日消外会誌　33（5）：584～589，2000年

原　　著

胆嚢癌におけるE型カドヘリン，αカテニンの発現性と予後との関連

佐賀医科大学一般・消化器外科，*同　病理
森　　倫人　　宮崎　耕治　　北原　賢二
向井　伸介　　本山健太郎　　枝國源一郎*

胆嚢癌切除32例を対象として，細胞間接着因子であるE型カドヘリンとその膜裏打ち蛋白質の一つであるαカテニンの免疫組織染色を行い，その発現性と深達度，分化度，n，ly，v，pn，予後との相関を検討した．癌組織において，E型カドヘリン，αカテニンがいずれも正発現は5例（15.6%）で，深達度ssまで，n，ly，v，pnはすべて陰性で，これらの5年生存率は100%であった．一方，いずれかが減弱・消失15例（46.9%），いずれも減弱・消失12例（37.5%）では，分化度が低い深達度se，si癌の占める割合が多かった(51.9%)．n，ly，v，pnの陽性率はおのおの43.8%，59.4%，25.0%，37.5%と高率であり，おのおのの5年生存率は33.9%，19.0%と有意に予後は不良であった．以上より，E型カドヘリン，αカテニンの発現減弱は癌浸潤程度と相関しさらには予後の予測が可能で，今後胆嚢癌の予後因子として有用であることが示唆された．

I．はじめに

胆嚢癌は消化器癌の中でも予後不良な癌の一つであり，その要因として比較的早期から漿膜下層以深に浸潤し，広範に血行性あるいはリンパ行性転移をきたすことがあげられる．この癌の転移過程のなかで，脈管内に侵入した癌母集団からの癌細胞の解離には細胞間接着因子が関与していることが明らかになっている[1)2)]．したがって，この接着因子の不活化が癌の浸潤・転移に大きく関与しているものと考えられる．我々は胆嚢癌におけるE型カドヘリン発現減弱とapoptosisとの関連について報告したが[3)]，E型カドヘリンはその膜裏打ち蛋白質であるカテニンを介して細胞骨格系と結合することにより細胞接着機能を示すことが報告されており[4)5)]，E型カドヘリンの機能を評価するにはカテニンを考慮に入れる必要がある．

今回，胆嚢癌におけるE型カドヘリンの発現性とその膜裏打ち蛋白質であるαカテニンの発現を免疫組織学的手法を用いて同時に評価し，臨床病理学的因子との関連について調べ，予後の予知に有用な因子となり得るかを検討した．

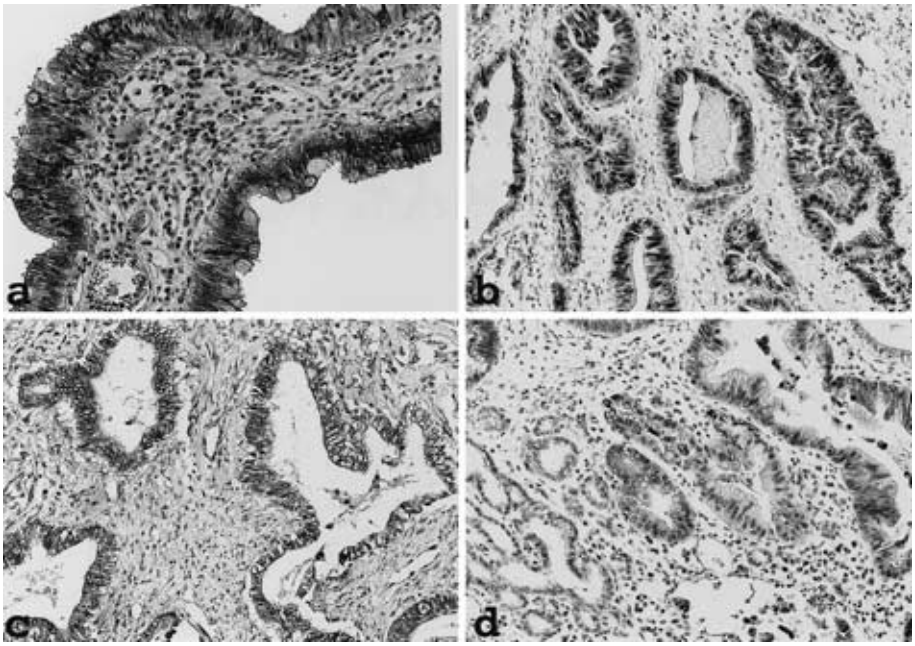
＜2000年3月23日受理＞別刷請求先：森　　倫人
〒849-8501　佐賀市鍋島5―1―1　佐賀医科大学一般・消化器外科

