

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462056

研究課題名(和文) 膵癌におけるBudding cancer cellの新たな生物学的評価法の確立

研究課題名(英文) Assessment of proliferation and apoptotic rate of tumor budding cells in pancreatic ductal adenocarcinoma.

研究代表者

滝沢 一泰 (Takizawa, Kazuyasu)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30706437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌における簇出の評価において、HE染色よりAE1/AE3免疫染色での評価の方が簇出検出個数が有意に増加した( $7.8 \pm 0.5$  vs  $15.3 \pm 1.0$ ,  $P < 0.001$ )。また、AE1/AE3およびKi-67の2重染色では、高簇出Ki-67陽性群は有意に予後不良であった( $P < 0.001$ )。簇出の形質発現について、Ki-67発現およびTUNEL法によるアポトーシス検出を確認すると、Ki-67陽性症例は73%でTUNEL陽性症例はわずか7%であり、簇出でのアポトーシスは減少していた。簇出は大部分がE-Cadherin陽性、ビメンチン陰性で、本研究においては簇出での上皮間質転換は示されなかった。

研究成果の概要(英文)：Tumor budding is a prognostic factor in PDAC. Budding cancer cells in AE1/AE3 immunostaining were counted significantly more than in HE staining ( $P < 0.001$ ). High grade budding evaluated with both standard HE and AE1/AE3 staining correlated significantly with poor overall survival and the histological grade. Multivariate analysis revealed that the margin status, lymph node metastasis, the high grade budding with proliferative potency assessed by AE1/AE3 and Ki-67 double immunostaining were independent prognostic factors. The cumulative 2-year survival rates were 63.6% for patients with negative immunostaining of tumor budding for Ki-67, 46.9% for patients with positive of low grade budding and 0% for patients with positive of high grade budding ( $P < 0.001$ ). The average percentage of cases showing Ki-67 positivity was 73% and the average percentage of cases showing TUNEL positivity was only 7%, suggesting decreased apoptosis at the budding cancer cells at invasive front of the tumor.

研究分野：消化器外科

キーワード：簇出 増殖能 アポトーシス 膵癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がんの転移や浸潤に関わる機序を解明することは、その治療方法に有益な情報をもたらす。近年、浸潤癌腫瘍進展部における Budding cancer cell (BUD) が腫瘍浸潤や転移に重要な役割を担っていると考えられ、その臨床的意義が注目されてきている。BUD の評価法は癌腫や研究者間で統一されていないものの、腫瘍の周囲臓器進展やリンパ管侵襲を来たすことが報告されている。

(2) 膵癌は5年生存率が20%にも満たない予後不良な消化器癌として認識されているが、その組織学的形態は浸潤性発育であり腫瘍先進部には他の癌腫に比べ極めて BUD が多い。実際に我々は、2012年に膵癌における BUD を高 BUD 群と低 BUD 群とに分け生存解析を行い、高 BUD 群は極めて予後不良であることを確認した。さらに、高 BUD 群において Ki-67 免疫組織化学を用いて細胞増殖活性が陽性であるほど再発率が高いことも確認した。

我々の解析結果からは膵癌では BUD の数だけでなく、増殖活性を含む、他の要因で再発率が増加していると考えられる。

(3) BUD は予後不良因子とされているが、BUD の数だけに注目が置かれ、その形態や細胞形質、増殖動態は未解明である。BUD は癌腺管の細胞間接着を逸脱し単個から数個の細胞塊として組織遊走能を獲得した状態であり、いわゆる上皮間質転換(EMT)に類似した状態で、その細胞表面マーカーは腺上皮に発現しているカドヘリンファミリーが消失し、ピメンチンなどの間葉系マーカーが発現しているとされる。このように孤立し細胞塊として組織遊走能を獲得することで、微小リンパ管や周囲組織への浸潤が可能となる。また、一方で癌腺管は宿主免疫による炎症細胞浸潤により腺管構造が破壊されて孤立し細胞死へと誘導されているため、炎症が強い組織では見かけ上 BUD が多く測定されてしまう。過去の我々の研究結果から、細胞増殖能をもちアポトーシスとは区別される BUD(真の BUD)が腫瘍の周囲臓器進展やリンパ管侵襲をきたすことが推測される。

