



Variation in MT exprssion in early-stage depressed-type and polypoid-type colorectal tumours

黒田, 浩平

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-02-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2663

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002663>

※ 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。



【 1 5 3 】

氏 名 ・ (本 籍) 黒 田 浩 平 (兵 庫 県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1861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15年2月12日

【 学位論文題目 】

Variation in MT expression in early-stage depressed-type
and polypoid-type colorectal tumours
(早期大腸腫瘍におけるMT蛋白発現の多様性)

審 査 委 員

主 査 教 授 春 日 雅 人

教 授 前 田 盛

教 授 黒 田 嘉 和

緒言

Metallothionein (MT) は 6-7 kD の低分子量蛋白であり、亜鉛や銅等の二価の金属イオンと結合する能力を有する。免疫組織学的検討では、ヒトや実験動物の種々の臓器の細胞の核や細胞質に MT 蛋白発現が確認されている。この蛋白はカドミウム等の金属イオンの解毒作用や、放射線やアルキル化剤からの細胞保護、さらには腫瘍の発育進展に重要な役割を果たす亜鉛のホメオスタシスに関与するとされている。

MT は免疫組織学的に種々の癌で認められていることから、MT は癌化において何らかの役割を果たしている可能性が示唆されている。大腸癌では MT 蛋白発現減少が進行度、リンパ節転移、予後と関連するという報告があるが、詳細については不明である。

一方、大腸腫瘍の癌化過程は、多段階遺伝子変化を経て腺腫から癌が生じるとされている (adenoma-carcinoma sequence)。しかしながら、近年報告が増加している陥凹型大腸腫瘍は 'adenoma-carcinoma sequence' と異なる癌化経路をたどると考えられており、腫瘍径が小さな段階ですでに粘膜下浸潤している場合が多いことから 'de novo carcinoma' と呼称される。

今回我々は大腸の癌化過程において、MT 蛋白発現減少は腫瘍の発育進展と相関性があることを再確認するとともに、癌化過程のどの段階で MT

蛋白減少が生じるのかを検討した。また MT 蛋白発現減少パターンの違いを通じて、早期大腸癌の肉眼型別相違、つまり隆起型と陥凹型の生物学的相違を明らかにすることを試みた。同時に proliferating cell nuclear antigen labelling index (PCNA-LI) を用いて細胞増殖活性の側面より検討を加えた。

対象と方法

神戸大学医学部附属病院で内視鏡的および外科的切除された大腸粘膜内腫瘍性病変 87 病変、浸潤癌 (TNM 分類上 T1 および T2 に相当) 128 病変を対象とした。

切除標本をホルマリン固定後、4 μ m の薄切切片を作製、DAKO 社 Envision System を用いることにより免疫組織学的検討を行った。一次抗体として、抗 MT 抗体 E9 と抗 PCNA 抗体 PC10 (いずれも DAKO 社) を用いた。

免疫組織学的評価として、MT については病変内の陽性細胞率が 5%未満を陰性、5%以上を陽性と定義した。また PCNA に関しては 200 倍の視野で無作為に 5 視野を選択し、腫瘍細胞 1,000 個中の PCNA 染色陽性細胞の平均百分率を PCNA-LI と定義した。

結果

1. MT 蛋白発現における大腸腫瘍と腫瘍近接正常粘膜の比較

腫瘍近接正常粘膜は全例 MT 蛋白陽性であるのに対し、粘膜内腫瘍性病変では67% (58/87 病変), 浸潤癌では49% (63/128病変)であり、腫瘍の発育進展に伴い MT 蛋白発現は有意に減少した (正常粘膜 vs 粘膜内腫瘍性病変, 粘膜内腫瘍性病変 vs 浸潤癌; $p<0.01$, 粘膜内腫瘍性病変 vs 浸潤癌; $p<0.05$).

2. 浸潤癌における臨床病理学的事項とMT蛋白発現, PCNA-LIとの相関性

MT 蛋白発現減少は深達度, 脈管侵襲 (各 $p<0.01$) と有意に相関した. PCNA-LI は深達度, 脈管侵襲, リンパ節転移 (各 $p<0.01$), 分化度 ($p<0.05$)と有意に相関した.

3. 肉眼型別 (隆起型と陥凹型) にみた浸潤癌の MT 蛋白発現と PCNA-LI

隆起型と陥凹型の両者間に平均腫瘍径, 深達度, 分化度, 脈管侵襲, リンパ節転移に関しては有意差はなかった. MT 蛋白発現陽性率は, 陥凹型

26% (12/46病変) で, 隆起型 (32/52病変; 62%) に比して有意に低率であった ($p<0.01$). また PCNA-LI は陥凹型 $41.9 \pm 7.5\%$ で, 隆起型 ($38.6 \pm 7.1\%$) に比して有意に高率であった ($p<0.05$).