II．対象および方法

1982年から1997年7月までに当科で行った胆嚢癌切除症例は49例であった．そのうち病理組織学的に再検索が可能であった32例を対象とした．平均年齢は65.1歳（45～81歳）で，男女比は1：3であった．対象症例の切除術式は，胆嚢摘出術：14例（内1例に胆管切除付加），肝床切除術：5例(内1例に胆管切除付加)，膵頭十二指腸切除：2例，肝区域（S4a5）切除＋胆管切除：1例，肝区域（S4a5）切除＋膵頭十二指腸切除：5例，肝区域（S4a56）切除＋膵頭十二指腸切除：2例，拡大肝右葉切除：2例，拡大肝右葉切除＋膵頭十二指腸切除：1例であり，肝膵同時切除8例の内3例は幽門輪温存膵頭十二指腸切除であった．

材料は10%ホルマリン固定手術摘出標本から得られた，腫瘍最大割面のパラフィン包埋ブロックより，4μmの切片を作成した．免疫染色は，まずantigen retrievalのためにpH6のクエン酸バッファー下でマイクロウェーブ処理（650W，5分間）[3)]を行った．その後，それぞれ抗ヒトE型カドヘリンモノクローナル抗体（HECD-1）および抗マウスαカテニンモノクローナル抗体（α-18）を用い，1次抗体と4°Covernight反応後，SAB法による標識，DABによる発色を行い，hematoxylinで核染色を行った．染色結果の評価はblindで3

Fig. 1　Immunohistochemical staining of E-cadherin and α-catenin.（×200）
a.　E-cadherin expression in normal gallbladder epithelium.
b.　Strongly expressed E-cadherin in gallbladder carcinoma.
c.　Strongly expressed α-catenin in gallbladder carcinoma.
d.　Weekly expressed α-catenin in gallbladder carcinoma.
E-cadherin and α-catenin are seen at the all epithelial cell-cell boundaries.



名にて施行したが，同一症例内で肝細胞索や正常胆嚢上皮におけるＥ型カドヘリンやαカテニンの発現が見られない場合は，抗原性が消失していると考え，検討対象から除外した症例が17例存在した．染色性の評価は，Ｅ型カドヘリンおよびαカテニンが共に強く発現している同一切片の正常胆嚢上皮細胞をコントロールとして，腫瘍の80％以上の部分で，正常上皮と同等に発現している症例を正発現群(＋)，80％未満を減弱・消失群（－）の２群に分類し，臨床病理学的因子と予後とについて検討した．手術所見・病理組織学的所見は胆道癌取扱い規約第４版[6]に準じて記載した．生存率の算出には，Kaplan-Meier 法を用い，Log-rank 検定を行った．また，病理学的所見には χ^2検定を行い，危険率（p）＜0.05以下を有意差ありとした．

Ⅲ．結　　果

1．Ｅ型カドヘリンとαカテニンの発現性と co-expression

正常上皮におけるＥ型カドヘリン（**Fig. 1a**）とαカテニンの発現は胆嚢粘膜上皮の膜に一致して染色され，上皮細胞全体に均一に認められた．一方，癌組織においては，Ｅ型カドヘリン正発現（＋）（**Fig. 1b**）は18例（56.2％），αカテニン正発現（＋）(**Fig. 1c**）は７例(21.9％)で，おのおのの発現頻度はＥ型カドヘリンの方がαカテニンの発現率より高かった．発現減弱例の染色態度はいずれも，１切片上に正常発現している部分と減弱または消失している部分がモザイク状に混在していることが多かった（**Fig. 1d**）．

