



# Distinctive expression of CD133 between intraductal papillary neoplasms of the bile duct and bile duct adenocarcinomas

大坪, 出

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5862

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005862>

※ 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。



## 学位論文の要旨

### Distinctive expression of CD133 between intraductal papillary neoplasms of the bile duct and bile duct adenocarcinomas

胆管内乳頭状腫瘍 (IPNB) と胆管癌における CD133 発現の相違について

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
肝胆膵外科学  
(指導教員: 具 英成教授)

大坪 出

#### 諸言

胆管内乳頭状腫瘍 (intraductal papillary neoplasms of the bile duct: IPNB) は大量の粘液産生と乳頭状増殖といった特徴から、膵臓の膵管内乳頭状粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN) の類似疾患として最近提唱された疾患概念で、通常の胆管癌に比べ切除率が高く予後は良好である。一方、肝内胆管癌 (IHCCC) や肝門胆管癌 (HBDC) は切除率も低く、予後が不良である。

癌幹細胞は、最初に乳癌から分離、同定された。固形癌は様々な階層からなる腫瘍細胞の集合で、癌幹細胞によりその増殖が維持されることが近年報告されてきた。CD133 は、さまざまなヒト癌の癌幹細胞マーカーとして報告されてきた。我々は CD133 がマウスにおいて膵組織の前駆細胞のマーカーであることを最近証明し、ヒトにおいて CD133 は成体膵臓の終末腺管細胞と膵癌細胞に発現している事を示し、また、ヒト膵癌組織に発現する CD133 が膵 IPMNs ではその発現が見られないことを初めて報告した。これらは、CD133 発現が膵 IPMN と腺癌を区別する有意義なマーカーとなりえることを示した。

胆管腫瘍の CD133 発現に関しては、3つの報告がある。これらの報告では肝内胆管癌において CD133 はびまん性、あるいは散在性の発現を示した。しかし、これらは IPNB の CD133 発現にはほとんど言及しておらず、IPNB における CD133 の役割は不明である。

今回の研究において、我々は IPNB と IHCCC、HBDC について CD133 発現を比較し、その発現に有意な差異を認めた。これらの結果は、CD133 発現が膵 IPMN と膵癌の場合と同様に、IPNB と胆管癌を区別する有用なマーカーである可能性を示した。

#### 方法

##### 対象患者、組織検体

1998~2010年に手術した IPNB 7例、IHCCC 16例と HBDC 8例を対象とし、予後を含む臨床病理学的因子を評価した。摘出標本は 10%ホルマリンで固定され、パラフィン包埋された。すべての組織標本について、患者から説明後に書面での同意を得た。IPNB は肉眼的に粘液分泌を認めるもの、認めないものの 2つのタイプを含み、未だその定義に混乱が見られるが、粘液産生タイプの IPNB が膵 IPMN と同じ特徴を持ち、他方は異なった疾患群を含むと考えられているため、前者のみを対象とした。

##### 免疫組織化学

CD133 発現を評価する免疫組織化学的染色は、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織の 3-4  $\mu\text{m}$  の切片で行った。キシレンで脱パラフィン後、抗原賦活化法を行った。組織切片を 1  $\times$  Target Retrieval solution (Dako) で 40 分間沸騰し、抗体は 50 倍希釈のマウス抗ヒト CD133 モノクローナル抗体 (Miltenyi Biotech) を加え、4 $^{\circ}$  C、オーバーナイトで反応させた。

2次抗体として、mouse HRP polymer probe (Dako) を使用し、ジアミノ・ベンジジンを加え 10 分間発色、ヘマトキシリンで 1 分間対照染色を行った。

MUC1-core、MUC2 と MUC5AC 検出は、マウス抗ヒト MUC1 mAb (Novocastra Laboratories, 1:100)、マウス抗ヒト MUC2 mAb (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) とマウス抗ヒト MUC5AC mAb (Chemicon International, 1:300) を使用した。癌および正常組織の同定のために、同時に H&E 染色を行った。

#### 免疫組織化学染色の評価

正常肝では CD133 発現が Hering 管周囲に見られ、すべての症例でそれを内部標準として評価した。胆管癌では、CD133 は癌細胞の細胞膜に発現していた。

