



Structural and biological properties of a papillary component generating a micropapillary component in lung adenocarcinoma

永野, 達也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5387

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005387>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Structural and biological properties of
a papillary component generating a micropapillary component in
lung adenocarcinoma

肺腺癌における微小乳頭状成分を生み出す乳頭状成分の構造的および生物学的特性

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

呼吸器内科学

(指導教員：西村善博准教授)

永野 達也

【目的】

微小乳頭状成分とは線維性血管芯を欠く乳頭状成分のことで、乳頭状成分から生み出され、5から20個の悪性細胞が連なった形状をしており、肺腔内や結合織の薄壁内に腫瘍組織から分離された状態で存在している。肺腺癌の中で微小乳頭状成分を有するものは浸潤能が高く転移しやすいことが報告されているが、その原因については明らかにされていない。本研究ではこの原因について調べるため微小乳頭状成分のみに着目してきたこれまでの報告とは視点を変え、これを生み出す乳頭状成分に着目してその形態学的、免疫組織化学的、臨床病理学的検討を行うこととした。

【対象と方法】

2001年1月から2003年12月までの期間に国立がんセンター東病院で外科的に完全切除された肺腺癌の全487例のうち、切除断端に腫瘍細胞が認められた症例、多臓器からの転移巣であった症例を除いた445例について病理標本を作製し、病理学的評価と臨床記録の解析を行った。

【結果と考察】

肺腺癌の445例の内、乳頭状成分は228例(全体の60%)に認められた。腫瘍の最大断面の1%以上に微小乳頭状成分を認める場合を微小乳頭状成分陽性と定義した場合、その陽性例は150例(全体の33.7%)で全て乳頭状成分を有する肺腺癌に認められた。また、乳頭状成分を有する肺腺癌228例の内、微小乳頭状成分陽性のもものでは、陰性のものと比較して細気管支肺胞上皮成分、腺房成分、粘液産生充実成分などの悪性度の異なる腺癌の各成分の含有率において差を認めなかったが、腫瘍径が3cmを超える症例の割合(P=0.022)、TNM分類による臨床病期がII期以上の割合(P<0.001)、リンパ節転移が陽性の割合(P<0.001)、elastic van Gieson染色で評価した場合の胸膜浸潤が陽性の割合(P=0.001)、リンパ管浸潤が陽性の割合(P<0.001)、脈管浸潤が陽性の割合(P<0.001)が有意に高かった(カイ2乗検定)。Kaplan-Meier法による生存解析では、微小乳頭状成分陽性例の全生存率は陰性例より有意に悪く(P<0.0001)、5年生存率はそれぞれ64%と91%であった。微小乳頭状成分陽性例では進行した臨床病期が多く含まれているため、臨床病期が予後に与える影響を無視できるようにI期の症例に限定して両者の生存解析を行ったが、微小乳頭状成分陽性例の全生存率は陰性例より有意に悪く(P=0.0035)、5年生存率はそれぞれ76%と96%であった。さらに、腫瘍組織に占める微小乳頭状成分の割合が1%未満のものをGrade 0、1%以上30%未満のものをGrade 1、30%以上のものをGrade 2と定義して分類しI期の症例に限定し解析を行ったところ、Gradeが1段階ずつ進むにつれ有意に生存率が悪化していくことを新たに見出した。

次に、Grade 2の微小乳頭状成分陽性の34例とGrade 0の微小乳頭状成分

陰性の 40 例について切除検体のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックから、HE 染色標本で乳頭状成分と微小乳頭状成分を含む領域を選び出し組織マイクロアレイ技術により直径 2 mm の円柱状に切り取って、パラフィンブロック 1 個に再構築して免疫染色用の厚さ 4 μm の切片を作成した。免疫染色の手順としてまず切片のパラフィンをキシレンで除去し、3%過酸化水素水/メタノール混合溶液で内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制した後、クエン酸緩衝液中で 95°C20 分間の加熱処理をして抗原を賦活化し、切片中の抗原に対して一次抗体で標識した後、ビオチン化二次抗体を一次抗体と反応させ、ストレプトアビチン-HRP 複合体で標識し、HRP と過酸化水素水、ジアミノベンチジンのカップリング色素で抗原の存在部位に呈色反応を生じさせた。染色の程度を 0 (染色なし)、1 (軽度)、2 (中等度)、3 (強度) の 4 段階に分類し、これに腫瘍細胞中の染色陽性細胞の割合 (0-100%) を乗じて 0 から 300 までの染色スコアとし染色の評価を行った。