今まで鑑別が困難であった本来の組織遊走能を獲得した BUD(真の BUD)とアポトーシスへと誘導される細胞とを区別するために、我々は細胞増殖活性に着目した。蛍光二重染色抗体法を用いて細胞増殖活性測定及び TUNEL 法を行うことで、真の BUD が初めて選別できるようになり、BUD という現象を正確に評価できる。

参考文献：

1) E. Karamitopoulou et al, Eur J Cancer. 2013 Jul; 49(10):2458-9

2) Yohei Masugi et al. Human pathology (2010) 41, 1061-1068

(4) 我々は細胞増殖能とアポトーシスに着目し、「BUD は、細胞増殖能をもち周囲への浸潤を来たす細胞と、TUNEL 法で証明されるアポトーシスへ誘導される細胞とに区別され、前者が腫瘍進展、転移に強く関与しており、それが予後不良の原因である」という仮説をたて、本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

癌組織腫瘍先進部でしばしばみられる細胞間接着能を失って孤立した癌細胞塊 Budding cancer cell (BUD) の示す分子細胞学的特徴に着目し、「BUD は、細胞増殖能をもち周囲への浸潤を来たす細胞と、TUNEL 法で証明されるアポトーシスへ誘導される細胞とに区別され、前者が腫瘍進展、転移に強く関与しており、それが予後不良の原因である」という仮説をたて、本研究を企画した。

特に膵癌は生命予後が不良であり、その腫瘍組織像では BUD が多くみられる。研究目的は、膵癌腫瘍先進部での BUD 形質発現から腫瘍組織進展、転移に至る機序を解明することである。

## 3. 研究の方法

「膵癌腫瘍先進部での BUD 形質発現から腫瘍組織進展、転移に至る機序を解明すること」であり、研究期間内に以下の諸点を解明する。

(1) BUD の臨床病理学的意義：膵癌切除標本に対し、HE 染色および AE1/AE3 免疫染色を行い簇出の評価方法を確立する。また、簇出を臨床病理学的因子と比較検討し、高簇出群のカットオフ値を決定する。高簇出群は術後の転移・再発により術後成績は不良であるという仮説を立て、簇出の予後予測因子としての臨床的意義を解明する。

(2) 二重免疫組織染色による BUD 細胞での細胞増殖動態：二重免疫組織染色にて膵癌腫瘍先進部の BUD 一個一個おける AE1/AE3 免疫染色および Ki-67 発現を検討する。簇出頻度と Ki-67 陽性細胞との関連、および生存解析を行う。

(3) BUD 細胞で形質発現の検討：免疫組織染色にて膵癌腫瘍先進部の BUD 一個一個おける Ki-67 発現および TUNEL 法によるアポトーシス検出を確認し、アポトーシスとは区別される BUD を同定し、その細胞増殖活性を評価する。

(4) BUD 細胞表面マーカーの検出：膵癌腫瘍先進部の BUD における細胞表面マーカーを検索し、カドヘリンスーパーファミリーの欠失及びピメンチン発現を確認して、BUD において上皮間質転換が起こっているかどうかを解明する。

## 4. 研究成果

(1) 1990年から2010年にリンパ節郭清を伴う膵切除術が施行された浸潤性膵管癌 81 例を対象とした。症例の平均年齢は 65.6 歳 (38 - 74 歳)、性別は男性 54 例、女性 27 例であった。腫瘍は WHO 分類および日本膵臓学会膵癌取り扱い規約第 6 版にて分類し、UICC-TNM 分類にて組織分化度 (TNM grade) を評価した。腫瘍の最大断面を代表切片とし 3  $\mu$ m の連続切片を作製して、それぞれ HE 染色、抗サイトケラチン染色 AE1/AE3 (DAKO, Glostrup, Denmark) を行った (図 1 A、B)。簇出を癌発育先進部の間質に認められる 5 個未満の細胞からなる癌巣と定義した。癌発育先進部における 20 $\times$ 10 倍 1 視野 (視野面積 = 0.950mm<sup>2</sup>) での簇出数を算出した。