各症例で CD133 陽性細胞率を算出するため、2人の著者(大坪、味木)が個別にスライドを観察した。200倍視野で4視野の細胞数を計測し、CD133発現陽性細胞の平均パーセントを計算した。MUC1、2と5ACの発現は、過去の報告に従い、0%；- (陰性)、1~10%；1+ (限局的)、11~50%；2+ (中等度)、50%以上；3+ (広範囲)とした。

#### 統計解析

統計解析は、 $\chi^2$  試験、Kruskal-Wallis 試験と Mann-Whitney U 検定を利用して行った。患者の平均生存時間は Kaplan-Meier 法で計算し、その差異はログランク検定で評価した。P 値は 0.05 未満で有意であるとみなした。

#### 結果

##### 患者の背景

腫瘍病期は、UICC 分類に基づき記載した。IPNB 群は、平均年齢 58.6 歳で、男性 1 例、女性 6 例であった。6 例で葉切除以上の肝切除、1 例で肝部分切除が行われた。追跡調査期間は平均 46.7 ヶ月 (26 - 84 ヶ月) で、全例が生存中であった。IHCCC 群は平均年齢 69.3 歳で、男性 12 例、女性 4 例であった。全例が腺癌と診断され、高分化型 2 例、中分化型 10 例、低分化型 4 例であった。8 例で肝葉以上の肝切除、8 例で肝部分切除が行われた。平均追跡期間は 28.4 ヶ月 (1 - 90 ヶ月) であった。HBDC 群は平均年齢 69.5 歳で、男性 5 例、女性 3 例であった。全例が腺癌と診断され、高分化型 2 例、中分化型 3 例、低分化型 3 例であった。全例で葉切除以上の肝切除が行われた。平均追跡期間は 8.3 ヶ月 (4 - 12 ヶ月) であった。

IPNB 群では他の群と比較して有意に女性が多く ( $P = 0.024$ )、IHCCC 群は有意に肝部分切除例が多かった ( $P = 0.044$ )。3 群間で年齢 ( $P = 0.30$ )、腫瘍病期 ( $P = 0.31$ ) には差を認めなかった。IPNB 群と IHCCC 群を比較すると、性別 ( $P < 0.01$ ) と年齢 ( $P < 0.01$ ) には有意差を認めたが、腫瘍病期 ( $P = 0.27$ ) には差を認めなかった。

##### IPNB の病理学的亜分類とムチン発現

IPNB 症例は全例が腺癌と診断された。組織学的に、3 例は胆管壁を超えて部分的に浸潤を認め、4 例は壁内に限局する癌であった。7 例中 6 例は、Stage I および II であったが、1 例はリンパ節・卵巣転移を認め、Stage IV であった。

過去の報告に準じ、IPNB 症例を細胞形態に基づき H&E 染色 4 型に亜分類した。6 例は

胆嚢型、1 例が腸型であった。Zen らの報告と同様に、全例で MUC5AC は中等度以上に発現していたが、MUC1、MUC2 の発現は様々であった。4 例 (57%) は MUC1+/MUC2- であり、2 例 (29%) は MUC1-/MUC2+、1 例 (14%) は MUC1-/MUC2- であった。浸潤癌は、全例で MUC1 陽性を示したが、壁内限局症例では MUC1 陽性は 4 例中 1 例のみであった。

##### IPNB と IHCCC の予後比較

IPNB 症例は、全例生存中であった。対照的に、IHCCC 症例では 1 年、3 年生存率が共に 76.4% であった。両群の生存率に有意差は認めなかった ( $P = 0.18$ ) が、IPNB 患者で予後が良好な傾向を認めた。この傾向は、Stage I および II の症例に限定しても同様であった ( $P = 0.38$ )。HBDC 患者では追跡期間が限られていたため、IPNB と HBDC の予後比較は行わなかった。

##### IPNB、IHCCC、HBDC の CD133 発現

IPNB は全例で CD133 発現を認めず、IHCCC 群、HBDC 群との間に有意な差を示した ( $P < 0.01$ )。CD133 陽性細胞率は IHCCC 群 (平均 16.4%、2.5 - 41.7%) と HBDC 群 (平均 17.2%、4.2 - 35.1%) との間で有意差を認めなかった ( $P = 0.95$ )。