Ｅ型カドヘリンとαカテニンがいずれも正発現と発現性が一致している症例(＋/＋)は５例(15.6％)で，いずれかが減弱・消失（＋/－）している症例は15例（46.9％），いずれも減弱・消失（－/－）している症例は12例（37.5％）で，αカテニンは正発現しているがＥ型カドヘリンの減弱または消失している症例を２例に認めた（**Table 1**）．

2．病理組織学的因子とＥ型カドヘリン・αカテニンの発現性との関連

壁深達度との相関をみるとE型カドヘリン，αカテニンともに正発現（＋/＋）のうち5例中4例（80%）が漿膜下層ssまでの深達度であったのに対して，いずれかが減弱・消失（＋/－）or（－/＋）は15例中8例（53.3%）がse，si癌，いずれも減弱・消失（－/－）は11例中6例(54.5%)がse，si癌であり，深達度m/mp，ss，se/siに分けて比較してみると（＋/－）or（－/＋）または（－/－）において有意にse以上の進行癌が多かった（**Table 2**）.

組織学的分化度においてもE型カドヘリン，αカテニンともに正発現（＋/＋）の内訳は乳頭状腺癌2例，高分化型腺癌2例，扁平上皮癌1例であったのに対して，いずれかが減弱・消失（＋/－）or（－/＋）は乳頭状腺癌2例，高分化型腺癌5例，中分化型腺癌5例，低分化型腺癌2例，腺扁平上皮癌1例，いずれも減弱・消失（－/－）は乳頭状腺癌1例，高分化型腺癌4例，中分化型腺癌5例，低分化型腺癌1例，扁平上皮癌1例であり，(＋/＋)において乳頭状，高分化型腺癌の占める割合が有意に多く，(＋/－)or(－/＋)または(－/－）で中分化・低分化型腺癌の占めるる割合が多い傾向にあった（**Table 3**）.

リンパ節転移およびly，v，pnとの関連では，E型カドヘリン，αカテニンともに正発現（＋/＋）では全例リンパ節転移は陰性で，ly，v，pnもともに陰性であった．これに対して，E型カドヘリン，αカテニンいずれかが減弱・消失（＋/－）or（－/＋）では15例中9例（60.0%）にリンパ節転移がみられly，v，pnの陽性率はそれぞれ66.7%，26.7%，46.7%であった．また，E型カドヘリン，αカテニンいずれも減弱・消失（－/－）では，12例中6例（50.0%）にリンパ節転移がみられly，v，pnの陽性率はそれぞれ66.7%，33.3%，41.7%であり，（＋/－）or（－/＋）または（－/－）では高率にリンパ節転移およびly，v，pnを伴っていることが明らかになった（**Table 4**）.

3．累積生存率の解析

E型カドヘリン，αカテニンともに正発現(＋/＋)は累積5年，10年生存率はともに100%と予後は良好であったのに対して，E型カドヘリン，αカテニンいずれかが減弱・消失（＋/－）or（－/＋），またはいずれも減弱・消失（－/－）の10年生存例はなく，累積5年生存率はそれぞれ33.9%，19.0%であり，(＋/＋)と比較す

Table 1　Relationship between expression of E-cadherin and α-catenin in gallbladder carcinoma

		α-catenin	
		(＋)	(－)
E-cadherin	(＋)	5(15.6%)	13(40.6%)
	(－)	2(6.3%)	12(37.5%)

Table 2　Relationship between co-expression of E-cadherin/ α-catenin and depth of tumor invasion in gallbladder carcinoma

		Depth of tumor invasion		
		m, pm	ss	se，si
E-cadherin / α-catenin	(＋/＋)	2	2	1
	(＋/－) or (－/＋)	2	5	8＊
	(－/－)	1	5	6＊

