

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月25日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791299

研究課題名（和文） 胆嚢癌における浸潤様式：脱分化のメカニズムと予後との関係

研究課題名（英文） The morphological invasion forms of the gallbladder cancer: dedifferentiation, budding and correlation of the prognosis

研究代表者

甲斐 敬太（ KAI KEITA ）

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：60516540

研究成果の概要（和文）：本研究は今までに注目されていなかった胆嚢癌の浸潤形式に着目し、浸潤に伴う脱分化や腫瘍の簇出といった形態変化と臨床病理学因子を解析した。その結果、脱分化や簇出は、深達度が T2(漿膜下層まで)の胆嚢癌においてのみ、その悪性度を反映することがあきらかとなった。また、胆嚢癌切除例の約 1/4 に肉眼的な胆嚢腺筋症の合併がみられ、そのような症例は全例が進行癌で発見されており、予後不良であった点を併せて報告する。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the morphological invasion forms of the gallbladder cancer which has been poorly investigated and revealed that dedifferentiation and budding were significantly correlated with survival in only patients with T2 tumor. This study also focused on the status of adenomyomatosis in surgically resected gallbladder cancer specimens and revealed that approximately a quarter of the cases grossly accompanied adenomyomatosis. In addition, all of the adenomyomatosis-accompanied gallbladder cancer was found in advanced stage and showed significantly worse survival than the cases of gallbladder cancer without adenomyomatosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：(1) 胆嚢癌 (2) budding (3) Tumor infiltrating lymphocyte (4) 脱分化 (5) 炎症細胞 (6) 浸潤 (7) 腫瘍-間質相互作用 (8) 胆嚢腺筋症

1. 研究開始当初の背景

胆嚢癌は T 因子(浸潤の深さ)によって予後が大きく異なるが、形態的な浸潤形式についての研究は殆どなされていない。大腸癌では、癌の浸潤先進部で癌細胞が孤在性、散在性に

浸潤していく様式を簇出(budding; BD)という用語で表現し、BD が予後やリンパ節転移と強く相関することが報告されている。また、大腸癌において癌組織に浸潤する CD8 陽性の細胞傷害性 T リンパ球(tumor infiltrating

cytotoxic T lymphocytes; TIL)も予後と強く関連し、TILはBDを抑制するが、DNAのマイクロサテライト領域不安定性(microsatellite instability; MSI)は異常ペプチドの産生によりTILを誘導することが知られている。しかしながら、胆嚢癌ではBDに関する報告はなく、MSIやTILに関する報告も極僅かに散見するのみであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まず胆嚢癌におけるBDや脱分化(dedifferentiation; DD)といった浸潤形式の状況およびその臨床病理学的な意義をあきらかにすることである。次にTILおよびMSIの解析を行い、その状況と臨床病理学的意義をあきらかにし、TILやMSIが浸潤形式にどのような影響を与えるのかを検討する。さらに、研究の過程で有意な病理所見や臨床的特徴を見いだした場合は、その追及も行う。

3. 研究の方法

(1)胆嚢癌におけるDDとBD

胆嚢癌外科切除例90例のうち、筋層以深の浸潤を有する80例を対象とした。BDはサイトケラチンの免疫染色を併用して判定し、対物20倍視野の腫瘍細胞5個以下からなるクラスターが5個以上のものを陽性とした。脱分化は、腫瘍の分化度を表層と浸潤部で別個に判定し、表層の分化度より浸潤部の分化度が低いものを陽性とした。BDとDDについて臨床病理学的因子およびdisease specific survival (DSS)との関係を統計学的に解析した。

(2)胆嚢癌におけるTIL

胆嚢癌外科切除例で筋層以深の浸潤を有する80例のうち、免疫染色に利用可能な組織が保存されていた77例を対象とした。CD8の免疫染色を行い、倍率100倍で腫瘍表層と浸潤部の写真を撮影し、腫瘍に浸潤しているCD8陽性リンパ球の計数をTILとした。TILは腫瘍の表層と浸潤部で別個に解析を行った。平均TIL数が10個以上の群(TIL-H)と10個未満の群(TIL-L)に2分し、両者で比較検討を行った。

(3)胆嚢癌におけるMSI

胆嚢癌と背景の正常胆嚢のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックよりそれぞれ10 μ m厚の切片を薄切。レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて、癌組織、非腫瘍胆嚢上皮を分離し、それぞれDNAを抽出した。抽出したDNAをMSIマーカー(BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250)の蛍光ラベルプライマーを用い

