

## 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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591214

研究課題名（和文） 乳房外パジェット病におけるハイリスク群の抽出の試み

研究課題名（英文） Attempt the extraction of high-risk group in extramammary Paget's disease

研究代表者

青柳 哲 (AOYAGI SATORU)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：40374277

研究成果の概要（和文）：

今回我々は、ムチンコア蛋白サブタイプの本腫瘍における検討の可能性に着目し、乳房外パジェット病における生物学的悪性度の指標となり得る免疫組織学的マーカーの確立を目指した。乳房外パジェット病症例の標本からムチンコア蛋白サブタイプの発現量を比較するために、38 症例の 44 病変に関して未染プレパラートを作成し、各標本において MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 の免疫染色を施行し、発現の強度と臨床情報との相関に関して検討を行った。MUC5AC は腫瘍が進展するにしたがってその発現頻度および強度が高くなることを有意差を持って確認することができた。

研究成果の概要（英文）：

The present study aims to identify a reliable marker for predicting the risk of invasion and metastasis in EMPD.

To confirm MUC protein expressions, we analyzed 44 specimens from 38 primary EMPD cases by immunohistochemical staining. Labeling rates of tumor cells were scored by staining intensity on a four-tiered scale (- to 3+) to investigate the correlation between the expression score of these molecular markers and the type of EMPD lesion. Invasive lesions and metastatic lymph nodes tended to express MUC5AC significantly higher than in situ lesions ( $P < 0.01$ ). In conclusion, the degree of MUC5AC expression may correlate with the invasiveness and progression of EMPD, and may be a useful marker for identifying high-risk EMPD cases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：乳房外パジェット病 ハイリスク群の抽出

## 1. 研究開始当初の背景

乳房外パジェット病（**Extramammary Paget's disease ; EMPD**）は、高齢者の外陰部あるいは腋窩に好発する皮膚悪性腫瘍の一つで欧米に比べて本邦での発症例が多い比較的まれな腫瘍である。その多くは緩徐に進行し上皮内に留まっている状態で発見され、側方および深部に十分なマージンを確保して完全切除が得られれば生命を脅かすことのない疾患である。しかしながらその一部には局所破壊性を示し、各臓器やリンパ節に転移した後、あらゆる化学療法や放射線療法にも抵抗性で不幸な転帰をたどるものがある。

本疾患で陽性となる免疫染色のマーカーはこれまでに複数知られているが、その予後を推定するマーカーで確立されたものはまだない。

他の内蔵悪性腫瘍、例えば大腸癌、胆嚢癌、そして胃癌の領域では、ムチンコア蛋白サブタイプの発現パターンの解析を通じて生物学的悪性度や予後に関して定見が得られつつある。一例を挙げると、大腸癌では **MUC5AC** の発現の低下が転移能とあるいは生命予後と密接な関係があることが知られている。ムチンは、消化管や気道分泌液の主成分となる糖蛋白で、一定のアミノ酸配列を繰り返したものの側鎖に多数の糖鎖を付着する巨大な蛋白である。

ムチンはそれを構成するコア蛋白にいくつかのサブタイプがあることが知られており、細胞から分泌される狭義のムチンのコアとなる、**MUC2,MUC5AC,MUC5B,MUC6** や細胞表面に発現する広義のムチンのコアとなる **MUC1,MUC3A,MUC4** などが知られている。

細胞形態学的にこれらと同様の **adenocarcinoma** である乳房外パジェット病に応用できないか、と考えた。

## 2. 研究の目的

これまでに乳房外パジェット病において予後を推定する因子の検索に関する報告は数少なく、またムチンコア蛋白のサブタイプ

を用いて転移例を含む多数の症例を解析した報告もない。しかし膀胱癌や胃がん、胆嚢癌においては既に解析が進んでおり、これらの内蔵悪性腫瘍同様に形態学的に **adenocarcinoma** に分類できる乳房外パジェット病にそれを応用した点は皮膚科領域において斬新な着想と考えられ、また何らかの知見が得られる可能性が極めて高い。発病の経過、治療履歴、長期的な術後経過を把握できている乳房外パジェット病の症例を単科で多数有している。またその中には局所破壊例やリンパ節転移例を複数含んでおり、さまざまな状態の症例の検討が可能である。

ムチンコア蛋白サブタイプのうちいずれかが、浸潤癌となり局所破壊を伴った症例やリンパ節転移例、あるいは不幸な転帰をたどった症例で陽性率が高くなるという知見が得られる可能性がある。すなわち、ハイリスク群の早期抽出が可能となり各症例に必要な検査法や治療方法、患者ごとに最適な医療を確立することへつながる可能性がある。

## 3. 研究の方法

2001 年以降に当科において採取した皮膚生検あるいは手術標本を用いてムチンコア蛋白のサブタイプである

**MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6** を用いた免疫染色を利用して各症例を検討する。同一症例であっても、上皮内病変、浸潤部、リンパ節転移病変があれば、それぞれ 1 病変としてカウントする。

ムチンコア蛋白の発現の程度と、腫瘍の拡がり、進行の速度や浸潤性、あるいは転移能、そして化学療法や放射線療法への耐性などの臨床的な項目とに相関性があるかをレトロスペクティブに検討する。

## 4. 研究成果

2001 年以降 2010 年までに当科において採取した皮膚生検あるいは手術を施行した **EMPD** の標本を検討した。

## ●臨床情報のまとめ

- ・患者平均年齢；73.2歳、
- ・男女比；1.257
- ・発生部位；陰嚢18例、女性外陰部16例、腋窩3例、肛門周囲1例

全例において、造影CT、および上下部消化管内視鏡などの全身検索を行い、重複癌あるいは二次性の paget 現象でないことを確認し、また、CK7/CK20を用いた免疫染色による評価によって、皮膚原発の EMPD で有ることを確認した。

44検体中28検体が in situ、11検体が invasion、5検体が lymph node metastasis で有った。

まず、EMPDの患者において正常皮膚と病変部において、microarrayによって網羅的にDNAの発現の差異のある遺伝子を調べ、およそ50000種類を同定した。そのうち、正常皮膚に比べて病変部で2倍上の増強のあるものを200種類、一方、2分の1以下の現象を示すものを7000種類、有ることを確認した。これらの中からMUC遺伝子について注目した。

病変の主たる部分の未染プレパラートを作成し、それぞれにおいてムチンコア蛋白のサブタイプであるMUC1、MUC2、MUC5AC、MUC6を用いた免疫染色を施行した。

標本内における明るい胞体をもつ大型のPaget細胞の総数とそのうちの陽性細胞の比率を検討し、陽性細胞が5%以下を(-)、陽性細胞が5-25%を(+)、陽性細胞が26-50%を(2+)、陽性細胞が50%以上を(3+)と定めて、複数医師による鏡検により判定を行った。

MUC5AC	in situ	invasive	LN
-	16	2	1
+	2	0	0
2+	4	1	1
3+	6	8	3
total	28	11	5

MUC5ACは腫瘍が進展するにしたがってその発現頻度および強度が高くなる傾向を見出し統計学的にも有意差を持つことを確認

することができた。

これまで乳房外パジェット病の予後因子として確立された免疫組織学的マーカーはない。今回我々は、病変からの microarray による DNA の増幅の解析を行う中から、ムチンコア蛋白サブタイプの本腫瘍における検討の可能性に着目し、乳房外パジェット病における生物学的悪性度の指標となり得る免疫組織学的マーカーの確立を目指した。

他の内蔵悪性腫瘍、例えば大腸癌、胆嚢癌、そして胃癌の領域では、ムチンコア蛋白サブタイプの発現パターンの解析を通じて生物学的悪性度や予後に関して定見が得られつつある。一例を挙げると、大腸癌ではMUC5ACの発現の低下が転移能とあるいは生命予後と密接な関係があることが知られている。

本研究では、免疫染色による検討の前に、上皮内病変、浸潤部、転移の確認されたリンパ節のそれぞれにおいて、microarrayによってMUC遺伝子のDNAの増幅の有無を確認した点が特筆すべき点である。EMPDのすべての標本においてMUC1に対して陽性、MUC6に対して陰性であることが判明した。これらの結果は、乳癌の場合と同様であった。リンパ節転移の5検体中4検体においてMUC5ACは、2+またはそれ以上の強陽性であった。これらの結果からMUC5ACの発現の強度と病理学的深達度と予後不良の危険性には相関性があることが示唆された。

既報告では、病理学的に表皮内病変から真皮への浸潤を認めるとMUC5ACの発現は低下するとされていたが、これとは対照的に、我々の研究では、MUC5ACは浸潤部と転移したリンパ節で発現が増強することがわかった。既報告と対照的な結果が出たことの原因は明らかでないが、本研究は同数以上の症例を検討していることと転移したリンパ節の標本が含まれていることから、その評価には一定の信頼性があるものと思われる。

MUC5ACがEMPDの病理学的浸潤あるいは生物学的な腫瘍の進展においてどのような役割を果たしているかは以降の知見の蓄積が待たれるところである。

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1件)

- ① **MUC5AC expression correlates with invasiveness and progression of extramammary Paget's disease.**  
*Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology (In Press)*  
Hiroo Hata, Riichiro Abe, Daichi Hoshina, Erina Homma, Satoru Aoyagi and Hiroshi Shimizu  
査読有

[学会発表] (計1件)

- ① Hata Hiroo  
**MUC5AC expression correlates with invasiveness and progression of extramammary Paget's disease.**  
The 71st Annual Meeting of American Academy of Dermatology  
2013年2月28日～2013年3月5日  
Miami Beach Convention Center  
( USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青柳 哲 (AOYAGI SATORU)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：40374277

(2) 研究分担者

有田 賢 (ARITA KEN)  
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：50374434

(3) 連携研究者

なし