

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893191

研究課題名(和文) 早期胃癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)適用の病理学的裏付け

研究課題名(英文) Significance of Muscularis Mucosae Invasion in Early Gastric Cancer

研究代表者

堀之内 道子(HORINOUCHI, MICHIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50336335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃粘膜内癌は、粘膜筋板への浸潤を伴わない粘膜内癌(“pT1a1-M”)と粘膜筋板への浸潤を伴う粘膜内癌(“pT1a2-MM”)とに細分しえるが、通常は胃癌取り扱い規約に準じてpT1a(M)として区別されずに評価されている。“pT1a1-M”と“pT1a2-MM”を細分化して評価したところ、“pT1a2-MM”は“pT1a1-M”と比較し、脈管侵襲の有無、リンパ節転移率、ならびにMUC1/DF3の発現がより高率に認められることが確認された。

研究成果の概要(英文)：In early gastric cancers, there is no discrimination between (1) the case with intramucosal proliferation showing no muscularis mucosae invasion (abbreviated as “pT1a1-M”) and (2) the case with intramucosal proliferation showing muscularis mucosae invasion (abbreviated as “pT1a2-MM”). Both of them are classified into the same depth invasion criteria, abbreviated as pT1a (M), not only in UICC but also in the Japanese Classification of Gastric Carcinoma. In the present study, “pT1a2-MM” showed higher rates of vessel permeation, lymph node metastasis, and the positive MUC1/DF3 expression than “pT1a1-M”. Therefore “pT1a1-M” and “pT1a2-MM” should be divided.

研究分野：医歯薬学

キーワード：早期胃癌 粘膜筋板 ムチン抗原 内視鏡的切除

1. 研究開始当初の背景

日本では上部内視鏡検査で早期に発見された胃癌が手術や内視鏡的治療により切除されることから、以前と比べ比較的良好な予後が得られるようになってきた。胃切除術を受けた 11261 例の胃癌患者において、stage IA の 5 年生存率は 91.8 パーセント、stage IB の 5 年生存率は 84.6 パーセントであった (Isobe et al. Gastric Cancer 14: 301-316, 2011)。

近年、早期胃癌の治療法として内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) が一般化してきているが、その適用拡大や ESD 後のリンパ節郭清を含む追加手術の基準には依然として議論の余地がある。

早期胃癌に対する内視鏡的切除は、リンパ節転移の可能性がほとんどなく、腫瘍が一括切除できる大きさと部位にあることを適応の原則としている (胃癌治療ガイドライン、第 4 版、2014)。具体的には 2cm 以下の肉眼的粘膜内癌 (cT1a) と判断される分化型癌で、肉眼型は問わないが潰瘍を伴わない UL(-) 病変が絶対適応病変とされている。更に適応拡大病変として 2cm を超える UL(-) の分化型 cT1a、3cm 以下の UL(+) の分化型 cT1a、2cm 以下の UL(-) の未分化型 cT1a、についても脈管侵襲がない場合にはリンパ節転移の危険性が極めて低く、適応を拡大してよい可能性がある、とされている。

内視鏡的切除の種類には内視鏡的粘膜切除術 (EMR) と内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) の 2 種類がある。

EMR は従来より行われていた方法であるが、スネアを使用することから、腫瘍の範囲が広い場合、一回の切除で取りきれず、遺残・再発する危険性が指摘されてきた。また切除標本の正確な病理診断のためにも病変の一括切除が望まれてきた。

近年の内視鏡機器と技術の進歩により導入されてきたのが ESD で、これにより大きな病変であっても完全に一括切除することが可能となった。ESD の普及とともに最近はその適応が拡大され、より大きな病変も ESD により切除されて診断する機会が増えてきている。

胃癌取り扱い規約では、リンパ節転移の有無にかかわらず癌の局在が粘膜 (M) または粘膜下組織 (SM) にとどまるものを早期胃癌と定義されている。規約上は細分されていないが、癌が粘膜にとどまるもの (pT1a) については更に (1) 粘膜筋板への浸潤を伴わない粘膜内癌 (“pT1a1-M”) と (2) 粘膜筋板への浸潤を伴う粘膜内癌 (“pT1a2-MM”) と、深達度の異なる二つのステージに亜分類しうる。

粘膜内癌の中には少数ではあるがリンパ

節転移を伴う症例が見られることが知られていることから、胃粘膜内癌における粘膜筋板浸潤の有無で脈管侵襲とリンパ節転移率に差異があるかを検討する意義があると考えられた。

2. 研究の目的

申請者の属する研究室での様々なヒト腫瘍におけるムチン性糖蛋白抗原発現の一連の研究において、膜結合型ムチンである MUC1 と MUC4 の発現は不良な予後に関係し、分泌型ムチンである MUC2 の発現は良好な予後に関係することが明らかになってきた (Yonezawa S et al: Pathol Int 61: 697-716, 2011; Yonezawa S et al: Proteomics 8, 3329-3341, 2008)。

癌の生物学的悪性度とムチン抗原発現の関連性についての研究で、胃癌においても MUC1 の発現が予後不良因子であることを示し (Utsunomiya et al. Clin Cancer Res 4: 2605-2614, 1998)、また MUC1 の細胞質内ドメインに対する新しいモノクローナル抗体 「MUC1-014E」 が、胃の低分化腺癌細胞の同定に非常に有用であることを実証した (Yonezawa et al: Gastric Cancer, 15: 370-381, 2012)。最近の早期胃癌の研究では、MUC4 の発現が脈管侵襲とリンパ節転移とに関連し、MUC1 と同様に予後不良の因子となることも見いだしている (Tamura et al: PLOS ONE 7 e49251, 2012)。

本研究では、早期胃癌を対象として、臨床病理学的事項と免疫染色によるムチンの発現を比較し、特に “pT1a1-M” と “pT1a2-MM” の差異を検討する。

具体的には胃腺癌を壁進達度 (pT1a1-M、pT1a2-MM、pT1b1、pT1b2) と組織型 (分化型、未分化型) とで分けて、それぞれのリンパ管侵襲・静脈侵襲の程度、リンパ節転移率、MUC1・MUC4 の発現に差があるかを比較検討し、内視鏡的切除の適用範囲に対する病理学的裏付けを検証する。

3. 研究の方法

1984 年から 2011 年にかけて鹿児島市医師会病院で胃癌切除術を施行された 3488 症例のうち早期胃癌 1643 症例を対象とした。平均年齢は 65.1 歳、男性 1076 例、女性 567 例であった。

壁深達度は胃癌取り扱い規約に準じたが、前述したとおり粘膜内病変 (pT1a) は粘膜筋板浸潤の有無で pT1a1-M、pT1a-MM と細分し

た。その内訳は以下の通りであった。

- “ pT1a1-M ”(粘膜内増殖に限る) 862 例、
- “ pT1a2-MM ”(粘膜筋板浸潤を伴う) 72 例、
- “ pT1b1 ”(SM1、粘膜筋板から 0.5mm 以下の浸潤) 227 例、
- “ pT1b2 ”(SM2、粘膜筋板から 0.5mm を超える浸潤) 482 例である。

代表例から顕微鏡的に腫瘍の代表切片を決定した。1 つの病変で 2 つ以上の組織型が混在する場合には、胃癌取り扱い規約に準じてそれぞれを個々に評価する。胃癌取り扱い規約第 14 版の組織型分類のうち、悪性上皮性腫瘍・一般型の pap、 tub1、 tub2 を分化型癌、 por1、 por2、 sig を未分化癌とし、分化型癌と未分化型癌が混在する場合は、優勢な組織像に従って分類する。

対象標本において、連続切片を用いて、各種染色を施行した。リンパ管侵襲と静脈浸襲を正確に評価するため、通常のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色に加えて、D2-40 と CD31 の免疫染色を行う。Desmin、 SMA で粘膜筋板を同定し、サイトケラチン (CAM5.2、 AE1/AE3) でがん細胞を染色することで粘膜筋板への浸潤を明らかにする。またがん細胞におけるムチンの発現については MUC1 コア蛋白 (MUC1/DF3)、MUC1 細胞質内ドメイン (MUC1/014E)、MUC4 (MUC4/8G7、MUC4/1G8) とを比較した。

MUC1 および MUC4 染色結果は、陽性癌細胞の割合に基づいて以下のように 6 段階に分類した : negative, none of the carcinoma cells stained; faint, <5% of carcinoma cells stained; 1+, ≥5% to <25%; 2+, ≥25% to <50%; 3+, ≥50% to <75%; and 4+: ≥75% stained。5 % 以上の癌細胞が染色された症例を陽性とした。

4 . 研究成果

(1) 脈管侵襲の比較

リンパ管侵襲と静脈侵襲を認めたのはそれぞれ “ pT1a1-M ” 862 症例中 5 例 (0.58%)、1 例 (0.1%)、 “ pT1a2-MM ” 72 症例中 14 例 (19.4%)、0 例 (0%)、 “ pT1b1-SM1 ” 227 症例中 82 (36.1%)、19 例 (8.4%)、 “ pT1b2-SM2 ” 482 症例中 305 例 (63.4%)、212 例 (44.0%) であった。 “ pT1a2-MM ” がリンパ管侵襲を伴う率は “ pT1a1-M ” より高かった (P<0.01)。

特に “ pT1a1-M ” で脈管侵襲の見られた症例は潰瘍を有する症例のみで、潰瘍のない “ pT1a1-M ” UL(-) 症例では脈管侵襲は認められなかった。