てPCRを行い、その産物をシークエンサーで解析した。MSIの判定は、Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancerに基づき、5つのマーカーのうち1つのマーカーのみが陽性の場合、MSI-L、2つ以上のマーカーが陽性の場合をMSI-Hとし、MSI-Hの症例を有意と解釈した。

(4)胆嚢癌と胆嚢腺筋症の関係

本研究を遂行するにあたり、胆嚢癌切除例中に腺筋症を合併する例が意外と多いことに気づき、この点について臨床病理学的に解析した。外科切除された胆嚢癌97例を対象とし、標本の肉眼像より胆嚢腺筋症合併の有無を判定した。組織学的にRokitansky-Aschoff sinusesを認めても、肉眼所見を伴わないものは腺筋症非合併群とした。胆嚢腺筋症は肉眼的にdiffuse, fundal, segmentalの3型に分類し、腺筋症の有無と胆嚢癌の臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析した。

(5)胆嚢癌における炎症細胞浸潤数とE-cadherinの発現

本研究により胆嚢癌の浸潤部では高率にBD、DDが起こっている事実があきらかとなった。胆嚢癌の浸潤部では、高度の炎症を伴っていることが多いため、癌浸潤部の炎症細胞浸潤が脱分化に関与しているのではないかという仮説を抱き、脱分化と炎症細胞浸潤についての追及を行った。

胆嚢癌50例の浸潤部のTissue microarrayを作成。脱分化の指標として最も有名な細胞接着因子であるE-cadherinの発現の定量値を求め、炎症細胞は白血球全体、Bリンパ球、Tリンパ球、CD8、CD4陽性Tリンパ球、好中球、マクロファージをそれぞれラベリングする抗体:LCA、CD20、CD3、CD8、CD4、MPO、CD68を用いて免疫染色を行い、評価することとした。E-cadherinの発現は画像解析ソフトTissue Studio (Definiens, München, Germany)を用いて定量化し、浸潤炎症細胞も同ソフトを用いてその個数をカウントし、E-cadherin発現との関連を解析した。

4. 研究成果

(1)胆嚢癌におけるDDとBD

80例中、47例(58.8%)にBDを認め、33例(41.2%)にDDを認めた。BDに関してはT因子(P=0.0003)、N因子(P<0.0001)と強い相関がみられ、DDはN因子(P<0.0001)、M因子(P=0.0005)と強い相関がみられた。BD、DDはいずれもDSSと強い相関(P<0.0001, P=0.0013)を示したが、TMN因子を加えた多変量解析では独立した予後不良因子とはな

らなかった。深達度(T-Stage)毎にサブグループ解析を行ったところ、興味深いことに T2 症例(n=32) のみが BD、DD とともに DSS との強い相関を示した(図 1)。リンパ節転移のリスクと BD、DD との関連についても解析を行ったが、これも T2 症例で関連が強く、特に BD より DD がリンパ節転移とよく相関した(P= 0.0209)。T2 症例において BD、DD いずれも陰性の例と少なくとも一方が陽性の例のリンパ節転移の Odds 比は 13.0 (95% 信頼区間 1.39-121.38, P= 0.0059)であった。

