



Cell cycle kinetic analysis of colorectal neoplasms using a new automated immunohistochemistry-based cell cycle detection method

Tomono, Ayako

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6384号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006384>

※ 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。



はじめに

学位論文の内容要旨

Cell cycle kinetic analysis of colorectal neoplasms using a new automated immunohistochemistry-based cell cycle detection method

iCCD 法を用いた大腸腫瘍における細胞周期の検討

大腸癌は世界各国で見られる腫瘍であり、その患者には集学的治療が行われている。その術前診断およびステージ決定には病理診断が不可欠であるが、近年、技術の進歩に伴い、分子レベルでの診断も可能となりつつある。EGFR(epidermal growth factor receptor; 上皮成長因子受容体)の発現や KRAS 変異の診断などは、既に実臨床の場において広く普及している。これらの傾向を踏まえて様々な分子病理学的手法が開発されており、従来通りの病理診断とともに利用されるようになっている。

我々は過日、iCCD(immunohistochemistry-based cell cycle detection)法と呼ばれる 3 重免疫染色の手法を開発し、細胞周期の可視化に成功した¹⁾。この方法は日常よく用いられるパラフィンブロックに対して施行可能であり、またその工程は既に自動化に成功しているため、極めて簡便かつ安価、導入が容易である。本法において我々が着目したのは geminin および cdt1、gamma H2A.X の 3 種の核内蛋白質である。これらの蛋白質はそれぞれ S, G2, M 期および G1 期、アポトーシス及び変性に陥った細胞に特異的に発現している²⁻⁵⁾。前 2 者においては、その過剰発現が腫瘍の増大と予後の悪化に関与していることが、大腸癌を含む複数の腫瘍で確認されている^{4,6-8)}。

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 外科学講座 食道胃腸外科学

(指導教員： 神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 病理診断学講座 伊藤智雄 教授

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 外科学講座 食道胃腸外科学分野 掛地吉弘 教授)

友野 純子

本研究は、当院での大腸癌手術検体を用いて、iCCD 法の有用性を検討したものである。

対象と方法

対象症例は 2009 年 1 月から 2013 年 9 までの期間に、当院当科にて大腸癌に対して切除術を施行された 141 名とした。早期癌、粘液癌および扁平上皮癌は分析対象に加えなかった。また、対照群として、同切除検体から正常粘膜および腺腫を採取した。なお、全患者より本研究への参加同意を得ており、またこの研究は学内倫理委員会にて承認済みである。

切除された手術検体は、通常通り 10% ホルマリンにて固定後、切り出しを行い、Dukes および TNM 分類を用いて診断した^{9, 10}。術前治療の組織学的効果判定には modified tumor regression grade (mTRG) 法を用いた¹¹。本研究のため、腫瘍最深部を含む 4 μm の薄切切片を作成し、文献 3 に掲載の通り 3 重免疫染色を行った。なお、精度管理のため、geminin および cdt1、gamma H2A.X に対する抗体を用いて単染色を行って結果を比較したが、染色結果に矛盾はなかった(図 1)。

作成標本内からランダムに視野を選択し、視野内の各抗体に陽性となっている腫瘍細胞数を算定してその比率を求めた。これらの比率と腫瘍および患者背景、予後を比較した。統計解析は JMP® 11 を用いて行い、P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した。

結果

患者背景

詳細は表 1、2 にまとめたが、以下に概要を示す。141 例の内訳は、結腸癌 105 例、直腸癌 36 例であった。そのうち、術前治療施行例は 12 例(結腸癌 4 例、直腸癌 8 例)、未施行例は 129 例(結腸癌 101 例、直腸癌 28 例)である。術前治療施行例のうち、直腸癌 6 例は化学放射線療法、その他の 2 例および結腸癌 4 例に対しては化学療法のみが施行された。

