HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大腸癌における新規予後予測マーカーとしての簇出とhCGβ発現の意義に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	小丹枝, 裕二
Description	配架番号：2433
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13377号
Issue Date	2018-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72401
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuji_Konishi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　小丹枝　裕二

学 位 論 文 題 名

大腸癌における新規予後予測マーカーとしての簇出と hCGß 発現の意義に関する研究
（Studies on significance of tumor budding and human chorionic gonadotropin-ß as a novel prognostic marker in colorectal carcinoma）

【背景と目的】大腸癌の悪性度は病期によって異なるが、同じ病期でもその予後は様々であることから、さらなる予後因子の確立が必要である。簇出 (tumor budding) とは腫瘍先進部間質に単個の腫瘍細胞もしくは 5 個までの腫瘍塊が存在することであり、大腸癌における新規予後予測因子として注目されている。簇出は、その形態や簇出細胞の遺伝子発現の変化から、上皮間葉移行 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT） の発現を表していると考えられているが、その真偽は明らかになっていない。我々は先行研究において、TGFβ (transforming growth factor- β) と構造的相同性を持つ hCGβ (human chorionic gonadotropin-β) が、TGFβ pathway を介して大腸癌の EMT を調整していることを明らかにした。本研究では、hCGβ が EMT を介して簇出を誘導すること、そして簇出が EMT の発現を表していることを明らかにするため、実験①では、簇出と hCGβ の関係性および臨床病理学的な意義や予後との関係性を、実験②では、hCGβ と簇出および EMT の関係性について、大腸癌組織の免疫染色標本を用いて評価検討を行った。

【対象と方法】2002～2004 年の間に当科で根治手術を施行した大腸癌患者 80 症例を対象とし、切除組織の腫瘍先進部を含む切片を用いた。実験①：簇出に関しては抗サイトケラチン抗体を用いた免疫染色を行った。簇出が最大となるエリアの腫瘍先進部間質に存在する簇出細胞の個数を高倍率の視野 (400x) でカウントし、10 個以上のものを簇出陽性とした。hCGβ の評価は連続切片を用いて抗 hCGβ 抗体で免疫染色を行い、5 個以上の hCGβ 発現細胞を認めるものを hCGβ 陽性とした。簇出と hCGβ 発現の関係性と臨床病理学的因子や予後との関連について検討した。実験②：hCGβ 発現と簇出および EMT の関係性を調べるため、簇出陽性例において hCGβ 陽性 5 例と hCGβ 陰性 3 例において、hCGβ と EMT 関連蛋白 3 種類 (E-cadherin、Snail、Twist) それぞれとの蛍光 2 重免疫染色を行った。評価は簇出含む腫瘍先進部腫瘍細胞における EMT 関連蛋白の発現強度を点数化し (発現無し：0 点、軽度：2 点、中等度：4 点、高度：6 点) 、hCGβ 陽性例と hCGβ 陰性例、hCGβ 陽性例における hCGβ 陽性細胞と hCGβ 陰性細胞での発現強度の平均値を、それぞれ比較した。

【結果】実験①：サイトケラチン免疫染色では、HE 染色と比較して腫瘍細胞が明瞭に描出されるため簇出細胞の評価が容易であった。大腸癌 80 例における簇出細胞の個数は 0 個から 34 個 (平均±標準偏差；8.9 ± 8.5 個) であり、21 例 (26.3%) においては簇出細胞を 1 個も認めなかった。本研究で定義した、簇出細胞 10 個以上の簇出陽性症例は 80 例中 28 例 (35.0%) であった。簇出陽性はリンパ節転移 ($P < 0.01$) 、病理学的病期 ($P < 0.01$) 、リンパ管浸潤 ($P = 0.044$) 、脈管浸潤 ($P = 0.013$) と有意に関連していた。hCGβ の免疫染色

では、大腸癌 80 例中 13 例 (16.3%) において hCGβ 発現陽性であった。hCGβ 陽性例では有意に簇出細胞数が多く (16.0±8.2 vs 6.7±7.2 ; P < 0.01) 、また簇出は hCGβ の発現と有意に関連していた (P < 0.01) 。80 例中 11 例で簇出と hCGβ の発現がともに陽性であった。簇出と hCGβ が共発現していたグループは、他のグループと比較して最も予後が不良であり (P < 0.01)、また全生存期間に対する Cox 比例ハザードモデルでは、簇出と hCGβ の共発現が独立した予後不良因子であった。実験②：hCGβ 陽性症例と hCGβ 陰性症例の EMT 関連蛋白発現強度の比較においては、hCGβ 陽性症例では hCGβ 陰性症例と比較し、E-cadherin の発現減弱 (0.5±0.58 vs 2.0±0.0 ; P=0.007) と、Snail の発現増加 (2.80±1.48 vs 1.33±1.53 ; P=0.229) 、Twist の発現減弱 (1.0±1.22 vs 5.0±1.73 ; P=0.008) を認めた。hCGβ 陽性症例における hCGβ 陽性細胞と hCGβ 陰性細胞での比較では、E-cadherin (0.50±0.58 vs 3.25±1.26 ; p=0.007) および Twist (1.0±1.22 vs 3.2±0.84 ; p=0.01) の発現減弱が見られた。Snail に関しては、hCGβ 陰性細胞と陽性細胞でその発現に大きな変化は見られなかった (2.8±0.84 vs 2.8±1.48 ; p=1.000) 。hCGβ 陽性症例においては腫瘍先進部間質細胞の Twist 発現が顕著であった。

【考察】本研究では、大腸癌組織において簇出や腫瘍先進部に hCGβ の発現を認め、なおかつ hCGβ と簇出の発現に有意な関係性があること、そして簇出と hCGβ が共発現するとリンパ節転移の可能性が高く、最も予後が不良であることが明らかになった。これは、簇出と hCGβ が密接に関係しながら大腸癌の悪性化に寄与していることを意味する。さらに先行研究では、hCGβ が TGFβ pathway を介して EMT を誘導していることを in vivo で示していたが、実験②では hCGβ 発現により簇出含む腫瘍先進部の腫瘍細胞に EMT 様の発現蛋白の変化 (E-cadherin の発現減弱と Snail の発現増加) が誘導されることを大腸癌組織において証明した。Twist は腫瘍細胞においては発現が減弱し、先進部間質細胞で発現が顕著になっていたが、これは Twist が腫瘍細胞ではなく先進部間質に存在することで、EMT 様の変化を来し簇出を形成させるという報告に一致していた。これらの結果は、未だ明らかになっていない簇出と EMT の関係性を、肯定する一助になりうると考えられた。一連の実験結果より、簇出の誘導因子の一つとしての hCGβ の存在が示唆された。つまり、先進部の腫瘍細胞が hCGβ を自己分泌し、TGFβ レセプターに結合することで、下流の TGFβ カスケードが活性化し、EMT 関連蛋白の転写に変化を与え (E-cadherin 発現の減弱、Snail 発現の増強、Twist の間質発現の増強) 、これにより腫瘍細胞が間葉系の表現型を獲得し、簇出細胞となる。また、hCGβ と簇出の発現が不良な予後に関連するという結果から、悪性度の増したこれらの腫瘍細胞が他臓器に転移していくのではないかと推測された。本研究の結果から、簇出と hCGβ 発現の臨床への応用方法として、①大腸癌根治切除後の標本において簇出と hCGβ の共発現が見られた場合、これらの患者は予後不良であることが予想されるため、より集学的で、可能であれば高容量での補助化学療法を行うべきなのかもしれない。また、②早期大腸癌の内視鏡的切除後の標本で根治切除が得られている症例においても、病理診断で簇出と hCGβ の共発現が見られた場合は、潜在的なリンパ節転移の可能性を示している可能性があり、リンパ節郭清を伴う外科的切除が示唆される。さらに、③hCGβ 陽性大腸癌においては、hCGβ を治療のターゲットにすることで、簇出自体や、簇出から発生する転移を予防できるかもしれない。

【結語】簇出と hCGβ 発現は EMT と密接に関連しながら、大腸癌の進展に寄与していた。簇出と hCGβ の共発現は大腸癌における新規予後予測マーカーとして、また hCGβ は簇出や転移を予防するための治療標的として、有用であるかもしれない。