HE 染色を用いて評価した簇出検出個数の平均  $\pm$  標準誤差は 7.8  $\pm$  0.5 であった。一方、AE1/AE3 免疫染色を用いて評価した簇出検出個数の平均  $\pm$  標準誤差は 15.3  $\pm$  1.0 であり、AE1/AE3 免疫染色を用いて評価した方が有意に簇出検出個数は増加した ( $P < 0.001$ , 図 1 C)。HE 染色を用いて評価した簇出検出個数の範囲は 1-29 個 (中央値 6 個) であり、AE1/AE3 免疫染色を用いて評価した簇出検出個数の範囲は 2-44 個 (中央値 13 個) であった。Cox 比例ハザードモデルによるカイ二乗値を基準として各染色別の簇出カットオフ値を求めると、HE 染色での簇出検出個数は 13 個、AE1/AE3 免疫染色での簇出検出個数は 15 個であった。

AE1/AE3 免疫染色を用いて評価した高簇出群は TNM 分類 G3 (低分化型) と有意に関連していた ( $P < 0.001$ )。腫瘍径やリンパ節転移、顕微鏡的癌遺残など、他の臨床病理学的因子との統計学的な関連は認めなかった。

膵癌切除 81 例での累積 2 年生存率は 38.8% で、累積 5 年生存率は 22.6%、生存期間中央値は 19.7 か月であった。単変量解析では男性、TNM 分類 G3 (低分化型)、顕微鏡的癌遺残陽性、HE 染色での高簇出群および AE1/AE3 免疫染色での高簇出群が有意な予後不良因子であった。多変量解析では、TNM 分類 G3 (ハザード比 2.062,  $P = 0.011$ )、顕微鏡的癌遺残 (ハザード比 2.603,  $P = 0.001$ ) および HE 染色での高簇出 (ハザード比 5.213,  $P < 0.001$ ) が独立した有意な予後不良因子であった (図 1 D、E)。

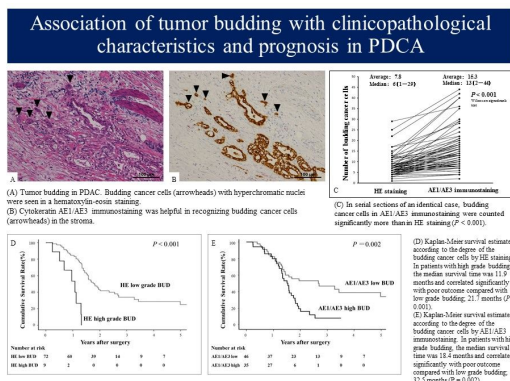


図 1 浸潤性膵管癌における簇出と臨床病理学的因子および予後との関連

(2) 簇出の検出のための抗サイトケラチン (AE1/AE3) および細胞増殖活性を検出するための Ki-67 (MIB-1) による 2 重免疫染色を行った (図 2 A)。簇出を高簇出群 (簇出数 15 個以上) と低簇出群 (簇出数 15 個未満) に分け 2 群間で生存解析を行うと、高簇出群は有意に予後不良であった ( $2 = 9.236$ ,  $P = 0.002$ )。また、腫瘍先進部における Ki-67 labeling index (LI) は中央値 15.5% (IQR 6.4 - 26.2%) であり、腫瘍先進部の Ki-67 LI は予後予測因子とはならなかった。しかし、簇出癌細胞の Ki-67 LI は中央値 5.9% (IQR 0-11.1%) と低値であるものの、Ki-67 陰性群、低簇出 Ki-67 陽性群、高簇出 Ki-67 陽性群の 3 群で比較すると生存期間中央値はそれぞれ 31.2 か月、17.6 か月、16.6 か月、2 年生存率はそれぞれ 63.6%、46.9%、0% であり、高簇出 Ki-67 陽性群は有意に予後不良であった ( $P < 0.001$ , 図 2 B)。

