

## 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular Characterization of Carcinoma of the  
Papilla of Vater

和訳 Vater 乳頭部癌における分子生物学的変化の研究

指導教官 幕内雅敏 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 趙 斌

### 1、[背景と目的]

Vater 乳頭部癌は胆道系の悪性腫瘍とされ、膵腫瘍より発生率が低いが膵頭部領域癌手術切除例の約40%を占めている。しかしその分子生物学的機構がまだ解明されていない。癌の発生に癌遺伝子と癌抑制遺伝子の変異が関わりとされている。本研究は Vater 乳頭部癌における癌遺伝子 *K-ras* の突然変異と癌抑制遺伝子 *p53* 及び *p21/Waf1* の発現を検討することを目的とした。また、固形の悪性腫瘍が周囲組織に浸潤したり遠隔臓器に転移する際には血管新生が必要であり、これには微小血管新生が腫瘍の浸潤と遠隔転移に強く関わっている。血管新生に幾つかの促進因子と抑制因子が存在し、これらの因子は腫瘍の予後に関連するとされている。本研究では、Vater 乳頭部癌において腫瘍血管新生および血管新生促進因子の Thymidine Phosphorylase (TP) と Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現と意義の検討を目的とした。

## 2、[材料と方法]

東京大学付属病院肝胆膵外科にて1970-1997年に実施された Vater 乳頭部癌の外科的手術切除症例 59 例を検討した。平均年齢は 63 歳(42-85), 男女比は 1.7 :1 (男性 37 例、女性 22 例)。進行度は TNM 分類で行った。全例は膵頭十二指腸切除術を受けていた。組織学分類は胆道癌取扱い規約に準じて施行したが、腸型、胆膵管型の分類は我々が独自に定義した方法で行った。37 例を検討したところ、腸型は 9 例で、胆膵管型は 27 例で、未分化は 1 例であった。ホルマリン固定、パラフィン包埋を行ったのち、5  $\mu$ m の薄切連続切片を用意し、それぞれ HE 染色、DNA 抽出そして免疫染色に用いた。

1) K-*ras* 突然変異：フェノール法で DNA 抽出後、2-step PCR-RFLP 方法で K-*ras* 遺伝子のコドン 12 の変異を検討した。さらに Direct Sequencing 法にて点突然変異の塩基配列と偽陰性の有無を検討した。

2) p53 と p21/Waf1 染色：脱パラフィン後、Microwave 或いは Autoclave で抗原賦活を行った。一次抗体は Do7 と EA10 を、二次抗体は biotinylated anti-mouse antibody を用いた。Avidin-Biotin Complex で反応させたのち DAB で発色した。Hematoxylin で核染色を施行し、顕微鏡で観察した。

3) TP と VEGF 染色：一次抗体は 654-1 と A20 を用いた。非特異的な抗原成分を 3% skim milk でブロックした。他の手順は p53 染色と同様に行った。

4) 血管新生の評価：血管新生の指標は F-VIII RAg を用いて免疫組織化学的に検討した。一次抗体は抗 F-VIII RAg 抗体 F8/86 を用いた。他の手順は p53 染色と同様に施行した。その評価は染色標本をまず低倍率で観察し、最も血管が豊富な視野を選択した。次いでこの視野を強拡大して、一視野内の血管数を数えた。この血管数を当症例の microvessel density (MVD) とした。一視野の面積は約 1 mm<sup>2</sup> であった。

## 3、[結果]

1) K-ras codon 12 突然変異: 37 例について検討したが、変異が PCR-RFLP 法で 51% (19/37)、Direct Sequencing 法で 38% (14/37) にみられた。PCR-RFLP 法の敏感度は 73% で、特異度は 100% であった。組織型では胆膵管型より腸型で高率に変異がみられた (67% vs. 30%;  $p < 0.05$ )。Direct Sequencing 法で変異はすべてコドン 12 の第二位の塩基にあることが判明した。すなわち GGT から GAT (9/14)、GGT から GTT (4/14)、および GGT から GCT (1/14) への変異がみられたが、変異の種類と臨床病理学因子との間には相関は認められなかった。

2) p53 と p21 の発現: p53 は正常上皮が染まらないが、癌細胞の核が強く染まった。10% 以上染まれば overexpression とした。p53 の overexpression は 44% (26/59) の症例でみられたが、何れの臨床病理学因子とも相関しなかった。一方、p21/Waf1 について 43% (22/51) の症例で正常上皮が染色され、また 58% (34/59) の症例で癌細胞が染色された。腫瘍細胞の 10% 以上染まれば overexpression としたところ、38% (22/59) に overexpression がみられた。潰瘍のある症例ではない症例より高率に発現された (56% vs. 12%;  $p = 0.006$ )。また、p21/Waf1 overexpression のある症例はない症例より有意に術後生存期間が短かった。この差は全症例で検討しても高度進行例 (stage III と IV) で検討してもいずれでも認められた。p53 蛋白の発現と p21/Waf1 の発現との間には有意な相関がみられた ( $p = 0.045$ )。

3) TP と VEGF の発現: TP に関して、正常上皮はほとんど染まらないが、癌細胞は細胞質が強く染まっていた。一部の症例では細胞核も染まっていた。癌細胞については細胞質か細胞核かを問わず染色された細胞数が 10% 以上であれば陽性とした。63% (37/59) の症例では陽性であった。TP の発現は局所リンパ節転移や腫瘍の臨床分期に有意に相関した。即ち、リンパ節転移のある腫瘍 ( $p = 0.006$ ) やより進展した腫瘍 ( $p = 0.03$ ) では TP が高率に発現されていた。TP 陰性の症例は陽性の症例に比して予後がより良好であった ( $p = 0.02$ )。VEGF については、正常上皮は染まらないが、腫瘍細胞は細胞質或いは細胞膜が染まって

いた。10%以上染色されていれば陽性としたところ、73% (43/59)の症例で陽性であった。VEGF の染色は TP と相関したが、臨床病理学因子や予後と相関しなかった。

4) Mircovessel density (MVD) : 腫瘍組織における新生血管が主に癌細胞の周囲に発現されていた。TP 陽性群の平均 MVD は(27.6±10.1) 陰性群のそれ(20.4±10.0)より有意に高値であった(p=0.01)。VEGF 陽性群の MVD(25.8±10.4) は VEGF 陰性群のそれ(22.8±11.2)より高値であったが、有意差がみられなかった。しかし、TP と VEGF とを併せて検索すると、TP と VEGF 両者が陽性の群の MVD は 27.7±9.6 で、両方が陰性の群の MVD (18.2±8.5)より有意に高値であった(p=0.01)。高 MVD 群の術後生存時間は低 MVD 群のそれより短かったが、有意差が認められなかった。

#### 4、[まとめ]

本研究は Vater 乳頭部癌を分子生物学レベルで比較的多数の症例を用いて検討したものである。この腫瘍における p21/Waf1 の発現及び血管新生に関しては初めての研究でもある。上述の結果から以下のような結論を得た。

1) 我々がこれまで提示してきた新たな組織分類の胆膵管型と腸型の乳頭部癌はそれぞれ異なるメカニズムで発癌する。K-ras 遺伝子が主に腸型に関与するのではないかと考えられた。

2) p21/Waf1 の変異は腫瘍の進展よりむしろ腫瘍の発生に関わる。p21/Waf1 蛋白の過剰発現は機能異常の一種で独立予後因子である。またこの腫瘍では p21/Waf1 の発現は p53-dependent に誘導されると考えられる。

3) Vater 乳頭部癌に於いては TP が血管新生を通じて腫瘍の浸潤を促進する。TP の発現はリンパ節転移と相関し独立しないことから TP のこの作用は微小リンパ管の新生を促進することにもよると考えられる。また、TP と VEGF と共に高度に発現する腫瘍で血管新生が高度にみられることは、腫瘍血管新生が多因子によって調節されることが示唆している。