4. 肉眼形態と MT 蛋白陽性細胞の分布パターン

我々は, MT 蛋白発現陽性群を染色分布の相違により散在性の分布を示す focally positive pattern (陽性細胞が 5-50%)と均一な分布を示す diffusely positive pattern (陽性細胞が 50%以上)の二通りに分類できることを見出した. MT 蛋白陽性隆起型浸潤癌 32 病変中, 9 病変 (28%) が diffusely, 23 病変 (72%) が focally positive pattern あったのに対し, MT 蛋白陽性陥凹型浸潤癌 12 病変は全て diffusely positive pattern であり, 隆起型と陥凹型の MT 染色の分布パターンは有意に異なっていた ($p<0.01$).

5. 大腸腫瘍における MT 蛋白発現と PCNA-LI の相関性

MT 蛋白陽性 121 病変, MT 蛋白陰性 94 病変の平均 PCNA-LI はそれぞれ $35.2 \pm 8.0\%$, $37.2 \pm 9.1\%$ であった. MT 蛋白発現と PCNA-LI の間には有意な相関性を認めなかった. さらに粘膜内腫瘍性病変と浸潤癌をわけ

た検討でも同様の結果であった。

考察

今回の我々の検討では、大腸正常粘膜の全てにおいて MT 蛋白発現が認められ、腫瘍の発育進展につれて MT 蛋白発現は有意に減少することを示した。また浸潤癌において、MT 蛋白発現減少は深達度や脈管侵襲と有意な相関性を認めたが、分化度やリンパ節転移とは相関性がなかった。この結果より、MT 蛋白発現減少は大腸腫瘍癌化過程において早期の段階で生じ、局所的な浸潤に関与している可能性が示唆された。それゆえ、大腸腫瘍に関する MT 蛋白発現の検討を行う際には癌化過程の早期の段階、つまり腺腫や早期癌で検討することが重要と考えられた。

近年、表面型および陥凹型大腸腫瘍に関して日本のみならず、欧米でも報告が増加している。我々も以前より、陥凹型病変は隆起型病変とは潜在的な生物学的悪性度の違いを理由に、厳密に鑑別すべきであると報告してきた。

我々の知見の範囲では、陥凹型大腸癌における MT 蛋白発現に関する報告は今回が初めてである。MT 蛋白発現陽性率において陥凹型は隆起型に比して有意に低率であり、また PCNA-LI において陥凹型は隆起型に比して有意に高率であった。このことより、MT 蛋白発現や PCNA-LI は両者の生物学的な相違を示す可能性が示唆された。また MT 蛋白発現が局所

浸潤や予後と相関性があることを考えると、MT 蛋白発現低下が陥凹型早期大腸癌の悪性度の指標となっている可能性が示唆された。

一般的に、隆起型大腸腫瘍は多段階遺伝子変化モデルに基づいた adenoma-carcinoma sequence を通じて腺腫を経て発育進展するものとされている。大腸腫瘍病変内に認められる heterogeneity はこの多段階遺伝子変化による可能性がある。一方、陥凹型病変は腺腫の段階を介さないような別の過程を通じて発育するものと考えられている。

今回の検討では、MT 蛋白発現陽性の定義を 5% に設定したが、さらにその染色の分布パターンに着目することにより、MT 蛋白陽性細胞の割合と染色の分布パターンに相関性が存在すること、さらにはその染色の分布パターンと肉眼形態の間には有意な相関性が存在することを示した。つまり、MT 蛋白陽性浸潤癌において、陥凹型における diffusely positive pattern を認める割合は隆起型のそれに比して有意に高率であった。これに関して、我々はつぎのように推察する。隆起型において、MT 蛋白減少は多段階癌化過程を通じて病変内に散在性に生じる。その結果、MT 蛋白の分布は focal pattern が高率となり、このことは病変内の heterogeneity を反映している可能性がある。一方陥凹型においては、'de novo' な癌化を通じて MT 蛋白発現減少が腫瘍内で同時に生じることにより、染色分布が均一となる割合が高率になると考えられる。このように MT 蛋白染色の分布パターンは肉眼形態ごとの遺伝子学的特徴をも反映している可能性が示唆された。