＊$p < 0.05$

Table 3　Relationship between co-expression of E-cadherin/ α-catenin and histological classification in gallbladder carcinoma

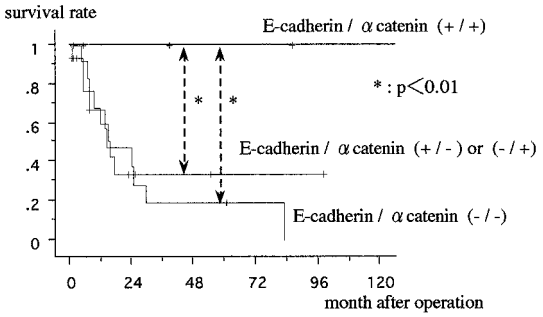
		Histological classification			
		pap/well	mod	por	scc/asc
E-cadherin / α-catenin	(＋/＋)	4＊	0	0	1
	(＋/－) or (－/＋)	7	5	2	1
	(－/－)	5	5	1	1

pap : papillary adenocaricinoma, well : well differentiated adenocaricinoma　＊$p < 0.05$
mod : moderately differentiated adenocaricinoma
por : poorly differentiated adenocaricinoma
scc : squamous cell carcinoma, asc : adenosquamous cell carcinoma

Table 4 Relationship between co-expression of E-cadherin/ α-catenin and histological findings in gallbladder carcinoma

		Histological findings			
		n	ly	v	pn
E-cadherin / α-catenin	(＋/＋)	0	0	0	0
	(＋/－) or (－/＋)	9	10	4	7
	(－/－)	6	9	4	5

Fig. 2 Cumulative survival curves of gallbladder carcinoma patients after operation in relation to the co-expression of the E-cadherin and α-catenin.



ると，(＋/－) or (－/＋)，(－/－) は有意に予後は不良であった（p<0.001)（**Fig. 2**）.

Ⅳ．考　察

癌の浸潤，転移の過程には，上皮系細胞間接着因子の一つであるE型カドヘリンの発現あるいは機能の減弱が深く関わっていると考えられる[7]．E型カドヘリンは上皮細胞間のCa依存性の細胞間接着因子であり，その細胞内ドメインには裏打蛋白質としてカテニンファミリー（α，βおよびγ-カテニン）が結合していることが知られている[5]．近年，癌細胞におけるカドヘリン-カテニン複合体の発現低下と癌悪性度との関連が，頭頸部癌[8]，食道癌[9)10]，胃癌[11]，大腸癌[12]，乳癌[13]，膀胱癌[14]などで報告されているが，胆道癌とくに胆嚢癌との関連の報告はみられない．E型カドヘリンは主に正常上皮組織に発現しており，正常胆嚢粘膜にもカドヘリン-カテニン複合体の発現がみられる．今回，胆嚢癌におけるE型カドヘリンとαカテニンを中心としたカドヘリン-カテニン複合体の発現を検索し，病理組織学的因子と予後との関連について検討した．

カドヘリンは数種類のカドヘリン結合蛋白質と結合し機能的単位を形成し，膜裏打ち蛋白質の一つであるカテニンを介して細胞骨格系と結合しその機能が発現されるため[4)5]，カドヘリンの機能異常はカドヘリン結合蛋白質，すなわちカテニンの異常によっても引き起こされる[15]．今回の免疫組織学的染色の結果，胆嚢癌でのE型カドヘリン，αカテニンの減弱．消失率はおのおの43.8%，78.1%であったが，αカテニンがより高頻度に発現の低下を起こしている傾向がみられた．このことは癌においてはE型カドヘリンの発現減弱のみならず，正常発現においてもその機能が低下している場合があることを示唆している．

