

学 位 論 文 題 名

Immunohistochemical analysis of expression  
of molecular biologic factors in intraductal  
papillary-mucinous tumors of pancreas-diagnostic  
and biologic significance

(粘液産生膵腫瘍の分子生物学的因子発現に関する免疫組織学的検討  
— 診断ならびに生物学的特性における重要性)

学位論文内容の要旨

I. 目的

粘液産生膵腫瘍 (intraductal papillary-mucinous tumors of pancreas、以下IPMT) は膵管上皮の乳頭状発育、著明な粘液産生、膵管拡張を特徴とする膵腫瘍のひとつで1982年に初めて報告された。IPMTは浸潤や転移が少ないことから、低悪性度の膵腫瘍と位置づけられ、通常膵管癌とは区別して考えられている。通常膵管癌にp53、rasp21、bcl-2、c-erbB-2、Ki-67などの分子生物学的因子 (molecular biologic factors、以下MBF) が発現していることは広く知られた事実であるが、IPMTについての報告は今だ少なく、一定の見解は得られていない。また、IPMTは術前の画像所見から良悪性の鑑別をすることが難しいという臨床上的の問題点があり、また、段階的なadenoma-carcinoma sequenceがIPMTに存在するかどうかについての結論も得られていない。そこで本研究では、IPMTにおけるMBFの発現を免疫組織学的手法を用いて調べ、MBF発現の差異が良悪性の鑑別に役立つかどうか、あるいはIPMTにadenoma-carcinoma sequenceが存在するかどうかを検討した。

II. 材料と方法

1. 材料

1987年12月から1997年12月までに北海道大学医学部第2外科において膵切除がなされ、WHO分類に基づきIPMTと病理診断がなされた28症例を対象とし、切除標本のホルマリン固定済みパラフィン包埋組織ブロックを使用した。IPMT28例のうち4例には多発病変が存在し、組織型の異なる病変部位から切片を作成した。したがって、対象としたIPMTの内訳はhyperplasia (n=6)、adenoma (n=15)、carcinoma in situ (n=2)、carcinoma (n=9)の28症例32病変であり、本研究ではhyperplasiaとadenomaを良性IPMT、carcinoma in situとcarcinomaを悪性IPMTと定義し検討した。また、IPMT切除標本から同様に、正常膵管 (n=6) の切片を作成しコントロールとした。さらに同時期に切除された通常膵管癌症例 (n=20) をランダムに選択し、同様に切片を作成し比較検討した。

2. 免疫組織染色

パラフィン包埋ブロックから作成した組織切片を、脱パラフィンした後、0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。抗原性賦活のためにp53、bcl-2、Ki-67にはmicrowave照射を20分間、rasp21にはtrypsin処理を室温で10分間おこなった。一次抗体は抗P53モノクローナル抗体；D0-7 (DACO社)、抗rasp21モノクローナル

抗体；Anti-pan ras (Oncogene Science社)、抗bcl-2モノクローナル抗体；Clone 124 (DACO社)、抗c-erbB-2ポリクローナル抗体；Anti-c-erbB-2 (ニチレイ社)、抗Ki-67モノクローナル抗体；MIB-1 (Immunotech社)を使用した。二次抗体にはHistofine kit (ニチレイ社)を使用し、発色にはdiaminobenzidineを用いた。Hematoxylinを用いて核染色させた後、脱水、透徹、封入し検鏡した。

### 3. 判定

染色の判定は個々の症例において最低300個の腫瘍細胞をカウントし、染色陽性細胞が5%未満のものを染色陰性、5%以上のものを染色陽性とした。さらに染色陽性率により5%以上10%未満を(1+)、10%以上40%未満を(2+)、40%以上を(3+)と定義した。統計学的解析は、2群間の比較にFisher検定を用いてp値0.05未満を有意差ありと判定した。

## III. 結果

正常膵管は、5種類全てのMBFが陰性であった。良性IPMTは、p53がadenomaの7% (1 / 15)に、rasp21がhyperplasiaの17% (1 / 6)、adenomaの27% (4 / 15)に、Ki-67がhyperplasiaの33% (2 / 6)、adenomaの27% (4 / 15)に陽性を示した。一方、悪性IPMTは、p53とrasp21がともにcarcinoma in situの50% (1 / 2)、carcinomaの67% (6 / 9)に陽性を示した。Ki-67はcarcinoma in situ (n=2)、carcinoma (n=9)の全例に陽性であった。なお、p53とKi-67は腫瘍細胞の核に、rasp21は細胞質に染色された。bcl-2、c-erbB-2は良悪性いずれのIPMTにおいても陰性であった。また、通常膵管癌においてはp53が55% (11 / 20)、rasp21が70% (14 / 20)、bcl-2が35% (7 / 20)、c-erbB-2が30% (6 / 20)、Ki-67が85% (17 / 20)に陽性であった。以上から、rasp21は正常膵管の0%、IPMTにおいてはhyperplasiaの17%、adenomaの27%、carcinoma in situの50%、carcinomaの67%に陽性となり、細胞異型に比例して陽性例が多くなることが示された。なお、通常膵管癌におけるrasp21陽性率は70%で、IPMT carcinomaとほぼ同等であった。

次に、p53、Ki-67、rasp21が陽性であったIPMT症例の個々の染色陽性率をみると、p53陽性例 (n=8)、Ki-67陽性例 (n=18)は、良性IPMTでは、Ki-67が(2+)を示したhyperplasiaの1例を除き他は全て(1+)で、悪性IPMTでは全て(2+)あるいは(3+)であった。すなわち、p53ないしKi-67が腫瘍細胞の10%以上に陽性を示したIPMT症例はいずれも悪性例であった。rasp21は陽性例 (n=12)のうち良性IPMTの3例が(2+)を、悪性IPMTの3例が(1+)を示し、個々の染色陽性率と良悪性との関連はなかった。

染色率(-)と(1+)を染色陰性、(2+)と(3+)を染色陽性と新たに定義し、2群に分けて検討した。p53は良性IPMT (n=21)において全て染色陰性で、悪性IPMT (n=11)では陰性4例、陽性7例であり、悪性IPMTにおいて有意にp53が陽性となることが示された ( $p < 0.0001$ )。Ki-67は良性IPMTで陰性20例、陽性1例に対し、悪性IPMTでは全例陽性であり、p53と同様、悪性IPMTにおいて有意にKi-67が陽性となることが示された ( $p < 0.0001$ )。rasp21は良性IPMTで陰性18例、陽性3例、悪性IPMTで陰性7例、陽性4例で統計学的有意差を認めなかった。

## IV. 考察

IPMTにおける5つのMBFの発現を免疫組織学的手法を用いて調べ、腫瘍細胞の10%以上がp53あるいはKi-67陽性であれば、有意に悪性例の多いことが示された。このことは術前に膵管鏡下の生検組織を用いてp53、Ki-67の発現を調べることで、IPMTの良悪性鑑別の重要な情報を提供し得るため、臨床上的診断的価値が高いものと考えられた。

近年、IPMTにおいてk-rasのcodon 12点突然変異がみられたとの報告や、k-ras遺伝子突然変異がIPMTの発癌に関与していることを示す報告がなされた。本研究においてrasp21の発現がIPMTの細胞異型に比例して増加することが示されたことを合わせて考えると、k-ras遺伝子の突然変異によって正常膵管からhyperplasiaあるいはadenomaへ、さらにcarcinoma in situあるいはintraductal carcinomaへと進行するような段階的なadenoma-carcinoma sequenceがIPMTにおいて存在することを示唆するものとする。intraductal carcinomaと通常膵管癌と

の間にはrasp21の発現に有意差はなく、両者間にsequenceはないものと考えられた。

## V. 結語

IPMTの免疫組織学的検討で、p53、Ki-67はhyperplasia、adenomaと比較してcarcinoma in situ、intraductal carcinomaにおいて有意に発現が増強することが示され、良悪性の鑑別に有用と考えられた。また、正常膵管、hyperplasia、adenoma、carcinoma in situ、intraductal carcinomaと細胞異型が強くなるに従い、rasp21陽性率が高くなることから、IPMTにおいては段階的なadenoma-carcinoma sequenceが存在することが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

## 学 位 論 文 題 名

### Immunohistochemical analysis of expression of molecular biologic factors in intraductal papillary-mucinous tumors of pancreas-diagnostic and biologic significance

(粘液産生膵腫瘍の分子生物学的因子発現に関する免疫組織学的検討  
－診断ならびに生物学的特性における重要性)

粘液産生膵腫瘍 (intraductal papillary-mucinous tumors of pancreas、以下IPMT) は浸潤や転移が少ないことから、通常膵管癌とは区別され低悪性度腫瘍の位置づけがされている。通常膵管癌にp53、rasp21、bcl-2、c-erbB-2、Ki-67などのmolecular biologic factors (以下MBF) が発現していることは知られているが、IPMTについては一定の見解はない。また、IPMTは術前画像所見から良悪性の鑑別が困難であり、さらに、IPMTにおける段階的なadenoma-carcinoma sequenceの存在についての結論も得られていない。本研究では、IPMTにおけるMBFの発現を免疫組織学的に調べ、その差異と良悪性の関係、IPMTにおけるadenoma-carcinoma sequenceの存在の検討をした。材料はIPMTと病理診断された28症例の切除標本のホルマリン固定済みパラフィン包埋組織ブロックを使用した。IPMT28例のうち4例には多発病変が存在し、組織型の異なる病変部位から切片を作成した。したがって、対象IPMTの内訳はhyperplasia (n=6)、adenoma (n=15)、carcinoma in situ (n=2)、carcinoma (n=9)の28症例32病変であり、hyperplasiaとadenomaを良性IPMT、carcinoma in situとcarcinomaを悪性IPMTと定義した。また、IPMT切除標本から、正常膵管 (n=6) の切片を作成しコントロールとした。さらに同時期に切除された通常膵管癌症例 (n=20) をランダムに選択し、同様に切片を作成し比較検討した。方法は組織切片を、脱パラフィンの後、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング、抗原性の賦活を行い、各MBFに対する一次抗体と二次抗体としてHistofine kit を用い、発色にはdiaminobenzidineを、核染色にはHematoxylinを用いた。判定は鏡検にて行い、切片上の最低300個の腫瘍細胞をカウントし、染色陽性細胞が5%未満を染色陰性、5%以上を染色陽性とした。さらに染色陽性率により

5%以上10%未満を(1+)、10%以上40%未満を(2+)、40%以上を(3+)と定義した。統計学的解析は、2群間の比較にFisher検定を用いて $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。結果であるが、正常膵管は5種類全てのMBFが陰性であった。良性IPMTでは、p53がadenomaの7%、rasp21がhyperplasiaの17%、adenomaの27%、Ki-67がhyperplasiaの33%、adenomaの27%で陽性だった。悪性IPMTは、p53、rasp21ともcarcinoma in situの50%、carcinomaの67%に陽性を示した。Ki-67はcarcinoma in situ、carcinomaの全例が陽性であった。bcl-2、c-erbB-2は良悪性いずれのIPMTにおいても陰性であった。通常膵管癌ではp53が55%、rasp21が70%、bcl-2が35%、c-erbB-2が30%、Ki-67が85%に陽性であった。以上から、rasp21は正常膵管の0%、IPMTにおけるhyperplasiaの17%、adenomaの27%、carcinoma in situの50%、carcinomaの67%に陽性となり、細胞異型に比例して陽性例が多くなった。通常膵管癌におけるrasp21陽性率は70%で、IPMTのcarcinomaとほぼ同等であった。p53、Ki-67、rasp21陽性のIPMT症例の個々の染色陽性率は、p53陽性例、Ki-67陽性例では、良性IPMTでは1例を除き全て(1+)で、悪性IPMTでは全て(2+)以上であった。すなわち、p53ないしKi-67が腫瘍細胞の10%以上に陽性を示したIPMT症例はいずれも悪性例であった。rasp21は染色陽性率と良悪性との関連はなかった。染色率(-)と(1+)を染色陰性、(2+)と(3+)を染色陽性と新たに定義すると、p53は良性IPMTでは全て染色陰性で、悪性IPMTでは陰性4例、陽性7例と、悪性IPMTで有意にp53が陽性となった( $p < 0.0001$ )。Ki-67は良性IPMTで陰性20例、陽性1例に対し、悪性IPMTでは全例陽性であり、悪性IPMTにおいて有意にKi-67が陽性となった( $p < 0.0001$ )。rasp21は良性・悪性IPMT間の染色陽性率に統計学的有意差を認めなかった。以上よりIPMTの免疫組織学的検査で、腫瘍細胞の10%以上でp53あるいはKi-67が陽性であれば、有意に悪性例の多いことが示され、術前に膵管鏡下生検組織でのp53、Ki-67の発現を調べることで、IPMTの良悪性の術前鑑別診断が可能となり、臨床的価値が高いものと考えられた。さらにrasp21の発現がIPMTの細胞異型に比例して増加することを考えると、正常膵管からhyperplasia・adenomaへ、さらにcarcinoma in situ・intraductal carcinomaへと進行するadenoma-carcinoma sequenceがIPMTに存在することが示唆された。

口頭発表において今村雅寛教授よりIPMTのadenoma-carcinoma sequenceと各MBFの染色率の違いの関係、IPMTが術前に良性と診断できる様になった場合の治療法の展望について、その後、吉木敬教授より今回の5種類以外のマーカーの染色性、c-erbB2が染色されなかった理由、一切片の中での細胞異型度の違いと染色性の違いの関係に関して質問があった。次いで、加藤紘之教授から同様に一個体内での異型性と染色性の関連と術前生検診断における診断精度の問題、IPMTの治療法の選択・follow upに対する質問があったが、申請者は概ね妥当な回答をした。

審査員一同は、この研究成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や単位取得なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を授与されるのに充分値するものと判定した。