

Expression of Mucin Core Protein in Gallbladder Carcinoma and Dysplasia and its Pathologic Significances : An Immunohistochemical Study

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9366

胆嚢癌および胆嚢ディスプラジアでのムチンコア蛋白の 発現とその病理学的意義

—免疫組織化学的検討—

金沢大学医学部医学科病理学第二講座 (主任: 中沼安二教授)

大 和 太 郎

ムチンは、ムチンコア蛋白とO-グリコシド結合型糖鎖からなる高分子糖蛋白であり、消化管や気管などの表層や腺房の粘膜上皮より分泌され、上皮細胞の保護や導管の潤滑剤としての役割を担っている。現在、9種類のムチンコア蛋白の遺伝子が同定されている。これら9種類のムチンコア蛋白は組織特異性、細胞特異性の発現形式を示し、近年、腫瘍の発生、進展に伴う変動が注目されている。今回、胆嚢癌と胆嚢ディスプラジアでのMUC1 (乳腺型)、MUC2 (大腸型)、MUC5AC (胃表層上皮型)、MUC6 (胃幽門腺型) ムチンコア蛋白の発現を免疫組織学的に検討し、さらにMUC1とMUC2のmRNA発現を組織内ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法により検討した。またMUC1およびMUC2 ムチンコア蛋白の発現と、細胞増殖活性の指標となるKi-67抗原の発現との関連についても検討した。材料は外科的に切除された胆嚢で、非癌非ディスプラジア性胆嚢15例、ディスプラジア20例 (癌非合併例6例、癌合併例14例)、胆嚢癌55例 (非浸潤癌10例、浸潤癌45例)、および胆道系の悪性腫瘍を高率に合併する膵・胆管合流異常27症例 (4例にディスプラジア、3例に胆嚢癌を合併) である。MUC1は非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮では発現がなく、ディスプラジアでは半数の例で巣状に発現した。胆嚢癌を合併したディスプラジア例で、MUC1の発現が高率であった。胆嚢癌ではMUC1は80%に発現し、分化度の低下した胆嚢癌に高率であった。MUC1の発現パターンとして癌細胞の管腔縁、胞体内、細胞膜全周性があり、高分化型では管腔縁や胞体内に発現し、低分化型では、胞体内や細胞膜全周性の発現がしばしばみられた。また浸潤部ではMUC1の発現が広範で、癌細胞膜全周性の発現や周囲結合組織へのMUC1の漏出もみられ、癌の浸潤に関連することが示された。またMUC1陽性の癌細胞は、MUC1陰性のものより増殖活性が高かった。合流異常に合併した胆嚢癌3例でも同様なMUC1の発現がみられた。さらに、合流異常例の非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮では約半数に、またディスプラジアでは全例に、胆嚢内腔縁にMUC1の線状の発現がみられた。一方、MUC2は非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮およびディスプラジアで、杯細胞化生に一致して発現した。胆嚢癌では65%に発現し、杯細胞型の癌細胞に発現がみられた。非癌非ディスプラジア性胆嚢、ディスプラジア、非浸潤性胆嚢癌の順にMUC2の発現が高くなる傾向があった。非浸潤性胆嚢癌では全例に、浸潤性胆嚢癌では58%にMUC2の発現がみられた。低分化の癌や癌の浸潤部でのMUC2の発現は殆どなく、MUC2陽性癌細胞の増殖活性も低かった。MUC1、MUC2蛋白の発現はISH法でmRNAの発現にはほぼ一致することが確認された。MUC5ACは、非癌非ディスプラジア性胆嚢、ディスプラジア、胆嚢癌ともに高率に発現がみられ、胃 (表層上皮) 型の表現型を示した。胆嚢癌でのMUC5AC発現は、組織型・分化度に関係なく、非浸潤性胆嚢癌では、浸潤性胆嚢癌と比べやや高率に発現した。MUC5ACは癌の浸潤部でも強く発現していた。また、胆嚢ディスプラジアでは70%、また非浸潤性胆嚢癌では90%にMUC2、MUC5ACが同時に発現し、胆嚢癌は癌発生早期には、胃型 (MUC5AC)、腸型 (MUC2) の両方の表現型を示すと考えられた。癌浸潤に伴いMUC2の発現は消失するが、MUC5ACの発現はあり、浸潤癌では、胃型の表現型が優位になることが明らかとなった。MUC6は、殆どの偽幽門腺化生部で強い染色性を示した。また非癌非ディスプラジア性胆嚢では全例に、ディスプラジアでは80%に、胆嚢癌では89%に発現があり、癌化、分化度・組織型、浸潤には明らかな傾向はみられなかった。以上より、胆嚢癌の発生および浸潤増殖にMUC1の発現が関連していることが示された。特に合流異常例では、非腫瘍性粘膜上皮に高率にMUC1が発現しており、すでに発癌リスクの高い状態にあると考えられた。

Key words mucin, mucin core protein, gallbladder, carcinoma, pancreatobiliary maljunction

平成9年11月26日受付, 平成9年12月22日受理

Abbreviations: ABC/PO, avidin-biotin-peroxidase complex; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; HLA, human leukocyte antigen; ISH, *in situ* hybridization; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde

ムチンは、生理的に消化管や気管などの管腔粘膜の細胞の保護や潤滑剤としての役割を担っており¹²⁾、ムチンコア蛋白と多量のO-グリコシド結合型糖鎖とからなる高分子糖蛋白である³⁾。現在、ムチンコア蛋白の解析が進み、9種のタイプの遺伝子 (MUC1~4, 5AC, 5B, 6~8) が同定されている^{4)~9)}。これらムチンコア蛋白は組織特異的な分布、細胞特異的な分布を示し、それぞれの生理的役割について研究されている^{10)~21)}。ムチンコア蛋白は膜型と分泌型に分類される。MUC1は、正常乳腺や膵の導管上皮に発現する膜貫通型のムチンコア蛋白として粘膜表層上皮や腺上皮に分布し、さらに分泌型のムチンコア蛋白として管腔内へも分泌される。その他のムチンコア蛋白はいずれも分泌型であり、MUC2は大腸粘膜上皮に発現するムチンコア蛋白^{10)~12)}、MUC5AC、MUC6は胃における主要な分泌型ムチンコア蛋白であり、MUC5ACは胃底部や胃前庭部の表層上皮細胞に、MUC6は胃底腺や胃幽門腺の腺頸部の細胞に発現する^{22)~25)}。

最近、ムチンコア蛋白の発現は個体発生、さらに癌化と関連することが明らかになり、また腫瘍の生物学的特徴との関連性も注目されている。特にMUC1とMUC2の発現は上皮系の悪性腫瘍の発癌や浸潤の過程、またその悪性度と関係することが、大腸、胃、膵などで報告されている^{11)13)~21)}。Osakoら¹⁹⁾やYonezawaら²⁶⁾は予後の悪い浸潤性膵管癌では全例にMUC1の発現を認め、比較的予後の良い膵管内乳頭腺癌ではMUC1の発現は認められなかったと述べている。一方、MUC2では逆に浸潤性膵管癌では発現せず、膵管内乳頭腺癌で高度の発現を認めたとしている。最近、Sakamotoら²⁷⁾は胃癌でのMUC1、MUC2、シアリルTn抗原の発現パターンを検討し、MUC1は若年者の胃癌で検出され、予後不良のサインとして有用であるが、MUC2やシアリルTn抗原は、予後とは直接関連せず、むしろ癌の高分化度や細胞形態と関連したと報告している。

胆嚢癌は高齢者に偏りのある癌で、40歳代より増加しはじめ70歳代にピークをもち、一般的に男女比は1:1.8と女性に多い²⁸⁾。胆嚢癌の胆石保有率は50~70%で、胆嚢胆石手術例の2~5%に胆嚢癌が合併し、胆石症と胆嚢癌は関連があるとの考えが一般的である²⁹⁾。胆嚢癌と関連をもつ病変として胆石の他

に膵・胆管合流異常症が注目されている。膵液の胆嚢内への逆流が発癌と関連するといわれており、胆嚢癌の約9%にこの合流異常を認め、一方、合流異常の15~25%に胆嚢癌、とくに無石胆嚢癌がみられる。合流異常をもつ胆嚢癌の75%以上は女性であり、平均年齢も非合流異常例と比較し若い傾向にある³⁰⁾。