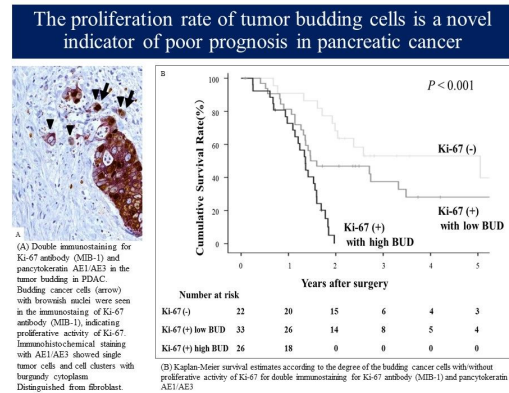
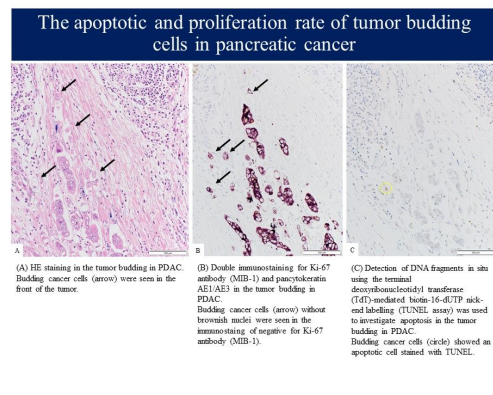


図 2 浸潤性膵管癌での簇出およびその細胞増殖活性と予後との関連

(3) 免疫組織染色にて膵癌腫瘍先進部の BUD 一個一個における Ki-67 発現および TUNEL 法によるアポトーシス検出を確認した (図 3)。対象症例の 42 例において TUNEL 法にて陽性と判断された BUD 症例は 3 例のみであり、BUD の大部分はアポトーシスを起こしていないと判断した。



(4) 対象症例の 56 例においてそれぞれの連続薄切切片に対し、E-Cadherin およびピメンチン染色を行った。全 56 症例中 1 例のみがピメンチン弱陽性であり、他はピメンチン陰性であった。その 1 例を除いた 55 例の BUD は E-adherin 陽性であった。

EMT としてのカドヘリンスーパーファミリーの欠失及びピメンチン発現は見られず、これらの EMT マーカーでは明らかな統計学的有意性を見いだせないと判断し、全症例の免疫染色は途中修了した。

BUD において上皮間質転換が起こっているかどうかは、E-Cadherin およびピメンチン発現の検討では判定できなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

滝沢一泰, 小林隆, 坂田純, 三浦宏平, 石川博補, 堅田朋大, 廣瀬雄己, 安藤拓也, 油座築, 若井俊文、膵癌腫瘍先進部における簇出およびその細胞増殖活性は独立した予後不良因子である、第 72 回日本消化器外科学会総会 (石川県金沢市) 2017.7.20

Kazuyasu Takizawa, Masahiro Minagawa, Kohei Miura, Masayuki Nagahashi, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Toshifumi Wakai.  
Association of tumor budding with clinicopathological characteristics and prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma: Impact of Ki-67 expression on budding cancer cells. International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists Continuing Medical Education: Advanced Post-Graduate Course in Tokyo 2015. (Tokyo) 2015.6.14

Takizawa K, Minagawa, M, Miura K, Nagahashi M, Sakata J, Kobayashi T, Wakai T.  
Association of tumor budding with clinicopathological characteristics and prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. The 5th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association. (Singapore) 2015.3.18-21

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

滝沢 一泰 (TAKIZAWA, Kazuyasu)  
新潟大学・医歯学総合病院・助教  
研究者番号：30706437

##### (2) 研究分担者

若井 俊文 (WAKAI, Toshifumi)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：50372470

皆川 昌広 (MINAGAWA, Masahiro)  
新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員  
研究者番号：10464009

高野 可赴 (TAKANO, Kabuto)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：30606306

小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号：40464010

亀山 仁史 (KAMEYAMA, Hitoshi)  
新潟大学・医歯学系・講師  
研究者番号：40626420

小杉 伸一 (KOSUGI, Shin-ichi)  
新潟大学・医歯学総合病院・特任教授  
研究者番号：90401736

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：