



Prognostic Significance of S100A4 Expression in Gallbladder Cancer

中村，哲

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2466

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002466>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【102】

氏名・(本籍) 中村 哲 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博い第1424号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

**Prognostic Significance of S100A4 Expression
in Gallbladder Cancer**

(胆嚢癌における予後因子としての S100A4 の発現)

審査委員

主査 教授 前田 盛

教授 黒田 嘉和 教授 尾原 秀史

Prognostic Significance of S100A4 Expression in Gallbladder Cancer

胆囊癌における予後因子としての S100A4 の発現

中村 哲^{1, 2)}、味木 徹夫¹⁾、村尾 真一³⁾、神垣 隆¹⁾、前田 盛²⁾、
具 英成¹⁾、黒田 嘉和¹⁾

1) 神戸大学大学院医学研究科応用分子医学講座消化器外科学、2) 生体情報医学講座分子病理学、3) 甲南病院中央検査部

【序論】胆囊癌は予後の悪い固体腫瘍の一つであり、この克服に対して肝臓合併切除や脾頭十二指腸切除術等の拡大手術が施行されている。しかしこのような治癒切除が完遂される様になったにもかかわらず、依然として高い再発率のために、予後不良な疾患である。この問題を解決するために、胆囊癌において予後に関する転移・浸潤関連分子を探索することが必要とされている。

一方、S100A4 は、二つの EF-hand を持つカルシウム結合蛋白で、高転移性腫瘍細胞から分離同定された遺伝子である。様々な基礎実験からその高発現は、細胞増殖、運動能、分化等に関与するとされ、癌の転移、浸潤機構における重要な役割が推測されている。さらに近年乳癌、肺癌等の上皮性腫瘍でのその発現と予後の関連が報告され注目されている。

現在までに、胆囊癌に関して S100A4 の発現に関する報告はなく、今回我々は胆囊癌切除標本での S100A4 の発現と臨床病理学的因子との関連性を検討した。

【実験方法】

(対象と標本)

1981 年から 1997 年までに当科および関連施設にて胆囊癌と診断され、切除された 60 例（男性 19 例、女性 41 例）を対象とした。標本はパラフィン包埋切片を使用し、S100A4 の発現と年齢、性別、Grade（組織形）、T、N、M、Stage、結石の有無、リンパ管侵襲と予後の関連を比較検討した。

(免疫組織化学染色)

精製した S100A4 蛋白を家兔に免疫して得られた抗 S100A4 ポリクローナル抗体を使用して免疫組織化学染色を行った。免疫ペルオキシダーゼ法と

ABC 法を用いて発色を行った。マクロファージや平滑筋細胞を内因性陽性対象として用い、腫瘍細胞の 5% 以上が染色されるものを陽性とした。

(統計学的解析)

S100A4 と個々の臨床病理学的因子との関連は、フィッシャー検定を用いて検定し、 $p < 0.05$ を有意差とした。生存分析は Kaplan-Meier 法を用いて行い、log-rank Test で有意差を検定した。Cox 比例ハザードモデルを用いて単変量および多変量解析を行い、予後に対するそれぞれの因子の影響を評価した。なお、これらの統計学的処理には、StatView® 5.0 ソフトウェアを使用した。