さて胆嚢癌には、種々の分化度や組織型があり、さらに胆嚢ディスプラジアからの発癌の過程も知られている³¹⁾³²⁾。胆嚢癌組織周辺にディスプラジアを認め、また癌との鑑別が困難な症例も、日常よく経験される。これは、ディスプラジアが胆嚢癌発生過程での中間的境界病変という考えを支持する。またYamagiwa³³⁾らは、胆嚢正常上皮にはスルフォムチンが多く含まれているが、腸上皮化生、ディスプラジア、胆嚢癌では、シアロムチンを含有する細胞が増加し、腸上皮化生→ディスプラジア→胆嚢癌へ至る多段階発癌の可能性を示唆している。さらに腸上皮化生のみならず、偽幽門腺化生も癌化への過程で重要とする報告もある³⁴⁾。一方、膵・胆管合流異常の胆管癌発生機序として、膵液の胆道内逆流による上皮の剥離、再生が重要とされており、それらに引き続いて起こる腸上皮化生や偽幽門腺化生のみならず、上皮の過形成性変化が発癌に関連しているとの報告もある³⁴⁾。胆道系病変とムチンとの関連性についてはさまざまな検討がなされているが¹⁷⁾³⁵⁾、胆嚢病変とムチンコア蛋白の発現に注目し、検討した報告は現在までのところなされていない。胆嚢ディスプラジア、胆嚢癌と、ムチン、特にムチンコア蛋白との関係や胆嚢癌の生物学的悪性度との関連性は依然不明である。

そこで今回、ヒト胆嚢癌および胆嚢ディスプラジア、それに胆嚢癌を合併しやすい膵・胆管合流異常症例の外科的切除胆嚢を用いて、胆嚢上皮でのMUC1、MUC2、MUC5AC、MUC6ムチンコア蛋白およびMUC1、MUC2 mRNAの発現を検討した。そして胆嚢癌とムチンコア蛋白の発現との関連性を病理学的観点から検討したので報告する。

材料および方法

1. 材 料

1. 胆嚢ディスプラジアの定義、胆嚢癌の組織分類、および

Table 1. The gallbladder tissue specimens used in this study

Diseasea	No. of cases	Age ($\bar{x} \pm SD$, years)	Sex (M: F)
Non-maljunction			
Carcinoma	55	71 $\pm$ 11	15: 40
Dysplasia	20	69 $\pm$ 10	9: 11
Without gallbladder carcinoma	6	65 $\pm$ 9	4: 2
With gallbladder carcinoma	14	71 $\pm$ 10	5: 9
Non-neoplastic, non-dysplastic epithelia ^{a)}	15	59 $\pm$ 13	7: 8
Maljunction			
Carcinoma	3	58 $\pm$ 19	0: 3
Dysplasia	6	24 $\pm$ 21	0: 6
Without gallbladder carcinoma	4	12 $\pm$ 9	0: 4
With gallbladder carcinoma	2	49 $\pm$ 13	0: 2
Non-neoplastic, non-dysplastic epithelia	20	11 $\pm$ 16	5: 15

^{a)} Chronic cholecystitis and almost normal gallbladder. M, male; F, female.

膵・胆管合流異常の定義

胆嚢ディスプラジアはAlbores-Saavedraら³⁶⁾³⁷⁾に従い診断した。つまりディスプラジアは、正常胆嚢上皮に比べN/C比の上昇した卵円形の核が重層化し、部分的に極性を失いクロマチンが増量しており、また上皮そのものは過形成性あるいはわずかに乳頭状を示す。軽度、中等度、高度の各段階に亜分類が可能であった。

胆嚢癌は組織異型、細胞異型により診断し、浸潤のないものを非浸潤癌 (*in situ carcinoma*) として、浸潤癌と区別した。なお、症例により非浸潤性胆嚢癌と高度ディスプラジアとの鑑別は困難であった。胆嚢癌の組織型および分化度は、外科・胆道癌取扱い規約³⁸⁾に準じて分類した。乳頭腺癌と高分化型管状腺癌を高分化腺癌とし、中分化型管状腺癌、低分化型管状腺癌をそれぞれ中分化腺癌、低分化腺癌とした。その他の組織型として、粘液癌、充実腺癌、印環細胞癌、腺扁平上皮癌、扁平上皮癌、小細胞癌 (内分泌細胞癌)、腺内分泌細胞癌などに分類した。また腺癌、扁平上皮癌、内分泌細胞腫瘍への分化を示さず、シート状、充実性の構造を示す癌を未分化癌とした。

膵・胆管合流異常は、日本膵胆道合流異常研究会による診

断基準³⁹⁾に基づいて診断した。膵・胆管合流異常は、解剖学的に膵管と胆管が十二指腸壁外で合流する先天性の奇形と定義される。機能的に十二指腸乳頭部括約筋 (Oddi筋) の作用が合流部に及ばないため、膵液と胆汁の相互混入 (逆流) が起こり、胆道ないし膵では種々の病態が発生する。乳頭部括約筋の作用が合流部に及ばないことを確認することは時に困難であり、内視鏡的逆行性胆管膵管造影、経皮経肝胆道造影、術中胆道造影などで膵管と胆管が、異常に長い共通管をもって合流するか、異常な形で合流するものを確認し、膵・胆管合流異常とした。また合流異常の形態を、総胆管が主膵管に合流するものを胆管型、主膵管が総胆管に合流する膵管型、その他の複雑な合流をするものを複雑型に分類した。

2. 胆嚢組織材料

今回の検索には、全例、外科的切除胆嚢を用いた。疾患別にその内訳 (症例数、年齢、性別) を表1に示す。いずれの例でも外科的に切除後、胆嚢内容 (胆汁、胆石を含む) を可及的に除去し、10%中性緩衝ホルマリン内で伸展固定を一昼夜以上行った。固定後、非腫瘍性胆嚢では代表的な組織片を切り出し、パラフィン包埋を行った。胆嚢癌では胆嚢の全割標本を作成し、

Table 2. The list of the cases of pancreatico-biliary maljunction

Diseases	Case no.	Age	Sex	Type	Gall stone	Clinical diagnosis	Background of the gallbladder epithelia		
							Pseudopyloric gland metaplasia	Goblet cell metaplasia	Papillary hyperplasia
Non-neoplastic, non-dysplastic epithelia ^{a)}	1	10 days	F	B	—	Choledocal cyst	—	—	—
	2	15 days	F	B	—	Choledocal cyst	—	—	—
	3	1 year	F	P	—	Choledocal cyst	—	—	—
	4	2 yrs	F	P	—	Choledocal cyst	+	+	+
	5	2 yrs	F	P	—	Choledocal cyst	—	+	+
	6	3 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	+	+	—
	7	3 yrs	M	B	—	Choledocal cyst	—	—	+
	8	4 yrs	M	B	—	Choledocal cyst	—	—	+
	9	4 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	—	—	+
	10	5 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	—	—	+
	11	5 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	+	—	+
	12	5 yrs	F	P	—	Choledocal cyst	—	—	+
	13	6 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	—	—	—
	14	6 yrs	F	P	—	Choledocal cyst	+	—	+
	15	7 yrs	M	B	—	Choledocal cyst	+	+	+
	16	10 yrs	M	B	—	Choledocal cyst	—	+	+
	17	24 yrs	F	P	—	Choledocal cyst	+	+	+
	18	25 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	—	+	+
	19	33 yrs	F	B	+	Cholecystlithiasis	—	+	+
	20	67 yrs	M	B	+	Choledocal cyst	+	+	—
Dysplasia	21	5 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	—	+	—
	22	5 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	—	+	+
	23	18 yrs	F	B	—	Choledocal cyst	+	—	—
	24	21 yrs	F	P	+	Cholecystlithiasis	+	—	+
Carcinoma	25	39 yrs	F	P	—	Gallbladder carcinoma	+	+	—
	26	58 yrs	F	P	—	Gallbladder carcinoma	—	+	—
	27	77 yrs	F	B	—	Gallbladder carcinoma	+	+	+

^{a)} Chronic cholecystitis and almost normal gallbladder. yrs, years; M, male; F, female; B, the common bile duct joins the pancreatic duct; P, the pancreatic duct joins the choledochus; —, negative; +, positive.

