HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝内胆管癌における上皮間葉転換に関する分子の発現と臨床病理学的研究［全文の要約］
Author(s)	寺下, 勝巳
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2160 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11678号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58950
Type	doctoral thesis
File Information	Katsumi_Terashita_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　（要　約）

肝内胆管癌における上皮間葉転換に関する分子の発現と臨床病理学的研究

(Studies on EMT-related molecules in intrahepatic cholangiocarcinoma.)

2015 年 3 月

北　海　道　大　学

寺下　勝巳

肝内胆管癌（Intrahepatic cholangiocarcinoma ：ICC）は胆管の二次分枝及びその末梢の胆管上皮から発生する悪性腫瘍と定義されている。肝原発癌の中で肝細胞癌に次いで二番目に多く、本邦では約10%程度と比較的稀であるが、国際的にも肝内胆管癌の発症は増加を辿っている。有効的な治療は外科的切除であるが、手術根治後も高頻度に再発転移を来し、予後不良な癌腫の一つである。肝内またはリンパ節、他臓器へ高頻度に転移再発し、これらが予後規定因子となる場合が多いにも関わらず、その分子機構は不明で更に切除不能例の肝内胆管癌症例に対して有効な化学療法は確立されていない。肝内胆管癌の転移再発、癌の進展に関与する分子機構を解明することは、いまだ予後不良な肝内胆管癌における有効的な治療の開発や新たなbiomarkerの同定に導く重要な課題である。Epithelial-Mesenchymal Transition（EMT ：上皮間葉転換）は上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生、器官形成過程で必須の現象であると考えられている。一方、EMTの獲得が細胞運動性の亢進や細胞外基質の変化をもたらすことから、癌細胞の浸潤、転移に関する重要な機序として近年注目されている。徐々にEMTを誘導するいくつかの転写因子は同定され、そのうちの一つにZEB1が挙げられる。ZEB1の重要な特徴としてE-cadherinの喪失があり、様々な経路でEMTに関わるkey moleculeと考えられている。EMT 関連分子の発現が、多臓器癌の予後、浸潤、転移能に関する臨床病理学的因子と相関することが多数報告されており、更に肝内胆管癌においてもEMT関連分子の高発現が予後と相関することが報告されている。しかし、EMT関連分子の肝内胆管癌における症例数は比較的少なく、EMTのmaster moleculeであるZEB1についての報告はない。本研究は、肝内胆管癌の悪性度進展、転移再発の機構としてEMTに注目し、肝内胆管癌におけるにおけるZEB1を始めとしたEMT関連分子（E-cadherin, vimentin, claudin1, CD44）について網羅的に免疫組織学的染色を行い、肝内胆管癌におけるにおけるEMTの臨床病理学的意義を明らかにする事を目的とした。

1996年から2012年に北海道大学病院（以下当院）、他4施設で切除された肝内胆管癌102症例とした。適格基準は病理学的に典型的に肝内胆管細胞癌で腺癌と診断され、臨床病理学的に術後経過を確認された症例を検討材料とした。除外基準として、術前に抗癌剤や放射線治療を施行していない症例は除外とした。観察期間の中央値は35か月(3-170か月)であった。EMT関連マーカー抗体として，EMT誘導転写因子であるZEB1，Claudin-1の2種類，上皮系マーカーのE-cadherin，間葉系マーカーのvimentin、幹細胞マーカーのCD44、計5種類の抗体で検討を行った。免疫組織化学染色はFFPE ブロックより作製したwhole sectionを用い、その選択は病変部の辺縁で非病変部を共に含むもので、免疫組織化学染色を施行した。鏡検は患者臨床情報を確認せず、病理専門医2名と共に評価した。腫瘍

細胞の免疫組織染色については強度と比率を評価した。強度は4つのスケール（0: 陰性, 1+: 弱陽性, 2+: 中陽性, 3+: 強陽性）で分類し、各々の強度が切片内の病変部においてどれくらいの割合を占めるか、p_0, p_1, p_2, p_3（p_x: 強度Xの病変部の比率(%) $p_0+p_1+p_2+p_3=100$, $0 \leqq p_0, p_1, p_2, p_3 \leqq 100$）を評価する。Total score は次の計算式で$t = p_0 \times 0 + p_1 \times 1 + p_2 \times 2 + p_3 \times 3$で、計算した。ZEB1の免疫組織染色について非癌部の血管内皮細胞をinternal controlとした。同様にE-cadherinは非癌部の肝細胞の細胞膜、Vimentinは非癌部の肝細胞の細胞質、Claudin-1は非癌部胆管上皮、CD44は非癌部門脈域のリンパ球とした。

肝内胆管癌の腫瘍部における ZEB1, E-cadherin, Vimentin, Claudin-1, CD44 の発現は、症例全体の 46.1%, 43.1%, 44.1%, 75.5%, 14.7%に認めた。癌細胞の核膜に発現する ZEB1 であるが、score の中央値は 40 (0-170)、E-cadherin の score 中央値は 140 (0-300)、Claudin-1 は 80 (0-260)、Vimentin は 0(0-300)、CD44 は 0(0-270)であった。この中央値を cut-off として、それぞれの EMT 分子の発現の差異により、全症例を高発現群(high group)、低発現群(low group)の 2 群に群別した。