#### 考察

本研究は胆管内乳頭状腫瘍 (IPNB) の CD133 発現についての最初の報告であると思われる。我々の結果では、CD133 は IPNB では発現せず、肝内胆管癌 (IHCCC) と肝門部胆管癌 (HBDC) では発現していた。CD133 は膵 IPMN でも発現しておらず、今回の結果は IPNB が膵 IPMN の対照疾患であるという説を強く支持すると考えられた。IPNB の臨床病理学的特徴をみると、過去に報告された膵 IPMN の特徴と合致し、良好な予後と粘液産生を示す傾向があった。

予後に関して、IPNB 患者は、IHCCC 患者と比較して良好な傾向であった。IPNB 群と HBDC 群については追跡期間不足のため予後比較は行えなかったが、Stage I - II の HBDC 患者の 3 年生存率は約 50% と報告されており、これは Stage I - II IHCCC の 61% に近い。本研究の Stage I - II IPNB 患者の 3 年生存率は 100% であり、IPNB は予後良好であった。

現在まで、胆管腫瘍における CD133 発現についての報告は少ない。Yoshikawa らは、IHCCC 腫瘍細胞と非腫瘍性の肝実質で、CD133 がびまん性に発現していると報告した。彼らの研究では、IHCCC 細胞の CD133 発現がびまん性に細胞膜に認められたのに対し、胆管上皮では一貫して弱い染色であった。一方、Smith らは IHCCC 検体の 67% で細胞膜に染色が見られたと報告し、Shimada らは IHCCC の 48% で細胞質に染色陽性と報告した。我々の研究においては、IHCCC の CD133 発現は、IHCCC 全例で認められた。しかし、CD133 陽性率は、各腫瘍で様々であった。この理由は不明であるが、膵腺癌におけるように、癌細胞周囲の微小環境が CD133 発現、局在に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

本研究では IHCCC で癌細胞の 16.4% (2.5~41.7%) で CD 133 発現が陽性であった。

これは Shimada らによって報告 (0.5 - 2.0%) されたよりも非常に高い率であった。この 2 つの研究間の結果の違いは保存法や染色法の違い、抗体の種類の違いに起因する可能性がある。本研究では、IHCCC 症例はホルマリン固定材料を使用して免疫染色法で検討したが、各症例の内部標準として肝幹細胞の存在する Hering 管周囲の細胞を利用して確実な免疫染色を行った。

胆管の発癌機序に関して、2 つの機序が仮定されている。平坦型の“biliary intraepithelial neoplasia (BiLIN)”、そして、乳頭状を呈する“IPNB”である。この 2 つの発癌経路は、ムチン蛋白質の発現、または遺伝子・タンパク質発現 (例えば p16、p21、p53、COX-2 や  $\beta$  カテニン) の違いにより区別でき、浸潤癌は BiLIN から IPNB から発生すると考えられている。しかし、この多段階発癌過程の詳細は現在まで不明である。この研究において、IPNB は浸潤傾向の有無に関わらず CD133 発現が見られなかったことから、IPNB と従来の胆管癌が異なる疾患概念であるという間接証拠になり得ると思われる。

最近、Nakanuma らは IPNB が IHCCC へと移行することがあるという仮説を提案した。この仮説を検討するとき、IPNB の定義は重要と考えられる。Ohtsuka らは最近、IPNB が肉眼的に粘液分泌を認める例と認めない例を含んでいるといった点から、全ての IPNB が一定の発癌機構から発生するのでは無いという説を報告している。本研究においては、癌浸潤については考慮せずに臨床的に粘液産生を伴う IPNB 症例を選択した。そのため、非浸潤癌および浸潤癌を含んだが、CD133 発現は全例で欠損していた。これに対し、IHCCC と HBDC では CD133 発現は全症例に認められた。CD133 発現が IPNB から IHCCC へと移行する間に獲得されるという可能性も考えられたが、癌幹細胞発生についての仮説から IPNB から IHCCC への移行は可能性が低い。これは、癌は癌幹細胞から派生したクローン細胞群から形成、維持されると考えられており、癌幹細胞のマーカーとされる CD133 が IHCCC では発現しているが IPNB では発現していないことからの推測である。今後 IPNB の更なる蓄積、研究が期待される。

細胞形態に基づき、IPNB は腺 IPMN と同様に、胆腺型、腸型、胃型、oncocytic 型に分類される。Ohtsuka らは粘液産生型の IPNB では腸型が優位であり、粘液非産生型の IPNB で胆腺型が優位であったと報告している。しかし、本研究では、IPNB は著しい粘液産生を示していたが胆腺型が優位だった。2 つの研究の違いの理由は、明白でないが、両研究とも限られた症例数が原因と思われた。IPNB において形態的亜分類と腫瘍性格の関係を決定するために、更なる検討が望まれる。

腺 IPMN は細胞形態に応じた典型的ムチン染色パターンが示されるが、IPNB のムチン染色パターンは様々であると報告されている。我々のムチン染色パターンもこれらの報告と同様で、細胞形態分類と必ずしも一致していなかった。この研究において、浸潤性 IPNB の MUC1 の陽性率 (100%) は、非浸潤性 IPNB (25%) と比較して高かった。Yonezawa らは、MUC1 発現が腺 IPMN において浸潤病変に限り観察されると報告している。MUC1 発現と腫瘍浸潤の関係は、IPNB と腺 IPMN の間で類似した特徴を示す可能性がある。

本研究の結論として、IPNB は CD133 発現の観点から胆管癌と異なる性格を持ち、胆管癌より予後が良い傾向があった。CD133 発現から考察すると、大部分の IPNB は胆管癌と異なる発癌機構を持つと推測される。また、IPNB の CD133 発現の欠損は、IPNB と従来の胆管癌を区別する時に有用なマーカーとして用いられる可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2 3 1 1 号	氏 名	大坪 出
論文題目 Title of Dissertation	Distinctive expression of CD133 between intraductal papillary neoplasms of the bile duct and bile duct adenocarcinomas 胆管内乳頭状腫瘍 (IPNB) と胆管癌における CD133 発現の相違について		
審査委員 Examiner	主 査 横 崎 元 Chief Examiner 副 査 栗 健 Vice-examiner 副 査 西 撰 一 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

胆管内乳頭状腫瘍 (intraductal papillary neoplasms of the bile duct; IPNB) は大量の粘液産生と乳頭状増殖等形態学的特徴から、膵臓の膵管内乳頭状粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN) の類似疾患として提唱された疾患概念で、通常の胆管癌に比べ切除率が高く予後は良好である。一方、肝内胆管癌 (IHCCC) や肝門胆管癌 (HBDC) は切除率も低く予後が不良である。申請者らはさまざまなヒト癌の癌幹細胞マーカーとして報告されている CD133 が、マウスにおいて膵組織の前駆細胞のマーカーであることを最近証明し、ヒトにおいて CD133 は成体膵臓の終末腺管細胞と膵癌細胞に発現している事、ヒト膵癌組織に発現する CD133 が膵 IPMNs ではその発現が見られないことを初めて報告し、CD133 発現が膵 IPMN と腺癌を区別する有意なマーカーとなりえることを示した。本研究では、胆管腫瘍における CD133 発現の意義を検索する事を目的として、手術的に切除された IPNB、IHCCC、HBDC について免疫組織化学的解析を行った。

検索に用いた症例は IPNB 7 例、IHCCC 16 例と HBDC 8 例であり、手術的に切除された標本のホルマリン固定、パラフィン包埋切片について、マウス抗ヒト CD133 モノクローナル抗体 (Miltenyi Biotech) を一次抗体、HRP polymer probe により可視化した。さらに、MUC1、MUC2、MUC5Ac 免疫組織化学により各腫瘍の粘液形質を検索した。CD133 染色の対照には正常肝 Herring 管周囲陽性所見を用いた。胆管癌における CD133 免疫活性は癌細胞細胞膜に認められ、200 倍視野で 4 視野の細胞数を計測し、CD133 発現陽性細胞の平均比率を計算した。MUC1、MUC2、MUC5Ac 発現は、0% ; - (陰性)、1~10% ; 1+ (限局的)、11~50% ; 2+ (中等度)、50%以上 ; 3+ (広範囲) として評価した。統計解析には  $\chi^2$  検定、Kruskal-Wallis 検定、Mann-Whitney U 検定を用いた。また、患者の平均生存期間は Kaplan-Meier 法で計算し、その差異はログランク検定で評価した。得られた結果は以下のごとくである。

