

氏名 (生年月日)	あ い かわ 相 川 あ か ね
学位論文題目	The clinicopathological significance of heterogeneous Ezrin expression in PDCs of colorectal cancers (結腸直腸癌の低分化胞巣における Ezrin 蛋白の特徴的染色パターンに着目した臨床病理学的検討)

学位論文内容の要旨

研究目的

低分化胞巣 (PDC) は腺管形成を欠いた 5 細胞以上からなる細胞集団を指し、結腸直腸癌の浸潤端で観察される。PDC の数が多い結腸直腸癌症例はリンパ節転移が多く、予後不良であることがこれまでに報告されている。また、線維血管性間質を欠き細胞極性の逆転を示す特異な組織形態である微小乳頭状 (MP) パターンを示す結腸直腸癌も、リンパ節転移や遠隔転移が多いことが知られている。本研究では、アクチン細胞骨格の制御因子の一つである Ezrin 蛋白が、PDC や微小乳頭状胞巣において不均一な染色性を示すことに着目し、その不均一性を定量化し、臨床病理学的指標との相関を明らかにすることを目的とした。

実験方法

2009 年から 2012 年までの間に金沢医科大学病院で外科的に治癒切除がなされた病期 I ～III の結腸直腸癌症例 195 例を対象とした。術前化学療法がなされた症例、粘膜内癌と診断された症例は除外した。最深部が含まれる組織切片のうち、PDC が最も多い切片について抗 Ezrin 抗体を用いた免疫組織化学を行った。Ezrin 陽性を示す細胞の腫瘍胞巣の角への局在を定量化するため、個々の PDC について (胞巣の角での Ezrin 陽性率) / (胞巣全体での Ezrin 陽性率) を求め、これを Ezrin Corner Score (ECS) とした。PDC の基準を満たし、かつ微小乳頭状を示す胞巣が 20 倍視野全体を占める場合に、微小乳頭状 (MP) PDC 陽性とした。MP PDC がみられる部位、もしくは MP PDC がみられない場合には PDC が最も多い領域の光学顕微鏡対物 20 倍視野のデジタル画像を取得し、デジタル画像内に含まれる全ての PDC について、ECS を求めた。この単位面積あたりの「ECS の平均値」、「ECS 高値の PDC の数」を指標とし、臨床病理学的指標との相関の有無の検討、Kaplan Meier 曲線を用いた予後解析を行った。

実験成績

結腸直腸癌患者 195 症例中、男性患者は 104 例、女性患者は 91 例で、手術時の年齢は平均 70.7 歳だった。このうち 11 例には PDC が認められなかった。PDC 陰性の 11 例中、術後化学療法が施行されたのは 0 例、PDC 陽性の 184 例中では 95 例 (51.6 %) であった。PDC での Ezrin の発現を検討するため、PDC 陰性の 11 例は以後の解析から除き、184 例を

対象とした。PDC 陽性の 184 例中、pT3 以上の症例は 136 例 (73.9 %), リンパ節転移陽性の症例は 66 例 (35.9 %), 術後再発をきたした症例は 28 例 (15.2 %) で、平均観察期間は 60.8 か月 (0.5 か月から 8.6 年) であった。

結腸直腸癌先進部での Ezrin 免疫染色を観察したところ、PDC や MP PDC において Ezrin 陽性細胞と陰性細胞が混在するモザイク状の染色パターンがみられ、個々の PDC の角や胞巣から突出する細胞での陽性像が目立っていた。また、budding と呼ばれる 5 細胞未満からなる腫瘍胞巣でも陽性像が目立っていた。PDC に対して上記「実験方法」で述べた ECS を算出し、更に個々の症例について「ECS の平均値」と「ECS 高値の PDC の数」の二つの指標を得た。

「ECS の平均値」はリンパ管浸潤陽性症例、PDC grade の高い症例、MP PDC 陽性の症例において有意に高かった。「ECS 高値の PDC の数」はリンパ節転移度の高い症例、リンパ管浸潤陽性症例、PDC grade の高い症例、MP PDCs 陽性の症例で有意に多かった。「ECS の平均値」「ECS 高値の PDC の数」はともに、PDC G1, G2, G3, MP PDC の順に段階的に数値が上昇していた。「ECS の平均値」が高い (>1.45) 群は低い (≤ 1.45) 群に比べ無再発生存期間が短い傾向にあったが、有意ではなかった ($p=0.2851$)。「ECS 高値の PDC の数」が多い (4 個以上) 症例は、少ない (3 個以下) 症例に比べ有意に無再発生存期間が短かった ($p=0.0067$)。一方、PDC G1, G2, G3 の 3 群および MP PDC の有無の 2 群に分けた予後解析では、PDC grade の高い群、および MP PDC 陽性の群は有意に無再発生存期間が短かった (それぞれ $p=0.0066$, $p=0.0014$)。

総括および結論

PDC G1, G2, G3, MP PDC の順に段階的に「ECS の平均値」が上昇していたことから、Ezrin は PDC から MP PDC への進展を示す一つの指標である可能性が示唆された。また、PDC から突出する細胞での陽性像が多くみられていることから、Ezrin は集団的細胞浸潤から個細胞性の浸潤へと浸潤形式を変換する部分で何らかの役割を担っている可能性が示唆された。PDC の進行については、KRAS 遺伝子変異や LCAM1 の関与等も報告されており、Ezrin 以外にも様々な要素が関わっていると考えられるが、今回我々が確立した ECS は他の抗体を用いた免疫組織学的解析にも応用可能であり、PDC の進行や浸潤の機序をより深く理解するための解析に寄与できる可能性がある。

また、結腸直腸癌において、PDC grade が高い群や MP パターンを示す群が予後不良であることはこれまでも報告されているが、治癒切除された病期 I ~ III の結腸直腸癌において、MP パターンを示す結腸直腸癌の無再発生存期間が短いことが示されたのはこれが初めてである。微小乳頭状成分を持つ結腸直腸癌では完全切除がなされていても、慎重な経過観察を要することが示された。

結論として、本研究により我々は、Ezrin 陽性細胞の PDC の角への偏りを定量化する手法を確立し、この Ezrin 陽性細胞の角への偏りが PDC の進行とリンパ管浸潤に関与していることを示した。ECS は悪性度の高い PDC を選別するマーカーとなり得るが、手法は煩雑で時間がかかるため、臨床応用にはさらに改善を要すると考えられた。