(2) リンパ節転移率の比較

リンパ節転移の見られた症例は “ pT1a1-M ” 862 症例中 5 例 (0.58%)、 “ pT1a2-MM ” 72 症例中 6 例 (8.3%)、 “ pT1b1-SM1 ” 227 症例中 14 (6.17%)、 “ pT1b2-SM2 ” 482 症例中 98 例 (20.33%) であった。

“ pT1a1-M ” でリンパ節転移を伴っていた 5 例は、いずれも潰瘍を有する未分化型癌であった。

“ pT1a2-MM ” でリンパ節転移を伴っていた 6 例の内訳は、潰瘍のない分化型癌 2 例、潰瘍のない未分化型癌 1 例、潰瘍を有する未分化型癌 3 例であった。

潰瘍を伴わない症例に限定すると、pT1a1-M-UL(-) ではリンパ節転移がなく、pT1a2-MM-UL(-) では 3 例であった。分化型癌 2 例のうち 1 例は大きさを確認できなかったが、もう 1 例は 5.5cm であったことから、現行の胃癌治療ガイドライン 2014 年 5 月改訂第 4 版では適応拡大病変として内視鏡的切除を考慮される症例に当たると考えられる。

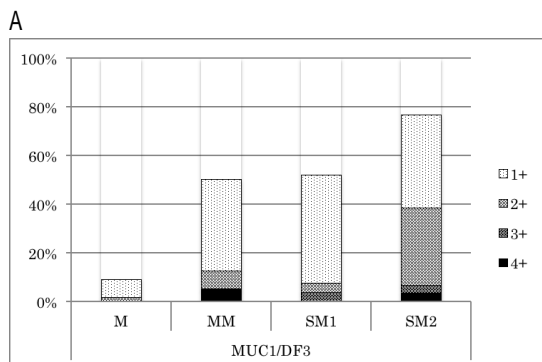
(3) 癌の深達度とムチン発現の比較

代表的な組織標本 205 症例 220 病変 (“ pT1a1-M ” 66 症例、 “ pT1a2-MM ” 40 症例、 “ pT1b1-SM1 ” 54 症例、 “ pT1b2-SM2 ” 60 症例) で MUC1 と MUC4 の免疫組織化学的検索を施行した。

MUC1/DF3 は主に細胞膜に発現し、MUC1/014E は細胞質ないし細胞膜に発現が見られた。MUC4/8G7 は細胞質に、MUC4/1G8 は細胞膜に発現が見られた。

深達度別に評価すると、いずれの抗体も “ pT1a1-M ” より “ pT1a2-MM ” での発現が高率であったが、有為差がみられたのは MUC1/DF3 のみであった。(図)

また MUC1/DF3 はリンパ節転移群、脈管侵襲を有する群で高率に発現していた。



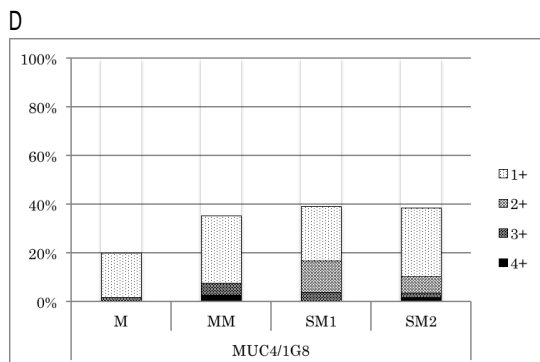
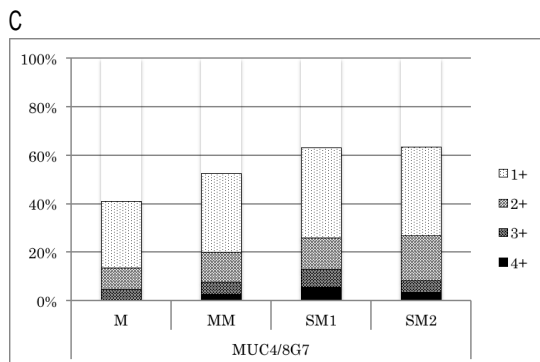
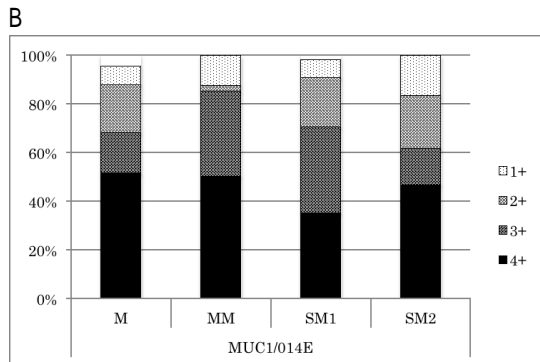