【結果】

胆囊癌腫瘍細胞において抗 S100A4 抗体は細胞質に染まった (Figure 1)。免疫組織染色陽性例は、60 例中 25 例 (42%) であった。

対象症例の臨床病理学的因子の背景と S100A4 との関連を (Table 1) に示す。年齢、性別、Grade（組織形）、T、N、M、Stage、結石の有無、リンパ管侵襲と S100A4 の発現率に有意な相関はみられなかった。生存分析では、Kaplan-Meier 曲線における対象全体の 5 年生存率は S100A4 発現群で 31.5%、S100A4 非発現群では、78.2% であった (Figure 2, $p=0.0006$)。さらに、T2 群でも、5 年生存率は S100A4 発現群で 57.1%、S100A4 非発現群では、83.3% であった (Figure 3, $p=0.048$)。T4 の症例は、全例一年以内に死亡した。Cox 比例ハザードモデルにおける単変量解析では、S100A4、T、N、M のハザード比は、それぞれ 4.05、12.38、4.09、9.05 であり、有意な予後因子であった (Table 2)。さらに多変量解析での、T、N、M、S100A4 のうち、N、M と S100A4 が有意な予後因子であった (Table 3)。S100A4 のハザード比は 2.77 であり他の因子と比べると、M 因子 4.85 に次ぐ重みであった。

【考察】

S100A4 は、転移浸潤関連分子として研究され、我々は今までに、in vitro の実験にて胆道癌においても、同様の性格を有していることを報告してきた。さらに近年、S100A4 の発現は、乳癌や肺癌にての臨床研究からその予後と関連が報告されている。本研究では、胆囊癌においても S100A4 の発現は、他の臨床病理学的因子に関わらず、独立した予後であることが示された。胆囊癌では、いくつかの分子と予後との関連が研究されている。CD44 variant の発現は予後因子として報告されているが、c-erbB2 や p53 の発現では、その関連性は指摘されていない。このことからも、胆囊癌において S100A4

が予後因子であることは、非常に有用であると考えられる。

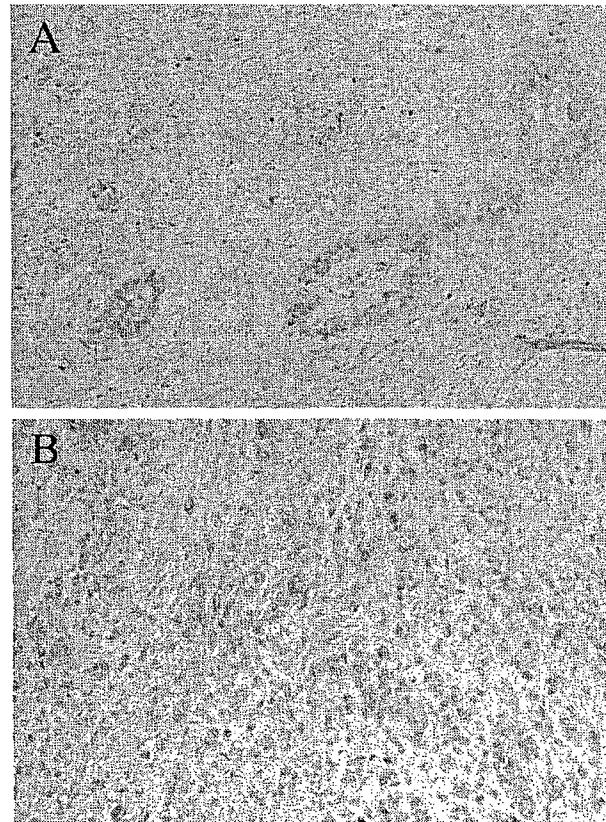
我々は、胆道癌においても、S100A4 遺伝子が細胞運動と浸潤能とに関連することを、胆道癌細胞株への遺伝子導入によって証明してきた。このことにより、胆囊癌における S100A4 の発現と腫瘍浸達度に相関があり、このことが、予後因子に影響を及ぼすと推測された。しかし、今回の研究では、S100A4 の発現と腫瘍浸達度に相関をみいだすことができず、この観点からでは胆囊癌において S100A4 が予後と関連する機構を解明することは出来なかった。

胆囊癌では対象全体だけでなく T2 の症例に関しても予後との有意な関連があり、このことは臨床において非常に有用と考えられ、今後、S100A4 の予後に関連する機構を解明することは重要と考えられる。

