

学位論文題名

胃癌組織における LUCA15発現量の臨床病理学的検討

学位論文内容の要旨

【緒言】

LUCA15 は 815 個のアミノ酸より構成される分子量約 100kDa の核内蛋白質であり、その mRNA の発現はほぼ全ての組織に検出されているが、組織間の蛋白発現レベルを検討した報告はない。その生理的な機能は十分に解明されていないが、細胞増殖抑制、アポトーシスに関与することが示唆されている。

LUCA15 の悪性腫瘍における検討では、肺癌組織や神経系腫瘍組織における mRNA の発現低下の報告はあるが、蛋白発現量の検討は肺癌において一報あるのみで、胃癌組織における検討は報告されていない。そこで本研究では LUCA15 の胃癌における病理学的な意義を調べるために、LUCA15 のモノクローナル抗体を独自に作成し、胃癌手術標本を用いて癌部、非癌部を免疫組織学的に比較検討し、臨床病理学的事項との関連性の検討を行った。

【方法と結果】

1. 抗 LUCA15 抗体の反応性、特異性の確認

作成した抗 LUCA15 モノクローナル抗体は、LUCA15 の C 末側を特異的に認識し、ヒト胃癌細胞株 MKN45 を用いた蛍光染色により、核内に限局して存在していることを確認した。

2. 免疫組織学的検討

北海道大学病院において 1990 年から 2000 年までの 10 年間に胃癌と診断され、胃切除術を施行された 106 症例の胃癌手術標本を用いて、LUCA15 の発現量の検討を行った。LUCA15 は胃組織でも核に特異的に染色された。非癌部の胃腺管上皮の核の染色強度を score 2 とし、それよりも染色が弱いものを score 1、強いものを score 3、全く染まらないものを score 0 として 4 段階評価を行った。score 1 群は 29 例、score 2 群は 33 例、score 3 群は 44 例であったが、今回の検討症例内では、score 0 群は認めなかった。

3. 臨床病理学的検討

低発現群 (score 1) と正常もしくは高発現群 (score 2 あるいは score 3) の 2 群に大別して臨床病理学的因子を統計学的に検討した。胃癌組織型を分化型と未分化型の 2 群に分類した場合、分化型 59 症例中 5 例のみが score 1 を示したが、未分化型では 47 症例中 24 例が score 1 を示し有意差を認めた。

胃壁深達度では T2 以深の 58 症例中 25 例 (42.4%) が score 1 を示したが、T1 症例では 47 症例中 4 例 (8.5%) のみが score 1 を示し、深達度の進行している腫瘍が LUCA15 の発現低下している傾向を示した。さらにリンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲の検討では、score 1 群の陽性率はいずれも有意に高かった。これらの病理学的因子を総合評価した進行度では、Stage I, II に占める score 1 群の割合 (17.8%) よりも Stage III, IV に占める割合 (48.5%) は有意に高かった。また腫瘍量と LUCA15 の発現量の検討において、score

1群における腫瘍最大径は有意に大きい傾向があった。

他病死を除いた 100 症例において、LUCA15 の発現量が累積生存率に与える影響を Kaplan-Meier 曲線に検討したところ、score 1 群は score 2, 3 群に比較して有意に予後不良であった。

【考察】

胃癌手術症例 106 例中、LUCA15 の染色強度が非癌部よりも低下している症例が 29 例存在した (score 1)。そのうち未分化型は 24 例 (82.8%) あり、腫瘍の分化度と LUCA15 の発現量が関連していることが示唆された。しかし、未分化型のうち、score 1 を呈した症例は、47 症例中 24 例 (51.1%) でほぼ半数であった。このことは、同じ未分化型であっても、LUCA15 の発現量が低下している群と低下していない群が存在することを示している。今回の結果では、LUCA15 の発現量の低下している群はより悪性度の高い形質を示しており、癌の悪性度としては、同じ未分化型であっても、LUCA15 の発現量の低下は、より後期に生じる形質変化であることが推察された。

胃癌を病理組織学的に分化型と未分化型に大別した場合、両者間に癌発生に関与する遺伝子異常に差があるか否かについて多くの検討がなされてきた。これまで p53, E-cadherin, K_{ras} などの発現異常が胃癌に高頻度で見られると報告されている。現在までのところ、それぞれの遺伝子の発現異常の相互関連を検討した報告は無く、LUCA15 との関連も不明であるが、核内蛋白質である LUCA15 が二次的な遺伝子異常を惹起しないか興味を持たれる点である。

腫瘍の分化度以外にも LUCA15 の score 1 群は、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲の陽性率が有意に高く、胃壁深達度では T2 以深の割合が有意に高かった。さらに胃癌の進行度として総合的に評価した際、score 1 群では Stage III, IV 群が 29 症例中 16 例 (55.2%) 占めるのに対し、score 2 あるいは score 3 群では 77 症例中 17 例 (22.1%) と有意に低かった。LUCA15 の発現低下が腫瘍細胞の増殖性、悪性度に関与している可能性が示唆される。これらの因子は術後生存率に反映され、score 1 群は有意に予後不良であった。

今回の検討範囲内では、LUCA15 の発現が消失している例は存在しなかったが、LUCA15 の発現量が消失していなくても、低下するだけで胃癌の発生や悪性化に関与していると仮定すると、発現している LUCA15 が変異などにより、蛋白質としての機能異常が存在する可能性が示唆された。今後は胃癌組織において発現している LUCA15 の mRNA のシーケンス情報を検討する必要があると思われた。また一部の癌抑制遺伝子では、発現量が低下することのみで発癌に寄与できる haploinsufficiency 型の癌抑制遺伝子が存在することが注目されており、LUCA15 についても詳細な遺伝子発現解析を行う必要がある。

今後、LUCA15 の病理学的意義を一層明確にするには、原発巣と転移巣との比較、あるいは PCNA や Ki-67 などの他の癌細胞増殖関連因子との多重染色などにより、さらに詳細に検討する必要があると考えられた。

【結語】

LUCA15 に対する特異的モノクローナル抗体を作成し、胃癌細胞、胃癌組織での染色性を検討し、臨床病理学的な検討を加えた。胃癌組織では、LUCA15 の発現量により、低、中、高発現の 3 群に分類された。LUCA15 低発現群は悪性度が高く、予後不良であり、LUCA15 は胃癌の転移、浸潤のマーカーになりうるということが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学位論文題名

胃癌組織における LUCA15発現量の臨床病理学的検討

LUCA15 は 815 個のアミノ酸より構成される分子量約 115kDa の核内蛋白質である。組織間の蛋白発現レベルを検討した報告はなく、その生理的な機能は解明されていないが、細胞増殖抑制、アポトーシスに関与することが示唆されている。LUCA15 の悪性腫瘍における検討では、肺癌組織や神経系腫瘍組織における報告はあるが、胃癌組織における報告はない。そこで本研究では LUCA15 の胃癌における病理学的意義を調べるために、LUCA15 のモノクローナル抗体を独自に作成し、胃癌手術標本を用いて癌部、非癌部を比較検討し、臨床病理学的解析を行った。症例は北海道大学病院において 1990 年から 2000 年までの 10 年間に胃癌と診断され、胃切除術を施行された 106 症例の胃癌手術標本を用いた。LUCA15 は核に特異的に染色された。非癌部の胃腺管上皮の核の染色強度をコントロールとして、score 0～score 3 の 4 段階評価を行い、低発現群 (score 1) と正常もしくは高発現群 (score 2 あるいは score 3) の 2 群に大別して臨床病理学的因子を統計学的に検討した。胃癌組織型を分化型と未分化型の 2 群に分類した場合、分化型 58 症例中 5 例のみが score 1 を示したが、未分化型では 48 症例中 24 例が score 1 を示し有意差を認めた。胃壁深達度では T2 以深の 58 症例中 25 例が score 1 を示したが、T1 症例では 47 症例中 4 例のみが score 1 を示し、深達度の進行している腫瘍が LUCA15 の発現が低下している傾向を示した。さらにリンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲の検討では、score 1 群の陽性率はいずれも有意に高かった。これらを総合評価した進行度では、Stage I、II に占める score 1 群の割合よりも Stage III、IV に占める割合は有意に高かった。他病死を除いた 100 症例において、LUCA15 発現量と累積生存率の関係を Kaplan-Meier 法で検討したところ、score 1 群は score 2、3 群に比較して有意に予後不良であった。胃癌手術症例 106 例中、LUCA15 が低発現の症例が 29 例存在し、そのうち未分化型は 24 例を占め、腫瘍の分化度と LUCA15 の発現量の関連が示唆された。また分化度以外にも LUCA15 の score 1 群は、リンパ節

転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲の陽性率と、胃壁深達度での T2 以深の割合が有意に高かった。さらに胃癌の進行度として総合的に評価した際、score 1 群では Stage III、IV 群が 55.2%を占めるのに対し、score 2、3 群では 22.1%と有意に低くかった。LUCA15 の発現低下が腫瘍細胞の増殖性、悪性度に関与している可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査の秋田教授より LUCA15 の機能についての推察、胃癌での LOH の有無、胃癌と LUCA15 の関連性についての質問があった。これに対し申請者は LUCA15 の機能は発癌よりも進行癌における転移や浸潤に関わる因子の可能性が高いこと、胃癌での 3p21 領域の LOH の報告は無いこと、胃癌と LUCA15 の関連性が強いものは胃壁深達度、リンパ節転移があることを解答した。次いで副査の近藤教授から免疫染色の判定方法における客観性、LUCA15 陽性細胞率の違い、LUCA15 高発現の機序についての質問があった。これに対し申請者は免疫染色は医師 2 人で判定し、かつ強拡大 3 視野における 1000 個の細胞の核の染色強度を純粋に評価したこと、癌部、非癌部における陽性細胞率は 90%以上で差がなかったこと、発現増加は DNA チェックポイント機構に関わる ATM、Chk2 等が癌化の早期段階では活性化されているが、進行に伴い不活化するという報告があり、LUCA15 も進行の各段階において変化がある可能性があることを解答した。

最後に主査の浅香教授より LUCA15 のポリクロナール抗体とモノクロナール抗体の違い、胃癌における LUCA15 の作用機序、p53 と LUCA15 との関連、LUCA15 のノックアウト株についての質問があった。これに対し申請者はポリクロナール抗体は特異性、力価共に不十分であり、核以外にも染色されること、LUCA15 は胃癌の転移・浸潤に関わっていると考えられること、p53 のアポトーシスを増強する可能性があること、ノックアウト株があるとすれば癌の転移や進行が早くなる可能性があることを解答した。

本研究は LUCA15 の胃癌組織における検討を行い、LUCA15 が腫瘍細胞の悪性度、転移・浸潤に関与している可能性を初めて報告したことで高く評価され、今後の胃癌研究への更なる応用が期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。