer Inst 83 : 281—285, 1991
- 3) Hirayama R, Sawai S, Takagi Y et al: Positive relationship between expression of antimetastatic factor (nm23 gene product or nucleoside diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer. J Natl Cancer Inst 83 : 1249—1250, 1991
- 4) Bevilacqua G, Sobel EM, Liotta AL et al: Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. Cancer Res 49 : 5185—5190, 1989
- 5) Haut M, Steeg PS, Willson JKV et al: Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. J Natl Cancer Inst 83 : 712—716, 1991
- 6) 中森正二, 石川 治, 大東弘明ほか: 転移抑制遺伝子 NDP キナーゼ/nm23遺伝子産物発現からみた膵腫瘍の生物学的悪性度. 胆と膵 14 : 517—522, 1993
- 7) Urano T, Furukawa K, Shiku H: Expression of nm23/NDP kinase proteins on the cell surface. Oncogene 8 : 1371—1376, 1993
- 8) Urano T, Fushida S, Furukawa K et al: Human nm23-H1 and H2 proteins have similar nucleoside diphosphate kinase activities. Int J Oncol 1 : 425—430, 1992
- 9) 日本胆道外科研究会編: 外科・病理. 胆道癌取扱い規約. 第3版. 金原出版, 東京, 1993
- 10) Kimura N, Shimada N, Nomura K et al: Isolation and characterization of cDNA clone encoding rat nucleoside diphosphate kinase. J Biol Chem 265 : 15744—15749, 1990
- 11) Leone A, Flatow U, Richiter KC et al: Reduced tumor incidence, Metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. Cell 65 : 25—35, 1991
- 12) Higashiyama M, Doi O, Kodama K et al: Immunohistochemical analysis of nm23 gene product/NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: lack of prognostic value. Br J Cancer 66 : 533—536, 1992
- 13) Stahl JA, Leone A, Rosengard A et al: Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. Cancer Res 51 : 445—449, 1991

Immunohistochemical Analysis of *nm23* Gene Product/NDP Kinase Expression in Bile Duct Carcinoma —Lack of Prognostic Value—

Ryouko Sasaki, Senji Kanno, Takayuki Suto Hiroyuki Nitta, Masahiko Murakami,
Yoshiro Hayakawa, Yutaka Shimada, Hidenobu Kawamura,
Yoshiyuki Tamasawa and Kazuyoshi Saito

Department of Surgery 1, Iwate Medical University School of Medicine

The expression of *nm23* gene products, that is, NDP kinase were investigated immunohistochemically in 54 resected cases using monoclonal antibodies for two types of isoform. The expression rate of *nm23*-H1 was 79.6% and that of *nm23*-H2 was 85.2%. The expression rate of *nm23*-H1 was significantly lower in the cases of duodenal invasion, but there were not significant relation between the expression of *nm23* and depth of invasion lymph node metastasis and pancreatic invasion. There was no significant correlation between the expression of *nm23*-H1 and *nm23*-H2, and prognosis ($p=0.79$ and $p=0.63$, respectively). The expression rate of *nm23* was not significantly different among patients with no recurrence over 3 years, those with no recurrence over 5 years and those who had liver metastasis after surgery. These results suggest that there is no significant correlation between the expression of *nm23* and lymph node metastasis, prognosis and liver metastasis, and *nm23* may lack value as an indicator of prognosis or metastasis in bile duct carcinoma.

Reprint requests: Ryouko Sasaki Department of Surgery 1, School of Medicine, Iwate Medical University
19-1 Uchimarui, Morioka, 020 JAPAN