iCCD 法を用いた染色結果

本法においては、geminin 陽性細胞核が青色、cdt1 陽性細胞核が赤色、gamma H2A.X 陽性細胞核が茶色を示す(図 2)。正常大腸粘膜及び腺腫、癌のそれぞれの染色パターンを分析したところ、正常粘膜において geminin 陽性細胞は腺管の底部を中心に存在し、上部には cdt1 陽性細胞が分布していた。gamma H2A.X 陽性細胞はほとんど観察されなかった。腺腫では geminin 陽性細胞が増加して cdt1 陽性細胞は減少しており、また、軽度の分布の乱れが認められた(図 3A)。癌標本においてはこの傾向がさらに強くなっている、gamma H2A.X 陽性細胞は癌部でのみ観察された(図 3B、3C)。統計学的には、cdt1 陽性細胞が結腸腺腫と比較して結腸癌では有意に減少している(P = 0.048、図 4)。

結腸癌症例において、染色結果と患者背景を比較したところ、静脈侵襲が高度になるにつれて、geminin 陽性細胞の比率が有意に上昇し、cdt1 陽性細胞の比率が低下していた。それぞれの P 値を表 1 に示す。また、gamma H2A.X 陽性細胞比の上昇は、無再発期間の

短縮と相関する傾向にあった(図 5)。

直腸癌症例においても同様の検討を行った。染色結果と患者背景を比較したところ、腫瘍深達度が増悪するにつれて、geminin 陽性細胞の比率が有意に上昇していた。gamma H2A.X 陽性細胞は高分化腺癌において、中分化腺癌より優位に増加していた。それぞれの P 値を表 2 に示す。また、結腸癌と同様に gamma H2A.X 陽性細胞比の上昇は、無再発期間の短縮と相関する傾向にあった(図 5)。

術前治療施行例(図 3D, 表 3)と未施行例を比較すると、結腸癌、直腸癌とも術前治療施行群において geminin 陽性細胞比率が低下し、gamma H2A.X 陽性細胞比が上昇していた。それぞれの P 値を表 4 に示す。術前化学療法施行群及び術前化学放射線療法施行群の間に有意差は見られなかった。効果判定結果に関しては、術前治療の効果が高いほど cdt1 陽性細胞が増加しており、gamma H2A.X 陽性細胞が減少していた。

考察

本研究で用いた iCCD 法は簡便に施行可能な多重免疫染色法であり、得られる情報は多い。本法で利用した geminin および cdt1、gamma H2A.X の各陽性細胞の定性および定量を同時にを行うことができ、また細胞周期の乱れを可視化することによって、腫瘍と非腫瘍の鑑別がより直感的に、容易に行えるようになる。また、同一腫瘍内での性質の差異を提示することが可能である。

今回我々は、iCCD 法の染色結果と患者背景因子を比較し、いくつかの興味深い所見を見出した。結腸癌における静脈侵襲と geminin 陽性細胞比の間の正の相関や直腸癌における腫瘍深達度と geminin 陽性細胞比の間の負の相関などである。前述のとおり geminin は腫瘍増殖のマーカーであるため、前者については論理的に矛盾するものではないが、後者はやや疑問が残る。これらの所見は、腫瘍の時系列的な性質変化を示唆するものかもしれないが、直腸癌検体は染色に対する反応性が悪く、十分数が検討できていないため、さらに検討を重ねる過程でこの所見は変化する可能性がある。また、両腫瘍における無再発生存期間と gamma H2A.X 陽性細胞比率の間の負の相関も認められた。一般に増殖能の高い腫瘍は壊死を伴うことが知られており、妥当な結果であると思われる。

術前治療施行例に対しては、現在いくつかの評価方法が存在するが^{11, 12)}、多分に主観的なものであり、変性やアポトーシスに陥った細胞や viable な細胞を正確に診断することは困難である。本法はそれらの細胞を示すことができるため、より客観的な評価が可能にな

ると考えられる。

本研究の問題点は症例数、特に直腸癌および術前治療施行例の少なさである。前述のように、直腸癌検体の染色性は結腸癌に比較して不良であった。また、過去3年間以前の検体も同様に染色性が不良であり、これが症例数の集積および予後解析の妨げとなつた。この問題は観察期間の延長とより染色能の高い抗体の開発によって解決可能であると考える。

結論

今回我々は大腸癌症例において、iCCD法を用いて細胞周期の検討を行つた。本法は大腸癌患者における腫瘍特性の把握や予後予測に役立ち、また術前治療の組織学的効果判定の精度を改善する可能性がある。

文献

- Yanagita E, Kamoshida S, Imagawa N, et al. Immunohistochemistry-based Cell Cycle Detection (iCCD): A Novel System to Visualize Cell Kinetics on Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissues. *Am J Surg Pathol* 2012; 36:769-73.
- Hofmann JF, Beach D. cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *EMBO J* 1994; 13:425-34.
- Nishitani H, Taraviras S, Lygerou Z, et al. The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase. *J Biol Chem* 2001; 276:44905-11.
- Xouri G, Lygerou Z, Nishitani H, et al. Cdt1 and geminin are down-regulated upon cell cycle exit and are over-expressed in cancer-derived cell lines. *Eur J Biochem* 2004; 271:3368-78.
- Lu C, Zhu F, Cho YY, et al. Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell* 2006; 23:121-32.
- Petropoulou C, Kotantaki P, Karamitros D, et al. Cdt1 and Geminin in cancer: markers or triggers of malignant transformation? *Front Biosci* 2008; 1:4485-94.
- Bravou V, Nishitani H, Song SY, et al. Expression of the licensing factors, Cdt1 and

Geminin, in human colon cancer. *Int J Oncol* 2005; 27:1511-8.

8. Nishihara K, Shomori K, Tamura T, et al. Immunohistochemical expression of geminin in colorectal cancer: Implication of prognostic significance. *Oncol Rep* 2009; 21:1189-95.
9. Gembenjäger E. The classification system of Dukes and its modification for rectal and colonic cancers. *Helv Chir Acta* 1981; 48:265-72.
10. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Tumours of the colon and rectum. In: Bosman FTF, Hruban RH, Theise NDCarneiro, editors. WHO classification of tumours of the Digestive System 4th edition. Lyon: the International Agency for Research on Cancer; 2010. P.131-182.
11. Chang HH, Leeper WR, Chan G, et al. Infarct-like necrosis: a distinct form of necrosis seen in colorectal carcinoma liver metastases treated with perioperative chemotherapy. *Am J Surg Pathol* 2012; 36:570-6.
12. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours:Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45: 228-247.

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2499 号	氏名	友野 純子
論文題目 Title of Dissertation	<p>Cell cycle kinetic analysis of colorectal neoplasms using a new automated immunohistochemistry-based cell cycle detection method</p> <p>iCCD 法を用いた大腸腫瘍における細胞周期の検討</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>林 洋一</p>		
	<p>具 莫木</p> <p>横山 元</p>		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

本研究は、大腸癌手術検体を用いて、iCCD 法の有用性を検討したものである。本法は geminin および cdt1、gamma H2A.X の 3 種の核内蛋白質に着目した 3 重免疫染色の手法で、これらの蛋白質はそれぞれ S, G2, M 期および G1 期、アポトーシス及び変性に陥った細胞に特異的に発現している。

対象症例は 2009 年 1 月から 2013 年 9 月までの期間に、当院当科にて大腸癌に対して切除術を施行された 141 名である。早期癌、粘液癌および扁平上皮癌は分析対象に加えなかった。また、対照群として、同切除検体から正常粘膜および腺腫が採取されている。

切除された手術検体は、通常通り 10% ホルマリンにて固定後、切り出しを行い、Dukes および TNM 分類を用いて診断された。術前治療の組織学的効果判定には modified tumor regression grade (mTRG) 法を用いた。

作成標本内からランダムに視野を選択し、視野内の各抗体に陽性となっている腫瘍細胞数を算定してその比率を求めた。これらの比率と腫瘍および患者背景、予後を比較した。P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した。

