



Title	MUC5AC expression correlates with invasiveness and progression of extramammary Paget' s disease
Author(s)	秦, 洋郎
Description	配架番号 : 2061
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11068号
Issue Date	2013-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11068
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53800
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroo_Hata.pdf



学 位 論 文

MUC5AC expression correlates with invasiveness and
progression of extramammary Paget' s disease.

(MUC5AC の発現の強度は乳房外パジェット病における浸潤および進行と相
関する)

2 0 1 3 年 9 月

北 海 道 大 学

秦 洋郎

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1頁
緒言	2頁
略語表	4頁
実験方法	5頁
実験結果	9頁
考察	19頁
総括および結論	22頁
謝辞	23頁
引用文献	24頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Hiroo Hata, Riichiro Abe, Daichi Hoshina, Nao Saito, Erina Homma, Satoru Aoyagi and Hiroshi Shimizu.

MUC5AC expression correlates with invasiveness and progression of extramammary Paget's disease.

Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology (2013)
doi: 10.1111/jdv.12156

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Hiroo Hata.

MUC5AC expression correlates with invasiveness and progression of extramammary Paget's disease.

The 71st Annual Meeting of American Academy of Dermatology
2013年02月28日～2013年03月05日, Miami Beach Convention Center (USA)

緒言

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アポクリン腺由来と考えられている¹。EMPDは欧米に比べて²本邦での発生例が多いとされているが、北海道大学皮膚科でも年間数例程度しか経験しない比較的まれな腫瘍である。EMPDの病理所見としては、肥厚した表皮内に、大型で明るい細胞質を有し、時に核分裂像を伴う細胞 (Paget細胞) が孤立散在性あるいは胞巣状に分布するのが一般的である。細胞質は特殊染色でPASおよびアルシアンブルーが陽性でありムチンであることが示唆されている。また免疫染色ではCK7、CEA、そしてGCDFP-15が陽性でありアポクリン腺由来の細胞であることが示唆されている^{3,4}。

その多くは年余にわたって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5年生存率は100%と、生命を脅かすことのない疾患である。しかしながら真皮浸潤を来し、Paget癌に移行した症例の一部には局所破壊性を示し、他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⁵⁻⁸。2個以上のリンパ節転移あるいは他臓器転移を有する場合に5生率では14.4%とする報告がある⁹。

化学療法ではこれまで、シスプラチンを中心とした様々なレジメやドセタキセルの投与などが試みられてきた。しかしながら現在までに確立されたものはない¹⁰。初療時にはすでに抗がん剤投与や放射線照射などの集学的治療が躊躇われるような高齢者であることも、疾患の特性上、しばしばである。そのため皮膚悪性腫瘍の中でも治療に難渋することが多い疾患である。

これまで、乳房外パジェット病と診断するための免疫組織学的マーカーは複数知られているが、予後因子として確立された免疫組織学的マーカーは知られていない^{11,12}。前述のように、進行性になると、治療の手段は限定的なものになってしまうため、初療時の病状の把握は然ることながら、経過観察における画像撮影や受診の頻度を含めた医療資源の投入の観点からも、EMPD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は切望されるところである。

前述のように、EMPDはアポクリン腺由来の細胞が癌化したものと考えられており、他のadenocarcinomaにおいて、浸潤能や転移能、あるいは生命予後との関連が指摘されている免疫組織学的マーカーが知られていないか文献的に検索する中から、ムチンコア蛋白 (Mucin Core Protein; MUC) のいくつかのサブタイプの発現パターンが検討されていること¹³⁻¹⁷に着目し、同様の病理学的形態を一部で示す本腫瘍に応用できないかとの着想に到った。

症例の集積に関して、他の皮膚悪性腫瘍においては、例えば基底細胞癌などは高齢者の露光部に好発するが、比較的中小型のものが多く外来的にあるいは他の市中病院においても切除を含めた治療をすることが可能であることが多い。しかしながらEMPDの場合は病変が広範囲に及び、また推奨されている外科的マージンが比較的大きく、大規模な手術かつ複雑な再建を要する

こと、加えて、他の内臓悪性腫瘍の合併を除外することなど、人員を多数配置し専門的な治療ができ得る北海道大学皮膚科に、患者が全道から多く集積する背景に恵まれた。

我々は免疫染色による網羅的な検討に先立って、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の部位からmicroarrayによる解析・比較を行って、ムチンコア蛋白サブタイプのうち、MUC2、MUC5ACの増幅の程度が浸潤・進展に相関する可能性があることを見出した。次に、全手術標本において、実際のムチンコア蛋白サブタイプの発現を、MUC1, 2, 5AC, そして6を用いた免疫染色にて検討を行った。

EMPDのすべて上皮内病変、浸潤部、リンパ節転移組織においてMUC1は陽性、MUC6は陰性であった。MUC2においては、発現の強度と病理学的深達度と予後不良の危険性には統計学的に有意な相関性は確認できなかったが、MUC5ACは、invasiveすなわち病理学的に浸潤を認める部位では11例中9例が、そしてリンパ節転移の5検体中4検体において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正の相関性があることが統計学的有意差を持って確認された。

本研究を通じて、MUC5ACの免疫組織学的染色は、EMPDにおいてハイリスク群の抽出に寄与する可能性があることを明らかにしたので、ここに供覧する。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

EMPD: Extramammary Paget' s disease
MUC: Mucin Core Proteins
LN: Lymph node
M: male
F: Female
CK: cytokeratin
PBS: Phosphate buffered saline
DAPI: Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
PAS: Periodic acid Schiff
CEA: Carcinoembryonic antigen
GCDFP: Gross cystic disease fluid protein

実験方法

A) 本研究に用いた症例の臨床情報

以下の表 1 に、本研究で用いた症例の臨床情報を示す。

表 1

症例	年齢	性	specimen	部位	転移	予後
1	53	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
2	94	F	invasive	外陰部	－	生存
3	74	M	<i>in situ</i>	腋窩	－	生存
4	71	M	LN	陰嚢	＋	生存
5	74	M	LN	陰嚢	＋	死亡
6	76	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
7	80	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
8	61	M	LN	陰嚢	＋	死亡
9	76	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
10	76	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
11	87	F	<i>in situ</i>	腋窩	－	生存
12	71	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
13	66	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
14	75	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
15	73	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
16	60	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
17	76	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
18	66	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
19	77	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
20	78	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
21	91	M	invasive	陰嚢	－	生存
22	91	M	invasive	陰嚢	－	生存
23	46	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
24	73	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
25	73	M	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
26	73	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
27	74	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
28	64	M	LN	陰嚢	＋	死亡
29	81	M	<i>in situ</i>	肛門	－	生存
30	74	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
31	79	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
32	67	F	invasive	外陰部	－	生存
33	77	F	invasive	外陰部	－	生存
34	87	F	<i>in situ</i>	外陰部	－	生存
35	66	M	<i>in situ</i>	陰嚢	－	生存
36	80	M	<i>in situ</i>	腋窩	－	生存
37	73	F	invasive	外陰部	－	生存
38	75	F	LN	外陰部	＋	生存

- ・ 患者平均年齢 ; 73.2歳、
- ・ 男女比 ; 1.26
- ・ 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CK7(+)/CK20(-)を確認することで直腸癌・大腸癌を否定し、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invasive、5検体がlymph node metastasisで有った。

B) Microarray

病理学的に、*in situ*、invasion、lymph node、metastasisであることが確認されたそれぞれ3人の患者（表1中、それぞれ症例34, 33, および38に該当する）において、拡大切除時に病変、およびその周辺の健常部位から、それぞれ1cm四方の立法状の組織を採取し、total RNAを抽出した。

RNAサンプルは、Filgen(名古屋、日本)に委託し、miNana™ miRNA Isolation Kit (Life Technologies Corporation ; Ambion) 、ラベリングにはMirus Bio社製のi Label 1T miRNA Labeling Kitを用いて遺伝子発現プロファイルを検討した。

C) 組織染色

(i) 免疫染色

表1に示したEMPDの標本を鏡検し、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。

免疫染色の施行手順は下記の通りである。

1. 脱パラフィン

キシレン 10分、キシレン 10分、100%エタノール 10分、100%エタノール 5分、95%エタノール 5分、90%エタノール 5分、80%エタノール 5分、70%エタノール 10分、蒸留水洗浄 10分

2. 抗原賦活処理

マイクロウェーブによる加熱処理 1分

3. ブロッキング

内因性Peroxidaseのブロッキング、3%過酸化水素溶液 10分、反応後PBSで洗浄 10分

4. 非特異的反応の阻止

ブロッキング試薬Ⅱ:10%ヤギ正常血清（ニチレイ；ヒストファイン SAB-PO(R) キット）にて浸漬、室温で30分

5. 一次抗体の反応

一次抗体 (1 μ g/ml) 4℃にて over night、反応後 PBS で浸漬 10 分×3 回

6. 二次抗体の反応

第二抗体: ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (動物種: ヤギ) (ニチレイ ; ヒストファイン SAB-P0 (R) キット) 反応後 PBS で浸漬 10 分×2 回、反応後 PBS で浸漬 10 分×2 回。その後にペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンを用いて室温で 30 分反応させる。反応後 PBS で浸漬 10 分×2 回。

7. 発色 (Peroxidase の発色)

DAB タブレット (シグマ社製) を溶解して調製した DAB 基質溶液を切片上に滴下する 5~15 分。反応停止のため蒸留水で洗い流して蒸留水に浸漬 10 分。

8. 対比染色 (核染色)

マイヤーのヘマトキシリン液に浸漬 5 分。浸漬後、流水で洗浄脱色 15 分。

9. 脱水

70%エタノール 30 秒、80%エタノール 30 秒、90%エタノール 30 秒、95%エタノール 30 秒、100%エタノール 30 秒、100%エタノール 30 秒、キシレン 2 分×3

10. 封入

マウントメディウムで封入する

(ii) 多重蛍光染色

1. 凍結切片 (5 μ m) を風乾
2. 4% PFA 4℃、10min で固定
3. PBS 洗浄 4℃、10min、1 回
4. 一次抗体を 50 μ L / 切片かけて 37℃、30min (PBS で終濃度 10 倍に希釈)
5. PBS 洗浄 4℃、5min、3 回
6. 二次抗体を 50 μ L / 切片にかけて 37℃、30min (BS で終濃度 50 倍に希釈)
7. PBS 洗浄 4℃、5min、3 回
8. DAPI 入りの封入剤で封入

多重染色に使用した薬剤は以下の通り。

一次抗体 : Cytokeratin7 (Abcam)、NCL-MUC-5AC (Novocastra)

二次抗体 : Goat Anti-Mouse IgG (H+L chain specific) TRITC

(southernBiotech)、FITC-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)

DAPI 入り封入剤 : VECTASHIELD MOUNTING MEDIUM FOR FLUORESCENCE WITH DAPI (VECTOR Laboratories)

D) 標本の評価

上記の手順によって得られた標本を鏡検し、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。

実験結果

A) Microarray

まず、EMPD の患者（表 1 中、症例 34 (図 1), 33 (図 2), および 38 (図 3)) の正常皮膚と病変部において、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 以下の減少を示すものを 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。

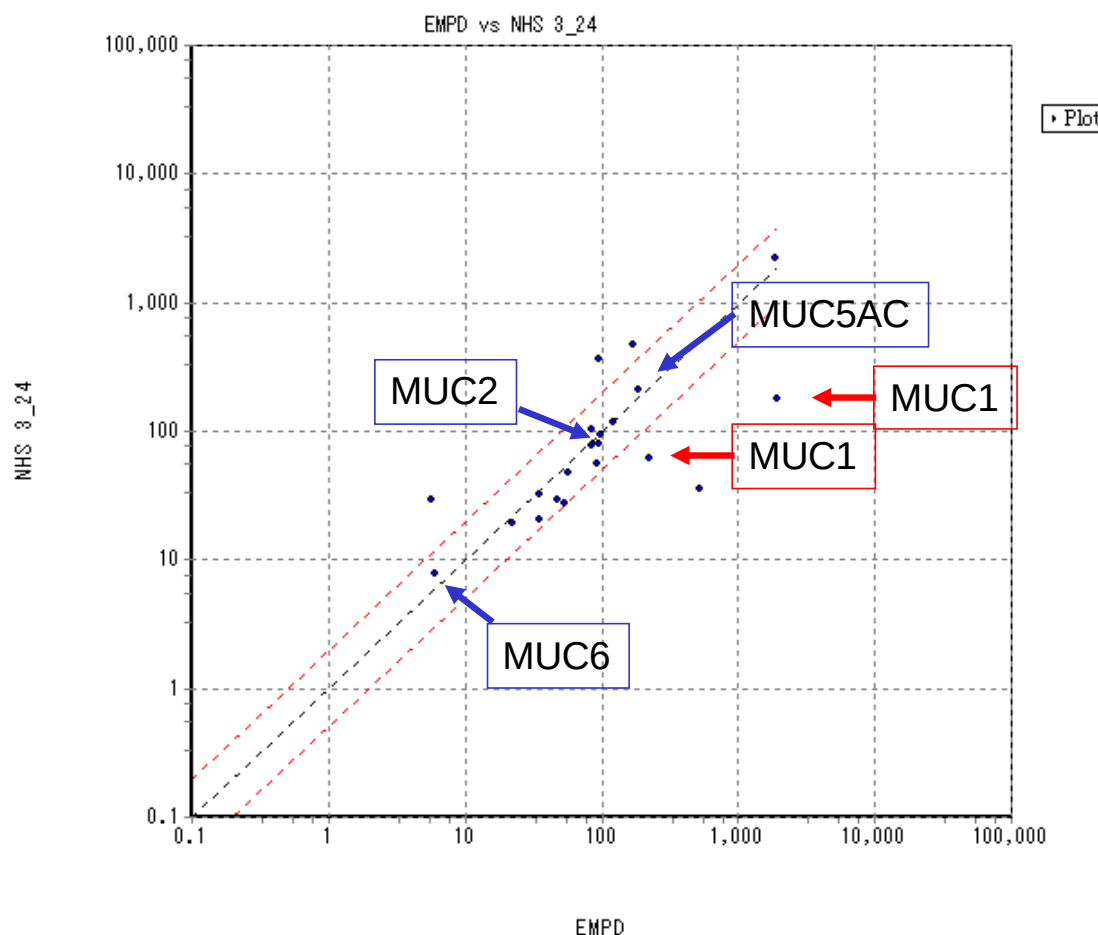


図 1A 症例 34 (*in situ*) の microarray による RNA 増幅の分析結果

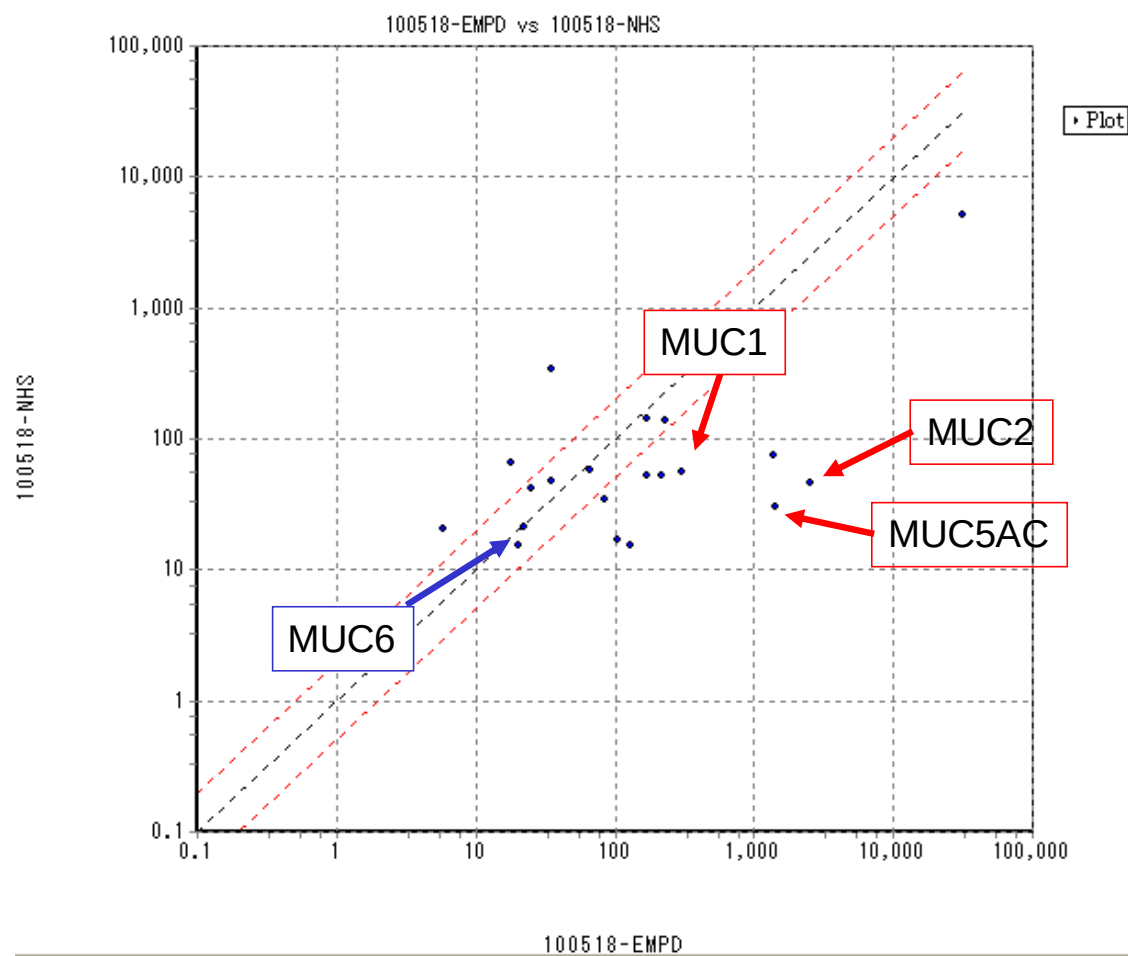


図 1B 症例 33(invasive)の microarray による RNA 増幅の分析結果

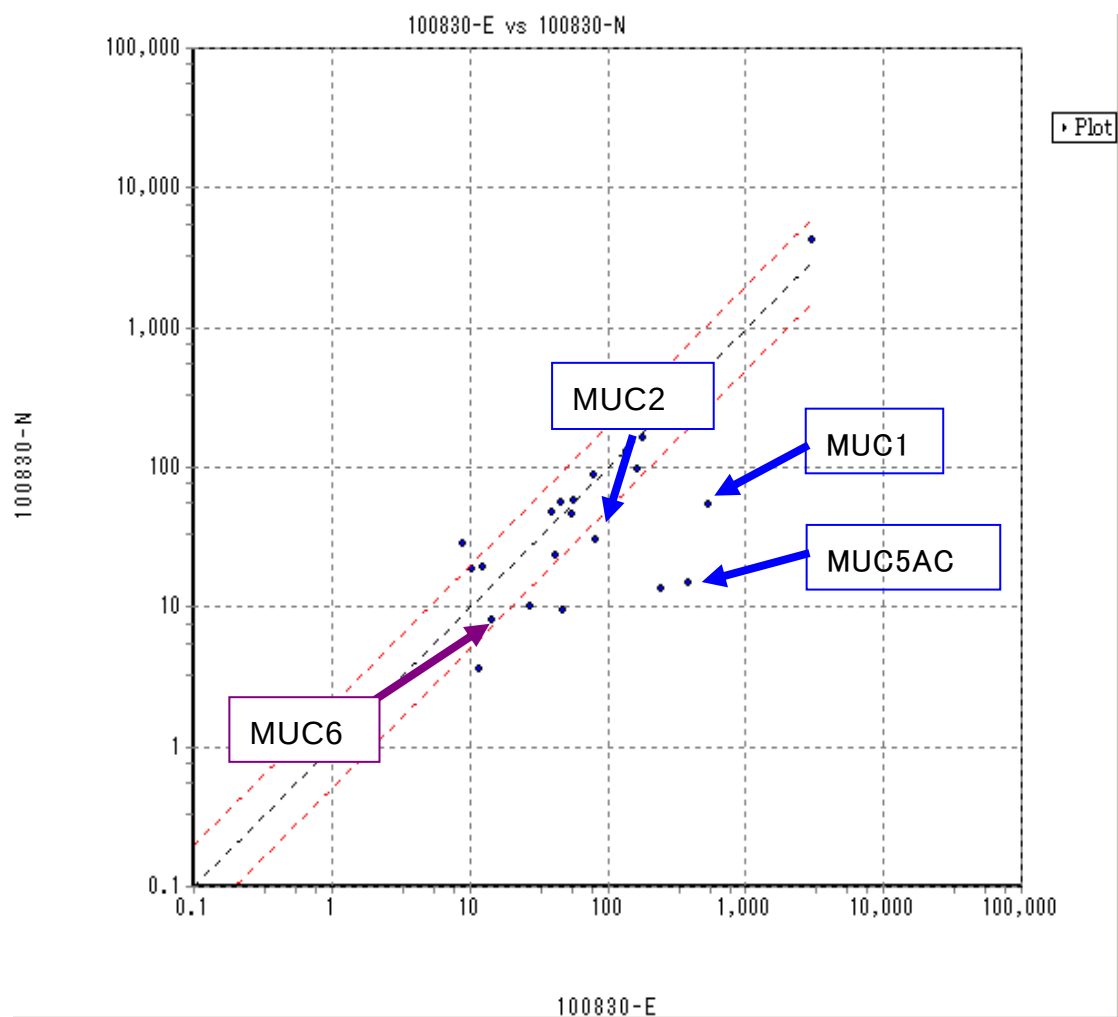


図1C 症例38 (lymph node) のmicroarrayによるRNA増幅の分析結果

*In situ*の症例 34 では、MUC1 の増幅を認めた。MUC2, 5AC, 6 の増幅は認めなかった。Invasive の症例 33 では MUC1, 2, 5AC の増幅を認めた。MUC6 の増幅は認めなかった。LN の症例 38 では MUC1, 2, 5AC の増幅を認めた。MUC6 の増幅は認めなかった。図中にドットで示されているものも他の MUC 遺伝子である。

B) HE 染色の結果；下記に一例を示す

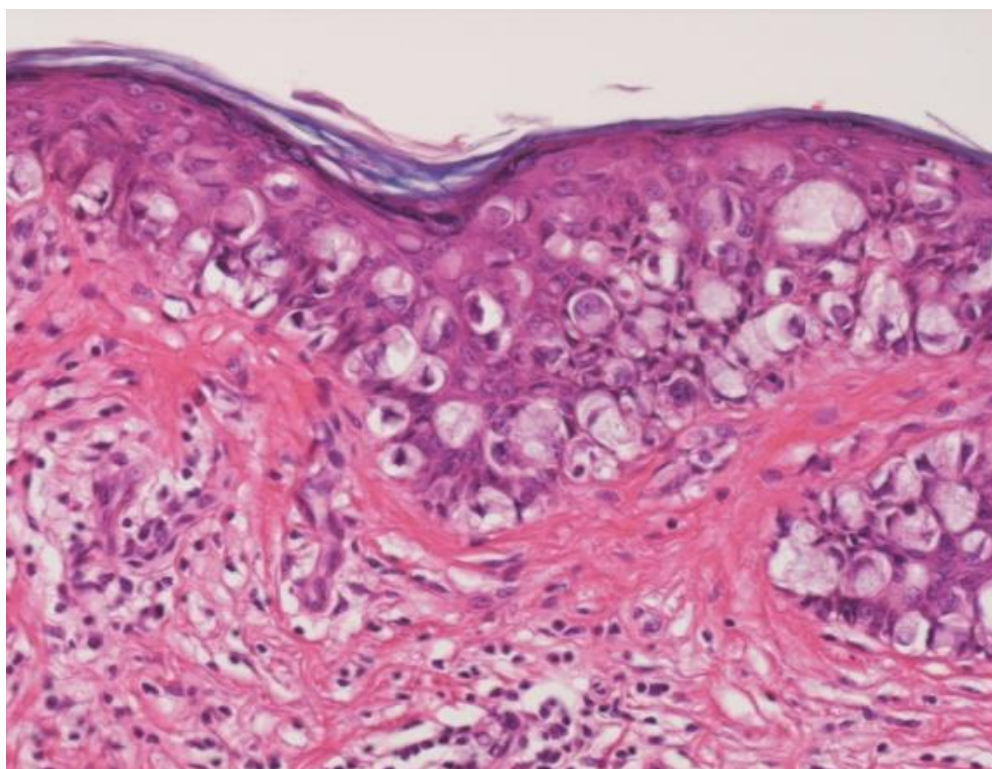


図 2 EMPD の皮膚生検の HE 染色像；肥厚した表皮内に、大型で明るい細胞質を有する細胞が孤立散在性あるいは胞巣状に分布し、EMPD と診断することができる。

C) MUC 染色の結果

MUC の免疫染色の結果；下記に MUC5AC の染色による 1 例を示す。

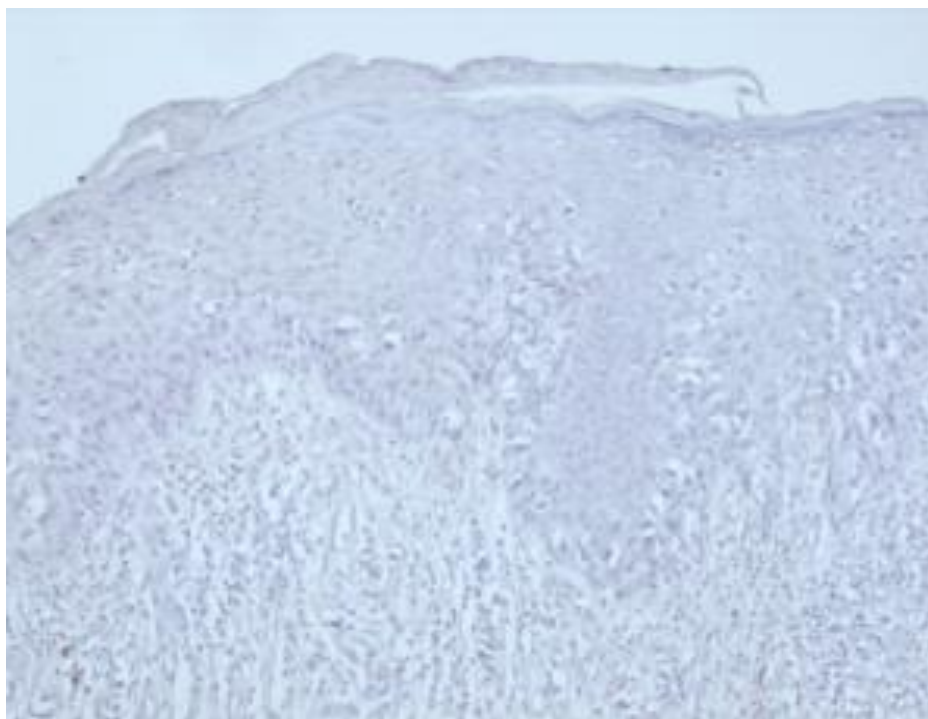


図 3A Negative; (-) 胞体の明るい腫瘍細胞は陰性である。

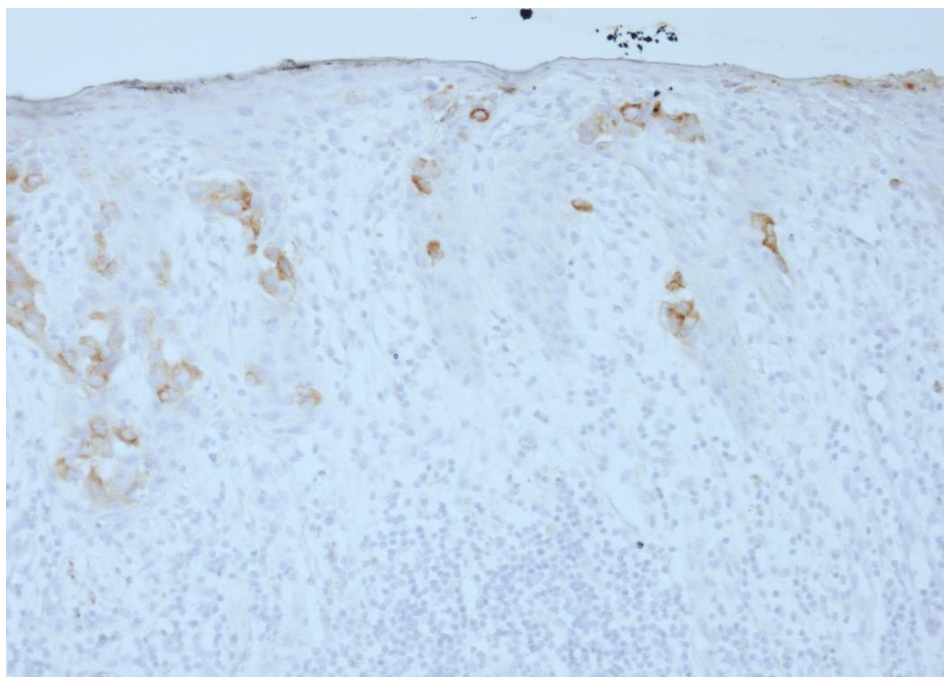


図 3B 5-25%; (+) 胞体の明るい腫瘍細胞の 5-25%が陽性である

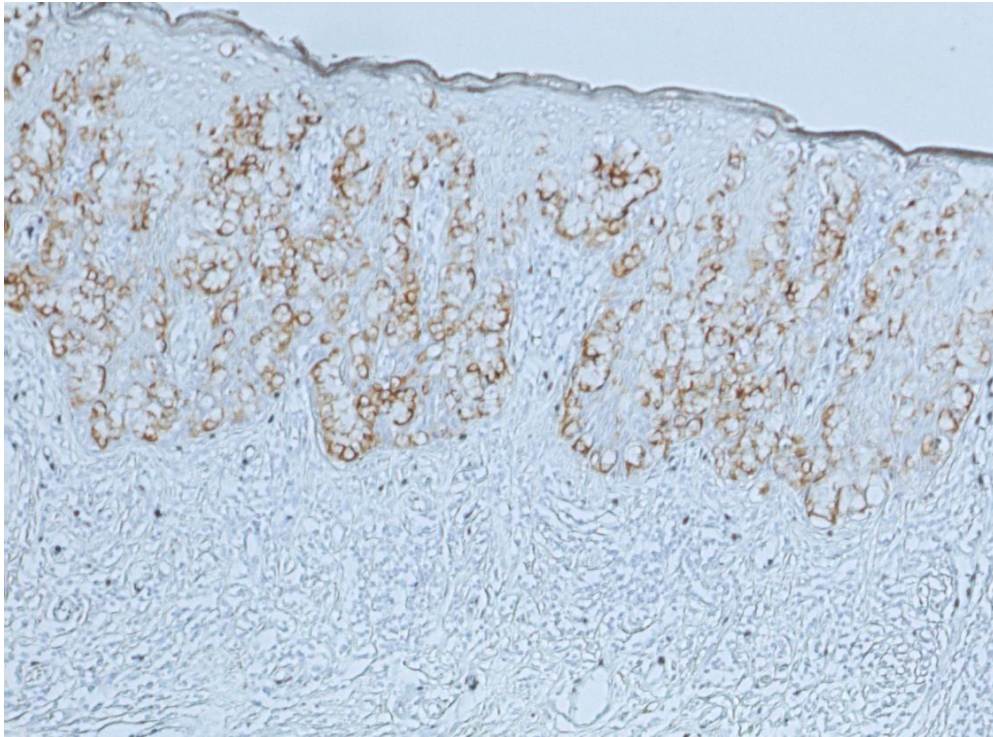


図 3C 26-50%; (2+) 胞体の明るい腫瘍細胞の 26-50%が陽性である

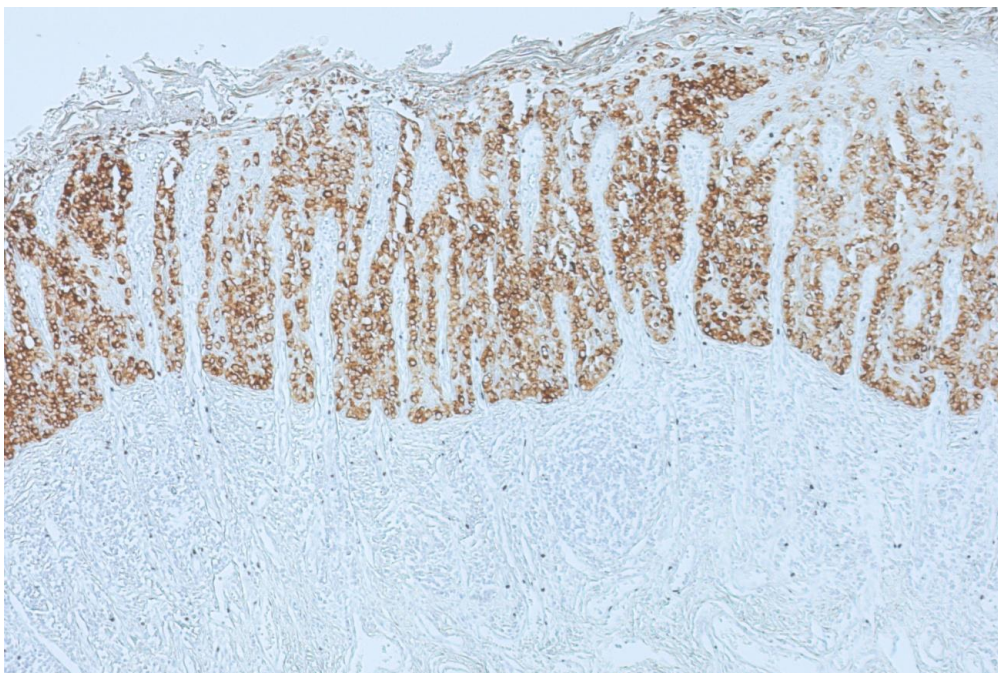


図 3D 50%以上; (3+) 胞体の明るい腫瘍細胞の 50%以上が陽性である。

D) 多重染色の結果

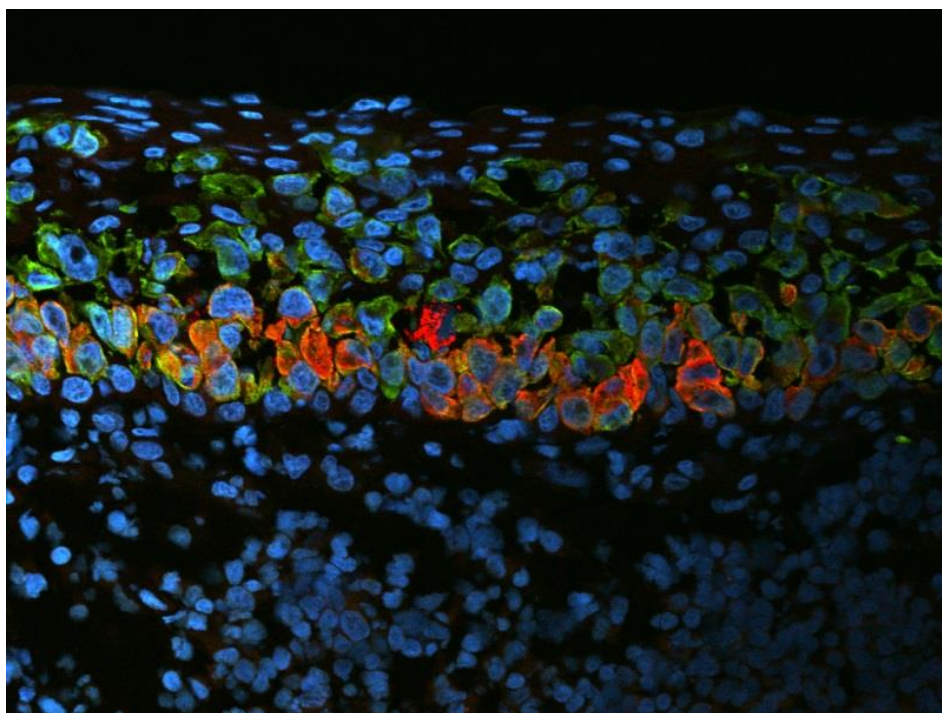


図4 CK7、MUC5ACの多重染色；染色は核染色をblue、CK7をgreen、そしてMUC5ACをredで行った。

皮膚の有棘細胞には染まらず、Paget細胞に特異的に染まっていることが確認するため多重染色を施行した。図中赤色で示されるMUC5ACは図中緑色に示されるCK7陽性のPaget細胞の一部にだけ染まっていることが確認された。

E) MUC の免疫染色の結果のまとめ

以下に MUC の免疫染色の結果のまとめを示す。

表 2 MUC の免疫染色の結果のまとめ

症例	specimen	MUC1	MUC2	MUC5AC	MUC6	転移	予後
1	<i>in situ</i>	3+	—	2+	—	—	生存
2	invasive	3+	—	2+	—	—	生存
3	<i>in situ</i>	3+	+	2+	—	—	生存
4	LN	3+	—	3+	—	+	生存
5	LN	3+	—	3+	—	+	死亡
6	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
7	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
8	LN	3+	—	—	—	+	死亡
9	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
10	<i>in situ</i>	3+	+	—	—	—	生存
11	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
12	<i>in situ</i>	3+	+	3+	—	—	生存
13	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
14	<i>in situ</i>	3+	—	2+	—	—	生存
15	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
16	<i>in situ</i>	3+	+	+	—	—	生存
17	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
18	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
19	<i>in situ</i>	3+	—	2+	—	—	生存
20	<i>in situ</i>	3+	—	3+	—	—	生存
21	invasive	3+	—	3+	—	—	生存
22	invasive	3+	—	—	—	—	生存
23	<i>in situ</i>	3+	—	3+	—	—	生存
24	<i>in situ</i>	3+	—	+	—	—	生存
25	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
26	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
27	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
28	LN	3+	—	3+	—	+	死亡
29	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
30	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
31	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
32	invasive	3+	—	3+	—	—	生存
33	invasive	3+	—	3+	—	—	生存
34	<i>in situ</i>	3+	—	—	—	—	生存
35	<i>in situ</i>	3+	3+	3+	—	—	生存
36	<i>in situ</i>	3+	2+	3+	—	—	生存
37	invasive	3+	—	—	—	—	生存
38	LN	3+	—	3+	—	+	生存

F) 浸潤・進展と MUC 発現の相関について

(i) 浸潤・進展とMUC5AC発現との相関

浸潤・進展とMUC5AC発現の結果を示す（表3）。この結果に対して Cochran-Mantel-Haenszel 検定を用いて検討したところ、MUC5ACは、invasiveおよびLNにおいて、発現が高くなることが有意差を持って確認された（ $p=0.0076$ ）。

表3；MUC5ACの染色結果

MUC5AC	<i>in situ</i>	invasive	LN
–	16	2	1
+	2	0	0
2+	4	1	1
3+	6	8	3
	28	11	5

(ii) 浸潤・進展とMUC2発現との相関

浸潤・進展とMUC2発現の結果を示す（表4）。この結果に対して Cochran-Mantel-Haenszel 検定を用いて検討したところ、MUC2は、invasiveおよびLNにおいて、発現が高くなることが有意差を持って確認できなかった（ $p=0.6391$ ）。

表4；MUC2の染色結果

MUC2	<i>in situ</i>	invasive	LN
–	22	9	4
+	4	1	1
2+	1	1	0
3+	1	0	0
	28	11	5

G) 同一症例内でのMUC5ACの発現の差異の検討

MUC5AC は同一症例において、*in situ*の部分と *invasive*の部分では発現に差異が出ているかを検討した。

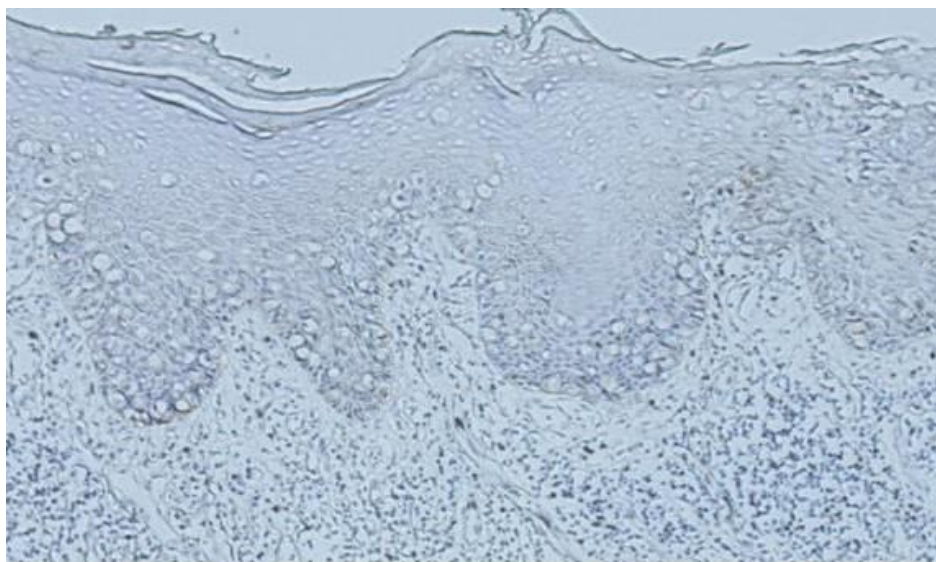


図 5A *in situ*の部分

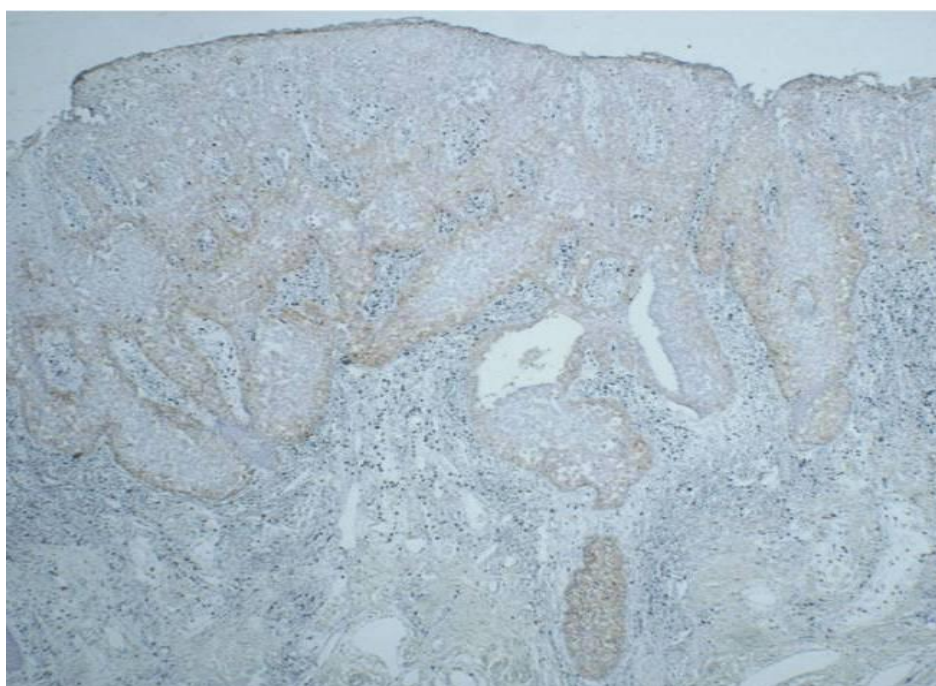


図 5B 同一症例における *invasive*の部分

図 5A、B に示すように同一症例において浸潤部において発現の増強を認め、同様に *invasion* の 11 例を検討すると、うち 8 例で上記のごとく、浸潤部において発現の増強を認めた。

考察

乳房外パジェット病は、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、その多くは年余にわたって緩徐に進行し上皮内に留まっている状態で発見され^{1,3}、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5年生存率は100%と、生命を脅かすことのない疾患である^{3,18}。しかしながら真皮浸潤を来し、Paget癌に移行した症例の一部には局所破壊性を示し、他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³⁻⁸。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が^{11,12}、このようなハイリスクの症例を初回治療時に検出できれば、手術的に侵襲を加える範囲や、術後補助療法、術後の経過観察などに反映させ、治療成績を改善することは我々の宿願といえる。

EMPDはアポクリン腺由来の細胞が癌化したものと考えられており、他のadenocarcinomaにおいて、浸潤能や転移能、あるいは生命予後との関連が指摘されている免疫組織学的マーカーが知られていないか文献的に検索するなかからムチンコア蛋白のいくつかのサブタイプの発現パターンが検討されていることに着目し、同様の病理学的形態を一部で示す本腫瘍に応用できないかとの着想に到った。

他の内臓悪性腫瘍、例えば大腸癌、胆嚢癌、膵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免疫組織学的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¹³⁻¹⁷。

例を挙げると、大腸癌、胃癌、そして胆管癌ではMUC1の発現が増強すると、浸潤能や転移能が高まるとされている¹⁹。大腸癌ではMUC5ACの発現が低下すると転移する率が高まりあるいは生命予後の悪化と密接な関係があることが知られている²⁰。また膵癌においてはMUC2の発現が低下すると予後が悪くなることが知られている²¹。

今回我々は、本研究に先立って、病変からのmicroarrayによるDNAの増幅の解析を行う中から、本腫瘍におけるムチンコア蛋白サブタイプのうちのいくつかに発現の増幅されているものがあることに着目し、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、MUC1, 2, 5ACそして6について検討した。

近年、ムチン型糖蛋白と癌化との関連が注目され、癌細胞におけるMUC発現の意義についての研究がなされるようになった²²。その生体内のメカニズムとしては、腫瘍細胞から分泌されたムチンを、周囲のマクロファージが貪食し、COX-2の活性化を経て、プロスタグランジンや血管内皮細胞増殖因子を放出する。放出されたサイトカインを通じて腫瘍細胞でもCOX-2が活性化して、同様にサイトカインを放出する。腫瘍細胞から放出したサイトカインも血管新生やマクロファージでのCOX-2活性化を促し、また同時にautocrine様にムチン分泌を促す。これらの作用を通じて、病巣への栄養血管を導いたり、腫瘍細胞周囲にムチンを配置することで各種免疫応答から逃れるようになったりするといわれている。MUCコア蛋白へのglycosylationが、癌の悪性

度や浸潤性性格にどのように関わっているかについては不明な点が多いが、マウス乳癌細胞株TA3-Haを用いた系においても、同細胞の産生するムチンがSCRを介してPGE2の産生を亢進することを示すと同時に、PGE2の産生に伴う血管新生や免疫抑制が腫瘍の増殖に大きく関与するとの報告もある²³。

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と考えるが、microarrayを施行した3病変の全てにおいてMUC1の増幅があることを、またMUC6の増幅が無い事を確認し、その結果をなぞるように、免疫染色でも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を確認し、EMPDでは、MUC1、MUC6に関しては、予後を推測するようなマーカーとならないことを確認した。

またMUC2とMUC5ACはmicroarrayにおいて増幅を認める症例では免疫染色でも2+以上の陽性であり、増幅を認めない症例では免疫染色でも陰性であることが確認できた。

MUC2においては、発現の強度と病理学的深達度と予後不良の危険性には統計学的に有意な相関性は確認できなかった(表4)が、MUC5ACは、invasiveすなわち病理学的に浸潤を認める部位では11例中9例が、そしてリンパ節転移の5検体中4検体において2+またはそれ以上の強陽性であった。これらの結果からEMPDにおける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正の相関性があることが統計学的有意差を持って確認された(表3)。

また、invasive11例に関して、その周辺に配する*in situ*での部分との発現の程度を比較したところ、うち8例で発現が強くなることが確認された(図5A、B)。

