

学位論文題名

Immunohistochemical study of cathepsin B :
prognostic significance in human lung cancer

(カテプシンBの免疫組織化学的研究：肺癌の予後における意義)

学位論文内容の要旨

I 研究目的

転移能は癌の悪性度を規定する因子の一つであるが、転移がおこるためには上皮下および血管内皮下基底膜を癌細胞が通過することが必要である。最近、癌転移に関してマトリックスメタロプロテアーゼなどの基底膜分解能をもったプロテアーゼの研究が進んでいる。カテプシンBもプロテアーゼの一つであるが、本来、粗面小胞体で合成され、ゴルジ小体でプロセッシングを受け、ライソゾームに移動し、細胞内蛋白の代謝に重要な働きをもっている。近年、カテプシンBもまた癌細胞において基底膜分解能をもち、転移と関連があることが示唆されている。しかし、カテプシンBの臨床医学的検討は少ない。そこで、筆者らは肺非小細胞癌において、カテプシンBの臨床病理学的パラメーターとの比較、および独立予後因子としての価値を検討した。

II 対象と方法

北海道大学医学部附属病院第一内科に入院し、原発性肺非小細胞癌の診断にて手術治療をおこなった108例を対象とした。108例の内訳は、肺腺癌59例、肺扁平上皮癌49例であった。臨床病期ではI期が44例、II期が12例、III A期が47例、III B期が4例、IV期が1例であった。カテプシンBの染色は以下のようにおこなった。10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した組織より4 μ mの切片を作製した。先ず最初にヘマトキシリン・エオジン染色にて病理組織学的に検討した後、同部位の組織標本の切片を使用した。対象切片はキシレン(各10分間、2回)で脱パラフィン後、100%、100%、90%、70%(各5分間)、PBS(各5分間、3回)で加水処理後、3% H_2O_2 (10分間)にて内因性ペルオキシダーゼブロッキングを、次に正常

血清（20分間）で非特異的染色をブロッキングした。1次抗体としてヒツジ抗ヒトカテプシンBポリクローナル抗体（Binding Site）（1：150）をもちいて4℃、一昼夜反応させた。2次抗体としてビオチニル化ウサギ抗ヒツジ抗体（Vector）（30分間）、さらにアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体（Vector）（20分間）を室温で反応させた。H₂O₂添加ジアミノベンジン-4 HClで発色させ、ヘマトキシリンで核染色した。陰性コントロールとして一次抗体の代わりにPBSあるいは正常ヒツジ血清をもちいた。各切片内のマクロファージを内因性の陽性コントロールとした。

判定は腫瘍細胞1000個数え、そのうち陽性細胞の割合を求め、20%未満を（-）、20%以上80%未満を（+）、80%以上を（++）と分類した。

カテプシンBと各パラメーターの関連はカイ二乗検定をもちいた。生存曲線はKaplan-Meier法で算出し、生存曲線の有意差検定はgeneralized Wilcoxon testでおこない、5%以下の危険率をもって統計学的有意差ありとした。単および多変量解析はCox比例ハザードモデルをもちいた。

III 結 果

カテプシンBは細胞質に顆粒状に染色された。108例の肺癌におけるカテプシンBの発現は（-）は18例（17%）、（+）は25例（23%）、（++）は65例（60%）であった。カテプシンB（++）の発現は、男性44/70例（63%）、女性21/38例（55%）、60歳以上42/67例（63%）、60歳未満23/41例（55%）であった。組織型別でみたカテプシンBの発現（-/+/++）は、扁平上皮癌では（9/12/28例）、腺癌では（9/13/37例）であり、統計学的有意差はなかった。病理学的病期別でみたカテプシンBの発現（-/+/++）は、I期では（8/14/22例）、II期では（2/3/7例）、IIIA期では（8/8/31例）、IIIB、IV期では（0/0/5例）であり、IIIB期以上で（++）が多かったものの統計学的有意差はなかった。病理学的T因子別でみたカテプシンBの発現（-/+/++）は、T1では（5/10/18例）、T2では（9/11/32例）、T3では（4/4/12例）、T4では（0/0/3例）であり、統計学的有意差はなかった。病理学的N因子別でみたカテプシンBの発現（-/+/++）は、N0では（10/15/25例）、N1では（3/5/10例）、N2では（5/5/29例）、N3では（0/0/1例）であり、統計学的有意差はなかった。しかしながらリンパ節転移の有無でみた場合、リンパ節転移を有する例ではカテプシンBの発現が（++）であるものが非小細胞癌、腺癌で有意に多かった（各々p<0.05）。扁平上皮癌でも同様の傾向を認めたが、統計学的には有意差はなかった。生存

曲線において非小細胞癌及び腺癌では{ (-) v.s. (++) : $p < 0.01$ }、{ (+) v.s. (++) : $p < 0.01$ }、扁平上皮癌でも{ (-) v.s. (++) : $p < 0.05$ }、I期の非小細胞癌でも同様{ (-) v.s. (++) : $p < 0.05$ }の結果で、カテプシンBの発現が(++)であるものが有意に予後不良であった。多変量解析の結果からカテプシンBの発現が病理学的病期、病理学的T因子、病理学的N因子とは独立した強力な予後因子であった。

V 考案ならびに結語

近年、マトリックスメタロプロテアーゼなど多くの蛋白分解酵素が、細胞外マトリックスを分解することによって浸潤転移と関連のあることが報告されている。カテプシンBもまた細胞外マトリックスの分解、浸潤転移と関連のあることが報告されている。今回筆者らの研究ではカテプシンBの免疫組織化学的発現がリンパ節転移と密接な関連にあり、浸潤転移と関連のあることが原発性肺非小細胞癌においてin vivoでも示された。

一方、これまでにカテプシンBの予後における価値の検討はあまりなされていない。アスパルティックプロテアーゼの一つであるカテプシンDに関しては乳癌主体に多くの研究報告がなされ、一般に予後と関連があると考えられている。システインプロテアーゼにおいては、乳癌において未転移生存率を検討した報告ではカテプシンB、カテプシンLともに二年間の短い期間では有意な関連はなかった。しかし、今回筆者らの研究では原発性肺非小細胞癌において更に長期間の予後との関連を検討した結果、原発性肺非小細胞癌、および各組織型いずれにおいてもカテプシンBが強く発現している例では有意に予後不良であった。同様の結果は原発性肺非小細胞癌のリンパ節転移の認められない病理学的病期I期においてもみられ、その死亡例がすべて転移再発例であることより、カテプシンBの強い発現は手術時には明らかではない微小転移を示唆するものと考えられた。更に、Cox比例ハザードモデルによる多変量解析を加えた結果、カテプシンBの免疫組織化学的発現は独立した予後因子であった。

一般に、癌において転移は予後を規定する大きな因子となっている。今回筆者らの結果では、原発性肺非小細胞癌においてカテプシンBの免疫組織化学的発現は浸潤転移と密接な関連があり、さらには独立した予後因子と考えられた。このことは臨床上、患者の生存予測に役立つとともに、今後カテプシンBとそのインヒビターの分子生物学的研究が肺癌における転移制御のアプローチの一つとなることを示唆するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和
副 査 教 授 武 市 紀 年
副 査 教 授 葛 巻 暹

学位論文題名

Immunohistochemical study of cathepsin B :
prognostic significance in human lung cancer

(カテプシンBの免疫組織化学的研究：肺癌の予後における意義)

研究目的

転移は癌の悪性度を規定する因子の一つであるが、転移がおこるためには癌細胞が基底膜を通過することが必要である。カテプシンBは本来ライソゾームで細胞内蛋白の代謝に重要な働きをもっているが、癌細胞ではその活性が増加し、基底膜の主成分であるラミニン、コラーゲンを分解する能力をもつことがin vitro中心に報告されている。しかし、臨床検体にてカテプシンBの臨床病理学的パラメーターとの比較、および多変量解析を用いた予後の検討はほとんどない。

本論文は、ヒト肺非小細胞癌におけるカテプシンBの発現と臨床病理学的パラメーターとの関連を検討、同時にCox比例ハザードモデルを用いて予後因子としての解析をし、カテプシンBの発現が転移、予後の指標となり得るかを検討したものである。

対象と方法

対象は術前無治療の原発性肺非小細胞癌患者108例(肺扁平上皮癌49例、肺腺癌59例)で、ホルマリン固定パラフィン包埋病理組織標本を用いた。カテプシンBの発現はABC法にて免疫組織化学的に胞体が顆粒状に染色される癌細胞の割合を算出した。その割合により、カテプシンBの発現を0%以上20%未満を(-)、20%以上80%未満を(+)、80%以上を(++)と3群に分類した。病理学的パラメーターとの関連はchi-square test、予後曲線はKaplan-Meierを用いて描出し、その有意差検定には

generalized-Wilcoxon testを用いた。また、独立予後因子としての価値はCox比例ハザードモデルを用いて解析した。

結果

肺非小細胞癌では病理病期、pT因子による違いは認めなかった。pN因子に関してはリンパ節転移を有する例では、有しない例に比べてカテプシンB(++)が有意に多かった($p < 0.05$)。また、カテプシンB(++)症例はカテプシンB(-)症例に比べて、肺非小細胞癌全症例、肺腺癌全症例、肺扁平上皮癌全症例、肺非小細胞癌病理病期I期症例において、各々有意に予後不良であった($p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$)。Cox比例ハザードモデルを用いた多変量解析より、カテプシンBは病理病期、pT因子、pN因子とは独立した有力な予後因子であった。

結論ならびに結語

癌において転移は予後を規定する大きな因子となっている。今回の結果では、原発性肺非小細胞癌においてカテプシンBの免疫組織化学的発現は浸潤転移と密接な関連があり、さらには独立した予後因子と考えられた。このことは臨床上、患者の生存予測に役立つとともに、今後カテプシンBとそのインヒビターの分子生物学的研究が肺癌における転移制御のアプローチの一つとなることを示唆するものと考えられた。

口答発表にあたり、武市教授よりカテプシンBと血行性転移、周囲への浸潤との関係、有転移症例でのカテプシンBの発現、病期・分化度との関係について、葛巻教授よりカテプシンBとras癌遺伝子との関係や転移先でのカテプシンBの発現について、阿部(和)教授よりcell cycleとの関連について、藤本教授よりカテプシンBと基底膜との関係や予後に及ぼす治療の影響について質問があったが、申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また、武市教授、葛巻教授より個別に審査を受け、合格との御返事をいただいている。

これまでに肺非小細胞癌においてカテプシンBの独立予後因子としての価値は明らかにされておらず、カテプシンBが浸潤転移の指標および独立予後因子となることを示したことは意義あるものと考えられ、よって本論文は博士(医学)に相当するものと認めた。