対象とした全 141 例の内訳は、結腸癌 105 例、直腸癌 36 例であった。そのうち、術前治療施行例は 12 例（結腸癌 4 例、直腸癌 8 例）、未施行例は 129 例（結腸癌 101 例、直腸癌 28 例）である。術前治療施行例のうち、直腸癌 6 例は化学放射線療法、その他の 2 例および結腸癌 4 例に対しては化学療法のみが施行された。

正常大腸粘膜及び腺腫、癌のそれぞれの染色パターンを分析したところ、正常粘膜において geminin 陽性細胞は腺管の底部を中心に存在し、上部には cdt1 陽性細胞が分布していた。gamma H2A.X 陽性細胞はほとんど観察されなかった。腺腫では geminin 陽性細胞が増加して cdt1 陽性細胞は減少しており、また、軽度の分布の乱れが認められた。癌標本においてはこの傾向がさらに強くなっている。gamma H2A.X 陽性細胞は癌部でのみ観察された。結腸癌では結腸腺腫と比較して cdt1 陽性細胞が有意に減少していた。

結腸癌症例において、染色結果と患者背景を比較したところ、静脈侵襲が高度になるにつれて、geminin 陽性細胞の比率が有意に上昇し、cdt1 陽性細胞の比率が低下していた。また、gamma H2A.X 陽性細胞比の上昇は、無再発期間の短縮と相關する傾向にあった。

直腸癌症例においても同様の検討が行われた。染色結果と患者背景を比較したところ、腫瘍深達度が増悪するにつれて、geminin 陽性細胞の比率が有意に上昇していた。gamma H2A.X 陽性細胞は高分化腺癌において、中分化腺癌より優位に増加していた。また、結腸癌と同様に gamma H2A.X 陽性細胞比の上昇は、無再発期間の短縮と相關する傾向にあった。

術前治療施行例と未施行例を比較すると、結腸癌、直腸癌とも術前治療施行群において geminin 陽性細胞比率が低下し、gamma H2A.X 陽性細胞比が上昇していた。術前化学療法施行群及び術前化学放射線療法施行群の間に有意差は見られなかった。効果判定結果に関しては、術前治療の効果が高いほど cdt1 陽性細胞が増加しており、gamma H2A.X 陽性細胞が減少していた。

iCCD 法の染色結果と患者背景因子を比較したところ、結腸癌における静脈侵襲と geminin 陽性細胞比の間の正の相関や直腸癌における腫瘍深達度と geminin 陽性細胞比の間の負の相関などの所見が見出された。geminin は腫瘍増殖のマーカーであるため、前者については論理的に矛盾するものではないが、後者にはやや疑問が残る。これらの所見は、腫瘍の時系列的な性質変化を示唆するものかもしれないが、さらに検討を重ねる必要がある。また、両腫瘍における無再発生存期間と gamma H2A.X 陽性細胞比率の間の負の相関も認められた。一般に増殖能の高い腫瘍は壞死を伴うことが知られており、妥当な結果であると思われる。

術前治療施行例に対しては、現在いくつかの評価方法が存在するが、多分に主観的なものであり、変性やアポトーシスに陥った細胞や viable な細胞を正確に診断することは困難である。本法はそれらの細胞を示すことができるため、より客観的な評価が可能になると考えられる。

本研究の問題点は症例数、特に直腸癌および術前治療施行例の少なさである。直腸癌検体の染色性は結腸癌に比較して不良であった。また、過去 3 年間以前の検体も同様に染色性が不良であり、これが症例数の集積および予後解析の妨げとなつた。この問題は観察期間の延長とより染色能の高い抗体の開発によって解決可能であると考える。

本研究で用いた iCCD 法は geminin および cdt1、gamma H2A.X の各陽性細胞の定性および定量を同時にを行うことができ、また細胞周期の乱れを可視化することによって、腫瘍と非腫瘍の鑑別がより簡便かつ正確に行なうことが可能となつた。

以上により本研究は、大腸癌患者における腫瘍特性の把握や予後予測に役立ち、術前治療の組織学的効果判定の精度を改善する可能性があり、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士の学位を得る資格があると認める。