In vitro の実験系では、S100A4 遺伝子のアンチセンスを導入することで細胞運動と浸潤能を抑えることが示されているが、このことから S100A4 の遺伝子治療への可能性が示唆されている。しかし、トロポミオシンや non-muscle myosin、E-cadherin 等以外は、S100A4 との相互関連の機構がほとんど解明されておらず、今後これらの機構の詳細な解明が必要である。

最後に、胆囊癌において、S100A4 の発現は、独立した有意な予後因子であり、陽性例では再発を防止し、予後を改善する上で、強力な補助療法が必要と考えられる。

Figure 1

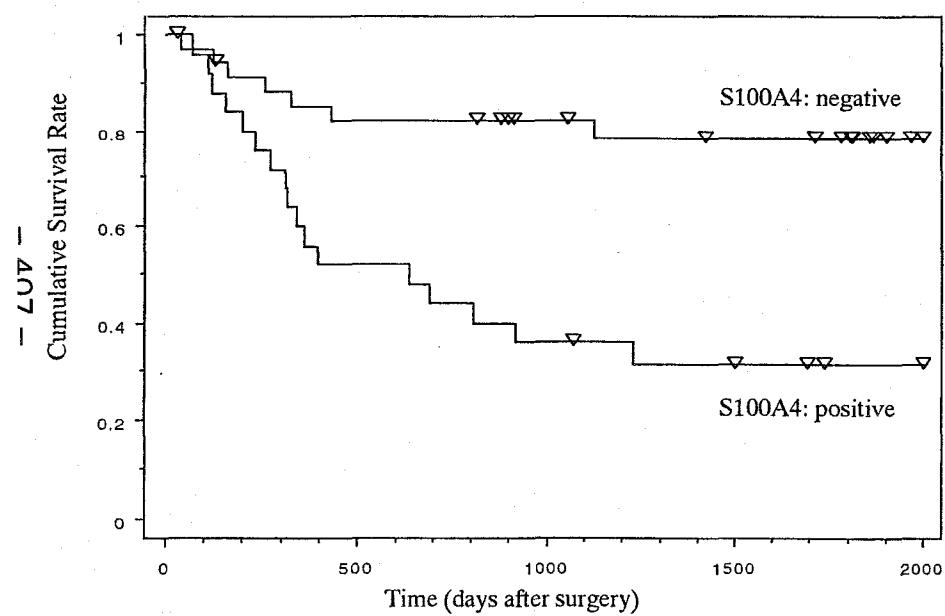


Immunohistochemical staining of gallbladder adenocarcinoma.

A, well differentiated adenocarcinoma; B, poorly differentiated adenocarcinoma.

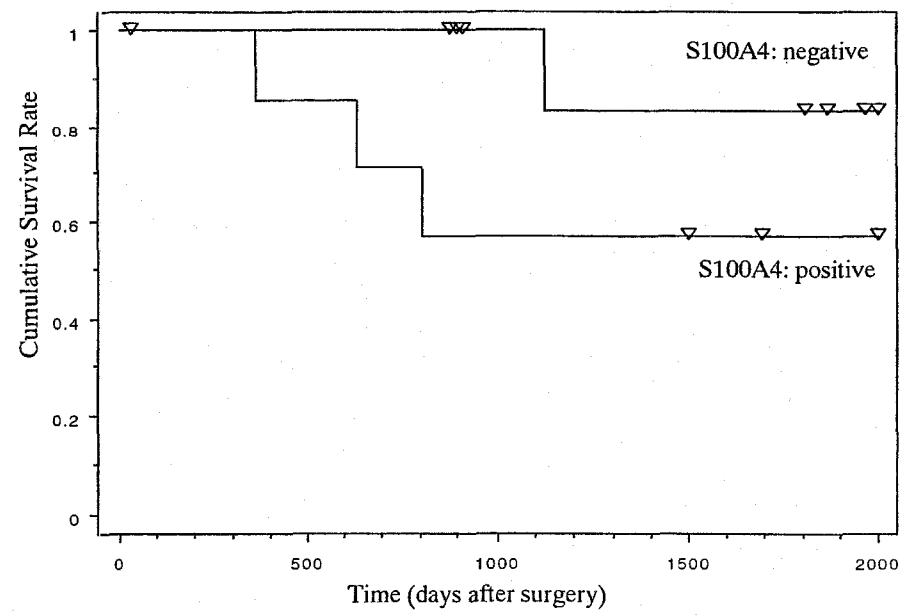
Both of the cancer cells show positive staining for anti-S100A4 antibody