まず、CD31、CD34、factor VIII による免疫染色を行い、微小乳頭状成分が線維性血管芯を欠いていることを確かめた。また、微小乳頭状成分では、乳頭状成分では直線状に認められる SMA の発現および collagen IV で染色される基底膜を欠いた構造をしていることを明らかにした。続いて乳頭状成分の中間部で基底膜間の距離を 1 症例につき 5 個の乳頭状成分すなわち微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分では計 165 個の乳頭状成分、微小乳頭状成分陰性の乳頭状成分では計 190 個の乳頭状成分について測定したところ、微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分の茎の幅は $17.64 \pm 9.53 \mu\text{m}$ (3.34-77.14 μm) で微小乳頭状成分陰性の乳頭状成分の茎の幅 $26.07 \pm 10.16 \mu\text{m}$ (7.89-65.41 μm) より有意に細いことを明らかにした ($P < 0.001$)。

アポトーシス関連蛋白質である cleaved caspase 3 の免疫染色陽性細胞の割合は微小乳頭状成分で 1.0%、微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分で 1.6%、陰性の乳頭状成分で 0.36%であり、微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分で陰性の乳頭状成分より有意に高いという結果であった ($P < 0.001$)。細胞接着分子である β -catenin、E-cadherin、CD44 の染色スコアには 3 者の間で違いを認めなかった。ムチン関連蛋白質である Muc-1、Muc-2、Muc-5AC および Muc-6 の免疫染色では、Muc-6 において微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分で陰性の乳頭状成分より高い傾向があったが ($P = 0.062$)、それ以外では 3 者で有意な違いは認めなかった。低酸素誘導性因子 (HIF-1) によって制御され、低酸素のマーカーとして知られる GLUT-1 の染色スコアは、線維性血管芯を構造上欠いている微小乳頭状成分で 69 であり、微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分の 26 より有意に高かった ($P = 0.001$)。さらに注目すべきこととして微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分では陰性の乳頭状成分の染色スコア 8.6 よりも染色スコアが有意に高く ($P = 0.025$)、形態学的に間質部分が少ないことを反映

したものであると考えられた。低酸素状態は腫瘍増殖の重要な制御因子であり浸潤能と深く関係していることが報告されており、微小乳頭状成分を有する肺腺癌の浸潤能が高い原因の一つとして低酸素状態が考えられた。また、多くの接着細胞にとって細胞外マトリックスへ接着することは生存や増殖のために必須であり、細胞接着を喪失した細胞はアポトーシスを起こすことが知られている。この細胞接着不全に起因するアポトーシスは特別にアノキスと呼ばれるが、今回の研究ではアポトーシス関連蛋白質である cleaved caspase 3 の免疫染色陽性細胞の割合が微小乳頭状成分で 1.0%と基底膜を有さず細胞外マトリックスとの接着を喪失した構造をしているにもかかわらず極めて低く、アノキス耐性を獲得している可能性が考えられた。アノキス耐性を持つ癌細胞は転移を起こしやすく、微小乳頭状成分を有する肺腺癌が転移を起こしやすい原因の一つとしてアノキス耐性の獲得が考えられた。

【結語】

今回の研究で、微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分と陰性の乳頭状成分は微小乳頭状成分の有無や浸潤・転移能において違いを認めるだけではなく、形態や低酸素状態においても生物学的に異なった構造をしていることを明らかとした。これらの違いが微小乳頭状成分を有する肺腺癌の浸潤能の高さや転移のしやすさに関係している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2211 号	氏 名	永野 達也
論文題目 Title of Dissertation	Structural and biological properties of a papillary component generating a micropapillary component in lung adenocarcinoma 肺腺癌における微小乳頭状成分を生み出す乳頭状成分の構造のおよび生物学的特性		
審査委員 Examiner	主 査 平田 健一 Chief Examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner 副 査 前川 信博 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

微小乳頭状成分とは線維性血管芯を欠く乳頭状成分のことで、乳頭状成分から生み出され、5から20個の悪性細胞が連なった形状をしており、肺腔内や結合織の薄壁内に腫瘍組織から分離された状態で存在している。肺腺癌の中で微小乳頭状成分を有するものは浸潤能が高く転移しやすいことが報告されているが、その原因については明らかにされていない。申請者らはこの原因について調べるため微小乳頭状成分のみに着目してきたこれまでの報告とは視点を変え、これを生み出す乳頭状成分に着目してその形態学的、免疫組織化学的、臨床病理学的に検討した。

【対象と方法】

2001年1月から2003年12月までの期間に国立がんセンター東病院で外科的に完全切除された肺腺癌の全487例のうち、切除断端に腫瘍細胞が認められた症例、多臓器からの転移巣であった症例を除いた445例について病理標本を作製し、病理学的評価と臨床記録の解析を行った。

【結果と考察】

肺腺癌の445例の内、乳頭状成分は228例(全体の60%)に認められた。腫瘍の最大断面の1%以上に微小乳頭状成分を認める場合を微小乳頭状成分陽性と定義した場合、その陽性例は150例(全体の33.7%)で全て乳頭状成分を有する肺腺癌に認められた。また、乳頭状成分を有する肺腺癌228例の内、微小乳頭状成分陽性のものでは、陰性のものと比較して、腫瘍径が3cmを超える症例の割合、TNM分類による臨床病期がII期以上の割合、リンパ節転移が陽性の割合、elastic van Gieson染色で評価した場合の胸膜浸潤が陽性の割合、リンパ管浸潤が陽性の割合、脈管浸潤が陽性の割合が有意に高かった。Kaplan-Meier法による生存解析では、微小乳頭状成分陽性例の全生存率は陰性例より有意に悪く、5年生存率はそれぞれ64%と91%であった。微小乳頭状成分陽性例の全生存率は陰性例より有意に悪く、5年生存率はそれぞれ76%と96%であった。

次に、Grade 2の微小乳頭状成分陽性の34例とGrade 0の微小乳頭状成分陰性の40例について免疫染色を行った。染色の程度を4段階に分類し、これに腫瘍細胞中の染色陽性細胞の割合(0-100%)を乗じて0から300までの染色スコアとし染色の評価を行った。まず、CD31、CD34、factor VIIIによる免疫染色を行い、微小乳頭状成分が線維性血管芯を欠いており、乳頭状成分では直線状に認められるSMAの発現およびcollagen IVで染色される基底膜を欠いた構造をしていることを明らかにした。

さらに、微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分の茎の幅は微小乳頭状成分陰性の乳頭状成分の茎の幅より有意に細いことを明らかにした。

また、アポトーシス関連蛋白質である cleaved caspase 3 の免疫染色陽性細胞の割合は微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分で陰性の乳頭状成分より有意に高かった。細胞接着分子である β -catenin、E-cadherin、CD44 の染色スコアには3者の間で違いを認めなかった。ムチン関連蛋白質である Muc-1、Muc-2、Muc-5AC および Muc-6 の免疫染色では、有意な違いは認めなかった。低酸素誘導性因子 (HIF-1) によって制御され、低酸素のマーカーとして知られる GLUT-1 の染色スコアは、線維性血管芯を構造上欠いている微小乳頭状成分で 69 であり、微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分の 26 より有意に高かった。さらに注目すべきこととして微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分では陰性の乳頭状成分の染色スコア 8.6 よりも染色スコアが有意に高く、形態学的に間質部分が少ないことを反映したものであると考えられた。多くの接着細胞にとって細胞外マトリクスへ接着することは生存や増殖のために必須であり、細胞接着を喪失した細胞はアポトーシスを起こすことが知られている。この細胞接着不全に起因するアポトーシスは特別にアノイクスと呼ばれるが、今回の研究ではアポトーシス関連蛋白質である cleaved caspase 3 の免疫染色陽性細胞の割合が極めて低く、アノイクス耐性を獲得している可能性が考えられ、微小乳頭状成分を有する肺腺癌が転移を起こしやすい原因の一つとしてアノイクス耐性の獲得が考えられた。

本研究は、微小乳頭状成分陽性の乳頭状成分と陰性の乳頭状成分は浸潤・転移能において違いを認めるだけでなく、形態や低酸素状態においても生物学的に異なった構造をしていることを明らかとし、微小乳頭状成分を有する肺腺癌の浸潤能の高さや転移のしやすさの理由を明らかにする重要な知見を得たものとして価値あるものと認める。よって本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。