



Immunohistochemical Evaluation of Thymidylate Synthase in Gastric Carcinoma Using a New Polyclonal Antibody : The Clinical Role of Thymidylate Synthase as a Prognostic Indicator...

国安, 哲矢

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-12-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2377

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002377>

※ 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。



氏名・（本籍）	くに やす てつ や 国 安 哲 矢	（岡山県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1716号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成11年12月8日	
学位論文題目	Immunohistochemical Evaluation of Thymidylate Synthase in Gastric Carcinoma Using a New Polyclonal Antibody The Clinical Role of Thymidylate Synthase as a Prognostic Indicator and Its Therapeutic Usefulness （新開発されたポリクローナル抗体を用いた胃癌におけるチミジル酸合成酵素発現の免疫組織科学的定性評価 チミジル酸合成酵素発現評価の予後因子としての臨床的な役割とその治療上の有用性について）	
審査委員	主査 教授 黒 田 嘉 和 教授 杉 村 和 朗	教授 前 田 盛

論文内容の要旨

はじめに

フルオロウラシルは5-フルオロデオキシウリジン5'-リン酸（FdUMP）に変換され腫瘍組織内でチミジル酸合成酵素（TS）を阻害することにより作用する標準的な抗癌剤である。このTSの働きはデオキシウリジン-リン酸（dUMP）をデオキシチミジン-リン酸（dTTP）にメチル化する触媒の役割であり、これは腫瘍内でのDNA合成に最も重要な過程と言える。多くの研究者達は腫瘍内においてTS阻害が結果としてDNA合成阻害となるという臨床的な重要性を解明し、これらの観点に基づきTSを阻害する種々の薬剤が開発され癌化学療法使用の可能性が示されてきた。しかしTSの存在は悪性腫瘍の化学療法の標的酵素としてだけでなく、癌細胞活性や5-FUへの抵抗性を示すことから、予後因子としても臨床的に重要である。Polymerase chain reaction（PCR）法を用いた癌腫内のTS測定は胃癌や結腸癌における予後やフッ化ピリミジン系薬剤での癌化学療法の反応性を推測する最も重要な独立した予測因子である事が近年多く報告されている。また直腸癌ではTS発現をモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色法による生存率との関連性を報告している。しかしながら、胃癌におけるTS発現の免疫組織化学的評価は我々が調べる限り殆ど報告されていない。そこで我々は胃癌におけるTS発現と予後や生存率に関連する臨床病理学的所見との関連性を新開発されたTSのポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的所見から検討した。

対象と方法

対象患者：神戸大学第一外科で外科的治療が施された134症例の胃癌患者を対象とした。男女比は89：45で、平均年齢は63.2才であった。全ての患者は術前加療はされていなかった。手術直後に肉眼的に進行癌と判定されたものではマイトマイシン C20mg を静注し、経口摂取が始まってから5-FU（200mg/body/日）もしくはテガフルウラシル（600mg/body/日）を投与するか、マイトマイシンCを投与せず5-FUもしくはテガフルウラシルを内服投与した。本研究ではこれらの術後癌化学療法を3カ月間以上継続投与された症例を化学療法群（n=82）、それ以外を非化学療法群（n=42）とした。

免疫組織化学的評価：各症例の切除胃癌標本は4%緩衝ホルマリンで固定しパラフィン包埋した。抗原活性の低下を来さないように固定時間は48時間以内とした。まず4 μ m 切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色とエラスチカワンギーソン染色を行い病理学的組織所見を観察した。11項目の臨床病理学的所見（年齢、性差、腫瘍径、組織型、深達度、リンパ管侵襲、血管侵襲、リンパ節転移、腹膜転移、肝転移、病期分類）が胃癌取扱規約に準じて記載された。組織型に関しては、高分化型及び中分化型線癌を分化型、低分化型及び印環細胞癌、粘液癌を未分化型と分類した。

TS の免疫組織化学的染色：TS の腫瘍内発現はヒト TS に対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色法により検索された。この抗体は大鵬薬品第2がん研究所福島氏らによる供与を受けたもので、既に細胞内 TS に対し特異的に反応することがウエスタンブロット法や免疫組織化学的染色法により証明されている。免疫組織化学的染色法の手順は以下の通りである。胃癌の腫瘍中心部切片に平行な4 μ m パラフィン切片を用いた。切片は脱パラフィン処理の後内因性ペルオキシターゼ活性の除去処理を行った。洗浄の後、マイクロウェーブ抗原賦活処理を5分間2回反復施行した。約20分間風冷した後 Dulbecco のリン酸緩衝溶液 (PBS) で洗浄し、10%正常ウシ血清で非特異的抗体を抑制した。その後、前述のヒト TS に対するポリクローナル抗体（希釈濃度1000倍）を用いて36℃のインキュベーター内で1時間反応させた。PBS で洗浄しビオチン化抗ウサギ+ネズミ第2抗体でインキュベートさせた後、ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン反応させた。免疫組織化学的反応としてジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB) を用いて7分間発色させ、ヘマトキシリン染色の後封入した。

