

学位論文題名

Staining pattern of type IV collagen and prognosis  
in early stage adenocarcinoma of the lung

(早期肺腺癌におけるIV型コラーゲンの染色性と予後との関連に関する研究)

学位論文内容の要旨

I 研究目的

肺腺癌は年々増加しているが、その病理学的、生物学的特性は十分に明らかにされてはいない。現時点においてもTNM分類が最良の予後推定因子である。

しかしながら、肺腺癌が術後病理病期でI期と診断されたり、末梢に限局性に存在していても、術後に再発や転移を来すことをしばしば経験する。この事実は、手術時すでに微小転移が存在していたためと考えられる。

基底膜は臓器実質細胞と間質細胞とを分ける細胞外マトリックスの一つであり、癌細胞が浸潤転移をするにあたっては基底膜の破壊がその第1段階となる。つまり、基底膜が保たれているか、破壊されているかをみることによって手術時の微小転移の有無が推定できると考えられる。

そこで筆者らは、基底膜の主要構成成分のひとつであるIV型コラーゲンの免疫組織染色を用いて、早期肺腺癌における基底膜の状態(連続性に保存されているか、破壊されているか)を観察し患者の予後との関連を検討した。

II 対象と方法

1970年から1986年までに北海道大学医学部第1内科に入院し、外科的に切除された術後病理病期I、II期の早期肺腺癌30症例(男性13例、女性17例 平均年齢54.9歳)を対象とした。その30例の内訳は

術後病理病期Ⅰ期の肺腺癌が24例、Ⅱ期が6例であった。Ⅳ型コラーゲンの免疫染色は以下の様におこなった。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 $\mu$ 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、同部位の組織標本を使用した。対象切片をキシレン（各10分間、2回）で脱パラフィン後、段階的アルコール、PBSで加水処理し、0.01N HCl加0.4%ペプシンで37℃ 120分間で抗原性の賦活化をおこない、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（10分間）にて内因性ペルオキシダーゼを抑制した。

1次抗体として、ウサギ抗ヒトⅣ型コラーゲン抗体（Adovance社）を用いて4℃、1昼夜反応させた。2次抗体としてビオチン化抗ウサギ免疫グロブリンと30分間反応させPBSで洗浄し、酵素結合ストレプトアビジンで30分間反応後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加ジアミノベンチジン-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1次抗体の代わりにPBS、ウサギ血清を使用した。

生存曲線はKaplan-Meier法によって表わし、生存曲線の有意差検定にはgeneralized Wilcoxon testによった。5%以下の危険率を持って統計学的有意差ありと判定した。

### III 結果

同一標本内の正常肺組織において、肺胞基底膜、血管基底膜、気管支腺の基底膜などのすべての正常基底膜はⅣ型コラーゲンによる免疫染色によって、強くかつ断裂なく連続性に染色された。肺腺癌組織内の基底膜の染色性は連続性に極めてよく保存されているもの、ごく一部断裂しているもの、高度に断裂しているもの、Ⅳ型コラーゲンが消失しているものに別れた。そこで筆者らは、Ⅳ型コラーゲンの染色性を以下の2群に分類した。Ⅳ型コラーゲンが極めてよく保存されているか、所々断裂していてもその断裂が標本癌病巣中の10%以内までの群を Continuous pattern（以下C群とする）、Ⅳ型コラーゲンが消失しているか、標本癌病巣中の10%以上（多くは80%以上の範囲で断裂している）の範囲でⅣ型コラーゲンが大きく断裂している群を Discontinuous pattern（以下D群とする）とした。

臨床病期Ⅰ期24例中、C群、D群は共に12例（50%）であった。臨床病期Ⅱ期6例中、C群は1例（16.7%）のみであった。

Ⅰ期24例とⅡ期6例の比較では、統計学的有意差はないもののⅠ期の

方が五年生存率でみて予後良好であった（65% vs 17%）。

臨床病期Ⅰ期24例に限ってみた場合、C群12例はD群12例に比べて有意に予後良好であった（88% vs 20.5%:  $P<0.05$ ）。

興味あることに、臨床病期Ⅰ期でかつD群である12例の生存曲線は臨床病期Ⅱ期6例の生存曲線と極めてよく類似していた。

#### Ⅳ 考案

肺腺癌において、TNM分類が最良の予後推定因子であることは今日においても変わらないが、残念ながら臨床病期Ⅰ期と診断された肺腺癌でさえ、その5年生存率は60－70%に過ぎない。つまり、TNM分類では推定できない予後因子があると考えられる。これまでに、TNM分類以外の予後推定因子がいくつか報告されているが決め手となる因子はない。

癌の浸潤転移はその予後を規定する最大の因子であり、基底膜が癌細胞によって破壊され、間質に癌細胞が侵入し、転移を来すが、その第1段階が基底膜の破壊である。近年、大腸癌や膀胱癌において、基底膜の状態が連続性によく保たれているものは予後が良いと報告されており、肺癌においてもいくつかの報告があるが、早期肺腺癌にしばった報告はない。

筆者らの今回の研究で、最も重要で興味深いことは、同じ臨床病期Ⅰ期でありながら、基底膜が連続性に強く発現した12例は、基底膜が破壊され、消失ないし非連続性に発現した12例に比べて有意に予後が良かったことであり、さらにこの非連続群の生存曲線が臨床病期Ⅱ期の6例の生存曲線と極めてよく類似していたことである。つまり、臨床病期Ⅰ期の基底膜非連続性群は手術時すでに、病理学的に確認できなかった微小転移を来していたものと推定された。この基底膜の染色性は腫瘍組織内における癌細胞の基底膜の構成成分の産生と、癌細胞由来の幾つかの蛋白分解酵素による基底膜の破壊という2つの相反する作用の結果であり、基底膜が非連続性に染色されることは、基底膜を破壊する蛋白分解酵素の発現が強い、高転移能の癌細胞であることを示していると考えられた。

#### Ⅴ 結語

Ⅰ期肺腺癌において、Ⅳ型コラーゲンの染色状態により、微小転移を推測することが可能であり、これは新たな予後推定因子に成りうると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 小 山 富 康

副 査 教 授 北 畠 顕

## 学 位 論 文 題 名

### Staining pattern of type IV collagen and prognosis in early stage adenocarcinoma of the lung

(早期肺腺癌におけるⅣ型コラーゲンの染色性と予後との関連に関する研究)

【研究目的】肺腺癌は年々増加しているが、その病理学的、生物学的特性は十分に明らかにされてはいない。現時点においてもTNM分類が最良の予後推定因子ではあるが、肺腺癌が術後病理病期でⅠ期と診断されたり、末梢に限局性に存在していても、術後に再発や転移を来すことをしばしば経験する。この事実は、手術時すでに微小転移が存在していたためと考えられる。

基底膜は臓器実質細胞と間質細胞とを分ける細胞外マトリックスの一つであり、癌細胞が浸潤転移をするにあたっては基底膜の破壊がその第1段階となる。つまり、基底膜が保たれているか、破壊されているかをみることによって手術時の微小転移の有無が推定できると考えられる。

本論文は、基底膜の主要構成成分のひとつであるⅣ型コラーゲンの免疫組織染色を用いて、早期肺腺癌における基底膜の状態（連続性に保存されているか、破壊されているか）を観察し患者の予後との関連を検討した。

【対象と方法】1970年から1986年までに北海道大学医学部第1内科に入院し、外科的に切除された術後病理病期Ⅰ、Ⅱ期の早期肺腺癌30症例を対象とした（病理病期Ⅰ期24例、Ⅱ期6例）。Ⅳ型コラーゲンの染色は、通常ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、ビオチン・streptavidin法による免疫組織染色でおこなった。生存曲線はKaplan-Meier法によって表わし、生存曲線の有意差検定にはgeneralized Wilcoxon testによった。5%以下の危険率を持って統計学的有意差ありと判定した。

【結果】同一標本内の正常肺組織において、肺胞基底膜、血管基底膜、気管支腺の基底膜などのすべての正常基底膜はⅣ型コラーゲンによる免疫染

色によって、強くかつ断裂なく連続性に染色された。肺腺癌内におけるⅣ型コラーゲンの染色性は不均一であり、ごく一部断裂しているもの、高度に断裂しているもの、Ⅳ型コラーゲンが全く消失しているものに別れた。以上からⅣ型コラーゲンの染色性を以下の2群に分類した。Ⅳ型コラーゲンが極めてよく保存されているか、所々断裂していてもその断裂が標本癌病巣中の10%以内までの群をContinuous pattern（以下C群）、Ⅳ型コラーゲンが消失しているか、標本癌病巣中の10%以上（多くは80%以上の範囲で断裂している）の範囲でⅣ型コラーゲンが大きく断裂している群をDiscontinuous pattern（以下D群）とした。

病理病期Ⅰ期24例中、C群、D群は共に12例であった。病理病期Ⅱ期6例中、C群は1例のみであった。

Ⅰ期24例とⅡ期6例の比較では、統計学的有意差はないもののⅠ期の方が五年生存率でみて予後良好であった（65% vs 17%）。

病理病期Ⅰ期24例に限ってみた場合、C群12例はD群12例に比べて有意に予後良好であった（88% vs 20.5%:  $P < 0.05$ ）。興味あることに、病理病期Ⅰ期でかつD群である12例の生存曲線は病理病期Ⅱ期6例の生存曲線と極めてよく類似していた。

【結論ならびに結語】本研究によって、病理病期Ⅰ期肺腺癌を、Ⅳ型コラーゲンの染色性から基底膜の状態（保存されているか、破壊されているか）を観察することにより2群に分けることができ、手術時にすでに存在していたと考えられる微小転移を推測することが可能となった。病理病期Ⅰ期肺腺癌の術後の経過観察をするうえで、極めて有用な臨床情報をもとらすものと考えた。

口答発表にあたり、小山（富）教授より、Ⅰ～Ⅲ型コラーゲンの染色状態や血管新生と基底膜の関連について、北畠教授より、他の基底膜構成成分（ラミニン等）の染色状態についてそれぞれ質問があった。申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また、小山（富）教授、北畠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。

基底膜の状態を観察することで、病理病期Ⅰ期肺腺癌の微小転移を推測可能であ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。