① IPNB 群は、平均年齢 58.6 歳で、男性 1 例、女性 6 例であった。6 例で葉切除以上の肝切除、1 例で肝部分切除が行われた。追跡調査期間は平均 46.7 ヶ月 (26 - 84 ヶ月) で、全例が生存中であった。IHCCC 群は平均年齢 69.3 歳で、男性 12 例、女性 4 例であった。全例が腺癌と診断され、高分化型 2 例、中分化型 10 例、低分化型 4 例であった。8 例で肝葉以上の肝切除、8 例で肝部分切除が行われた。平均追跡期間は 28.4 ヶ月 (1 - 90 ヶ月) であった。HBDC 群は平均年齢 69.5 歳で、男性 5 例、女性 3 例であった。全例が腺癌と診断され、高分化型 2 例、中分化型 3 例、低分化型 3 例であった。全例で葉切除以上の肝切除が行われた。平均追跡期間は 8.3 ヶ月 (4 - 12 ヶ月) であった。IPNB 群では他の群と比較して有意に女性が多く ( $P=0.024$ )、IHCCC 群は有意に肝部分切除例が多かった ( $P=0.044$ )。

3群間で年齢 ( $P=0.30$ )、腫瘍病期 ( $P=0.31$ ) には差を認めなかった。IPNB群とIHCCC群を比較すると、性別 ( $P<0.01$ ) と年齢 ( $P<0.01$ ) には有意差を認めたが、腫瘍病期 ( $P=0.27$ ) には差を認めなかった。

② IPNB症例は全例が腺癌と診断された。組織学的に、3例は胆管壁を超えて部分的に浸潤を認め、4例は壁内に限局する癌であった。7例中6例は、Stage IおよびIIであったが、1例はリンパ節・卵巣転移を認め、Stage IVであった。過去の報告に準じ、IPNB症例を細胞形態に基づきH&E染色4型に亜分類した。6例は胆膵型、1例が腸型であった。Zenらの報告と同様に、全例でMUC5ACは中等度以上に発現していたが、MUC1、MUC2の発現は様々であった。4例(57%)はMUC1+/MUC2+であり、2例(29%)はMUC1-/MUC2+、1例(14%)はMUC1-/MUC2-であった。浸潤癌は、全例でMUC1陽性を示したが、壁内限局症例ではMUC1陽性は4例中1例のみであった。

③ IPNB症例は、全例生存中であった。対照的に、IHCCC症例では1年、3年生存率が共に76.4%であった。両群の生存率に有意差は認めなかった ( $P=0.18$ ) が、IPNB患者で予後が良好な傾向を認めた。この傾向は、Stage IおよびIIの症例に限定しても同様であった ( $P=0.38$ )。HBDC患者では追跡期間が限られていたため、IPNBとHBDCの予後比較は行わなかった。

④ IPNBは全例でCD133発現を認めず、IHCCC群、HBDC群との間に有意な差を示した ( $P<0.01$ )。CD133陽性細胞率はIHCCC群(平均16.4%、2.5-41.7%)とHBDC群(平均17.2%、4.2-35.1%)との間で有意差を認めなかった ( $P=0.95$ )。

以上の研究成果はIPNBは胆管癌に比較して予後良好な疾患で、腫瘍細胞はCD133免疫活性を持たず、膵IPMNの胆道系における対照疾患であることを強く示唆し、さらに、IPNBのCD133発現の欠損は、IPNBと従来の胆管癌を区別する時に有用なマーカーとしてなり得るものとみなされた。

本研究は胆道系腫瘍における癌幹細胞マーカーCD133の発現について、粘液形質の比較とともに予後を含めた臨床病理学的意義を解析したものであるが、従来ほとんど検討されなかった胆管内乳頭状腫瘍がCD133を発現せず、通常の胆管癌とは異なった生物学的態度を示すことを明らかにした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ものと認める。