

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790361

研究課題名(和文) カテニンシグナル系による胃良悪性境界病変の新規病理組織診断ツールの確立

研究課題名(英文) A combination of nuclear beta-catenin and atypical scores as useful diagnostic markers for borderline malignancy of gastric tumours.

研究代表者

高橋 博之(Hiroyuki, Takahashi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60377330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年胃カメラの発達で胃癌が早期に発見される機会が増え、それとともに見た目は似ているが性格の違う良性の腺腫と悪性の高分化型腺癌の区別に悩む症例が増えた。この研究では、病理組織学的なわずかな違いに着目し、それが実際に重要であることを腫瘍の悪性度の増加に関係する因子との関連性から証明し、良悪を区別するツールを作成することを目的とした。この研究で、核の重なりや腺管の枝分かれの程度からなる新たな指標と、悪性度の増加に関係する中心的な因子の -カテニン核集積などとの関係から、腺腫と腺癌を区別するフローチャートを作成した。良悪のより正確な区別により、胃カメラの発達に即した医療の提供に貢献できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although recent advances in endoscopic technology, including submucosal dissection (ESD), contribute to significant improvement in detection and treatment for early gastric carcinomas (GCas), discrepant diagnosis between forceps biopsied and ESD sections sometimes occurs. Here, we focused on histological markers for accurate diagnosis of gastric tumours in forceps biopsied samples before ESD treatment.

In conclusion, the present study provided evidence that a combination of nuclear -catenin and atypical scores which were evaluated according to degree of nuclear pseudostratification and number of branching features which were evaluated by nuclear and structural abnormalities may be useful for differential diagnosis of borderline malignancy of gastric tumours, even in forceps biopsied samples before ESD treatment.

研究分野：消化管病理

キーワード： -カテニン 胃良悪性境界病変 病理組織診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃の腺腫と超高分化型腺癌の病理組織学的鑑別診断の問題点：

近年、胃癌の死亡率は激減しているものの、その罹患率は依然高値を示している。その原因として、①消化器内視鏡技術の進歩により、極めて微細な病変の検出も可能になった、②内視鏡的粘膜下層剥離術の普及による治療適応病変の拡大、などが挙げられる。その一方で、内視鏡的治療適応の判断や、術後の follow up 期間の決定などから、より精度の高い術前病理診断が求められるようになった。この際、しばしば遭遇する問題点として、腺腫と超高分化型腺癌などの良悪性境界病変群の鑑別がある。これまで、病理組織学的に、①腫瘍の表層面の凸凹さ、②腫瘍腺管の管腔構造の不均一さ、③深層部から表層部への分化傾向の有無、④異型腺管構成細胞の核腫大の有無、⑤異型腺管構成細胞の核の配列の乱れの有無、などの観点からその鑑別診断が試みられてきたが、どの所見を重要視するかで最終診断に影響がでることが多い。また、判定する病理医間の個人差や経験による差も生じやすい。

(2)  $\beta$ -カテニンシグナル系による胃腫瘍発生機構における機能解析：

$\beta$ -カテニンとは、通常は E-カドヘリン系接着装置に関与するが、ある種の条件下（遺伝子異常など）では転写因子として、TCF4 をはじめとする転写因子と複合体を形成して、様々な遺伝子の転写調節を行うなど、複数の機能を有するユニークな分子である。これまで我々の研究室では、 $\beta$ -カテニンシグナル伝達系が、子宮内膜癌細胞の形態形成、細胞分化、および増殖制御に関与することを報告してきた (*J Pathol* 2008, *Am J Pathol* 2009, *J Pathol* 2010)。一方、消化器癌では、主に大腸腫瘍でその機能解析が行われてきたが (*Cancer* 2008)、胃腫瘍に関しては、多くの点が手付かずのまま残されている。加えて、

$\beta$ -カテニンシグナル系を胃の腺腫と超高分化型腺癌の病理組織診断業務に応用する試みは、全く行われていない。

2. 研究の目的

近年、消化器内視鏡技術の進歩により胃の微細病変の治療が可能になった一方で、術前生検組織での良悪性境界病変群（腺腫と超高分化型腺癌）の鑑別診断に苦慮する機会が増えた。E-カドヘリン系接着因子群に属する  $\beta$ -カテニンは、ある種の条件下で転写因子として腫瘍発生や形態形成に関与する。本研究は、胃腫瘍における  $\beta$ -カテニンシグナル系の機能を、腫瘍形態の観点から分子及び細胞レベルで解明し、良悪性境界病変群の発生過程における役割を明らかにする。さらに、本シグナル系を用いた同病変群の新たな病理組織学的鑑別診断ツールの確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 症例の収集：

術前生検で、良悪性境界領域の病変と診断され、内視鏡的粘膜下層剥離術（以下、ESD）で、超高分化型腺癌と診断された症例を中心に検索する。術前に明らかな腺腫あるいは腺癌と診断され、ESD 標本で確認できた症例、および進行癌症例を対象コントロールとする。

具体的には、以下の A~C 群に分けて検討する。

A 群(生検で腺腫 Group 3、ESD でも腺腫)：50 例 (図 6)

B 群(生検で癌の断定困難な腫瘍性異型上皮 Group 4、ESD で高分化型管状腺癌)：50 例 (図 7)

C 群(生検で高分化型管状腺癌 Group 5、ESD でも高分化型管状腺癌)：50 例 (図 8)

D 群(粘膜下組織浸潤癌)：50 例

(2) 病理形態学的指標（異型スコア）の決定：

<目的>ESD 標本で、以下の項目を定量化して異型スコアを算出し、3 群間の識別に最も有効な因子を決定する。

<方法> 異型スコア=核異型因子 X 構造異型因子

核異型因子—核形、大きさ、偽重責、極性、核小体

構造異型因子—腺管走行、分岐、融合

(3)  $\beta$ -カテニンシグナル系と腫瘍形態との関連性：

<目的>核内 $\beta$ -カテニン異常集積及び $\beta$ -カテニンシグナル系関連分子と胃腫瘍形態との関連性を解明する。

<方法>収集したA, B, C, D群の胃ESD標本で、免疫組織学的に核内 $\beta$ -カテニン集積率を算出し、異型スコアとの関連性を検索する。

また、 $\beta$ -カテニンシグナル系関連分子としてTCF4, APC, E-cadherin, MUC2, MUC5AC, MUC6, CDX2, MIB1, p53, p21, p14, pAKT, GSK3 $\beta$ などの検索を行い、同様に異型スコアとの関連性を検索する。

(4)  $\beta$ -カテニンシグナル系の分子病理学的検討：

<目的> $\beta$ -カテニン及びその関連分子であるAPCの遺伝子異常を解析する。

<方法>収集したA, B, C, D群の胃ESD標本で、 $\beta$ -カテニン遺伝子エクソン3やAPC遺伝子のホットスポットとされるエクソンでの点突然変異を、PCR-direct sequence法で検索する。また、APC遺伝子プロモーターのメチレーションの有無も検索する。それらの結果と免疫組織学的検索及び異型スコア結果と比較検討することにより遺伝子レベルでの裏付けを得る。

(5) 総括：

上記の結果に基づいて、腺腫と超高分化型腺癌の病理組織学的鑑別診断への $\beta$ -カテニンシグナル系の応用を図ると同時に、胃の腺腫と超高分化型管状腺癌の病理組織鑑別診断ツールを作成する。

#### 4. 研究成果

異型スコア（異型腺管の核偽重積 x 分岐異常腺管数）（図1）は、腺腫より腺癌で有意

に高値を示した（図2）。

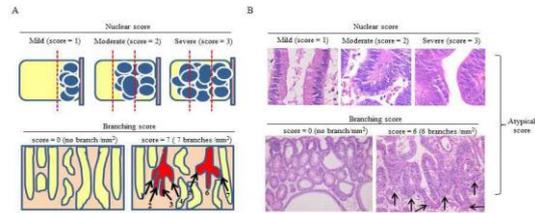


図1 異型スコアの判定法

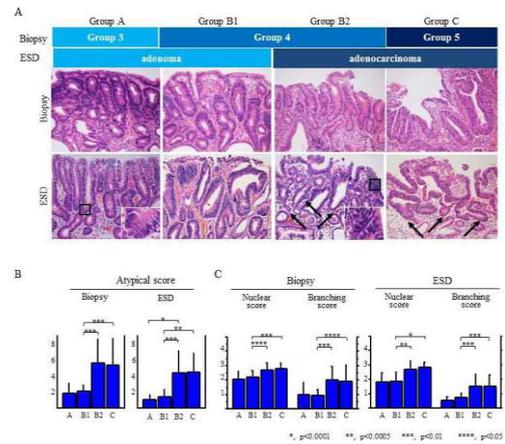


図2 異型スコアの判定結果

核内 $\beta$ -カテニン集積は、腺腫より腺癌で有意に高く、かつ、異型スコア、特に分岐異常腺管数因子と正の相関を示した（図3）。

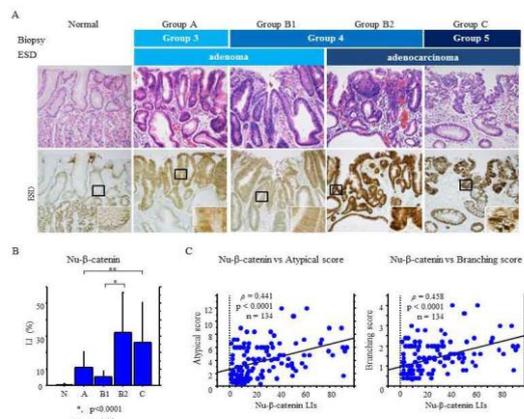


図3 核 $\beta$ -カテニン陽性と異型スコアの関係

一部の分岐異常部では、核内 $\beta$ -カテニンと共に、癌幹細胞マーカーのALDH1が発現していた（図4）。

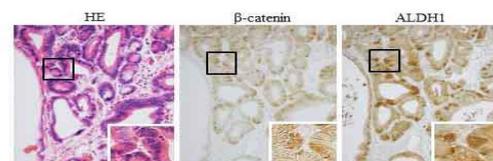


図4 核 $\beta$ -カテニン陽性とALDH1の関係

β-カテニン遺伝子異常は、2/86 例 (2.3%)  
であった (図 5)。

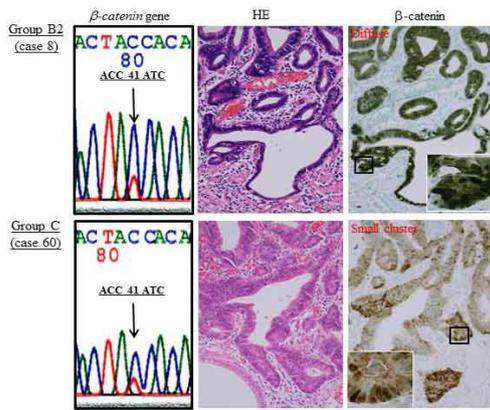


図5 β-カテニン遺伝子エクソン3のシーケンス解析  
核内β-カテニン集積と pAkt 発現は、正の相  
関を示す傾向があった (図 6)。

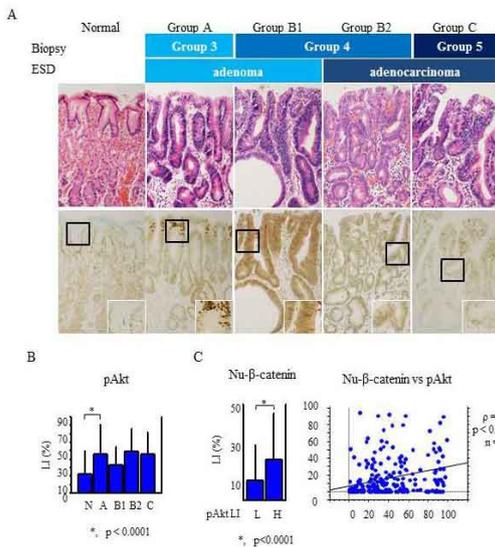


図6 核β-カテニン陽性とpAktの関係

以上より、異型スコアと核内β-カテニン集積から、胃良悪性境界病変群 (腺腫と超高分化型腺癌) の新たな病理組織学的鑑別診断ツールを確立した (図 7)。

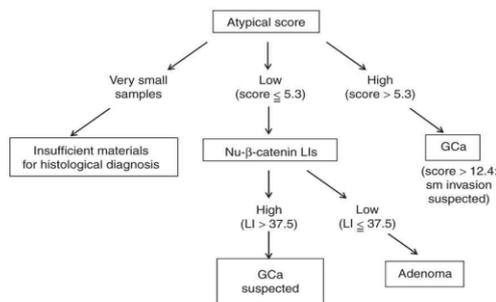


図7 鑑別診断ツール

<引用文献>

① Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Watanabe J, Kawaguchi M, Okayasu I. Transcription factor Egr1 acts as an upstream regulator of beta-catenin signalling through up-regulation of TCF4 and p300 expression during trans-differentiation of endometrial carcinoma cells. *J Pathol.* 2008; 216: 521-32.

② Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Okayasu I. Requirement of the Akt/beta-catenin pathway for uterine carcinosarcoma genesis, modulating E-cadherin expression through the transactivation of slug. *Am J Pathol.* 2009; 174: 2107-15.

③ Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T. Pin1 acts as a modulator of cell proliferation through alteration in NF-κB but not β-catenin/TCF4 signalling in a subset of endometrial carcinoma cells. *J Pathol.* 2010; 222: 410-20.

④ Kwon IK, Schoenlein PV, Delk J, Liu K, Thangaraju M, Dulin NO, Ganapathy V, Berger FG, Browning DD. Expression of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in metastatic coloncarcinoma cells blocks tumor angiogenesis. *Cancer.* 2008; 112: 1462-70.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Takahashi H, Ohkuma T, Tsuruta T, Saegusa M. A combination of nuclear β-catenin and atypical scores as useful diagnostic markers for borderline malignancy of gastric tumors.

Histopathology. 査読有、65、2014、828-838  
doi: 10.1111/his.12513.

② Takahashi H, Yoshida T, Matsumoto T, Kameda Y, Takano Y, Tazo Y, Inoue H, Saegusa M. Frequent  $\beta$ -catenin gene mutations in atypical polypoid adenomyoma of the uterus. Hum Pathol. 査読有、45、2014、33-40  
doi:10.1016/j.humpath.2013.06.020.

〔学会発表〕(計 2件)

① 高橋博之、大熊拓也、三枝 信：“ $\beta$ -カテニンによる胃良悪性境界病変の新規病理組織診断ツールの確立 第103回日本病理学会総会 (20140424). 会場名 (広島県広島市)

② 高橋博之、梶田咲美乃、鶴田智子、橋村美紀、亀田陽一、高野康雄、三枝 信：“子宮ポリープ状異型腺筋腫における $\beta$ -カテニン遺伝子異常の意義 第102回日本病理学会総会 (20130606). 会場名 (北海道札幌市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 博之 (Takahashi, Hiroyuki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60377330

### (4) 研究協力者

三枝 信 (Saegusa, Makoto)