病理組織学的因子との関連では癌組織のE型カドヘリン・αカテニンの発現は全体に不安定，不均一であるものが多かったが，組織学的分化度が高く，深達度ssまでのリンパ節転移のない比較的早期の癌組織においては，正常胆嚢上皮と同等の発現を示した．また，E型カドヘリン・αカテニンが減弱，消失している例では，深達度se，si癌の占める割合が多く（53.3%），組織学的に分化度も低く，リンパ節転移（60.0%），リンパ管浸潤（66.7%），静脈浸潤（26.7%），神経周囲浸潤（46.7%）陽性の進行癌の占める割合が多かった．

カドヘリン-カテニン複合体の発現の低下は，他の消化器癌[9)~12]での報告と同様に癌浸潤の程度，またはリンパ節転移と関連が確認されたが，その発現が正常上皮と同等に保たれている症例はその予後も有意に良好なことが今回の検討で明らかとなった．Eカドヘリン，αカテニンの発現の評価法には差異が見られるが，塩崎ら[10]は陽性細胞の割合を90%以上，90～10%，10%未満の3段階に分類しており，また，平山ら[13]は正常上皮と同様，細胞膜に均一に発現したものを非減弱型，減弱・消失を認めたものを減弱型の2段階に分類している．我々はこれに準じた形で，80%以上を正発現，80%未満を減弱・消失の2群にそれぞれ分類した．最近，βカテニンが大腸癌発癌初期に関わる癌抑制遺伝子の*APC*産物と結合することが示され[16)17]，またβカテニンが細胞接着に対してはむしろ抑制的に作用し得る可能性も指摘されており[18]，その関連については今後検討を要する．

我々は胆嚢癌の治療に当たっては，肝（S4a+S5）切除＋胆管切除＋D2リンパ節郭清を基本として，術前の壁深達度診断とリンパ節転移を含めた腫瘍の進展に応じて縮小手術として胆嚢全層切除＋D2リンパ節郭清，拡大手術として拡大肝葉切除±膵頭十二指腸切除にD3リンパ節郭清を付加している．しかし，深達度ss以上の胆嚢癌の治療成績は満足のいくものではなく，

特にss胆嚢癌は単純胆摘で治癒の得られるものから拡大手術によっても早期に再発するものまで多様な転帰を示す．今回の対象症例のうち，ss胆嚢癌は12例含まれているが，そのうちE型カドヘリン・αカテニンがともに正発現している症例が2例（16.7%）あった．この2例は拡大手術を導入する1989年以前の症例で，いずれも単純胆嚢摘出（±D2リンパ節郭清）にて，無再発生存が得られており，このことはss胆嚢癌でも縮小手術で良好な予後が得られる例が存在することを示唆している．胆嚢癌の治療方針，術式の決定に当たって，術中切除標本よりこれらの迅速診断が可能になれば，より正確な癌進展度あるいは予後の予測が可能になるため，今後検討していきたいと考えている．

以上より，E型カドヘリン，αカテニンの発現性を同時に評価することにより，癌浸潤程度さらに予後の予測が可能で，今後，胆嚢癌の予後予測因子として有用な因子となりうることが示唆された．

文　献

1）Takeichi M：Cadherins in cancer：implication for invasion and metastasis. Curr Opin in Cell Biol **5**：806―811, 1993

2）Matsuura K, Kawanishi J, Fujii S et al：Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid. Br J Cancer **66**：1122―1130, 1992

3）Sasatomi E, Tokunaga O, Miyazaki K：Spontaneous apoptosis in gallbladder carcinoma：Relationships with clinicopathologic factors, expression of E-cadherin, bcl-2 protooncogene, and p53 oncosuppressor gene. Cancer **78**：2101―2110, 1996

4）Vestweber D, Kemler R：Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. Cell Diff **15**：269―273, 1984

5）Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S：The 120kD cadherin-associated protein：similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. Cell **65**：849―857, 1991

6）日本胆道外科研究会偏：胆道癌取扱い規約．第4版．金原出版，東京，1997

7）Fixen UH, Behrens J, Sachs M et al：E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J Cell Biol **113**：173―185, 1995

8）Schipper JH, Frixen UH, Behrens J et al：E-cadhein expression in squamous cell carcinomas of head and neck：inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. Cancer Res **51**：6328―6337, 1991