Figure 2



Survival curves of 60 gallbladder cancer patients (S100A4 positive vs.S100A4 negative).

Figure 3



Survival curves of T2 gallbladder cancer patients (S100A4 positive vs.S100A4 negative).

Table 1 Clinical and pathologic features of the patients in this study

Factors	S100A4			<i>p</i>
	positive (n=25)	negative (n=35)		
Age	mean(SD)	67.2(9.0)	67.7(11.1)	NS
Gender	male	9 (47%)	10 (53%)	
	female	13 (46%)	25 (54%)	NS
Histological grade	1	18 (46%)	21 (54%)	
	2	3 (37%)	5 (63%)	
	3	3 (27%)	8 (73%)	
	4	1 (50%)	1 (50%)	NS
T	is	1 (13%)	7 (87%)	
	1	2 (25%)	6 (75%)	
	2	13 (45%)	16 (55%)	
	3	6 (55%)	5 (45%)	
	4	3 (75%)	1 (25%)	NS
N	0	13 (35%)	24 (65%)	
	1	9 (50%)	9 (50%)	
	2	3 (60%)	2 (40%)	NS
M	0	22 (40%)	33 (60%)	
	1	3 (60%)	2 (40%)	NS
Stage	0	1(4%)	7(20%)	
	I	2(8%)	6(17%)	
	II	7(28%)	10(29%)	
	III	7(28%)	7(20%)	
	IV	8(32%)	5(14%)	NS
lymphatic invasion	negative	3(12%)	8(23%)	
	positive	22(88%)	27(77%)	NS

NS: not statistically significant.

Table 2 Univariate predictors for prognosis

	Variables	HR	95% CI	<i>p</i>
Stage	(II,III,IV/0,I)	12.38	1.664 ~ 92.074	0.014
T	(2,3,4/ 0,1)	12.38	1.664 ~ 92.074	0.014
N	(yes/ no)	4.09	1.800 ~ 9.298	0.0008
M	(yes/ no)	9.05	3.143 ~ 26.029	<0.0001
S100A4	(positive/ negative)	4.05	1.721 ~ 9.534	0.0014
lymphatic invasion (yes/ no)		3.18	0.749 ~ 13.520	0.1169

CI, confidencial interval.

Table 3 Multivariate predictors for prognosis

Variables		HR	95% CI	p
S100A4	(positive/ negative)	2.77	1.119 ~ 6.837	0.028
T	(2,3,4/ 0,1)	5.39	0.654 ~ 44.498	0.118
N	(yes/ no)	2.21	0.926 ~ 5.252	0.074
M	(yes/ no)	4.85	1.657 ~ 14.212	0.004

CI, confidencial interval.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1444号	氏名	中村哲
論文題目	Prognostic Significance of S100A4 Expression in Gallbladder Cancer 胆囊癌における予後因子としてのS100A4の発現		
審査委員	主査	斎田盛	
	副査	黒田毒和	
	副査	尾原秀史	
審査終了日	平成14年2月28日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

胆嚢癌は予後の悪い固体腫瘍の一つであり、依然として高い再発率のために、予後不良な疾患である。この問題を解決するために、胆嚢癌において予後に関する転移・浸潤関連分子を探索することが必要とされている。

一方、S100A4は、二つのEF-handを持つカルシウム結合蛋白で、高転移性腫瘍細胞から分離同定された遺伝子である。様々な基礎実験からその高発現は、細胞増殖、運動能、分化等に関与するとされ、癌の転移、浸潤機構における重要な役割が推測されている。

本研究者は胆嚢切除標本でのS100A4の発現と臨床病理学的因子との関連性を検討した。

【実験方法】

1981年から1997年までに当科および関連施設にて胆嚢癌と診断され、切除された60例（男性19例、女性41例）を対象とした。

（免疫組織化学染色）

精製したS100A4蛋白を家兎に免疫して得られた抗S100A4ポリクローナル抗体を使用して免疫組織化学染色を行った。免疫ペルオキシダーゼ法とABC法を用いて発色を行った。マクロファージや平滑筋細胞を内因性陽性対象として用い、腫瘍細胞の5%以上が染色されるものを陽性とした。

【結果】

胆嚢癌腫瘍細胞において抗S100A4抗体は細胞質に染まった（Figure 1）。免疫組織染色陽性例は、60例中25例(42%)であった。

対象症例の臨床病理学的因子の背景とS100A4との関連を（Table 1）に示す。年齢、性別、Grade（組織形）、T、N、M、Stage、結石の有無、リンパ管侵襲とS100A4の発現率に有意な相関はみられなかった。生存分析では、Kaplan-

Meier曲線における対象全体の5年生存率はS100A4発現群で31.5%、S100A4非発現群では、78.2%であった（Figure 2、 $p=0.0006$ ）。さらに、T2群でも、5年生存率はS100A4発現群で57.1%、S100A4非発現群では、83.3%であった（Figure 3、 $p=0.048$ ）。T4の症例は、全例一年以内に死亡した。Cox比例ハザードモデルにおける単変量解析では、S100A4、T、N、Mのハザード比は、それぞれ4.05、12.38、4.09、9.05であり、有意な予後因子であった（Table 2）。さらに多変量解析での、T、N、M、S100A4のうち、N、MとS100A4が有意な予後因子であった（Table 3）。S100A4のハザード比は2.77であり他の因子と比べると、M因子4.85に次ぐ重みであった。

【考察】

S100A4は、転移浸潤関連分子として研究され、当グループは今までに、in vitroの実験にて胆道癌においても、同様の性格を有していることを報告してきた。さらに近年、S100A4の発現は、乳癌や肺癌にての臨床研究からその予後と関連が報告されている。本研究では、胆嚢癌においてもS100A4の発現は、他の臨床病理学的因子に関わらず、独立した予後であることが示された。胆嚢癌では、いくつかの分子と予後との関連が研究されている。CD44 variantの発現は予後因子として報告されているが、c-erbB2やp53の発現では、その関連性は指摘されていない。このことからも、胆嚢癌においてS100A4が予後因子であることは、非常に有用であると考えられる。胆道癌においても、S100A4遺伝子が細胞運動と浸潤能と関連することを、胆道癌細胞株への遺伝子導入によって証明してきた。このことにより、胆嚢癌におけるS100A4の発現と腫瘍浸達度に相関があり、このことが、予後因子に影響を及ぼすと推測された。しかし、今回の研究では、S100A4の発現と腫瘍浸達度に相関をみいだすことができず、この観点からでは胆嚢癌においてS100A4が予後と関連する機構を解明することは出来なかった。

胆嚢癌では対象全体だけでなくT2の症例に関しても予後との有意な関連があ

り、このことは臨床において非常に有用と考えられ、今後、S100A4の予後に関連する機構を解明することは重要と考えられる。

最後に、胆囊癌において、S100A4の発現は、独立した有意な予後因子であり、陽性例では再発を防止し、予後を改善する上で、強力な補助療法が必要と考えられる。

以上、本研究は、予後不良な胆囊癌の予後因子について研究したものであるが、従来ほとんど研究されていないS100ファミリーの役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。