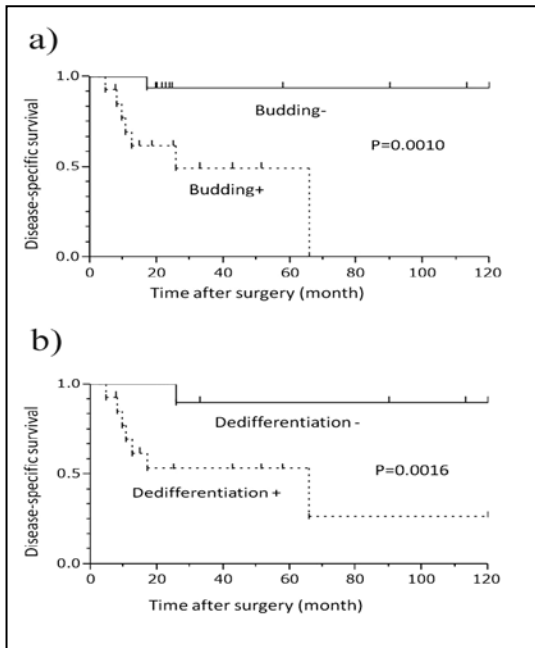


図 1; T2 症例における BD(a)および DD(b)と DSS との関係

(2) 胆嚢癌における TIL

77 例の胆嚢癌切除例において、表層の TIL-H と TIL-L はそれぞれ 61 例と 16 例、浸潤部の TIL-H と TIL-L は 57 例と 20 例という結果であった。それぞれ、BD と DD との関連を解析したが、有意な相関はみられなかった。DSS との関係も解析したが、表層でも、浸潤部でも TIL と予後の相関はみられなかった。特に予後がよい Stage IA と、特に予後が悪い Stage IV を除外して解析すると、浸潤部の TIL-H 群は TIL-L 群に比して予後がよい傾向にあったが、統計学的な有意差は得られなかった(P= 0.17, log-rank test)。

(3) 胆嚢癌における MSI

PCR が可能な DNA を抽出できる組織が保存されていた症例は 50 例程であり、うち 20 症例の解析を行ったが、7 例の MSI-L は認められたものの、MSL-H の症例が 1 例もなかった。全症例を解析しても MSL-H の症例数が統計解析に耐えうるものではないと想定される点、想定に反して TIL が BD、DD、予後と

それほど相関しないことがあきらかになり、TIL の誘導因子としての MSI の解析の意義がなくなった点、解析費用がかさむ点から MSI の解析は中断することとした。

(4) 胆嚢癌と胆嚢腺筋症の関係

97 例の胆嚢癌手術例のうち 25 例(25.8%) に肉眼的に胆嚢腺筋症の合併がみられ、うち 16 例が segmental type で 9 例が fundal type であった。diffuse type は 1 例もなかった。胆嚢腺筋症を合併した症例は全例が T2 以上の進行した状態で手術されており、それを反映して腺筋症の有無は T 因子(P=0.0004)、N 因子 (P<0.0001)、M 因子(P=0.008)の全てにおいて強く相関し、有意に予後不良であった(図 2)。また、腺筋症に発生した癌は、低分化のものが多く、segmental type の底部側に発生することが多いといった知見も得ることができた。

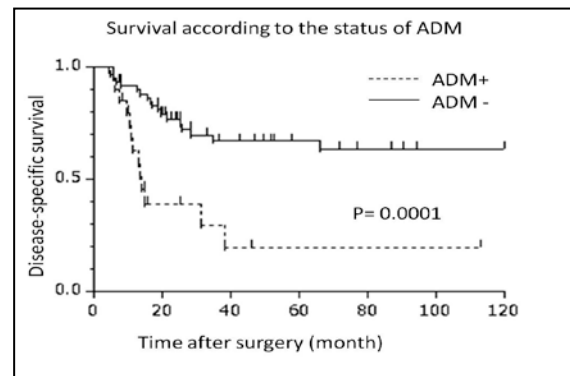


図 2; 腺筋症陽性例(ADM+)と陰性(ADM-)例における DSS の関係

(5) 胆嚢癌における炎症細胞浸潤と E-cadherin 発現

胆嚢癌の浸潤部において、腫瘍細胞の E-cadherin 発現と最も有意な逆相関を示したのは、CD8 陽性リンパ球の浸潤(Spearman の相関係数 $\rho = -0.2961$, P= 0.0006)であった。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究により BD と DD は T2 胆嚢癌の予後因子となることがあきらかとなった。胆嚢癌は T1 では極端に予後が良く、T3, T4 では極端に予後が悪い。一方、T2 胆嚢癌は予後が良い症例と悪い症例が混在しており、臨床的にも T2 胆嚢癌の治療戦略についてしばしば議論される。今回の解析結果は T2 胆嚢癌の治療戦略に影響を与えるものであり、胆石症などで摘出された胆嚢に偶然 T2 胆嚢癌が見つかった場合などに、追加治療が必要かどうかの判断材料となる。また DD はリンパ節転移の予測因子ともなることから、術中迅速病理診断で、追加のリンパ節郭清が必要かどうかの判断材料とすることもできる。胆嚢癌