9）Doki Y, Shiozaki H, Tahara H et al：Correlation between E-cadherin expression and invasiveness in vitro in a human esophageal cancer cell line. Cancer Res **53**：3421―3426, 1993

10）塩崎　均, 五福淳二, 井上雅智ほか：癌転移と接着分子　細胞間接着分子カドヘリン―臨床例におけるカドヘリン発現と転移の相関　消化器系癌（食道癌, 胃癌, 大腸癌）. 日臨　**53**：1602―1606, 1995

11）Shimoyama Y, Hirohashi S：Expression of E- and P-cadherin in gastric canrcinomas. Cancer Res **51**：2185―2192, 1991

12）Dorudi S, Sheffield JP, Poulsom R et al：E-cadherin expression in colorectal cancer. Am J Pathol **142**：981―986, 1993

13）平山廉三, 仁瓶善郎, 長内孝之ほか：癌転移と接着分子　細胞間接着分子カドヘリン―臨床例におけるカドヘリン発現と転移の相関―乳癌組織におけるE-カドヘリンの発現と予後. 日臨　**53**：1613―1618, 1995

14）Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE et al：Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. Cancer Res **53**：3241―3245, 1993

15）小池晃彦，浜口道成：癌転移と接着分子細胞間接着分子カドヘリン（Cadherin）：カドヘリン・ファミリーの分子構造, 機能とその病態生理機能. 日臨 **53**：1578―1584, 1995

16）Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW et al：Association of the *APC* tumor suppressor protein with catenins. Science **262**：1734―1737, 1993

17）Rubinfeld B, Souza B, Albert I et al：Association of the *APC* geneproduct with beta-catenin. Science **262**：1731―1734, 1993

18）Nagafuchi A, Ishihara S, Tsukita S et al：The role of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion：functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules. J Cell Biol **127**：235―245, 1994

Relationship between prognosis of gallbladder carcinoma patients and the expression of E-cadherin/α-catenin

Michito Mori, Kohji Miyazaki, Kenji Kitahara, Shinsuke Mukai,
Kentaro Motomaya and Genichiro Edakuni*
Department of Surgery and Pathology*, Saga Medical School

The process of progression and metastasis from a malignant neoplasm consists of sequential steps, some of which can be largely affected by intercellular adhesion between cancer cells. Since E-cadherin is one of the major molecules involved in adhesion between cells in normal and malignant epithelial tissues, we immunohistochemically measured the expression of E-cadherin and α-catenin, an E-cadherin-associated cytoplasmic protein that regulates E-cadherin function, in gallbladder carcinomas. Then comparison of the expression mode of these proteins with histologic parameters and the prognosis in 32 patients with primary gallbladder carcinoma was performed. Five cases (15.6%) with preserved expression of both E-cadherin and α-catenin had no lymph node metastasis, lymphatic invasion, vascular invasion or perineural invasion, and their depth of invasion was limited to less than the subserosal layer. The cumulative 5-year survival rate of this group was 100%.

However, most of 15 cases with reduced or negative expression of either E-cadherin or α-catenin and 12 cases with negative expression of both E-cadherin and α-catenin were in the advanced stage of the disease with carcinoma invasion deeper than se. Lymph node metastasis (43.8%), lymphatic invasion (59.4%), vascular invasion (25.0%) and perineural invasion (37.5%) also accompanied these groups. The cumulative 5-year survival rates of these groups were 33.9% and 19.0%, respectively, and are significantly poorer compared with the survival rate of the patient with preserved expression of both E-cadherin and α-catenin ($p<0.01$). In conclusion, determination of E-cadherin and α-catenin expression in gallbladder carcinoma is expected to provide useful information with regard to the prognosis.

Key words: E-cadherin,α-catenin, gallbladder carcinoma, prognosis

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：584—589, 2000〕

Reprint requests: Michito Mori Department of Surgery, Saga Medical School
5-1-1 Nabeshima, Saga, 849-8501 JAPAN