結論

今回の検討では大腸腫瘍における MT 蛋白発現減少は癌化過程の早期の段階で生じる可能性, また局所浸潤に関与している可能性が示唆された。さらに, MT 蛋白発現は陥凹型, 隆起型大腸癌の両者間の生物学的相違を反映している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1863号	氏 名	黒田 浩平
論文題目	Variation in MT expression in early-stage depressed-type and polypoid-type colorectal tumours. 早期大腸腫瘍におけるMT蛋白発現の多様性		
審査委員	主 査 春日 雅人 副 査 黒田 盛 副 査 黒田 嘉和		
審査終了日	平成 15 年 1 月 29 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

<p>Metallothionein (MT) は 6-7kD の低分子量蛋白であり、二価の金属イオンと結合する能力を有し、カドミウム等の金属イオンの解毒作用や、放射線やアルキル化剤からの細胞保護、さらには腫瘍の発育伸展に重要な役割を果たす亜鉛のホメオスターシスに関与するとされている。この蛋白は様々な癌種で確認されているが、その生物学的役割については不明な点が多い。本研究では大腸腫瘍における MT の臨床病理学的意義の明瞭化を目的として、内視鏡的および外科的切除された正常粘膜附随大腸腫瘍性病変計 215 病変 (粘膜内病変 87 病変, TNM 分類上 T1 および T2 に相当する浸潤癌 128 病変) を対象とし、切除標本のホルマリン固定後パラフィンブロック薄切切片を用いて免疫組織学的に MT 蛋白発現について検討した。MT 蛋白発現の免疫組織学的評価としては、病変内の陽性細胞率が 5%未満を陰性、5%以上を陽性と定義した。</p> <p>大腸腫瘍と腫瘍近接正常粘膜の比較では、正常粘膜では全例 MT 蛋白陽性であるのに対し、粘膜内腫瘍では 67% (58/87 病変)、浸潤癌では 49% (63/128 病変) であり、腫瘍の発育伸展に伴い MT 蛋白発現率は有意に減少した (正常粘膜 versus 粘膜内腫瘍性病変, 正常粘膜 versus 浸潤癌; $p<0.01$, 粘膜内腫瘍性病変 versus 浸潤癌; $p<0.05$)。この結果より MT 蛋白発現減少は大腸腫瘍癌化過程において早期の段階で生じる可能性が示唆された。</p> <p>浸潤癌では、MT 蛋白発現減少は深達度 (T1 60% versus T2 33%; $p<0.01$)、脈管侵襲 (陽性 35% versus 陰性 61%; $p<0.01$)、肉眼形態 (隆起型 62% versus 陥凹型 26%; $p<0.01$) と相関性を認めた。この結果より MT 蛋白発現減少が局所浸潤に関与している可能性と陥凹型癌が隆起型癌に比して悪性度が高い可能性が示唆された。</p> <p>一般的に、隆起型大腸腫瘍は多段階遺伝子変化モデルに基づいた adenoma-carcinoma sequence を通じて腺腫を経て発育するものとされており、病変内に認められる heterogeneity はこの多段階遺伝子変化による可能性がある。一方、陥凹型腫瘍は腺腫の段階を介さないような 'de novo' な癌化過程をたどると考えられている。本研究では、MT 蛋白発現陽性群を染色分布の相違により、散在性の分布を示す focally positive pattern (陽性細胞が 5-50%) と均一な分布を示す diffusely positive pattern (陽性細胞が 50%以上) の二通りに分類できることを見出した。さらに肉眼形態別にみると MT 蛋白陽性隆起型浸潤癌 32 病変中、9 病変 (28%) が diffusely, 23 病変 (72%) が focally positive pattern であったのに対し、MT 蛋白陽性陥凹型浸潤癌 12 病変は全て diffusely positive pattern であり、隆起型と陥凹型の MT 染色の分布パターンは有意に異</p>

<p>なっていた ($p<0.01$)。この結果からは、隆起型においては多段階癌化過程を通じて MT 蛋白発現減少は病変内に散在性に生じるため MT 蛋白発現の分布は focal pattern が高率となり、このことは病変内の heterogeneity を反映している可能性があるのに対し、陥凹型においては 'de novo' な癌化を通じて MT 蛋白発現減少が腫瘍内で同時に生じることにより、染色分布が均一となる割合が高率になると推察された。</p> <p>陥凹型大腸癌における MT 蛋白発現に関する報告は本研究が初めてであり、MT 蛋白染色の陽性率や分布パターンにより、陥凹型癌が隆起型癌とは遺伝子学的背景が異なる腫瘍群である可能性を示唆した重要な知見を得たものとして価値の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。</p>