EMPDにおいてMUCの発現パターンを検討した既報告では、一編があるのみで、それによると、EMPD36症例に関して、上皮内にとどまるものを*in situ*、真皮乳頭層にとどまるものをmicroinvasive、真皮乳頭層よりも深部への浸潤をみとめるものをinvasiveと分類して、それぞれ36, 13, 6病変を検討している。それによると、MUC2, 6は全病変において陰性であり、MUC1は全病変において陽性で、我々の結果と同様に浸潤の有無によっても発現に差異は見られなかった。MUC5ACは、病理学的に表皮内病変から真皮への浸潤を認めると発現が低下すると報告した²⁴。

既報告と対照的な結果が出たことの理由は明らかでないが、既報告では病変からのmicroarrayによるMUC遺伝子の増幅の検討は行われていない点、本研究は同数以上の症例を検討し、加えて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。

本研究を通じて、EMPDにおいて、MUC5ACの発現の程度は病理学的に真皮への浸潤を来たし、リンパ節転移などを来たす現象と正の相関があり、ハイリスク症例を抽出する免疫組織学的マーカーとなりうることが示唆された。MUC5ACの発現の有無あるいは程度を初療時に検討することで、MUC5ACが陰性であるときには、初療時の侵襲的検査を少なくしてすでに高齢である患者の負担を軽減したり、経過観察における画像検索や受診の頻度をすくなくする

などの工夫をすることが、また、MUC5ACが陽性のときには、リンパ節郭清を含む大掛かりな治療を考慮したり、集学的治療も視野に入れるなど治療方針の決定にも寄与できるなどのメリットが生まれる可能性があると考ええる。

総括および結論

本研究の結果、以下の結果を得ることができた。

- ・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のmicroarrayによる解析・比較を行ったところ、ムチンコア蛋白サブタイプの発現のパターンが浸潤・進展に相関する可能性があることを見出した。
- ・実際のムチンコア蛋白サブタイプのタンパク発現を免疫染色にて検討を行った。EMPDのすべて上皮内病変、浸潤部、リンパ節転移組織においてMUC1は陽性、MUC6は陰性であった。リンパ節転移の5検体中4検体においてMUC5ACは、2+（腫瘍細胞の26～50%陽性）またはそれ以上の陽性率であった。
- ・MUC5ACは、invasionおよびLNにおいて、発現が高くなることが有意差を持って確認された。

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。

EMPDにおいて、MUC5ACの発現は病理学的に真皮への浸潤を来とし、リンパ節転移などを来す現象と正の相関があり、ハイリスク症例を抽出する免疫染色のマーカーとなりうることが示された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多くの御指導と御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 清水 宏教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導いただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 阿部理一郎准教授に心より深謝いたします。また検体の提供にご協力をいただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 青柳 哲講師、そして本研究にご協力いただきました乳房外パジェット病の患者様に深く御礼申し上げます。最後になりましたが、北大皮膚科教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Kanitakis J. Mammary and extramammary Paget' s disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. **21**, 581-590(2007).
2. van der Zwan JM, *et al*. Invasive extramammary Paget' s disease and the risk for secondary tumours in Europe. *Eur J Surg Oncol*. **38**, 214-221(2012).
3. 日本皮膚悪性腫瘍学会. 乳房外パジェット病. In *皮膚悪性腫瘍取扱い規約第2版*(日本皮膚悪性腫瘍学会), 金原出版, 東京, 57-77(2010).
4. 神谷秀喜. 乳房外パジェット病グループスタディ2008年報告. *日本皮膚外科学会誌*. **13**, 148-151(2009).
5. Zollo JD, Zeitouni NC. The Roswell Park Cancer Institute experience with extramammary Paget' s disease. *Br J Dermatol*. **142**, 59-65(2005).
6. Murata Y, Kumano K, Tani M. Underpants-pattern erythema: a previously unrecognized cutaneous manifestation of extramammary Paget' s disease of the genitalia with advanced metastatic spread. *J Am Acad Dermatol*. **40**, 949-956(1999).
7. Karam A, Dorigo O. Treatment outcomes in a large cohort of patients with invasive Extramammary Paget' s disease. *Gynecol Oncol*. **125**, 346-351(2012).
8. Lam C, Funaro D. Extramammary Paget' s disease: Summary of current knowledge. *Dermatol Clin*. **28**, 807-826(2010).
9. 神谷秀喜. 乳房外パジェット病グループスタディ2008年報告. *日本皮膚外科学会誌*. **13**, 148-151(2009).
10. Yamazaki N. Chemotherapy for advanced adenocarcinoma of the skin: experience with combination chemotherapy and a review of the literature. *Gan To Kagaku Ryoho*. **24**, 30-36(1997).
11. Perrotto J, Abbott JJ, Ceilley RI, Ahmed I. The role of immunohistochemistry in discriminating primary from secondary extramammary Paget disease. *Am J Dermatopathol*. **32**, 137-143(2010).
12. Aoyagi S, Akiyama M, Shimizu H. High expression of Ki-67 and cyclin D1 in invasive extramammary Paget' s disease. *J Dermatol*

- Sci.* **50**, 177-184(2008).
13. Wakatsuki K, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of mucin phenotype in gastric cancer. *J Surg Oncol.* **98**, 124-129(2008).
 14. Park SY, Roh SJ, Kim YN. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact. *Oncol Rep.* **22**, 649-657(2009).
 15. Ho SB, *et al.* Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology.* **109**, 735-747(1995).
 16. De Bolos C, Garrido M, Real FX. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology.* **109**, 723-734(1995).
 17. Sasaki M, Nakanuma Y, Kim YS. Characterization of apomucin expression in intrahepatic cholangiocarcinomas and their precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hepatology.* **24**, 1074-1078(1996).
 18. 吉野公二、他. 乳房外パジェット病のTNM分類について. *日皮会誌.* **116**, 1313-1318(2006).
 19. 竹内 英之, 入村達郎. ムチンの分子生物学-構造と機能、分類. *膵と胆.* **26**, 1435-1440(2005).
 20. 米澤 傑, 他. ムチンに関する最近の考え方～ムチン発現の膵腫瘍における病理診断的意義. *膵と胆.* **26**, 451-457 (2005) .
 21. Yang W. Inactivation of p21WAF1/cip1 enhances intestinal tumor formation in Muc2^{-/-} mice. *Am J Pathol.* **166**, 1239-1246(2005).
 22. Yonezawa S, *et al.* Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors: its relationship with the biological behavior of the tumor. *Pathol Int.* **49**, 45-54(1999).
 23. Sugihara I, Yoshida M, Shigenobu T, Takagi H, *et al.* Different progression of tumor xenografts between mucin-producing and mucin-non-producing mammary adenocarcinoma-bearing mice. *Cancer Res.* **66**, 6175-6182(2006).
 24. Yoshii N, *et al.* Expression of mucin core proteins in extramammary Paget's disease. *Pathol Int.* **52**, 390-399(2002).