図 早期胃癌における深達度毎のムチン発現の比較

- A. MUC1/DF3 pT1a1-M より pT1a2-MM の発現が高率に見られた (P<0.01)。
- B. MUC1/014E いずれの深達度でも高頻度に発現が見られた。
- C. MUC4/8G7 ならびに D. MUC4/1G8 進行するにつれ発現率は増加したが、有為差はなかった。

(4) 癌の分化度とムチン発現の比較

MUC1/DF3、MUC4/8G7、MUC4/1G8 はいずれも分化型癌に有意に高率に発現していた。MUC1/014E は分化型癌、未分化型癌いずれにも高率に発現していたが、明らかな差異は見られなかった。

(5) 予後との比較

1643 例のうち死亡が確認されたのは 22 例であった。内訳は“pT1a1-M”8 例(他病死 4 例、詳細不明 4 例)“pT1b1-SM1”2 例(他病死 1 例、詳細不明 1 例)“pT1b2-SM2”12 例(原病死 9 例、他病死 2 例、詳細不明 2 例)であった。“pT1a2-MM”では死亡例はなかった。

“pT1b2-SM2”原病死 6 例を含む 205 症例のムチン発現を Kaplan-Meier 法で比較したが、MUC1/DF3、MUC1/014E、MUC4/8G7、MUC4/1G8 のいずれも有意の差は見られなかった。

(6) 成果の意義

胃粘膜内癌は粘膜筋板への浸潤を伴わない粘膜内癌(“pT1a1-M”)と粘膜筋板への浸潤を伴う粘膜内癌(“pT1a2-MM”)とに細分しえるが、通常は胃癌取り扱い規約に準じて pT1a(M)として区別されずに評価されている。

今回の研究で“pT1a1-M”と“pT1a2-MM”に細分化して評価したところ、“pT1a2-MM”は“pT1a1-M”と比較し、脈管侵襲の有無、リンパ節転移率、ならびに MUC1/DF3 の発現がより高率に認められることが確認された。すなわち、“pT1a2-MM”は、“pT1a1-M”よりも脈管侵襲を伴うことが有り、リンパ節転移の率も高い。また、“pT1a2-MM”では、より高率に MUC1/DF3 が発現していることが明らかになった。ムチンの発現については、これまでさまざまなヒト腫瘍で MUC1 の発現が予後不良と関連していることが指摘されていたが、今回の結果もそれに合致するものであった。

今回対象とした症例では、胃癌治療ガイドライン 2014 年 5 月改訂第 4 版で絶対適応病変とされる大きさが 2cm 以下で潰瘍のない分化型癌にリンパ節転移は見られなかった。しかし“pT1a2-MM”例の中に、適応拡大病変として内視鏡的切除を考慮される症例に当たる“2cm を超える UL(-)の分化型癌 cT1a”に相当する例でリンパ節転移を有する症例が確認された。

また、本研究では連続切片を作成し、各種染色を行ったが、その際、診断時の深達度より深い浸潤部や脈管侵襲が新たに確認された症例が数例認められた。診断時の外科切除標本では最深部の面が出ていなかったためと考えられる。pT1a2-MM 症例では、深切り切片や連続切片等の作成を行い、詳細な組織学的検討を行う必要があると考えられた。

近年、内視鏡機器・技術の発展により拡大内視鏡像と病理組織像との対比がなされるようになり、術前の深達度診断の精度が向上

してきている。このため、粘膜内癌の中でも浸潤傾向の見られる粘膜筋板への浸潤を伴う粘膜内癌(“pT1a2-MM”)を区別して評価することは、特に潰瘍の見られない症例においては重要な意義があると考えられた。またESD 検体で同様の検索を行い、内視鏡像とムチン発現の関連の有無等を検討していく予定である。

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. Kitazono I, Higashi M, Kitamoto S, Yokoyama S, Horinouchi M, Osako M, Shimizu T, Tabata M, Batra SK, Goto M, Yonezawa S. Expression of MUC4 mucin is observed mainly in the intestinal type of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas*. 2013 Oct;42(7):1120-8.
doi: 10.1097/MPA.0b013e3182965915.

[学会発表](計 1件)

1. 米澤 傑、北島信一、東美智代、堀之内道子、横山勢也、木村伯子、工藤和洋、下山則彦、清水 健、後藤正道、胃癌 por2 の検出に有用な新しいモノクローナル抗体 MUC1-014E (第3報): スキルス胃癌の壁深達度診断への応用、第103回日本病理学会総会、2014年4月24日~26日、ANA クラウンプラザホテル広島、広島県広島市

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀之内 道子 (MICHIKO HORINOUCHI)
鹿児島大学 医学部・歯学部附属病院
医員
研究者番号: 00707044

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし