

論 文 要 旨

MUC4 Expression is a Novel Prognostic Factor in Patients with Invasive
Ductal Carcinoma of the Pancreas

MUC4 は浸潤性膵管癌患者における新しい
予後因子である

齋藤 幸

【序論および目的】

浸潤性膵管癌は依然予後不良の疾患であり、日本における5年生存率は9.7%である。ムチンは、蛋白骨格にオリゴ糖側鎖がO-グリコシド結合した構造をとる高分子糖蛋白であり、これまでの我々は、MUC1 ムチンの発現は不良な予後に関連し、MUC2 の発現は良好な予後に関連することを報告してきた。MUC4 は、当初、気管・気管支型ムチンとして報告された膜結合型ムチンであり、様々な正常ヒト組織に発現する。MUC4 は、正常の膵や胆管上皮には発現しないが、浸潤性膵管癌には発現し、さらに、前癌病変である pancreatic intraepithelial neoplasia において、そのグレードが上がるにつれ発現頻度が増加することが報告されている。最近、我々は、腫瘍形成型肝内胆管癌において、MUC4 の発現が新しい予後不良因子であることを初めて報告した (Hepatology 2004 39:220-229)。本研究の目的は、まだ検索されていない浸潤性膵管癌における MUC4 の発現と予後との関連性を検討することであった。また、MUC4 の subunit が intramembrane ligand として ErbB2 と結合し、p27 の発現を誘導する機序が報告されており、あわせて、ErbB2、p27 の発現も検討した。さらに、比較のため、様々な癌で予後不良因子として報告してきた MUC1 の発現についても検討した。

【材料および方法】

既採取病理検体から、倫理審査のもとに収集した浸潤性膵管癌の外科切除症例 135 例を対象とし、ホルマリン固定パラフィン切片を用い、MUC4 の発現ならびに、MUC4 の発現と関連があるとされている ErbB2 と p27 の発現、さらに、MUC1 の発現を ABC 法による免疫組織化学的染色で検索した。各抗原の発現程度の評価は、腫瘍細胞の陽性染色の比率が、5%未満を一、5%から 20%までを+、20%から 50%までを++、50%以上を+++とした。

統計学的検討をするにあたって、各抗原の発現程度を低発現群(20%未満)と、高発現群(20%以上)に二分し検討した。さらに、その検索結果と予後をはじめとする臨床病理学的因子との関連性を、単変量解析や多変量解析を用いて比較検討した。

【結 果】

1. MUC4 は正常膵組織に発現を認めなかった。MUC4 は浸潤性膵管癌 135 例中 43 例 (31.9%) に発現し、ErbB2 は 46 例 (34.1%)、p27 は 62 例 (45.9%)、MUC1 は 116 例 (85.9%) に発現していた。
2. MUC4 の発現と、ErbB2、p27、あるいは、MUC1 の発現には有意な相関は認められなかった。
3. MUC4 の高発現群は 21 例 (15.6%)、低発現群は 114 例 (84.4%) であったが、MUC4 の高・低発現と各臨床病理学

的因子との間には有為な相関はなかった。他の抗原では、ErbB2 の発現と組織学的分化度に有為な相関があったが(p=0.0234)、p27 も MUC1 も各臨床病理学的因子との間に有為な相関はなかった。

4. カプラン・マイヤー法による生存率曲線の検討では、MUC4 高発現群は MUC4 低発現群に対して、p=0.0043 と有為に生存率が不良であった。さらに、各抗原を組み合わせた生存率曲線では、MUC4 高発現かつ p27 高発現の群は、MUC4 低発現かつ p27 低発現の群に対して p<0.0001 と有為に生存率が不良であった。
5. 臨床病理学的因子を併せた検討では、単変量解析において、MUC4 高発現 (p=0.0061、hazard ratio (HR) 2.127、95% confidence interval (CI) 1.240 - 3.649)、T 因子(>T2) (p=0.0436、HR 1.846、95%CI 1.018 - 3.350)、遠隔転移 (p=0.0383、HR 2.438、95% CI 1.049 - 5.665)、リンパ管浸襲 (p=0.0243、HR 3.208、95% CI 1.163 - 8.846)、切除断端陽性 (p=0.0333、HR 1.608、95% CI 1.038 - 2.490) が予後不良因子であった。
6. 単変量解析で p<0.2 であった因子を用いた多変量解析では、MUC4 高発現のみ (p=0.0165、HR 1.956、95% CI 1.130 - 3.384) が予後不良因子であった。
7. バックワード・ステップワイズ法による多変量解析では、MUC4 高発現 (p=0.0121、HR 2.005、95% CI 1.164 - 3.452)、リンパ節転移 (p=0.0245、HR 1.687、95% CI 1.069 - 2.660)、リンパ管浸襲 (p=0.0239、HR 3.282、95% CI 1.170 - 9.207) が独立した予後不良因子であった。

【結論及び考察】

本研究は、腫瘤形成型肝内胆管癌患者と同様に、浸潤性膵管癌患者においても、MUC4 高発現群は MUC4 低発現群に対して有為に生存率が不良であることを初めて明らかにし、単変量解析、多変量解析、ならびに、バックワード・ステップワイズ法による多変量解析で、MUC4 高発現が予後不良因子であることを示した。このような所見は、膵癌の発癌モデルである pancreatic intraepithelial neoplasia において、そのグレードが上がるにつれて MUC4 の発現が増強するということとも関連しているかもしれない。

MUC4 と ErbB2 の複合体は、p27 の up regulation もしくは down regulation のスイッチとして機能し、増殖と分化を調節するというモデルが提唱されている。本研究では、ErbB2 は有意な予後因子ではなく、MUC4 と ErbB2 の発現の間に相関も認めなかった。一方、MUC4 と p27 の双方ともに高発現の群が、MUC4 と p27 の双方ともに低発現の群より生存率曲線において予後不良であり、膵癌においては、p27 の up regulation が MUC4 発現により誘導されている可能性がある。

MUC4 は、細胞膜表面から突出する巨大分子であり、細胞接着や間質との相互作用を修飾する可能性が指摘されている。さらに、MUC4 の過発現は、腫瘍細胞表面の抗原をマスクすることにより、細胞障害性リンパ球の攻撃から逃れる機序も報告されている。これらの現象が、MUC4 高発現の膵癌患者の予後に関連しているかもしれない。

腫瘤形成型肝内胆管癌において、MUC1 が管腔表面細胞膜ないしは細胞膜に発現していたのに対し、MUC4 は細胞質のみに発現していたが、本研究で、浸潤性膵管癌でも MUC4 が細胞質に発現していることが確認できた。MUC1 も MUC4 も細胞情報伝達機能をもつ膜結合型ムチンであるが、MUC1 は docking protein、MUC4 は receptor ligand であり、MUC1 と MUC4 の発現様式の違いは、両者の発現機構が異なることを示唆している。

以上、本研究において、MUC4 発現は、外科切除を受けた浸潤性膵癌患者における、新しい予後因子であることが示され、外科切除を受けた浸潤性膵癌患者の臨床経過を予測するマーカーとなりうる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 4 号	学位申請者	齋藤 幸
審査委員	主査	坪内・博仁	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	秋山 伸一	副査 仙波 伊知郎
	副査	梅北 善久	副査 夏越 祥次

MUC4 Expression is a Novel Prognostic Factor in Patients with Invasive Ductal Carcinoma of the Pancreas

(MUC4 は浸潤性膵管癌患者における新しい予後因子である)

Journal of Clinical Pathology 2005 ; 58 : 845-852

膜結合型ムチン抗原 MUC4 は正常膵組織には発現しないが、浸潤性膵管癌組織には発現し、さらに、前癌病変である pancreatic intraepithelial neoplasia では、その悪性度が上がるにつれ発現頻度が増加することが報告されている。そこで学位申請者らは浸潤性膵管癌の外科切除症例 135 例のホルマリン固定パラフィン切片を用い、MUC4 の発現ならびに、MUC4 の発現と関連する ErbB2 と p27 の発現、さらに、MUC1 の発現を ABC 法による免疫組織化学的染色で検索し、浸潤性膵管癌における MUC4 の発現と予後との関連性を検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. MUC4 は正常膵組織に発現を認めなかった。MUC4 は浸潤性膵管癌 135 例中 43 例 (31.9%) に発現し、ErbB2 は 46 例 (34.1%)、p27 は 62 例 (45.9%)、MUC1 は 116 例 (85.9%) に発現していた。
2. MUC4 の発現と、ErbB2、p27、あるいは、MUC1 の発現には有意な相関は認められなかった。
3. MUC4 の高発現群 (20%以上) は 21 例 (15.6%)、低発現群 (20%未満) は 114 例 (84.4%) であったが、MUC4 の高・低発現と各臨床病理学的因子との間には有意な相関はなかった。また、ErbB2 の発現は組織学的分化度と有意に相関した ($p=0.0234$)。
4. カプラン・マイヤー法による生存率曲線の検討では、MUC4 高発現群は MUC4 低発現群に比較して、有意に生存率が不良であった ($p=0.0043$)。さらに、MUC4 高発現かつ p27 高発現の群は、MUC4 低発現かつ p27 低発現の群に比較して有意に生存率が不良であった ($p<0.0001$)。
5. 臨床病理学的因子と予後との関連では、単変量解析において、MUC4 高発現、T 因子 (>T2)、遠隔転移、リンパ管侵襲、切除断端陽性が予後不良因子であった。
6. 多変量解析では、MUC4 高発現のみが予後不良因子であった。
7. バックワード・ステップワイズ法による多変量解析では、MUC4 高発現、リンパ節転移、リンパ管侵襲が独立した予後不良因子であった。

本研究は、外科切除を受けた浸潤性膵管癌患者において、MUC4 高発現群は MUC4 低発現群に比較して有意に生存率が不良であることを初めて明らかにし、単変量解析、多変量解析、ならびに、バックワード・ステップワイズ法による多変量解析で、MUC4 高発現が独立した予後不良因子であることを示した。MUC4 高発現は、外科切除を受けた浸潤性膵管癌患者の臨床経過を予測するマーカーとなりうる可能性を示した点で興味深く、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 4 号	学位申請者	齋藤 幸
審査委員	主査	坪内 博仁	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	秋山 伸一	副査 仙波 伊知郎
	副査	梅北 善久	副査 夏越 祥次

主査および副査の5名は、平成18年12月26日、学位申請者 齋藤 幸 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) MUC4 が関与する ErbB2 のリン酸化が細胞周期に影響を与える機序と、MUC4 が細胞膜に突出し、細胞接着の阻害や細胞障害性リンパ球の攻撃から逃れる機序と、どちらが大きな役割を有するか。

(回答) 膵癌の発生モデルである pancreatic intraepithelial neoplasia(PanIN)において、PanIN の悪性度上昇に応じて MUC4 の発現が増加すると報告され、膵癌の発生進展の各時期において、両者が同等の役割を果たしていると考えられる。

質問2) ニューレグリンはどこから分泌されるか。

(回答) 上皮に接する間質細胞から分泌される。

質問3) ニューレグリンの発現の有無が p27 の発現レベルに影響を与える重要なファクターである可能性があるが、ニューレグリンの発現は確認したか。

(回答) 今回は MUC4、ErbB2、p27 の発現相関を検討しており、ニューレグリンの発現は確認していない。

質問4) 細胞周期において p27 発現に関係するユビキチンリガーゼ skp2 の発現は検討したか。

(回答) 今回は検討していない。今後の検討課題としたい。

質問5) 膵癌標本で、リンパ球浸潤を始めとする間質の炎症反応はどの程度か。

(回答) 膵癌では、概して、腫瘍組織および腫瘍組織周囲の間質の炎症反応は強い。

質問6) 組織学的分化度は何を指標としたか。

(回答) 細胞異型と構造異型をもとに、UICC の TNM 分類に従って、高分化 G1、中分化 G2、低分化 G3 に分類した。日本の膵癌取り扱い規約では、最も優勢な組織型を採用するが、TNM 分類に従い、最も分化度の低い部分で評価した。

質問7) 一標本の中でも、癌の組織学的分化度は一様ではないと考えるが、各組織標本の観察において、MUC4 の発現と組織学的分化度の間に相関を見いだすことはあったか。

(回答) 一つのプレパラートにおける、多様な組織学的分化度と MUC4 発現の相関については、今後の検討課題と考えている。

質問8) MUC4 を発現していない症例ではどのような原因で MUC4 が発現していないと考えられるか。

(回答) 同じ膜結合型ムチンである MUC1 は、糖鎖の付加状況が異なる様々なグリコフォームが存在す

る。MUC4 においても、糖鎖の付加状況により抗原がマスクされる状態が異なり、MUC4 を発現する症例、発現しない症例が存在する可能性がある。今後、MUC4 の mRNA の発現とともに詳細に検討したい。

質問 9) 予後分析には入院死の症例は含まれているか。

(回答) 周術期死亡症例は予後分析に含まれていない。

質問 10) 切除断端陽性例が多いが、直接予後に関係し、大きな影響を及ぼすと考えられる切除断端については、検討可能な症例数にもよるが、陰性例だけでの検討が望ましいのではないか。

(回答) 今後、より多数の切除断端陰性例を収集して検討してみたい。

質問 11) MUC4 は膜結合型ムチンだが、腫瘍細胞の細胞膜、細胞質のいずれに多く発現するか。

(回答) リガンドとして ErbB2 とは細胞質内で結合すると報告されており、多くは細胞質に発現する。

質問 12) ErbB2 の染色強度は評価したか。

(回答) 今回は染色強度については評価していない。

質問 13) 抗 MUC4 抗体は MUC4 のどこを認識しているのか。

(回答) ムチンサブユニットである MUC4 α のタンデムリーピートをエピトープとして認識する。

質問 14) 今回、タンパク抗原レベルで MUC4 の発現が確認されたが、mRNA レベルでの MUC4 発現はどうか。

(回答) パイロットスタディーにおいて、in situ hybridization で MUC4 の mRNA 発現を確認している。

質問 15) 135 症例は何年間の症例か。

(回答) 1984 年から 2000 年までの 16 年間である。

質問 16) 膵癌は炎症を伴い、TGF- β が MUC4 発現に関与すると指摘されているが、インターロイキンなどの化学修飾物質についての検討は。

(回答) 今回は検討していない。

質問 17) 今回、MUC1 発現が予後不良因子でなかったのはなぜか。

(回答) これまで、当教室の膵腫瘍におけるムチン発現は、膵管内乳頭粘液性腫瘍と膵癌を対比検討してきており、膵癌だけでの検討は、今回が初めてである。ちなみに、当教室での検討では、肝外胆管癌や腫瘤形成性の肝内胆管癌では MUC4 同様に MUC1 発現は予後不良因子と報告している。

質問 18) ErbB2 のリガンドとしては MUC4 以外のものは考えられないか。

(回答) 現時点では不明である。

質問 19) MUC4 が発現している腫瘍組織と発現していない腫瘍組織で、臨床病理学的因子に何らかの差異は見いだせなかったか。

(回答) 今回の臨床病理学的な検討では、MUC4 の発現に有意に相関する臨床病理学的因子は認めなかった。

質問 20) MUC4 発現と p27 発現に免疫組織化学的に有意な相関を認めなかった理由は。

(回答) 細胞周期は種々のサイクリン依存性プロテインキナーゼと p27 をはじめとする複数のサイクリン依存性プロテインキナーゼインヒビターで複雑に制御されている。このため、今回の検討では、MUC4 発現と p27 発現に有意な相関を認めなかった可能性がある。

質問 21) MUC4 の可溶性成分は、膵癌の腫瘍マーカーとして応用できないか。

(回答) 血清中の MUC4 そのものを測定する手法ではないが、MUC4 に反応しているリンパ球を測定する試みが報告されており、将来的には可能性がある。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。