染色の評価：TS 発現は一視野腫瘍細胞数中の染色細胞数が25%以下の症例を TS 低発現群、25%以上の症例を TS 高発現群と区分した。陽性コントロールとしては FdUrd 感作 DLD-1 発癌マウスの腫瘍切片を、陰性コントロールとしては上記免疫組織化学的染色法の過程において一時抗体処理を省いたものを作成した。

統計処理：データは Student-t テスト、カイ二乗検定、フィッシャー直接確立計算法を用いて検定した。生存率解析はカプラン-マイヤー法に準じ生存曲線を作成しウィルコクソン法で検定した。多変量解析に関してはコックス比例ハザードモデル解析し、P 値を5%以下で有意差有りとした。

結果

TS の免疫組織化学的発現：正常組織内では TS は胃粘膜の増殖帯や、粘膜関連リンパ濾泡 (MALT) の胚中心、杯細胞の一部で同定された。癌細胞においては granular cytoplasmic pattern と称する染色パターンを示した。原発腫瘍内で TS は不均一な分布を示し、また原発巣と転移巣とで染色状況に違いは認めなかった。

TS 発現と臨床病理学的所見との関連性：TS 高発現群は56症例、TS 低発現群は78症例であった。TS 発現は深達度、腹膜転移、病期分類と有意な関連を有した（表1）。つまりより進行した症例や、腹膜転移陽性例、進行した病期にある症例は TS 高発現群に多かったと言える（ $P<0.05$ ）。

単変量解析：TS 低発現群の生存曲線は明らかに TS 高発現群より良好な結果を示した（ $P<0.05$ ）。TS 低発現群における5年生存率は65.2%であるが、TS 高発現群では43.2%であった（図3）。術後補助化学療法の予後に対する影響は図4に示す。術後補助化学療法を施行した TS 低発現群と TS 高発現群では有意に生存率に差が生じた。（化学療法施行が必要であった）TS 低発現群における5年生存率は60.4%であるが、TS 高発現群では33.1%であった。つまり、TS 高発現群に属する進行胃癌症例では化学療法を施行しても予後は不良であった。これに対し、化学療法が不要であった症例では TS 低発現群及び高発現群共に、5年生存率は71.1%であった。加えて TS 低発現群においては、化学療

法の有無に関わらず生存率は統計上有意差は認めなかった。

多変量解析：11項目の臨床病理学的因子（腫瘍径，組織型，深達度，リンパ管侵襲，血管侵襲，リンパ節転移，腹膜転移，肝転移，病期分類，根治度，TS 染色性）を用い，胃癌患者の予後に影響を与える因子をコックス比例ハザードモデルで解析した。その結果4つの因子（腹膜転移，リンパ管侵襲，肝転移，TS 染色性）が独立した予後に寄与する因子であることが判明した（ $P<0.05$ ：表2）。TS 低発現群の高発現群に対するハザード比は0.464だった。

考察

TS は分子量36kD のサブユニットの二重体で，酵素活性は細胞周期の G1 後期から S 期早期に上昇し，dTMP 合成過程における最終段階で触媒酵素の役割を担う。5-FU の活性型代謝産物である FdUMP と還元型葉酸は，複合体を形成して TS を特異的に阻害する。この TS 阻害は細胞内での dUMP を阻害し，DNA 合成の前段階である *de novo* チミジル酸合成経路を抑制する。そのため TS の抑制は癌化学療法の標的と考えられた。加えて TS binding assay の研究では，癌患者の予後と 5-FU の感受性は腫瘍内の総 TS 発現量に有意に相関していると報告されている。PCR を用いた TS の定量法においても胃癌において TS mRNA レベルが 5-FU の感受性と予後を規定できると報告されている。しかしこれらの方法は技術的に簡便では無い。これに対し TS の免疫組織化学的評価はパラフィン切片が使用でき，臨床上実用的と言える。本法施行の際には抗原活性の低下を避けるべきで，固定時間は48時間以内で行いその結果染色程度も良好となった。胃癌細胞内 TS は Granular cytoplasmic pattern を呈した。この染色パターンは他のポリクローナル抗体を用いた研究でも報告されている。

単変量解析にては胃癌腫内 TS 高発現群は予後が悪い事が示され，これは胃癌において TS の評価が腫瘍の進展や疾患の予後を推測する指標の一つとなる事を示唆している。ほぼ同様の考察は散見されるが，我々の重要視したいのはいかに簡便に施行され，なおかつ指標とされ得るかである。

本研究では術後補助化学療法は進行癌において施行される傾向にあった。結果としては進行癌症例でも TS 低発現群の場合，経口抗癌剤投与でも化学療法未施行群と同様の予後まで改善させることができた。それに反して TS 高発現群は同療法にても予後の改善には寄与しなかった。