ZEB1 と EMT 関連分子の発現の相関性について、ZEB1 の発現は E-cadherin と逆相関(p=0.004)、Vimentin と同相関(p=0.022)を示した。Claudin-1 と CD44 の発現に有意な相関を認めなかった。

EMT 関連分子の発現と臨床病理学的因子の関連について、ZEB1 の高発現は TNM 分類の進行癌 Stage IV (p=0.037)、低分化型腺癌 (p=0.017)、リンパ節転移(p=0.024)、門脈浸潤 (p=0.037)のある症例で多く認めた。E-cadherin では相関性のある因子を認めなかったが、vimentin の高発現症例では腫瘍径が大きく(p=0.007)、門脈腫瘍栓を有する傾向(p=0.027)を認めた。CD44 の高発現症例では肝内転移(p=0.045)、遠隔転移(p=0.045)を有する症例で関連を認めた。Claudin-1 の高発現症例では TNM 分類の進行癌 Stage IV (p=0.027)、リンパ節転移陽性症例(p=0.024)で関連を認めた。

EMT 関連分子の発現の差異に基づいた肝内胆管癌患者の術後生存期間について、ZEB1 高発現群、低発現群の術後 3 年生存率はそれぞれ 33.5%、64.9%であり、ZEB1 の高発現群は有意に予後不良であった(p=0.027)。E-cadherin について高発現群は予後が良好であり(p=0.041)、高発現群、低発現群の術後 3 年生存率はそれぞれ 58.8%、39.1%であった。Vimentin では高発現群は予後不良で(p=0.049)、高発現群、低発現群の術後 3 年生存率はそれぞれ 39.8%、57.3%であった。Claudin-1 については、有意差はつかないものの高発現群は比較的予後良好の傾向があった。CD44 について高発現群は予後不良で(p=0.015)、高発現群、低発現群の術後 3 年生存率はそれぞれ 32.7%、54.2%であった。

臨床病理学的因子からログランク検定で解析したところ、性別、年齢、腫瘍個数、腫瘍径、分化度、リンパ節転移症例、門脈浸潤陽性症例、肝内転移症例、肝静脈浸潤陽性症例と共に今回検討した分子、ZEB1 高発現症例、CD44 高発現症例、E-cadherin 低発現症例、vimentin 高発現症例について比較的予後不良の因子として抽出された。

抽出された因子から多変量解析は Cox の比例ハザードモデルにて検討した。性別(Hazard ratio 2.046, 95% CI; 1.045-4.007 *P*=0.037)、分化度(Hazard ratio 2.063, 95% CI; 1.139-3.737 *P*=0.017)、リンパ節転移(Hazard ratio 2.056, 95% CI; 1.105-3.827 *P*=0.023)、肝内転移(Hazard ratio 2.813, 95% CI; 1.157-6.838 *P*=0.023) が術後生存期間に寄与する因子として抽出された。また、検討した分子の発現では ZEB1 は寄与する因子として抽出されなかったが、CD44 高発現(Hazard ratio 2.241, 95% CI; 1.112-4.1516 *P*=0.024)は抽出された。

癌細胞は多段階のステップを経て浸潤、転移することが知られており、この癌浸潤過程に EMT が重要な役割を来すことが明らかになってきている。EMT に関する master 制御因子として ZEB1 という分子が同定され、各種の臓器癌で注目されつつある。肝内胆管癌においても、その転移、浸潤機序 に EMT の関与が報告されつつあるが、報告例で検討された EMT 関連分子と臨床病理学的意義については、多くは明らかではなく、ZEB1 の報告はない。臨床的にも比較的稀な肝内胆管癌を、本研究では 102 例という大規模な症例において、網羅的に EMT 関連分子の免疫組織化学染色を行なった。

EMT 関連蛋白の発現と病理学的因子との関連について、ZEB1 高発現と男性、高齢、TNM stage、腫瘍分化度、リンパ節転移、門脈浸潤に相関を認めた。ZEB1 と EMT 関連蛋白の発現の相関では、Vimentin と同相関、E-cadherin と逆相関を認めた。Log-rank 検定を用いた単変量解析にて、男性、腫瘍個数、腫瘍径、低分化、リンパ節転移、門脈浸潤、肝静脈浸潤、肝内転移といった臨床病理学的因子に加えて、E-cadherin 低発現、Vimentin 高発現、ZEB1 高発現、CD44 高発現といった EMT 関連タンパク質の発現が予後にあたえる因子として抽出された。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では、男性、低分化、リンパ節転移、肝内転移、CD44 高発現が独立した予後規定因子として検出された。

その結果により、各種の臓器癌でも報告されているように、肝内胆管癌でも ZEB1 を始めとした EMT 関連分子、EMT に関したがん幹細胞マーカーである CD44 が、臨床病理学的な癌の転移、浸潤において重要な役割を担っており、予後に関与する事が明らかになった。本研究が予後不良な肝内胆管癌における有効的な治療の開発に導く可能性があると考え、今後更に大規模な症例において本知見の臨床的有用性を検証する必要があると思われる。