の BD と DD について論文報告したのは、国内外を通して本研究が初報である。

胆嚢腺筋腫症は頻度の高い胆嚢の良性疾患で、症状がなければ通常経過観察される。今回、胆嚢癌として切除された症例の約 1/4 に腺筋症がみられ、その全例が進行例で発見され、さらに有意に予後不良であった点は見過ごすことのできない結果であり、胆嚢腺筋症のクリニカルマネージメントに一石を投じるものである。さらなる研究により胆嚢癌と腺筋症の関連が確証されれば、胆嚢腺筋腫症を予防的に切除することにより胆嚢癌の罹患率、死亡率を大幅に減らすことができる可能性がある。胆嚢癌の外科切除例と腺筋症について論文報告したのは、国内外を通して本研究が初報である。

(7) 今後の展望

BD、DD に関しては CD8 陽性細胞障害性リンパ球浸潤と E-cadherin 発現の関係を *in vitro* の研究も交えて追及していきたい。胆嚢癌の脱分化の分子機序が解明されれば、治療への応用も可能となるので、E-cadherin と CD8 陽性リンパ球浸潤のみだけではなく、多方面からの追及を試みたい。

胆嚢腺筋症については、「なぜ腺筋症では胆嚢癌が早期に発見できないのか」を明確にする必要があると考えている。具体的には、腺筋症合併胆嚢癌と非腺筋症合併胆嚢癌で、CT や MRI といった画像による腫瘍の描出像の違いや、腫瘍の発見契機、胆嚢腺筋症のクリニカルフォローアップの状況について詳細に解析する必要があると考えている。

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 2 件)

① Kai K, Kohya N, Kitahara K, Masuda M, Miyoshi A, Ide T, Tokunaga O, Miyazaki K, Noshiro H. Tumor budding and dedifferentiation in gallbladder carcinoma: potential for the prognostic factors in T2 lesions. *Virchows Archiv*. 2011; 459(4): 449-56.

② Kai K, Ide T, Masuda M, Kitahara K, Miyoshi A, Miyazaki K, Noshiro H, Tokunaga O. Clinicopathologic features of advanced gallbladder cancer associated with adenomyomatosis. *Virchows Archiv* 2011; 459(6): 573-80.

[学会発表] (計 8 件)

① 甲斐 敬太、増田 正憲、徳永 藏. 胆嚢癌における E-cadherin の発現と炎症細胞浸潤

との関係. 第 101 回日本病理学会総会. 2012.4.28. 東京.

② 甲斐 敬太、井手 貴雄、増田 正憲、北原 賢二、三好 篤、宮崎 耕治、能城 浩和、徳永 藏. Adenomyomatosis 合併胆嚢では胆嚢癌の早期診断は困難である. 第 22 回日本消化器癌発生学会総会. 2011.11.25. 佐賀.

③ 甲斐 敬太、増田 正憲、徳永 藏. Adenomyomatosis 合併胆嚢癌の臨床病理学的特徴. 第 100 回日本病理学会総会. 2011.4.30. 横浜

④ 甲斐 敬太、神谷尚彦、徳永 藏、三好 篤、北原 賢二、増田 正憲、宮崎 耕治、能城 浩和. 胆嚢癌の浸潤形式と T2 胆嚢癌の組織学的予後規定因子について第 21 回日本消化器癌発生学会総会. 2010.11.18. 軽井沢

⑤ 甲斐 敬太、徳永 藏. 胆嚢癌における腫瘍胞巣のクラスター化 (Budding) と深達度および予後との関係. 第 99 回日本病理学会総会. 2010.4.28. 東京

⑥ 甲斐 敬太、神谷 尚彦、徳永 藏、北原 賢二、三好 篤、能城 浩和、宮崎 耕治. 胆嚢癌の浸潤形式と Tumor infiltrating lymphocyte(TIL)の検討. 第 20 回日本消化器癌発生学会総会. 2009.11.26. 広島

⑦ 甲斐 敬太、徳永 藏. 胆嚢癌における Tumor infiltrating lymphocyte(TIL)の検討. 第 98 回日本病理学会総会. 2009.5.3. 京都

⑧ 甲斐 敬太、神谷 尚彦、北原 賢二、大塚 隆生、三好 篤、中房 祐司、宮崎 耕治. 胆嚢癌における Tumor budding と脱分化の検討. 第 109 回 日本外科学会定期学術集会. 2009.4.2. 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 敬太 (KAI KEITA)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号: 60516540

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし