

膵上皮内病変におけるムチンとCD10の発現解析

永田 耕治

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科
先進治療科学専攻 腫瘍学講座
人体がん病理学
(旧鹿児島大学医学部病理学第二講座)
(主任：米澤傑教授)

Analysis of mucins and CD10 expression in pancreatic intraductal neoplasia

Kohji NAGATA

Department of Human Pathology
(Director: Prof. Suguru Yonezawa, M. D.),
Field of Oncology,
Course of Advanced Therapeutics,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Kagoshima University, Kagoshima 890-8544, Japan

Abstract

Background & Aims: Adequate nomenclature for precancerous lesions is essential for the understanding of carcinogenesis. Nowadays, it is believed that invasive ductal carcinoma of the pancreas (IDC) is developed from histologically well-defined precursor ductal lesions known as “pancreatic intraepithelial neoplasia” (PanIN). The PanINs are graded as PanIN-1A, -1B, -2, and -3, according to the atypia. Mucins are high molecular weight glycoproteins having oligosaccharides attached to serine or threonine residues of the mucin core protein backbone by *O*-glycosidic linkages. These mucin genes are differentially expressed by different cells and organs. Since synthesis and secretion of mucin is a common feature of glandular epithelial tissues, my laboratory have investigated the expression of mucin antigens mainly in adenocarcinomas. The study examined alterations in the pattern and level of expression of several mucins (MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, and MUC6) and most popular small intestinal type-brush border marker (CD10) in the PanIN lesions.

Methods: From the surgically resected 18 specimens (3 specimens with chronic pancreatitis, 10 specimens with intraductal papillary-mucinous adenoma, and 5 specimens with IDC), I selected 9 normal ducts, 80 PanIN lesions (PanIN-1A, 35; PanIN-1B, 20; PanIN-2, 18; PanIN-3, 7), and 8 IDC lesions. Expression profiles of the mucins and CD10 in the normal ducts, PanIN lesions and IDC lesions were examined by using immunohistochemistry.

Results: MUC1 was expressed in 33% of normal ducts, 20% of PanINs-1A, 20% of PanINs-1B, 44% of PanINs-2, 57% of PanINs-3, and 88% of IDCs. MUC2 was not expressed in any PanINs nor IDCs. MUC4 was not expressed in normal ducts, but was expressed in 14% of PanINs-1A, 5% of PanINs-1B, 11% of PanINs-2, 14% of PanINs-3, and 38% of IDCs. MUC5AC was not expressed in normal ducts, but was expressed in 83% of PanINs-1A, 90% of PanINs-1B, 100% of PanINs-2, 71% of PanINs-3, and 88% of IDCs. MUC6 was expressed in 67% of normal ducts, 83% of PanINs-1A, 75% of PanINs-1B, 72% of PanINs-2, 57% of PanINs-3, and 38% of IDCs. CD10 was expressed in 67% of normal ducts, 23% of PanINs-1A, 60% of PanINs-1B, 17% of PanINs-2, 14% of PanINs-3, and 13% of IDCs. The results showed over expression of MUC1, a pancreatic mucin, and MUC6, a gastric pyloric glandular mucin, and de novo expression of MUC4, a respiratory epithelial

mucin, and MUC5AC, a gastric foveolar epithelial mucin, in all grades of PanINs and IDCs. The expression of CD10, a small intestinal marker, was markedly decreased in PanINs and IDCs. In addition, increase in the expression of MUC1 and decrease in the expression of CD10 were correlated with grades of the PanINs.

Conclusions: Expression of both MUC5AC and MUC6, and downregulation of CD10 are early event, whereas upregulation of MUC1 is a late event in the recently defined progression model of pancreatic carcinogenesis.

Key words; Mucin, CD10, PanIN, Pancreas,

緒言

ムチン (MUC) は、消化管や気道、生殖器などの内腔を覆う粘液を構成する主要な糖タンパク質である。ほとんどのムチンは、コアタンパクとしてセリン、スレオニンに富む反復配列ドメインを持ち、O-グリコシド結合でオリゴ糖が付加されている。近年、多くのヒトムチン (MUC1-MUC9, MUC11-13, 15-17) のコアタンパク質をコードする遺伝子がクローニングされ、クロモソームでの位置も明らかにされ¹⁻⁸⁾、それぞれのムチンが、臓器ごと、細胞ごとに異なった発現を示す。Table 1に、MUC1からMUC6の一覧 (MUC3を除く) を示す。このうち、MUC1, 4は膜結合型ムチンであり、MUC2, 5AC, 6は分泌型ムチンである。これまでに、当教室で行った一連の研究において、予後不良の膵臓の浸潤性膵管癌 (Invasive ductal carcinoma: IDC) では、MUC1を高率に発現し、MUC2はほとんど発現しないという特徴を示すことを報告してきた⁸⁻¹⁰⁾。さらに、一般にIDCに比べて予後良好である膵臓の膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary-mucinous neoplasm: IPMN) が、病理組織学的に少なくとも二種類に分けられ^{8, 10-12)}、両者

で粘液形質の発現が異なり、予後にも差がある傾向があることを報告してきた^{10, 12)}。

2001年のHrubanらの報告以来、膵管病変をPancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) という“nomenclature and diagnostic criteria”で呼称することが提唱され^{13, 14)}、そのグレードは、低異型度から高異型度までPanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2, PanIN-3とされている¹³⁾。その詳細が記載されている文献¹³⁾と有名な著書“Histology for Pathologist”¹⁵⁾を見較べてみると、前者で“PanIN-1B”と表記されている写真の一部は、後者に“papillary hyperplasiaを伴うmucinous metaplasia”として、また前者の“PanIN-3”の写真の一部は、後者の“carcinoma in situ (CIS)”として掲載されている写真と全く同一のものである。さらに、PanIN-2の写真やその用語説明は、“Histology for Pathologist”¹⁵⁾に“atypical hyperplasia”として掲載されている写真やその説明と同じであると思われる、PanIN-2がこれまでのatypical hyperplasiaに相関しているという表も掲載されている。これらのことから、従来hyperplasiaやmetaplasia等としていた膵管上皮の病変を“neoplasia”として捉え、統一用語であるPanINを使用して分類しようという意図がよく分かる。現在この基

Table 1. Characteristics of human mucin core proteins.

Mucin type	Repeat peptide sequence	High level expression	Chromosome location
MUC1	GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH (20)	Breast Pancreas	1q21-23
MUC2	PTTTPITTTTIVTPTPTGTQT (23)	Colon Small intestine Airways	11p15
MUC4	TSSASTGHATPLPVD (16)	Airways Colon	3q29
MUC5AC	TTSTTSAP (8)	Stomach Airways	11p15
MUC6	SPFSSTGPMATSFQTTTTYPTPSHPQTT LPTHVPPFSTSLVTPSTGVITPPTHAQMA TSASIHSTPTGTIPPTTLKATGSTHTAPP MPTTSGTSQAHSSFSSTAKTSTSLHSHTS STHHPEVPTSTTTITPNPTSTGTSTPVAH TTSATSSRLPTPFTTHSPPTGS (169)	Stomach Gallbladder Ileum	11p15

(), number of amino acids

準で膵管病変が記載され、IDCの前癌病変や、IPMN等の良性から悪性にわたる疾患概念が、PanINを元に再構築され膵癌の癌化過程のさらなる検討が行われようとしている¹⁴⁾。

これまでのPanIN病変におけるムチン発現の研究においては、膜型ムチンのうち、MUC1は低異型度から高異型度までの各PanIN病変で高率に発現し¹⁶⁾、MUC3とMUC4は異型度の進行と共に発現率が高くなると報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。分泌型ムチンのうち、胃型の粘液形質であるMUC5ACやMUC6は低異型度の段階からかなり高率に発現するが、腸型の粘液形質であるMUC2はどの段階でもほとんど発現しない¹⁶⁾。一方、ムチン型糖鎖抗原であるSialyl Tnは高異型度であるPanIN-3の段階で高率に発現するようになる¹⁶⁾と報告されている。しかし、これまでの報告は、PanIN病変におけるおおまかなムチン発現の動向を捉えてはいるが、ムチン発現を各々の膵管ごとに厳密に比較しているわけではない。

そこで、今回、PanIN病変におけるムチン発現を各膵管ごとに厳密に比較検討するため、完全連続切片で各種のムチンの免疫組織学的染色を行い、各膵管ごとにすべて写真を撮影してそのデータを比較することにより、より客観的な評価を行うことを試みた。

一方、CD10は胃癌において小腸型形質のマーカーとして広く用いられているが^{19,20)}、これまでPanIN病変における発現を研究した報告はなされていない。今回、PanIN病変におけるCD10の発現も併せて検索し、PanIN病変におけるムチン発現との比較検討を行った。

研究材料と方法

1) 組織標本

1997年から2003年にかけて外科的に切除された18症例(慢性膵炎3例、膵管内乳頭粘液性腺腫10例、IDC5例)を、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院病理部にファイルされた症例から選択した。対象の平均年齢は68.9歳(最低年齢58歳、最高年齢79歳)、男:女比は8:10であった。対象症例の研究については、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究倫理委員会の承認を受けている(受付番号16-52)。すべての標本は10%ホルマリンで固定され、パラフィン包埋の後、4- μ mの厚さで連続的に薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色と免疫染色を行った。

2) PanINの判定基準

膵管内乳頭粘液性腺腫とIDCにおいては、摘出標本の全体を検索し、PanIN病変は、主病変から十分に離れた部位で、主病変とは連続性がないことを確認して選り出した。PanIN病変の判定基準はHruban, R.Hら^{13,14)}の文献

による基準を用いた。概略は以下の通りである。

●正常膵管上皮: 正常上皮は立方から低円柱上皮細胞からなり、核の重層化や異型を認めない。

●PanIN-1A: 平坦な構造で、胃の腺窩上皮様の高円柱上皮細胞で内腔を覆われ、核は球形から卵円形である。

●PanIN-1B: 円柱上皮細胞で覆われる低乳頭状の構造を示し、核は球形から卵円形である。核の重層化や異型を認めない。乳頭状構造の基部で胃の幽門腺様の構造を示すことがある。

●PanIN-2: 異型を持つ円柱上皮が、平坦ないし乳頭状構造を示す。乳頭状構造は線維性の間質を持つ。異型細胞は、長く延長した核を持ち、中には偽重層化を示す部位を持つ。核分裂像はほとんどみられない。

●PanIN-3: 著明な異型を示す円柱ないし立方上皮が低乳頭状から乳頭状構造、稀に平坦構造を示す。核の極性は消失し明瞭な核小体を持つ。

3) 免疫組織化学

抗体

一次抗体として、MUC1の検出には、マウスモノクローナル抗体「DF3」(mouse IgG, Fujirebio Diagnostics, Inc. U.S.A.)を用いた。DF3はMUC1コアタンパク(TRPAPGS)を認識し、糖鎖の存在下でタンパク質との結合が増強されるといわれている²¹⁾。MUC2の検出には、ポリクローナル「抗MUC2抗体」を用いた。「抗MUC2抗体」は、Takara Custom Services Center (Ohtsu, Japan)に依頼して、スレオニンの豊富な「PTTTPISITTTMVTPTPTPTGTQT」の23アミノ酸からなるタンデムリピート構造を持つMUC2ペプチドを合成し、それを抗原として用いてGumら²²⁾の記載した方法に若干の変法を加えて作製した¹²⁾。MUC4の検出には、マウスモノクローナル抗体「clone 8G7」(Surinder K. Batra, Ph.D., Department of Biochemistry and Molecular Biology, Eppley Cancer Institute, University of Nebraska Medical Center, Omaha, U.S.A.より供与)を用いた。^{23,24)} MUC5ACの検出には、マウスモノクローナル抗体「NCL-MUC-5AC」(Novocastra, Newcastle, U.K.)を用いた。MUC6の検出には、マウスモノクローナル抗体「NCL-MUC-6」(Novocastra, Newcastle, U.K.)を用いた。CD10の検出には、マウスモノクローナル抗体「56C6」(Novocastra, Newcastle, U.K.)を用いた。

二次抗体として、ビオチン化されたウマ-抗マウスIgGならびにヤギ-抗ウサギIgGを用いた。アビジン・ビオチン標識化ペルオキシダーゼ複合体(ABC複合体)としてはVector LaboratoriesのVectastain ABC kit (Burlingame, CA, U.S.A.)を用いた。

染色方法

免疫染色はABC複合体を使う免疫ペルオキシダーゼ法を用い、文献に記載された手技で行った^{12,26-27}。標本は1%ウシ血清アルブミンとリン酸緩衝生理食塩水で希釈されたそれぞれの一次抗体で (DF3, 1:10; anti-MUC2, 1:40,000; clone 8G7, 1:3000; NCL-MUC-5AC, 1:100, NCL-MUC-6, 1:100; and 56C6, 1:80), 切片上で4℃, 16時間インキュベートした。標本はPBSで3回洗い, ビオチン化した二次抗体でインキュベートし, さらにPBSで3回洗浄した。標本をABC複合体で30分間処理した後, PBSで3回洗浄し, 標本はdiaminobenzidine基質で10分から30分の間発色した。流水で洗浄しhematoxylinで核染後封入した。コントロールとして一次抗体の代わりに非免疫血清とPBSを用いたが, 発色反応は生じなかった。

画像撮影

観察対象としたすべての正常膵管, PanIN病変, IDC病変については, 連続切片上で, ヘマトキシリン-エオジン染色と免疫染色の撮影を行い, 厳密に同一部位を撮影したデジタル写真で評価を行った。デジタル写真撮影はカラーデジタルカメラ (COOLPIX995, Nikon, Tokyo, Japan) を光学顕微鏡 (BX51, OLYMPUS, Tokyo, Japan) に接続して行った。

免疫染色の結果の評価

免疫染色標本を撮影した画像上で陽性の細胞をカウントし, 陽性細胞のパーセンテージによって次のように評価した。陽性細胞が5%未満の場合を「-」, 陽性細胞が5%以上50%未満の場合を「+」, 50%以上の場合を「++」。病変としては, 陽性細胞の割合が5%以上の病変を

陽性と評価した。

4) 統計解析

低異型度PanIN (PanIN-1A, -1B) 病変と, 高異型度PanIN (PanIN-2, -3) 病変の陽性率はtwo-tailed Fisher exact testによって検定した。

正常, PanIN-1A, -1B, -2, -3, IDCの6群において, 染色のグレード (-, +, ++) を加味した染色性に段階制があるかどうかについてはスピアマン順位相関係数検定を行った。

同様に6群間において, 染色のグレード (-, +, ++) を加味した染色性に独自性があるかどうかについては, それぞれの群間の比較をTukeyのHSD検定で行った。すべての統計処理はJMP 5.1 (SAS Institute Inc., USA) を用い, 検定は危険率5%未満を有意とした。

研究結果

1) ムチンの正常膵管, PanIN病変, 浸潤性膵管癌における発現の概要

切除された18症例の膵臓組織から97ヶ所の部位を選び (正常膵管9ヶ所, PanIN病変80ヶ所, IDC8ヶ所), 免疫染色標本のデジタル写真画像で評価を行った。PanIN病変80ヶ所の内訳はPanIN-1A:35病変, PanIN-1B:20病変, PanIN-2:18病変, PanIN-3:7病変であった。症例からサンプリングした正常膵管, PanIN病変, IDCのまとめをTable 2に, 免疫染色の結果のまとめをTable 3に示す。

Table 2. Distribution of normal duct, PanINs and IDCs in 18 cases examined.

	Normal duct epithelium	PanIN-1A	PanIN-1B	PanIN2	PanIN3	IDC
Chronic pancreatitis	3	7	5	0	0	0
IPMA*	2	22	10	12	0	0
IDC	4	6	5	6	7	8

*IPMA: intraductal papillary-mucinous adenoma.

Table 3. Expression rates of each mucin and CD10 in normal duct, PanINs and IDCs.

Antibody	Normal duct epithelium	PanIN-1A	PanIN-1B	PanIN2	PanIN3	IDC	P-value*
MUC1	3/9(33%)	7/35(20%)	4/20(20%)	8/18(44%)	4/7(57%)	7/8(88%)	0.016
MUC2	0/9(0%)	0/35(0%)	0/20(0%)	0/18(0%)	0/7(0%)	0/8(0%)	NS
MUC4	0/9(0%)	5/35(14%)	1/20(5%)	2/18(11%)	1/7(14%)	3/8(38%)	NS
MUC5AC	0/9(0)	29/35(83%)	18/20(90%)	18/18(100%)	5/7(71%)	7/8(88%)	NS
MUC6	6/9(67%)	29/35(83%)	15/20(75%)	13/18(72%)	4/7(57%)	3/8(38%)	NS
CD10	6/9(67%)	8/35(23%)	12/20(60%)	3/18(17%)	1/7(14%)	1/8(13%)	0.033

P values represent the comparison of immunohistochemical abnormalities between "low grade" (PanIN-1A and -1B) versus "high grade" (PanIN-2 and -3) using two-tailed Fisher exact test.

2) MUC1の発現

MUC1の代表的染色結果をFig. 1に示す。MUC1の発現頻度は、正常膵管で33% (+:0/9, ++:3/9), PanIN-1A病変で20% (+:5/35, ++:2/35), PanIN-1B病変で20% (+:2/20, ++:2/20), PanIN-2病変で44% (+:4/18, ++:4/18), PanIN-3病変で57% (+:2/7, ++:2/7), IDCでは88% (+:0/8, ++:7/8)であった。

すなわち、MUC1は、PanIN-2以降過剰発現するようになり、IDCでは高発現を示し、軽度異型PanIN (PanIN-1A, PanIN-1B) と高度異型PanIN (PanIN-2, PanIN-3) との間で陽性率に有意差を認めた (P=0.016)。

正常, PanIN-1A, -1B, -2, -3, IDCの6群のスピアマン順位相関係数検定の結果は相関係数0.3298, p値0.001であり、異型性のグレードが上がるに従って、MUC1の染

色性が段階的に上昇する傾向が見られた。また、TukeyのHDS検定では、正常, PanIN-1A, -1B, -2, -3, IDCの6群の染色性に独自性を認めた (P<0.05)。

3) MUC2の発現

MUC2の発現は、正常膵管で0% (+:0/9, ++:0/9), PanIN-1A病変で0% (+:0/35, ++:0/35), PanIN-1B病変で0% (+:0/20, ++:0/20), PanIN-2病変で0% (+:0/18, ++:0/18), PanIN-3病変で0% (+:0/7, ++:0/7), IDCでは0% (+:0/8, ++:0/8)であった。軽度異型PanIN (PanIN-1A, PanIN-1B) と高度異型PanIN (PanIN-2, PanIN-3)の間には有意差を認めなかった (P=1)。

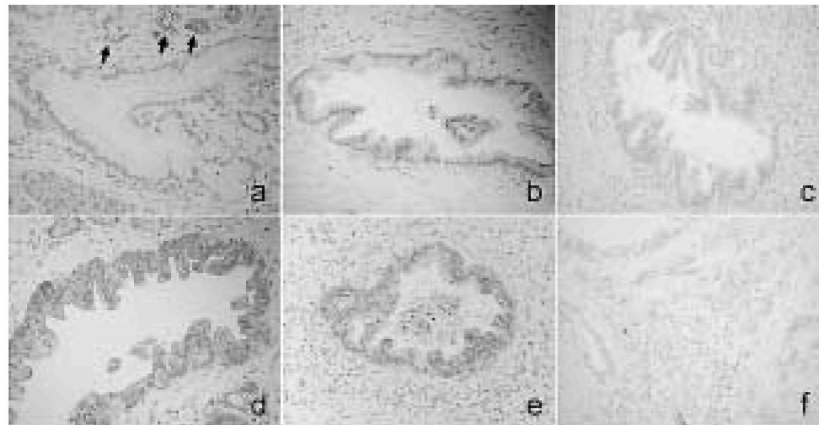


Fig. 1. MUC1 Expression in PanIN lesions and invasive ductal carcinoma. MUC 1 is not expressed in PanIN-1A (a), but is expressed in the apical surface of normal cuboidal epithelium of the small pancreatic ducts (a, arrows). MUC1 is expressed sparsely in the apical surface of PanIN-1B (b). MUC1 is not expressed in PanIN-2 in this duct (c). MUC1 is apparently expressed in PanIN-3 (d and e) and IDC (f). ×200.

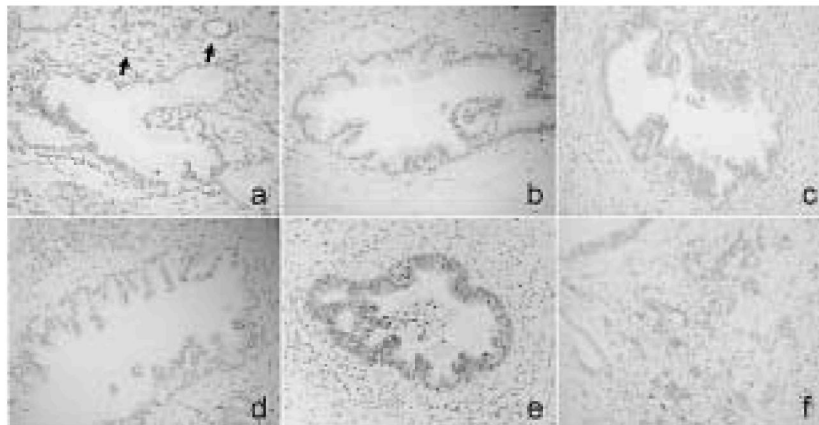


Fig. 2. MUC4 Expression in PanIN lesions and invasive ductal carcinoma. MUC4 is not expressed in the normal cuboidal epithelium of the small pancreatic ducts (a, arrows). MUC4 is not expressed in PanIN-1A (a), PanIN-1B (b) and PanIN-2 (c). MUC4 is not expressed in one lesion of PanIN-3 (d) but is pronounced positive for another lesion of PanIN-3 (e) and IDC (f). ×200.

4) MUC4の発現

MUC4の代表的染色結果をFig. 2に示す。MUC4の発現頻度は、正常膵管で0% (+:0/9, ++:0/9), PanIN-1A病変で14% (+:2/35, ++:3/35), PanIN-1B病変で5% (+:0/20, ++:1/20), PanIN-2病変で11% (+:2/18, ++:0/18), PanIN-3病変で14% (+:1/7, ++:0/7), IDCでは38% (+:1/8, ++:2/8)であった。軽度異型PanIN (PanIN-1A, PanIN-1B)と高度異型PanIN (PanIN-2, PanIN-3)との間には有意差を認めなかった ($P=1$)。

6群のスピアマン順位相関係数検定の結果は相関係数0.1285, p 値0.2098であり、異型性のグレードが上がるに従って、MUC4の染色性が段階的に上昇する傾向はなかった。また、TukeyのHSD検定では、6群の染色性に独自性はなかった。

5) MUC5ACの発現

MUC5ACの代表的染色結果をFig. 3に示す。MUC5ACの発現頻度は、正常膵管で0% (+:0/9, ++:0/9), PanIN-1A病変で83% (+:0/35, ++:29/35), PanIN-1B病変で90% (+:2/20, ++:16/20), PanIN-2病変で100% (+:0/18, ++:18/18), PanIN-3病変で71% (+:0/7, ++:5/7), IDCでは88% (+:2/8, ++:5/8)であった。軽度異型PanIN (PanIN-1A, PanIN-1B)と高度異型PanIN (PanIN-2, PanIN-3)との間には有意差を認めなかった ($P=0.3226$)。MUC5ACは、正常膵管ではまったく発現せず、PanIN-1A病変から高度に発現するようになり、癌組織においても高度に発現していた。

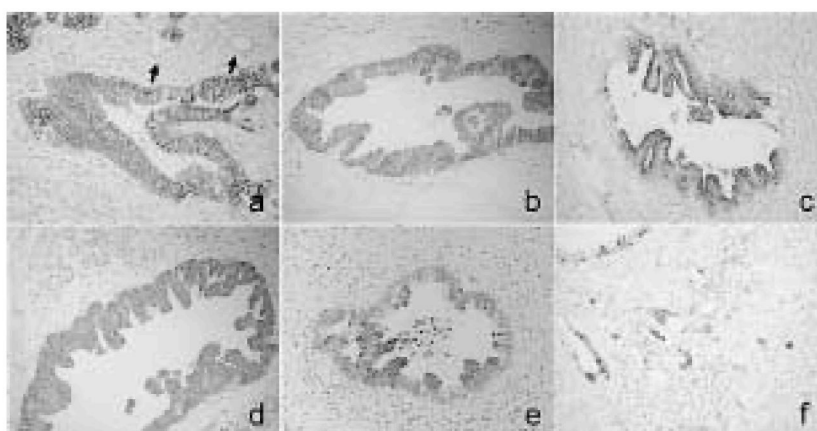


Fig. 3. MUC5AC Expression in PanIN lesions and invasive ductal carcinoma. MUC5AC is not expressed in the normal cuboidal epithelium of the small pancreatic ducts (a, arrows). In contrast, MUC5AC is expressed in the cytoplasm of PanIN-1A (a), PanIN-1B (b), PanIN-2 (c), PanIN-3 (d and e), and IDC (f). $\times 200$.

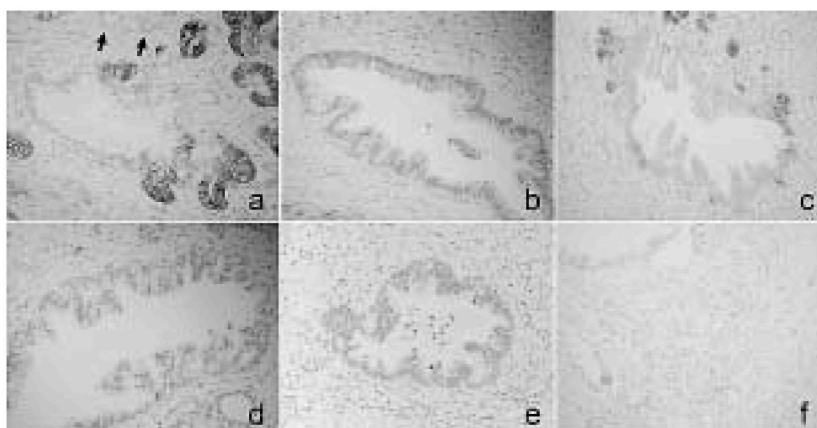


Fig. 4. MUC6 Expression in PanIN lesions and invasive ductal carcinoma. MUC6 is expressed in the normal cuboidal epithelium of the small pancreatic ducts (a, arrows). MUC6 is expressed in the cytoplasm of PanIN-1A (a), PanIN-1B (b) and PanIN-2 (c). The positive cells are mainly located in the basal region of the low-papillary pattern. MUC6 is expressed sparsely in one PanIN-3 (d) but not expressed in another PanIN-3 (e). MUC6 is slightly positive in IDC (f). $\times 200$.

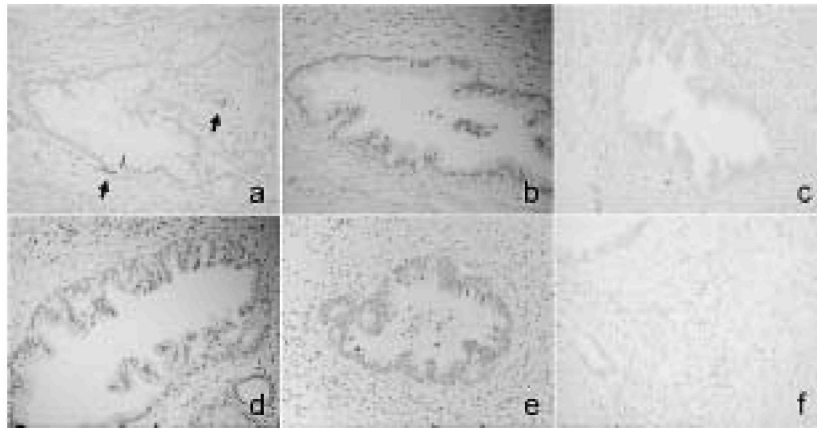


Fig. 5. CD10 Expression in PanIN lesions and invasive carcinoma. CD10 is expressed in the apical surface of normal cuboidal epithelium of the small pancreatic ducts (a, arrows). CD10 is slightly positive for apical surface of PanIN-1A (a). CD10 is not expressed in PanIN-1B (b) in this duct. CD10 is not expressed in PanIN-2 (c) and PanIN-3 (d and e). CD10 is not expressed in IDC, but is positive for infiltrated inflammatory cells among the carcinoma cells. $\times 200$.

6) MUC6の発現

MUC6の代表的結果をFig. 4に示す。MUC6の発現頻度は、正常膵管で67% (+:3/9, ++:3/9), PanIN-1A病変で83% (+:6/35, ++:23/35), PanIN-1B病変で75% (+:5/20, ++:10/20), PanIN-2病変で72% (+:9/18, ++:4/18), PanIN-3病変で57% (+:2/7, ++:2/7), IDCでは38% (+:2/8, ++:1/8)であった。MUC6は、PanIN-1Aの早期病変から出現し、それ以降の全てのPanINに発現するが、PanINのグレードが上がるに従って段階的にその発現率が減少する傾向がみられた。しかし、軽度異型PanIN (PanIN-1A, PanIN-1B) と高度異型PanIN (PanIN-2, PanIN-3) との間には有意差を認めなかった ($P=0.2669$)。

6群のスピアマン順位相関係数検定の結果は相関係数 -0.2733 , p 値 0.0068 であり、異型性のグレードが上がるに従って、MUC6の染色性が段階的に下向する傾向がみられた。また、TukeyのHSD検定では、6群の染色性に独自性はなかった。

7) CD10の発現

CD10の代表的染色結果をFig. 5に示す。CD10の発現は、正常膵管で67% (+:0/9, ++:6/9), PanIN-1A病変で23% (+:7/35, ++:1/35), PanIN-1B病変で60% (+:7/20, ++:5/20), PanIN-2病変で17% (+:1/18, ++:1/18), PanIN-3病変で14% (+:0/7, ++:1/7), IDCでは13% (+:1/8, ++:0/8)であった。CD10は、正常膵管で高発現を示したが、PanIN-1A病変で発現が低下し、PanIN-1B病変で高発現を示すものの、PanIN-2病変より高いグレードでは、再度、低発現となった。軽度異型PanIN (PanIN-1A, PanIN-1B) と高度異型PanIN (PanIN-2, PanIN-3) の間には有意差

を認めた ($P=0.033$)。

考 察

当教室ではこれまで膵胆管系腫瘍を含む様々なヒト腫瘍におけるムチンの発現を検討し、予後を含む臨床病理学的因子との比較を行ってきたが、特に、膵胆管系腫瘍においては、膜型ムチンのMUC1やMUC4の発現は腫瘍の浸潤性増殖や患者の不良な予後との密接な関連があり、一方、分泌型ムチンのMUC2の発現は腫瘍の非浸潤性や患者の良好な予後に関連していた^{8-10,12,23,24,28-30}。

2001年以来、Hrubanら^{13,14}によって、IDCの初期病変としてPanINという概念が提唱され、膵癌の発生初期像をこれらの病変に求めている。PanINにおけるムチン発現についても、少数ながら報告はあるが¹⁶⁻¹⁸、それらの論文の報告では、PanIN病変の各グレードにおけるムチン発現のおおまかな傾向は把握されているものの、本研究によって行われたような写真画像上での微少な膵管ごとの客観的な観察までは行われていない。本研究ではデジタル写真画像を用いた客観的評価により、これまでの報告によるPanINにおけるムチン発現の検証を行った。

まず、膜型ムチンのMUC1とはMUC4の発現について考察する。MUC1は、PanIN-2以降過剰発現するようになりIDCでは高発現を示し、その傾向は、Kimらの報告¹⁶と類似していた。Adsayらは、IPMNからとPanINからの2方向の癌化過程とMUC1とMUC2の発現について述べており³¹、PanINからの癌化過程では、MUC1の発現率が段階的に高率になってゆくとしている報告にも一致する。ただし、MUC1の発現については、正常膵組織においても、小さなサイズの膵導管系上皮の管腔表面に発現していることがわかっており^{9,10}、PanIN-1AやPanIN-1B

といったかつてmucinous hyperplasiaと呼ばれていたような低異型度の病変におけるMUC1の発現は、単に、正常膵導管におけるMUC1の発現がそのまま残っているにすぎない可能性もある。しかしながら、PanIN-2以降のMUC1の過剰発現は、IDCにおけるMUC1の高発現に関連するものであろう。なお、Kimらの報告では、MUC1の検出にHMFG-2というある程度糖鎖の結合したMUC1を検出する抗体を用いており¹⁶⁾、今回の研究で用いた、主としてMUC1のコア蛋白を検出する抗体であるDF3のPanIN病変における陽性率よりかなり高い陽性率を示し、PanIN病変のグレードの進行とも明確な関連性を見いだせていなかった。今回の研究で用いたDF3で検出されるMUC1は、低異型度群 (PanIN-1A, PanIN-1B) と高異型度群 (PanIN-2, PanIN-3) の間に有意差を認めた ($P=0.016$)。さらに、スピアマン順位相関係数検定やTukeyのHSD検定でも、正常、PanIN-1A, -1B, -2, -3, IDCの6群間において、段階制と独自性がみられ、PanIN病変の進行とMUC1発現との関連性を検討するには、DF3抗体の方が有益であることが判明した。

MUC4の発現については、正常膵導管においては全く発現せず、PanIN病変からde novo発現を認めた点はこれまでのParkやSwartzらの結果と矛盾しなかった^{17,18)}。しかしながら、本研究では、ParkやSwartzらとまったく同じ抗体を使用し、同じ方法で免疫染色をしたにもかかわらず、IDC自体におけるMUC4の陽性率が38%と、Parkらの79%、Swartzらの89%と比較してかなり低かった。Parkらは10%以上を陽性、Swartzらは1%以上を陽性としており、我々の5%以上を陽性とした基準とは異なるものの、1%以上を陽性とした場合でもIDC自体におけるMUC4の陽性例は半数にも満たなかった。IDC自体におけるMUC4の陽性率の低さと相応して、PanIN病変におけるMUC4の陽性率もParkやSwartzらのデータに比べて全般的に低い数値になっている。135例のIDCにおけるMUC4の発現を検索した教室のSaitouらの最近の研究でも、IDC自体のMUC4の陽性率は、今回と同様31.9%であり、さらに、肝の腫瘍形成型胆管細胞癌でもMUC4の陽性率はIDCの場合と似た37%であることから²⁴⁾、PanIN病変とIDCにおけるMUC4の陽性率についての今回のデータには信頼性があると判断される。

続いて、分泌型ムチンの発現について考察する。腸型ムチンのMUC2は全てのグレードのPanINならびにIDCに全く発現しなかった。このデータは、Kimら¹⁶⁾のデータにはほぼ一致する。また、前述したAdsayらのIPMNからとPanINからの2方向の癌化過程とMUC1とMUC2の発現の報告では、PanINからの癌化過程ではMUC2は陰性のまま推移するとしている³¹⁾。今回のデータはこうした現象を確認したことになる。

MUC5ACは、正常胃組織においては表層粘膜上皮に特異的に局在しているが、正常膵組織では、導管をはじめどの部位にも発現していない。しかしながら、PanIN-1Aという最も異型度の低いPanIN病変から高率に発現するようになり、正常導管上皮とPanIN病変との間には大変大きな差があることから、PanINの初期病変の検出には有利といえるが、PanIN病変のどのグレードにも、さらにはIDCでも同様に高い陽性率を示すことから、PanIN病変の悪性化の指標にはなり得ない。

MUC6はPanIN-1Aの早期病変から出現し、それ以降の全てのPanINやIDCに発現したが、IDCの陽性率の38%に向かって段階的にその発現率が減少する傾向がみられた。このような現象は、Kimらの報告でもみられ¹⁶⁾、癌化過程におけるMUC6の発現の減衰の原因に興味を持たれる。MUC6は、正常胃組織の幽門腺や十二指腸のブルネル腺に局在しており、このような独特の腺の分化に関連するムチン抗原ともいえる。PanIN病変のグレードの進行に伴うMUC6の発現の減衰は、脱分化に関連しているかもしれない。

MUC5AC, MUC6, MUC2はMUC5Bと共に同じ、11p15のクロモソームに局在している。これら4つの遺伝子はいくつかの構造上の特徴を共有しており、分泌型ゲル形成ムチンをコードし、MUC6, MUC2, MUC5AC, MUC5Bの順序で11p15のクロモソームに配列する³²⁾。この11p15クロモソーム上のムチン遺伝子の配列が、PanIN病変でMUC5ACとMUC6は高率に発現するのに対し、MUC2はほとんど発現しないという現象に関係するか否かは、将来の重要な研究課題と考えられる。

今回初めてPanIN病変で検索が行われたCD10は、もともとはcommon acute lymphocytic leukemia antigenとしてプレB細胞による白血病の特異抗原と見なされていたが³³⁾、小腸上皮の刷子縁にも陽性であることが判明し³⁴⁻³⁷⁾、そのほか気管支上皮、培養線維芽細胞、骨髄のストローマ細胞、毛細胆管などにも陽性であることが知られている³⁸⁾。また、胃癌においては、MUC2と共に腸型形質のマーカーとして、胃型胃癌、腸型胃癌の鑑別に用いられており、その有用性が指摘されている^{19,20)}。今回、CD10の発現が正常膵導管に高率に認められることを明らかにし、PanIN病変においては、CD10の発現は高異型度PanIN病変で有意に陽性率が低下していた。CD10は、PanIN-2病変以降にその発現が低下し、高異型度のPanIN病変では小腸上皮にみられる刷子縁構造がなくなることが示唆された。このことは、癌化においては、細胞分化が低下するという考えに矛盾しないと考えられる。

結 論

今回の検索の結果、膵管上皮の癌化の過程におけるPanIN病変では、早期の低異型度のうちにMUC5AC, MUC6という胃型の粘液を発現する形質を獲得する。高異型度になると、CD10で同定される刷子縁構造を失う。膜型ムチンのMUC1は段階的に異型度の上昇に伴って高発現するようになり、その高異型度PanIN病変での有意な高発現は、IDCでのMUC1の発現に関連すると考えられた。一方、MUC2はどの段階でのPanIN病変にも発現せず、IDCでMUC2が発現しないという現象に関連すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を御指導、さらには御校閲賜りました恩師米澤傑教授に深謝いたします。

文 献

1. D'Cruz OJ, Dunn TS, Pichan P, Hass GG, Jr., Sachdev GP. Antigenic cross-reactivity of human tracheal mucin with human sperm and trophoblasts correlates with the expression of mucin 8 gene messenger ribonucleic acid in reproductive tract tissues. *Fertil Steril* 1996; 66: 316-26.
2. Gum JR, Jr., Crawley SC, Hicks JW, Szymkowski DE, Kim YS. MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 466-75.
3. Lapensee L, Paquette Y, Bleau G. Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertil Steril* 1997; 68: 702-8.
4. Pallesen LT, Berglund L, Rasmussen LK, Petersen TE, Rasmussen JT. Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2755-63.
5. Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res* 1999; 59: 4083-9.
6. Williams SJ, Wreschner DH, Tran M, Eyre HJ, Sutherland GR, McGuckin MA. Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18327-36.
7. Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer* 2002; 98: 737-40.
8. Yonezawa S, Sato E. Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential. *Pathol Int* 1997; 47: 813-30.
9. Osako M, Yonezawa S, Siddiki B, Huang J, Ho JJ, Kim YS, et al. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors. *Cancer* 1993; 71: 2191-9.
10. Horinouchi M, Nagata K, Nakamura A, Goto M, Takao S, Sakamoto M, et al. Expression of Different Glycoforms of Membrane Mucin (MUC1) and Secretory Mucin (MUC2, MUC5AC and MUC6) in Pancreatic Neoplasms. In: *Acta Histochemica et Cytochemica*; 2003; 36: 443-53.
11. Yonezawa S, Horinouchi M, Osako M, Kubo M, Takao S, Arimura Y, et al. Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors: its relationship with the biological behavior of the tumor. *Pathol Int* 1999; 49: 45-54.
12. Nakamura A, Horinouchi M, Goto M, Nagata K, Sakoda K, Takao S, et al. New classification of pancreatic intraductal papillary-mucinous tumour by mucin expression: its relationship with potential for malignancy. *J Pathol* 2002; v197: 201-10.
13. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 579-86.
14. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, et al. An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 977-987.
15. Klimstra DS, editor. *Histology for Pathologist*. Second ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
16. Kim GE, Bae HI, Park HU, Kuan SF, Crawley SC, Ho JJ, et al. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 2002; 123: 1052-60.
17. Park HU, Kim JW, Kim GE, Bae HI, Crawley SC, Yang SC, et al. Aberrant expression of MUC3 and MUC4 membrane-associated mucins and sialyl Le(x) antigen in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* 2003; 26: e48-54.

18. Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, et al. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 791-6.
19. Tajima Y, Yamazaki K, Nishino N, Morohara K, Yamazaki T, Kaetsu T, et al. Gastric and intestinal phenotypic marker expression in gastric carcinomas and recurrence pattern after surgery-immunohistochemical analysis of 213 lesions. *Br J Cancer* 2004; 91: 1342-8.
20. Shimada S, Matsuzaki H, Marutsuka T, Shiomori K, Ogawa M. Gastric and intestinal phenotypes of gastric carcinoma with reference to expression of brain (fetal)-type glycogen phosphorylase. *J Gastroenterol* 2001; 36: 457-64.
21. Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, Kufe D. Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 2320-3.
22. Gum JR, Jr., Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 2440-6.
23. Shibahara H, Tamada S, Higashi M, Goto M, Batra SK, Hollingsworth MA, et al. MUC4 is a novel prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type. *Hepatology* 2004; 39: 220-9.
24. Saitou M, Goto M, Horinouchi M, Tamada S, Nagata K, Hamada T, et al. MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *J Clin Pathol* 2005. in press.
25. Higashi M, Yonezawa S, Ho JJ, Tanaka S, Irimura T, Kim YS, et al. Expression of MUC1 and MUC2 mucin antigens in intrahepatic bile duct tumors: its relationship with a new morphological classification of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 1999; 30: 1347-55.
26. Nakagohri T, Kinoshita T, Konishi M, Inoue K, Takahashi S, Tanizawa Y, et al. Mucin-producing intrahepatic cholangiocarcinoma with portal vein thrombosis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 2194-5.
27. Tamada S, Goto M, Nomoto M, Nagata K, Shimizu T, Tanaka S, et al. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in extrahepatic bile duct carcinomas: its relationship with tumor progression and prognosis. *Pathol Int* 2002; 52: 713-23.
28. Yamashita K, Yonezawa S, Tanaka S, Shirahama H, Sakoda K, Imai K, et al. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 82-91.
29. Kitamura H, Yonezawa S, Tanaka S, Kim YS, Sato E. Expression of mucin carbohydrates and core proteins in carcinomas of the ampulla of Vater: their relationship to prognosis. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 631-40.
30. Yonezawa S, Sueyoshi K, Nomoto M, Kitamura H, Nagata K, Arimura Y, et al. MUC2 gene expression is found in noninvasive tumors but not in invasive tumors of the pancreas and liver: its close relationship with prognosis of the patients. *Hum Pathol* 1997; 28: 344-52.
31. Adsay NV, Merati K, Andea A, Sarkar F, Hruban RH, Wilentz RE, et al. The dichotomy in the preinvasive neoplasia to invasive carcinoma sequence in the pancreas: differential expression of MUC1 and MUC2 supports the existence of two separate pathways of carcinogenesis. *Mod Pathol* 2002; 15: 1087-95.
32. Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zouitina S, d'Hooge MC, et al. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* 1996; 38: 340-52.
33. Ritz J, Pesando JM, Notis-McConarty J, Lazarus H, Schlossman SE. A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen. *Nature* 1980; 283: 583-5.
34. Trejdosiewicz LK, Malizia G, Oakes J, Losowsky MS, Janossy G. Expression of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA gp100) in the brush border of normal jejunum and jejunum of patients with coeliac disease. *J Clin Pathol* 1985; 38: 1002-6.
35. Ronco P, Allegri L, Melcion C, Pirotsky E, Appay MD, Bariety J, et al. A monoclonal antibody to brush border and passive Heymann nephritis. *Clin Exp Immunol* 1984; 55: 319-32.
36. Metzgar RS, Borowitz MJ, Jones NH, Dowell BL. Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J Exp*

- Med 1981; 154: 1249-54.
37. Danielsen EM, Vyas JP, Kenny AJ. A neutral endopeptidase in the microvillar membrane of pig intestine. Partial purification and properties. *Biochem J* 1980; 191: 645-8.
 38. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 1993; 82: 1052-70.