多変量解析にては TS 発現の免疫組織化学的評価は腹膜転移，リンパ管侵襲，肝転移などの臨床病理学的所見と同様の独立した予後因子であると解析された。リンパ管侵襲はリンパ節転移の有無に関わらず癌細胞の侵襲度を示す重要な因子であると解釈された。その一方，リンパ節転移や病期分類は積極的なリンパ節廓清を行った結果として予後には影響は与えなかった。

我々は新開発された TS のポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的評価は胃癌患者の予後や生存を的確に評価する上で臨床上非常に有用であると確信した。更には TS の評価はフッ化ピリミジン系薬剤を用いた癌化学療法の反応性を示す指標と成り得る点から治療的にも有用であることを示唆した。今後 TS 高発現群に対するより積極的な癌化学療法の効果を検討することが必要と思われた。

論文審査の結果の要旨

（はじめに）フルオロウラシルは5-フルオロデオキシウリジン5'-リン酸（FdUMP）に変換され腫瘍組織内でチミジル酸合成酵素（TS）を阻害することにより作用する抗癌剤である。腫瘍内において，TS 阻害が結果として DNA 合成阻害となる点に基づき TS を阻害する種々の薬剤が開発され癌化学療法使用の可能性が示されてきた。しかし TS の存在は悪性腫瘍の化学療法の標的酵素としてだけでなく，癌細胞活性や 5-FU への抵抗性を示すことから，予後因子としても臨床的に重要である。

胃癌における TS 発現と予後や臨床病理学的所見との関連性を新開発された TS のポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的所見から検討した。

（対象と方法）134切除胃癌症例を対象とし、手術直後に肉眼的に進行癌と判定されたものでは、経口摂取が始まってから 5-FU（200mg/body/日）もしくはテガフルウラシル（600mg/body/日）を内服投与した。術後癌化学療法を 3 カ月間以上継続投与された症例を化学療法群（n=82）、それ以外を非化学療法群（n=42）とした。切除胃癌標本よりパラフィン包埋切片を作成し、臨床病理学的所見を胃癌取扱規約に準じて記載した。TS の腫瘍内発現はヒト TS に対するポリクローナル抗体を用いたマイクロウェーブ処理下免疫組織化学染色法により検索した。TS 発現は一視野腫瘍細胞数中の染色細胞数が 25% 以下の症例を TS 低発現群、25% 以上の症例を TS 高発現群と区分し、臨床病理学的所見や生存率、癌化学療法との関連を検討した。

（結果）正常組織内では TS は胃粘膜の増殖帯や、粘膜関連リンパ濾泡（MALT）の胚中心、杯細胞の一部で同定された。癌細胞においては granular cytoplasmic pattern と称する染色パターンを示した。原発腫瘍内で TS は不均一な分布を示し、また原発巣と転移巣とで染色状況に違いは認めなかった。TS 高発現群は深達度、腹膜転移、病期分類と有意な関連を有した。また TS 低発現群における 5 年生存率は 65.2% であるが、TS 高発現群では 43.2% と有意に不良であった。癌化学療法の予後に対する影響に関する検討では、化学療法施行中 TS 低発現群における 5 年生存率は 60.4% であるが、TS 高発現群では 33.1% と不良であった。これに対し、化学療法が不要であった症例では TS 低発現群及び高発現群共に、5 年生存率は 71.1% であった。胃癌患者の予後に影響を与える因子を多変量解析した結果、腹膜転移、リンパ管侵襲、肝転移、TS 染色性が独立した予後因子であることが判明した。

（考察）胃癌における TSmRNA レベル定量法は 5-FU の感受性と予後を規定できると報告されているが技術的に簡便では無い。これに対し本法はパラフィン切片が使用でき、臨床上実用的である。本法施行の際には抗原活性の低下を避けるべきで、固定時間は 48 時間以内で行いその結果染色程度も良好となった。単変量解析では胃癌腫内 TS 高発現群は予後が悪い事が示され、これは胃癌において TS の評価が腫瘍の進展や疾患の予後を推測する指標の一つとなる事を示唆している。また進行癌症例でも TS 低発現群の場合、経口抗癌剤投与でも化学療法未施行群と同様の予後まで改善させることができた。TS 高発現群は同療法にても予後の改善には寄与せず、より集学的な術後補助療法が必要である事が示唆された。多変量解析では TS 発現の免疫組織化学的評価は腹膜転移、リンパ管侵襲、肝転移などの臨床病理学的所見と同様の独立した予後因子であると示された。

（まとめ）以上より、新開発された TS のポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的評価は胃癌患者の予後や癌化学療法の反応性を推測する上で臨床上非常に有用であると示唆された。本研究は、胃癌においてこれまでなされなかった TS 定性的評価の意義を研究したものであるが、新開発された TS 抗体の至適染色条件を定義付けるとともに、その定性的評価の予後因子としての位置付けや癌化学療法の反応性を推察するに簡便かつ有用な検査法であることを明らかにしたのもとして価値ある業績であると認める。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。