パラフィン包埋を行った。なお、本研究では胆嚢頸部腺は検索対象から除外した。

1) 非合流異常例

i. 非腫瘍性胆嚢

非腫瘍性胆嚢は21例(16例が胆石症を合併)であり、組織学的に非癌非ディスプラジア性胆嚢が15例、ディスプラジアがみられたものが6例であった。うち11例に偽幽門腺化生が、13例に杯細胞化生が、5例に上皮の過形成性変化がみられた。

ii. 胆嚢癌

胆嚢癌は55例であり、22例は胆石を合併していた。これら胆嚢癌55例の内訳は高分化腺癌31例、中分化腺癌12例、低分化腺癌8例、未分化癌2例、粘液癌2例であった。胆嚢癌55例中10例(いずれも高分化腺癌)では明瞭な浸潤像はなく、非浸潤性胆嚢癌と考えられた。残りの45例では、種々の程度の浸潤像が認められた。

また胆嚢癌55例中14例で、癌部に接した非腫瘍部胆嚢粘膜上皮に、ディスプラジアがみられた。

2) 膵・胆管合流異常例

術前あるいは術中に胆道造影を行い、膵・胆管合流異常症が確認された27症例の外科的切除胆嚢を用いた。これら27症例の内訳(年齢、性別、合流異常様式、胆石の有無、臨床診断、胆嚢粘膜上皮の背景病変)を表2に示す。27例中22例が、術前、術中に先天性胆道拡張症と診断された。残りの5例には胆管の拡張は認められなかった。なお、成人例の3例に胆石の合併を認めた。

27症例の胆嚢の病理学的検索では、3例に胆嚢癌がみられ、高分化腺癌が1例、中分化腺癌が2例であり、いずれも浸潤癌

であった。またこれら胆嚢癌3例中2例で、癌部に接した非腫瘍部胆嚢粘膜上皮に、ディスプラジアがみられた。残りの24例の内、4例に胆嚢ディスプラジアがみられた。またこれら24例の内、9例に偽幽門腺化生が、11例に杯細胞化生が、16例に上皮の過形成性変化がみられたが、炎症性細胞の浸潤は軽度かあるいは殆どみられず、非合流異常での非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮とはやや異なっていた。

II. 検討方法

1. 病理組織学的検討

各々のパラフィン包埋ブロックより、4~5 μ mの切片を作成した。その内1枚はHE染色を行い病理組織診断に供した。他の切片はシランコート付マイクロスライドガラス(松浪硝子工業、大阪)にのせ、以下に述べる免疫組織化学的検討および組織内ハイブリダイゼーション(*in situ* hybridization, ISH)法に用いた。

2. ムチンコア蛋白発現の免疫組織化学的検討

MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 ムチンコア蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。免疫組織化学的検討(免疫染色)は、通常のアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(avidin-biotin-peroxidase complex, ABC/PO)法⁴⁰⁾を用いて行った。使用した抗体(MUC1^{41)~44)}, MUC2¹²⁾⁴⁵⁾, MUC5AC²²⁾はモノクローナル抗体, MUC6⁴⁶⁾はポリクローナル抗体)とその至適濃度を表3に示す。まず、脱パラフィン切片を0.3%過酸化水素(H₂O₂)添加メチルアルコール液中で30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。なお、MUC2発現の検討では、別途、切片をあらかじめ0.01Mリン酸緩生理食塩水(pH 7.2) (phosphate-buffered saline, PBS)に入れ、Shiら⁴⁷⁾に従

Table 3. Primary antibodies used for immunohistochemistry

Antibodies against	Source	Animals immunized	Type of antibodies (IgG)	Working concentration (μ g/ml)
DF3 (MUC1)	Toray-Fuji Bionichs, Tokyo, Japan	Mouse	Monoclonal	0.1
Ccp58 (MUC2)	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK	Mouse	Monoclonal	0.2
45M1 (MUC5AC)	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK	Mouse	Monoclonal	0.2
M6P (MUC6)	Gift from Dr. Ho ^{a)}	Chicken	Polyclonal	7
Nuclear Antigen Ki67 (MIB1)	Immunotech, Marseille, France	Mouse	Monoclonal	2

^{a)} Dr. S.B.Ho, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, USA.

Table 4. Sequence of synthetic oligonucleotides used to detect MUC1 and MUC2 mRNA

Gene	Oligonucleotide sequence	
MUC1	Anti-sense	5' GTC CGG GGC CGA GGT GAC ACC GTG GGC TGG GGG GGC GGT GGA GCC CGG 3'
	Sense	5' CCG GGC TCC ACC GCC CCC CCA GCC CAC GGT GTC ACC TCG GCC CCG GAC 3'
MUC2	Anti-sense	5' GGT CTG TGT GCC GGT GGG TGT TGG GGT T GG GGT CAC CGT GGT GGT GGT 3'
	Sense	5' ACC ACC ACC ACG GTG ACC CCA ACC CCA ACA CCC ACC GGC ACA CAG ACC 3'

いマイクロウェーブ処理を行い抗原の賦活化を行った。次に、切片を10%の非免疫動物血清 (MUC1, MUC2, MUC5ACの場合は馬血清, MUC6の場合は家兎血清) で20分間、室温で処理し2次抗体の非特異的結合を阻止した。次に、予備実験によって決めた至適濃度にPBSで希釈した各ムチンコア蛋白に対する1次抗体を反応させた。次に、マウスIgGに対するビオチン化2次抗体 (馬, IgG) (Vector Laboratory, Burlingame, USA) およびニワトリIgGに対するビオチン化2次抗体 (家兎, IgG) をPBSで200倍に希釈して室温で1時間反応させ、次にABC/PO溶液 (Vectastain ABC Kit) (Vector) で30分反応後、0.03% H₂O₂添加ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) で発色させた。その後、ヘマトキシリンで核染後、脱水封入し鏡検した。なお各々の反応の間には、切片をPBS内で3回以上十分に洗浄した。

なお免疫染色特異性は、染色の過程で1次抗体の代わりにPBSあるいは非免疫動物血清を用いた場合、陽性所見は得られないことにより確認した。

各組織切片上でのムチンコア蛋白の発現を、その範囲と程度により+++, ++, +, -に分けた (+++, 75%以上の範囲で陽性のもの; ++, 25%~75%の範囲で陽性のもの; +, 25%以下の範囲で陽性のもの; -, ムチンコア蛋白の発現がないもの)。なお、染色強度は、+++例で強く、+例で弱い傾向があった。しかし、+でもムチンコア蛋白の強い発現を示す例、+++でも弱陽性を示す部位を混在する例もみられた。

3. 胆嚢癌およびディスプラジアでのMUC1, MUC2 ムチンコア蛋白発現と細胞増殖活性との検討

非合流異常例で、MUC1とMUC2 ムチンコア蛋白の発現と細胞増殖活性との関連性を検討した。細胞増殖活性は、休止期 (G₀期)、初期の合成準備期 (G₁期) 以外の増殖期の細胞核に出現するKi-67抗原⁴⁸⁾⁴⁹⁾の発現率で評価した。つまり、MUC1あるいはMUC2の免疫染色を行った切片に連続する切片を用いて、Ki-67の免疫染色を行った。型の如く脱パラフィンを行った切片を、0.1%トリプシン (Difco Laboratories, Detroit, USA) 溶液 (PBS, pH 7.5) で37℃20分反応させ⁵⁰⁾、冷PBSで反応を停止させた。次いで、10mMクエン酸緩衝液pH6.0の溶液で5分間3回のマイクロウェーブで処理し⁴⁷⁾、抗原の賦活化を行った。その後、10%ウマ血清で室温で30分間反応させた後、100倍希釈の抗ヒトKi-67抗体⁴⁸⁾⁴⁹⁾ (MIB1, Immunotech, Marseille, France) を室温で1時間反応させた。その後、マウスIgGに対する2次抗体 (馬, IgG, 1:200) (Vector) を室温で1時間反応させABC/PO溶液 (Vector) 内で30分反応後、0.03% H₂O₂添加DABで発色させ、ヘマトキシリンで核染後、脱水封入し鏡検した。なお、各々の反応の間には、切片をPBS内で3回以上十分に洗浄した。

組織切片上でのMUC1, MUC2 ムチンコア蛋白の発現と細胞増殖活性の関連性を以下の如く検討した。弱拡大レベルで各々のムチンコア蛋白を発現している部位あるいは発現していない部位での、Ki-67の発現状態を調べた。ムチンコア蛋白陽性の細胞1000個とムチンコア蛋白陰性の細胞1000個中で、各々Ki-

Table 5. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 protein in carcinoma, dysplasia and non-neoplastic, non-dysplastic epithelia of gallbladder (non-maljunction)

Diseases	No. of cases	No. (%) of positive cases			
		MUC1	MUC2	MUC5AC	MUC6
Carcinoma	55	44 (80)	36 (65)	44 (80)	49 (89)
<i>In situ</i> carcinoma	10	6 (60)	10 (100)	9 (90)	9 (90)
Invasive carcinoma	45	38 (84)	26 (58)	35 (78)	41 (91)
Dysplasia	20	10 (50)	15 (75)	17 (85)	16 (80)
Without gallbladder carcinoma	6	2 (33)	4 (67)	6 (100)	6 (100)
With gallbladder carcinoma	14	8 (57)	11 (79)	11 (79)	10 (71)
Non-neoplastic, non-dysplastic epithelia	15	0	7 (47)	14 (93)	15 (100)

* p<0.05.

Table 6. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 protein in carcinoma, dysplasia and non-neoplastic, non-dysplastic epithelia of gallbladder (maljunction)

Diseases	No. of cases	No. (%) of positive cases			
		MUC1	MUC2	MUC5AC	MUC6
Carcinoma	3	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
Dysplasia	6	6 (100)	4 (67)	4 (67)	6 (100)
Without gallbladder carcinoma	4	4 (100)	2 (50)	2 (50)	4 (100)
With gallbladder carcinoma	2	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
Non-neoplastic, non-dysplastic epithelia ^{a)}	20	11 (55)	8 (40)	17 (85)	20 (100)

^{a)} Chronic cholecystitis and almost normal gallbladder.

67発現を示す細胞の百分率を求め、両群を比較検討した。

4. MUC1とMUC2の2重染色

部位により2種以上の分化度を示す5例の胆嚢癌のホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い、MUC1とMUC2ムチンコア蛋白の2重染色⁵¹⁾を行うことで、癌細胞でのMUC1発現とMUC2発現の分布を検討した。まず、MUC2に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。前述の如く、0.03% H₂O₂添加DABで発色後、水道水とPBSで十分に洗浄し、次いで、0.01%アビジン (アビジンD, Vector) で20分間、0.001% ビオチン (和光純薬, 大阪) で20分間反応させ内因性ビオチンを失活させた。次に、切片を10%の馬血清で室温で30分間反応させた後、MUC1に対するモノクローナル抗体を4℃で1晩反応させた。その後、マウスIgGに対する2次抗体 (馬, IgG, 1:200) (Vector) を室温で1時間反応させ、次いでアルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン-ビオチン複合体⁵²⁾ (streptavidin-biotin complex with alkaline phosphatase) (DAKO, Glostrup, Denmark) 内で30分反応後、ファーストレッド (Vector) で発色させた。ヘマトキシリンで核染色後、脱水封入し鏡検した。MUC1はファーストレッドで赤色に、またMUC2はDABで褐色に染色され、両者の識別は光学顕微鏡的に可能で

あった。観察は主として光学顕微鏡で行い、確認のため共焦点レーザー顕微鏡での観察も行った。なお、各々の反応の間は、切片をPBS内で3回以上十分に洗浄した。ただしアルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン-ビオチン複合体反応の前後は、トリス緩衝液 (100mM トリス塩酸pH7.6, 150mM 塩化ナトリウム) で3回以上十分に洗浄した。免疫染色の特異性はムチンコア蛋白での免疫染色と同様の方法で行った。

5. ISH法によるMUC1およびMUC2 mRNA発現の検討

1) ジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブの作製

胆嚢組織切片でのMUC1およびMUC2 mRNAの発現を以下の如く検討した⁵³⁾。プローブとしてMUC1およびMUC2遺伝子の特異的塩基配列を選び、これに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (各48塩基, バイオロジカ, 名古屋) およびセンスオリゴヌクレオチド (表4) を合成した。プローブのジゴキシゲニン標識はジゴキシゲニンテイルキット (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany) を用い、3'末端テイル法にて行った。すなわち、各100pmolのオリゴヌクレオチドに、テイル緩衝液、ジゴキシゲニン標識dUTP溶液、dATP溶液、ターミナルトランスフェラーゼを混合し、37℃で60分間反応させ、精製後、50μlのトリス塩酸-EDTA

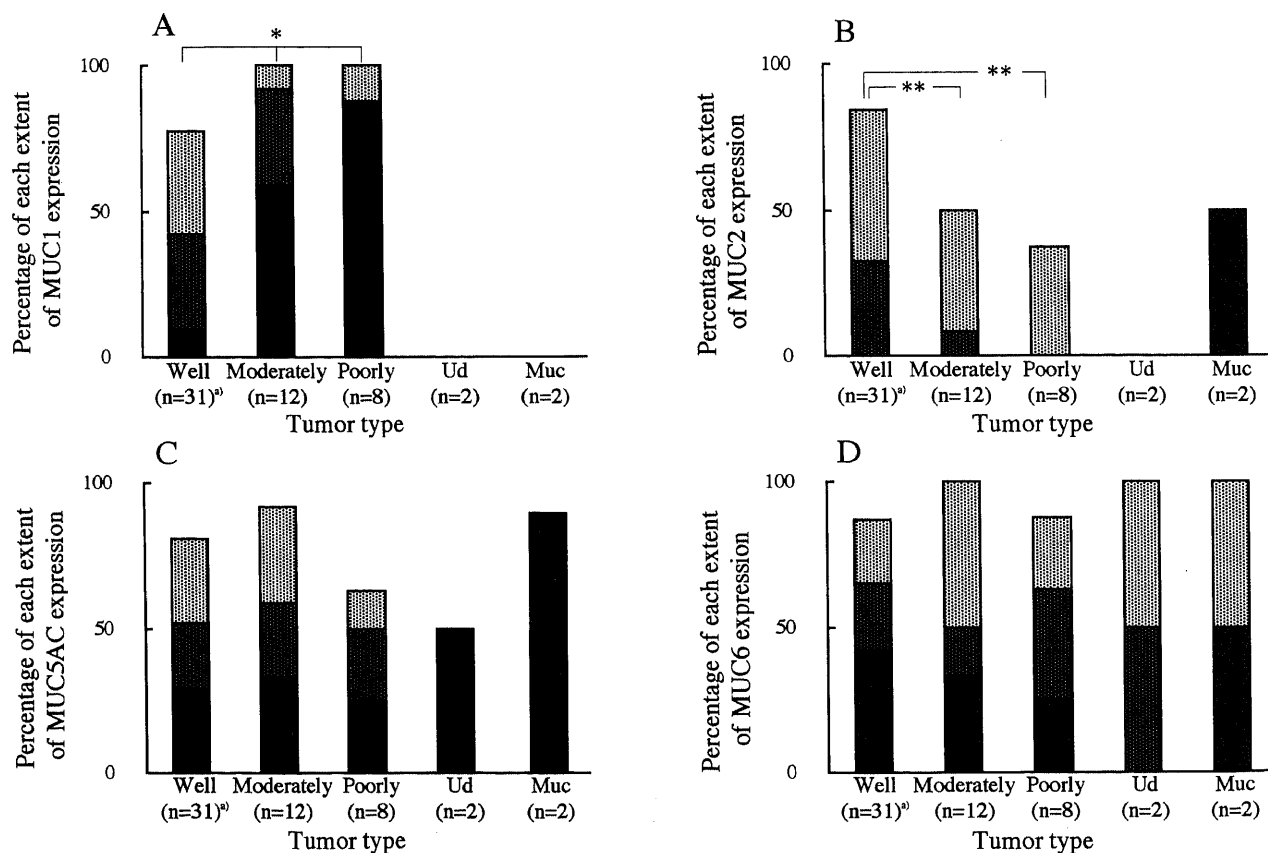


Fig. 1. Comparison of each extent of mucin core protein among tumor type (non-malignant). (A) MUC1, (B) MUC2, (C) MUC5AC, (D) MUC6. ■, percentage of positive cell is > 75%; ▨, percentage of positive cell is 25% ~ 75%; ▩, percentage of positive cell is < 25%; Well, well-differentiated adenocarcinoma; Moderately, moderately-differentiated adenocarcinoma; Poorly, poorly-differentiated adenocarcinoma; Ud, undifferentiated adenocarcinoma; Muc, mucinous carcinoma. ^{a)} Number of cases examined. MUC1 expression is related to de-differentiation with regard to well, moderately- and poorly-differentiated adenocarcinoma, when tested by Spearman's rank correlation coefficient test (*p < 0.05). MUC2 expression is more frequent in well-differentiated than moderately- and poorly-differentiated adenocarcinoma, when tested by chi-square test (**p < 0.05).

緩衝液に溶解した。

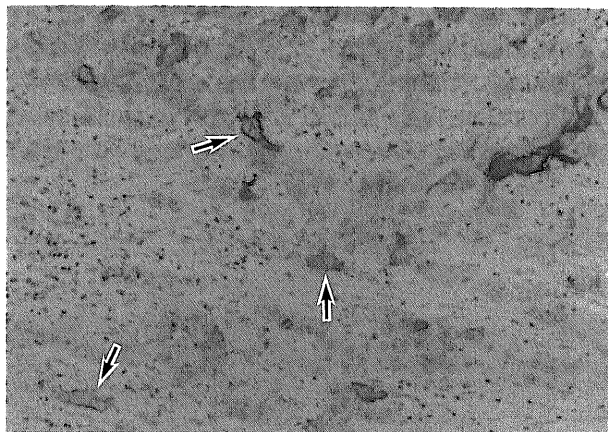
2) ホルマリン固定パラフィン包埋切片の前処置

型の如く行った脱パラフィン切片を、0.2N HCl溶液中で20分間反応させた後、37℃のプロテナーゼK溶液(和光純薬)で30分間反応させ除蛋白処置を行った。次いでPBSで希釈した4%パラフォルムアルデヒド(paraformaldehyde, PFA)(PFA/PBS)(pH7.6)で10分間後固定を行い、非特異的なプローブの吸着防止のために0.1Mトリエタノールアミン塩酸pH8.0と0.25%酢酸溶液で10分間アセチレーションを行った後、エタノール系列で脱水、風乾した。なお、各反応過程間はジエチ

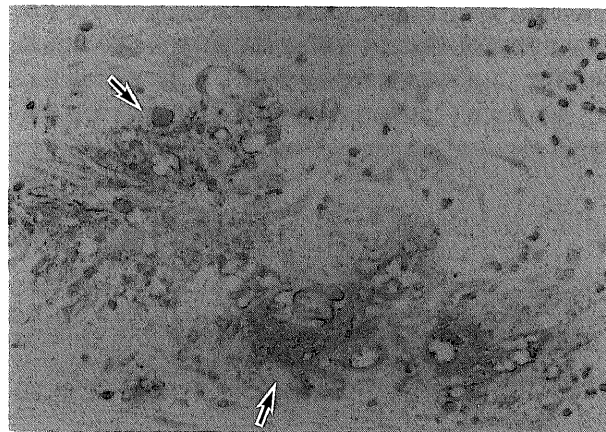
ルピロカーボネイト(diethylpyrocarbonate)処理したPBSで充分洗浄した。

4) ハイブリダイゼーション

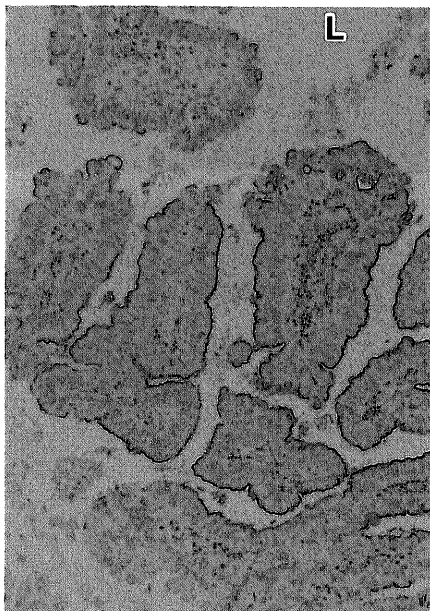
前処置した切片を、プレハイブリダイゼーション溶液(50%脱イオン化ホルムアミド、10mMトリス塩酸pH7.6、酵母tRNA200mg/ml、1×デンハルト溶液、サケ精子DNA250mg/ml)で室温、1時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、上記に10%デキストラン硫酸を加えたハイブリダイゼーション溶液で希釈した0.2nM/mlのジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブで、42℃一晩、ハイブリダイゼー



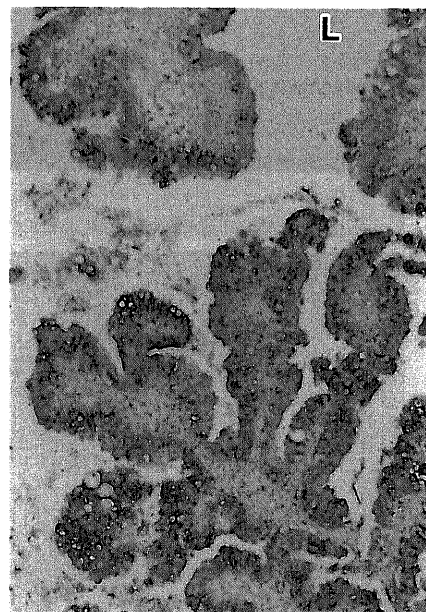
A



B



C



D

Fig. 2. Immunohistochemical staining of MUC1 (non-maljunction). (A) In poorly-differentiated carcinoma, many carcinoma cells infiltrating are positive for MUC1. MUC1 protein is expressed granularly in the cytoplasm and also expressed and/or accentuated on the cell borders (arrows). (B) At infiltrating areas, the reaction products of MUC1 are frequently leaked outside the carcinoma cell nests and imbibed to the adjacent connective tissue (arrows). (C) and (D) are step serial sections of the same tissue specimen. (C) MUC1 is expressed on the luminal surface of the papillary adenocarcinoma cells. L, lumen of the gallbladder. Immunostaining of MUC1 (ABC method) and hematoxylin. (D) *In situ* hybridization technique reveals MUC1 mRNA signals in gallbladder carcinoma cells. L, lumen of the gallbladder. Counterstain is methylgreen. $\times 200$ (A), $\times 100$ (B), $\times 160$ (C) and $\times 160$ (D).

ションを行った。洗浄は50%ホルムアミド加2×SSCで、50℃で15分間1回、2×SSC、1×SSCで50℃で20分間各1回ずつ、最後に、0.5×SSCで50℃で20分間1回行った。

5) ハイブリッドの免疫組織化学的検出

ジゴキシゲニンの検出は、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いて行った。すなわち、洗浄後の組織切片を1.5%ブロッキング試薬 (Boehringer Mannheim Biochemica) で1時間ブロッキング後、アルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗ジゴキシゲニンモノクローナル抗体 (500倍希釈, Boehringer Mannheim Biochemica) に3時間反応させ、ニトロブルーテトラゾリウム/リン酸ブロモクロロインドリル溶液 (nitroblue tetrazolium salt/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) で発色を行った。十分な発色を確認後、メチルグリーン液で核染色、風乾、キシレンで透徹後、封入した。各反応過程間は、トリス緩衝液で充分洗浄した。なお、陰性対象として、センスプローブを用いた染色で陽性所見が消失することを確認した。

6. 統計学的検討

統計学的検討には、 χ^2 検定、スピアマン順位相関係数、Pairedのt検定を用いて行い、危険率0.05未満を以て有意差ありとした。

成 績

非腫瘍性、腫瘍性胆嚢粘膜でのムチンコア蛋白の発現を、表5 (非合流異常例) と表6 (合流異常例) に示す。

I. 非腫瘍性、腫瘍性胆嚢粘膜でのMUC1ムチンコア蛋白の発現

1. 非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜でのMUC1ムチンコア蛋白の発現

MUC1の発現は、非合流異常例の非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮には認められなかったが、合流異常例では、20例中11例 (55%) の表層上皮の管腔縁に沿って認められた ($p < 0.05$)。また非合流異常例では、上皮の過形成性変化は15例中4例 (27%) に認めるのみであったが、合流異常例では、20例中

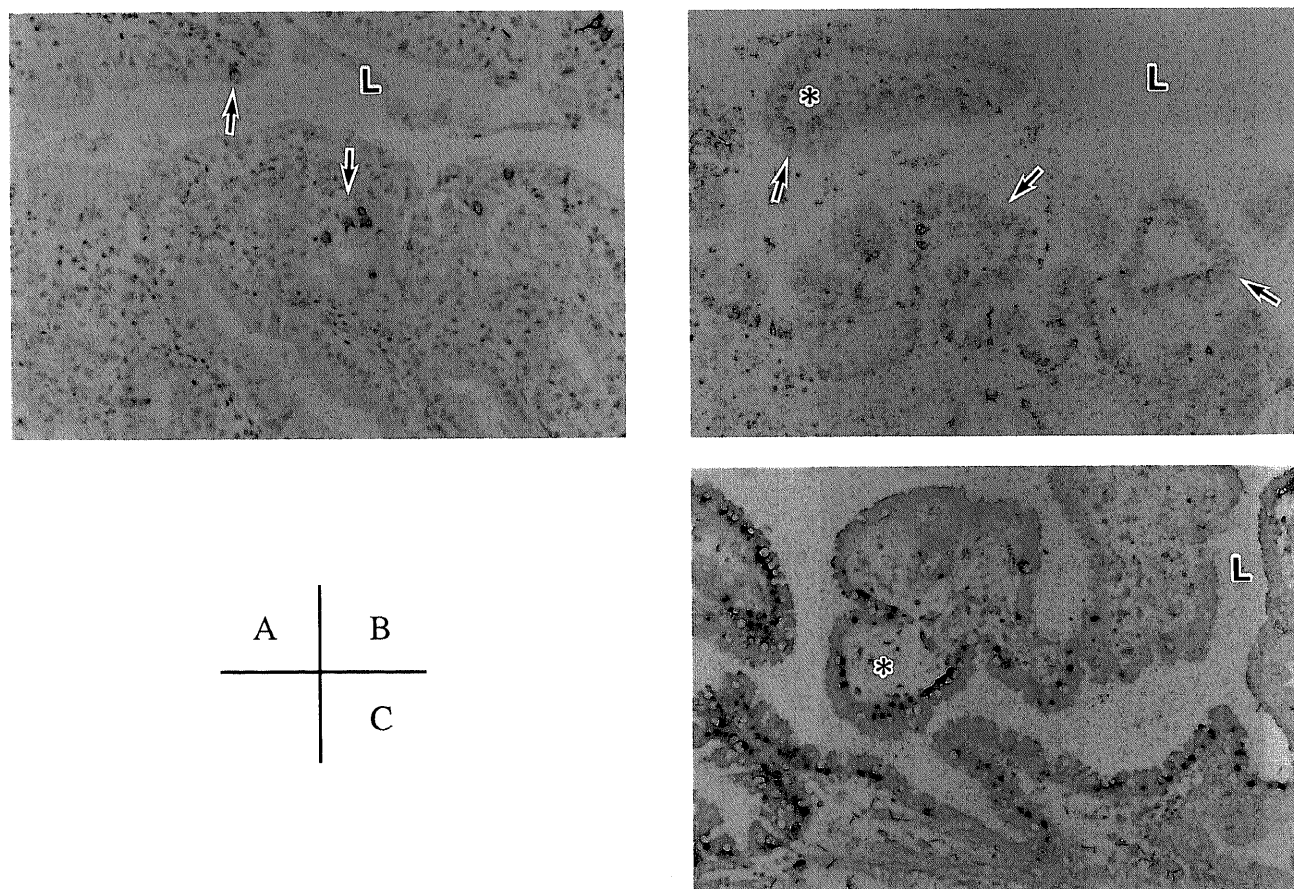


Fig. 3. Immunohistochemical staining of MUC2 (non-maljunction). (A) MUC2 protein is expressed granularly in the cytoplasm of cells resembling goblet cells (arrows) intermingled dysplastic cells. In goblet cells, perinuclear cytoplasm is strongly positive for MUC2. L, lumen of the gallbladder. (B) and (C) are step serial sections of the same tissue specimen of gallbladder carcinoma. (B) MUC2 is expressed in the cytoplasm of the carcinoma cells of several papillae (*). MUC2 positive cells resemble goblet cells with perinuclear cytoplasmic staining (arrows), while the others were columnar or cuboidal cells with whole cytoplasmic staining. L, lumen of the gallbladder. Immunostaining of MUC2 (ABC method) and hematoxylin. (C) *In situ* hybridization technique reveals MUC2 mRNA signals in some of the papillary parts of carcinoma (*), corresponding to the immunohistochemically positive area. L, lumen of the gallbladder. Counterstain is methylgreen. ×200 (A), ×160 (B) and ×160 (C).

14例 (70%) に上皮の乳頭状増生を認めた。MUC1の発現部位は、合流異常例での過形成性変化を示す上皮とは必ずしも一致していなかった。生後15日以内に切除した合流異常2例の過形成性変化に乏しい胆嚢表層上皮では、MUC1の広範に強い発現がみられた。なお偽幽門腺化生部や杯細胞化生部では、合流異常、非合流異常ともにMUC1の発現はみられなかった。

2. 胆嚢ディスプラジアでのMUC1ムチンコア蛋白の発現

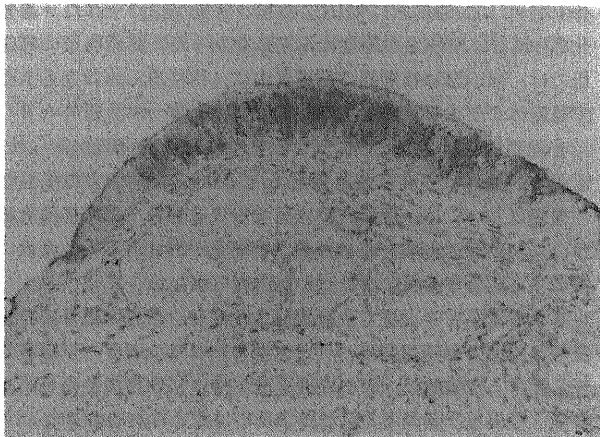
ディスプラジアを認めた非合流異常例20例中10例 (50%) でディスプラジア上皮の一部にMUC1の発現が認められた。いずれも異型上皮細胞の管腔縁に発現し、胆嚢癌を合併した14例中では8例 (57%) に、癌を合併しない症例6例中では2例 (33%) に発現を認めた。癌合併ディスプラジアでは癌非合併ディスプラジアと比較し、高率かつ広範に発現し、特に癌に接する部分の上皮によくみられた。一方、合流異常例のディスプラ

ジア6例 (うち2例は胆嚢癌合併例) では、6例全例で異型上皮細胞の管腔縁に種々の程度にMUC1の発現がみられ、癌合併例でより広範であった。非合流異常例に比べ、合流異常例でのMUC1の発現はより高率であった。

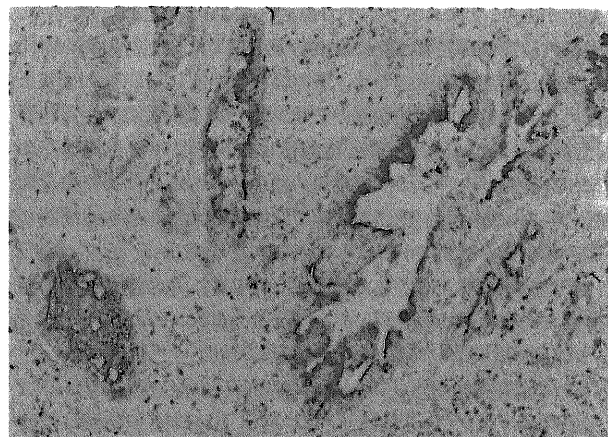
3. 胆嚢癌でのMUC1ムチンコア蛋白の発現

胆嚢癌では、種々の範囲、パターン、強度でMUC1の発現が認められた。つまり、癌組織内でMUC1が部分的に発現するもの、広範に発現するものなどがみられた。その発現パターンとして、癌胞巣の管腔縁や癌細胞の細胞膜全周性に発現するもの、癌細胞の胞体内全体 (びまん性) にあるいは一部に発現するものがあつた。なお、癌胞巣の管腔内や胆嚢内腔の分泌物もMUC1陽性であつた。

まず、胆嚢癌の分化度・組織型とMUC1の発現を検討した。図1に示す如く、MUC1は、胆嚢癌ではその組織学的分化度が



A

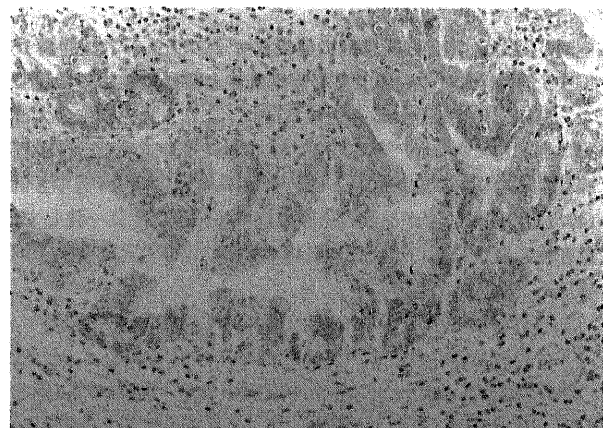


B

Fig. 4. Immunohistochemical staining of MUC5AC (non-maljunction). (A) MUC5AC protein is expressed granularly in the cytoplasm of the non-neoplastic, non-dysplastic epithelium. (B) MUC5AC protein is expressed granularly in the cytoplasm of carcinoma tubule. Immunostaining of MUC5AC (ABC method) and hematoxylin. $\times 320$ (A) and $\times 160$ (B).



A



B

Fig. 5. Immunohistochemical staining of MUC6 (non-maljunction). (A) MUC6 protein is slightly expressed in the cytoplasm of carcinoma tubule (arrows). In the background of the gallbladder epithelia (*), MUC6 protein is frequently expressed in the cytoplasm of pseudopyloric gland (arrowheads). (B) MUC6 protein is expressed granularly in the cytoplasm of carcinoma tubule. Immunostaining of MUC6 (ABC method) and hematoxylin. $\times 80$ (A) and $\times 200$ (B).

低い程、強く広範な発現があり、分化度が高くなるにつれてMUC1の発現率やその範囲が減少、消失する傾向があった($p < 0.05$)。また同一症例で部位により癌組織の分化度が異なる場合、高分化度の部位ではMUC1の発現が低下あるいは陰性であるのに対し、分化度が低い部位ではMUC1は高率に強く発現する傾向がみられた。なお、未分化癌2例、粘液癌2例ではMUC1の発現はみられなかった。次に、胆嚢癌の組織型とMUC1の発現パターンとの関連性を検討した。高分化腺癌の管状あるいは乳頭状増殖を示す癌細胞では、管腔縁が主に染まるものが多くみられたが、管状あるいは索状の配列を示す中分化腺癌、低分化腺癌では、胆嚢癌の癌細胞の胞体がびまん性に染まるもの、さらに主に細胞膜周囲が染まるものが多くみられた(図2A)。これらのMUC1の発現パターンは、症例により混在してみられた。

非浸潤性胆嚢癌でのMUC1発現は、浸潤性胆嚢癌より低率で(表5)、MUC1は胆嚢内腔に面する表層部に部分的に発現する傾向があり、ディスプラジアでの発現パターンに類似していた。浸潤性胆嚢癌の胆嚢内腔に面する表層部では分化度の高い傾向があり、同部の癌細胞では、管腔縁に散在性にMUC1の発現を認めた。これに対し癌細胞が管状あるいは索状に浸潤する胆嚢壁深部では、MUC1は強く広範に発現していた。同部でのMUC1発現パターンは、癌細胞の胞体全体あるいは細胞膜全周性に発現がみられ、浸潤先端部では反応陽性物が癌細胞周囲の結合織に染み出す像がしばしばみられた(図2B)。

また合流異常を合併した胆嚢癌3例でも、非合流異常例の胆嚢癌と同様のMUC1発現パターンがみられた。

4. ISH法によるMUC1 mRNA発現の検討

非合流異常例を用いてMUC1 mRNA発現の検討を行った。非癌非ディスプラジア性胆嚢ではMUC1 mRNAの発現は認められなかった。しかし、ディスプラジアや胆嚢癌では種々の程度でMUC1 mRNAの発現があり、連続切片による観察で、MUC1ムチンコア蛋白の発現に一致してMUC1 mRNAのシグナルがみられた(図2C, 2D)。

Ⅱ. 非腫瘍性、腫瘍性胆嚢粘膜でのMUC2 ムチンコア蛋白の発現

1. 非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜でのMUC2 ムチンコア蛋白の発現

MUC2は、非合流異常例の非癌非ディスプラジア性胆嚢15例中7例(47%)の表層上皮の細胞質核上部に顆粒状に発現した。MUC2陽性細胞は散在性にみられ、これら陽性細胞の大部分は杯細胞であり、一部の円柱上皮にも発現を認めた。偽幽門腺化生部では発現はなかった。合流異常例では20例中8例(40%)に、MUC2が粘膜の表層上皮の杯細胞化生に一致して、散在性に発現していた。その発現パターンは非合流異常例と同様であった。

2. 胆嚢ディスプラジアでのMUC2 ムチンコア蛋白の発現

非合流異常例のディスプラジア20例中15例(75%)にMUC2の発現が認められた(うち癌合併14例中11例、癌非合併6例中4例)。MUC2は、異型上皮細胞に混じって存在する杯細胞型の細胞や円柱上皮の細胞質核上部や核周囲に顆粒状に発現した(図3A)。合流異常例では6例中4例(67%)に軽度から中等度の発現がみられ、非合流異常例と同様の発現パターンを示した。非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜と比較し、広範な発現が認められた。

3. 胆嚢癌でのMUC2 ムチンコア蛋白の発現

非合流異常例の胆嚢癌では、55例中36例(65%)にMUC2の発現がみられた。その発現は散在性で、一部の円柱状の癌細胞の細胞質核上部や杯細胞型の癌細胞の細胞質内に顆粒状に認められた。なお、MUC2陽性細胞は単細胞性にみられるか、あるいはやや密在してみられても、同時にMUC2陰性細胞も癌細胞内に混在していた。なお、管腔内粘液はMUC2陰性であった。

胆嚢癌の分化度・組織型とMUC2の発現を検討した。図1に示す如くMUC2は、高分化腺癌では31例中26例(84%)に発現がみられ、中分化腺癌(12例中6例, 50%)、低分化腺癌(8例中5例, 38%)と比較し、より高率であった($p < 0.05$)。MUC2は、高分化度の胆嚢癌ではより広範な発現があり、分化度が低くなるにつれて発現率と発現範囲が減少あるいは消失する傾向があった。また同一症例で部位により癌の分化度が異なる場合、MUC2は高分化度の部位は高率には発現し、低分化度の部位では低下あるいは陰性化する傾向がみられた。粘液癌2例中1例(50%)では、癌細胞にMUC2の強い発現が認められた。未分化癌2例ではMUC2の発現はみられなかった。杯細胞型の癌細胞では、MUC2は核周囲の細胞質内に、円柱あるいは立方上皮では胞体がびまん性に陽性であった。

非浸潤性胆嚢癌では、全例に散在性にMUC2発現がみられ、浸潤性胆嚢癌より高率であった($p < 0.05$) (表5)。また浸潤性胆嚢癌においては、胆嚢内腔に面する表層部の一部の癌細胞胞体内にMUC2の発現を認めたが、癌細胞が管状あるいは索状に浸潤する胆嚢壁深部にはほとんど認められなかった。

また合流異常を合併した胆嚢癌3例でも、非合流異常例の胆嚢癌と同様のMUC2発現パターンがみられた。つまり、胆嚢内腔に面する表層部の一部の癌細胞胞体内にMUC2の発現を認めたが、癌細胞が浸潤する胆嚢壁深部には認められなかった。

4. ISH法によるMUC2 mRNA発現

非合流異常例を用いてMUC2 mRNA発現の検討を行った。非癌非ディスプラジア性胆嚢ではMUC2 mRNAの発現は認められなかった。ディスプラジアや胆嚢癌では、連続切片による観察で、MUC2ムチンコア蛋白の発現に一致してMUC2 mRNAのシグナルがみられた(図3B, 3C)。

Ⅲ. 非腫瘍性、腫瘍性胆嚢粘膜でのMUC5AC ムチンコア蛋白の発現

1. 非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜でのMUC5AC ムチンコア蛋白の発現

非合流異常例の非癌非ディスプラジア性胆嚢15例中14例(93%)にMUC5ACの発現がみられた。主に表層上皮の細胞質内にびまん性に発現がみられ(図4A)、偽幽門腺化生部では殆ど発現が認められなかった。また杯細胞化生部では殆ど発現がなかったが、一部の陽性杯細胞では、核上部胞体内にわずかに発現がみられた。合流異常例でのMUC5ACは、非合流異常の非癌非ディスプラジア性胆嚢と同様の傾向を示し、20例中17例(85%)に発現がみられた。

2. 胆嚢ディスプラジアでのMUC5AC ムチンコア蛋白の発現

MUC5ACは、非合流異常例のディスプラジア20例中17例(85%)に、主にディスプラジア上皮の細胞質内にびまん性に発現が認められた(うち癌合併14例中11例、癌非合併6例全例)。合流異常例では6例中4例(67%)に発現がみられ、非合流異常例と同様の発現パターンを示した。またディスプラジアでは、合流異常、非合流異常例ともに、非癌非ディスプラジア性胆嚢

粘膜と比較し、その発現パターンに違いはみられなかった。

3. 胆嚢癌でのMUC5ACムチンコア蛋白の発現

非合流異常例の胆嚢癌では、55例中44例(80%)にMUC5ACの発現がみられた(表5)。その発現は主に癌細胞の細胞質核上部にびまん性に、あるいは管腔縁にみられた(図4B)。また癌細胞が浸潤する胆嚢壁深部では、癌細胞の胞体全体あるいは細胞膜全周性に発現がみられた。

胆嚢癌の分化度・組織型とMUC5ACの発現を検討した。図1に示す如くMUC5ACは、分化度・組織型とは明らかな相関はなかった。粘液癌2例はともに、MUC5ACの強い発現が認められ、分泌粘液にも発現が認められた。未分化癌2例中1例(50%)でMUC5ACの強い発現がみられた。

非浸潤性胆嚢癌10例中9例(90%)にMUC5ACの発現がみられ、浸潤性胆嚢癌(45例中35例, 78%)と比較し高率に発現が認められた(表5)。

また合流異常を合併した3例全例で癌部にMUC5ACの発現があり、1例で広範に強く発現し、2例では散在性に発現がみられた。非合流異常例の胆嚢癌と同様のMUC5AC発現パターンがみられた。

Ⅳ. 非腫瘍性、腫瘍性胆嚢粘膜でのMUC6ムチンコア蛋白の発現

1. 非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜でのMUC6ムチンコア蛋白の発現

非合流異常例の非癌非ディスプラジア性胆嚢15例全例にMUC6の発現を認めた。MUC6は主に偽幽門腺化生部に一致して、強くかつ広範な発現が認められた。また表層上皮の核周囲や管腔縁にも顆粒状の陽性像を認め、その発現は表層上皮腺頸部に強い傾向がみられた。合流異常例でのMUC6は、非合流異常例の非癌非ディスプラジア性胆嚢と同様の傾向を示し、20例全例に種々の程度に発現がみられた。

2. 胆嚢ディスプラジアでのMUC6ムチンコア蛋白の発現

MUC6は、非合流異常例のディスプラジア20例中16例(80%)に発現が認められた(うち癌合併14例中10例, 癌非合併6例全例)。病変部、背景部にみられた偽幽門腺化生部では、MUC6の強い発現がみられた。ディスプラジア上皮でのMUC6

の発現は、偽幽門腺化生部と比較して、弱い傾向が認められた。異型上皮細胞胞体内に顆粒状の発現が認められた。合流異常例では6例全例に発現がみられ、非合流異常例と同様の発現パターンを示した。ディスプラジアでは、合流異常、非合流異常例ともに、非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜と比較し、ほとんど違いはみられなかった。

3. 胆嚢癌でのMUC6ムチンコア蛋白の発現

MUC6は、非合流異常例の胆嚢癌では、55例中49例(89%)に発現がみられた。MUC6は主に癌細胞の細胞質全体に顆粒状の発現が認められた。偽幽門腺化生部では、MUC6の強い発現がみられた(図5A, 5B)。

胆嚢癌の分化度・組織型とMUC6の発現を検討した。図1に示す如くMUC6は、分化度・組織型と発現範囲には明らかな傾向はみられなかったが、高分化度の胆嚢癌では強い染色性を示し、分化度が低くなるにつれてMUC6の染色性は弱くなる傾向がみられた。特に高分化腺癌の場合、胆嚢内腔に面する表層部の癌細胞より腺頸部に強く発現した。

MUC6発現は、非浸潤性胆嚢癌と浸潤性胆嚢癌で特に差はなかった(表5)。

また合流異常を合併した3例全例に、高度のMUC6の発現がみられた。その発現パターンは非合流異常例の胆嚢癌と同様であった。

V. MUC1およびMUC2ムチンコア蛋白の発現と細胞増殖活性

非合流異常例を用いて、胆嚢癌およびディスプラジアでのMUC1ムチンコア蛋白の発現の有無と細胞増殖活性との関連性について検討した(表7)。なお、Ki-67抗原は非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮、胆嚢ディスプラジア上皮や胆嚢癌の核に種々の程度に発現した。

胆嚢ディスプラジアではMUC1陽性細胞でのKi-67発現率は27.4%であり、MUC1陰性細胞でのKi-67発現率は9.47%であり、MUC1陽性細胞で増殖活性が高かった。一方、MUC2陽性細胞でのKi-67発現率は17.1%であり、MUC2陰性細胞でのKi-67発現率は9.47%であり、MUC2陽性細胞でKi-67の発現が高率であった。

Table 7. Cell proliferation activity in carcinoma, dysplasia and non-neoplastic, non-dysplastic epithelia of gallbladder (non-maljunction)

Diseases	No. of cases	MIB-1 indices (%)			
		MUC1-positive area	MUC1-negative area	MUC2-positive area	MUC2-negative area
Carcinoma	40	34.8	13.5	20.0	14.1
Well	20	29.0	11.7	18.1	11.7
Moderately	12	36.0	17.7	19.5	17.7
Poorly	8	47.2	NA*	32.7	27.7
Dysplasia	20	27.4	9.5	17.1	9.5
Without gallbladder carcinoma	6	59.4	22.1	44.0	22.1
With gallbladder carcinoma	14	18.2	5.2	7.3	5.2
Non-neoplastic, non-dysplastic epithelia	15	NA**	1.4	8.0	1.4

MIB-1 index, Cell proliferation activity is shown as MIB-1 index. The percentages of MIB-1 positive cells was determined by scoring in the most extensively immunostained areas of mucin core protein and negative areas of mucin core protein; well, well-differentiated adenocarcinoma; moderately, moderately-differentiated adenocarcinoma; poorly, poorly-differentiated adenocarcinoma; NA, not available; NA*, No area negative for MUC1; NA**, No area positive for MUC1; * p<0.05.

胆嚢癌全体では、MUC1陽性細胞でのKi-67発現率は34.8%であり、MUC1陰性細胞でのKi-67発現率は13.5%であり、MUC1陽性細胞でKi-67の発現が高率であった ($p < 0.05$)。またMUC1陽性細胞では、高分化、中分化、低分化と分化度が下がるにつれ、Ki-67陽性細胞の比率が29.0%、36.0%、47.2%と増加した ($p < 0.05$)。また、MUC2陽性細胞でのKi-67発現率は20.0%であり、MUC2陰性細胞でのKi-67発現率は14.1%であり、有意差はなかった。

Ⅵ. MUC1とMUC2ムチンコア蛋白発現の関連性

部位により2種以上の分化度を示す5例の非合流異常胆嚢癌を用い、癌細胞でのMUC1発現とMUC2発現との関連性についてMUC1とMUC2蛋白の2重染色にて検討した。いずれも腫瘍表層部に比べ浸潤部では分化度は低下していた。分化度の高い表層部ではMUC2の発現が、より分化度の低い浸潤部ではMUC1の発現が強く、広範囲に認められた。同一切片内あるいは連続切片内で、MUC1、MUC2の両者が発現する症例では、MUC1とMUC2は互いに相補的に発現する傾向を認めた。

考 察

本研究では、胆嚢粘膜上皮でのMUC1、MUC2、MUC5AC、MUC6ムチンコア蛋白の発現の病理学的意義を、免疫組織化学およびISH法にて検討した。

まず、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたISH法で、胆嚢ディスプラジアおよび胆嚢癌でのMUC1およびMUC2 mRNAの発現を検討した結果では、それらはMUC1およびMUC2ムチンコア蛋白と同様の分布を示した。これらの所見は、胆嚢ディスプラジアおよび胆嚢癌でMUC1およびMUC2ムチンコア蛋白の転写、合成が活発に行われていることを示している。これらの所見から胆嚢粘膜上皮でのMUC1およびMUC2の発現は、癌化と関連した異常な現象を表していると考えられる。また、ムチンコア蛋白の発現の動態が免疫染色で十分把握できることを示している。

まず、膜貫通型および分泌型の両者の性格をもつムチンコア蛋白であるMUC1の発現に関して述べる。今回の検討で、胆嚢癌におけるMUC1の発現形式は、組織学的分化度、浸潤性ならびに細胞増殖活性と関連があることが示された。MUC1ムチンコア蛋白は、非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮に発現はみられなかったが、胆嚢ディスプラジアでは部分的に管腔縁に発現がみられた。特に癌合併ディスプラジアは、癌非合併ディスプラジアよりMUC1の発現は高率で、より発現範囲は広い傾向があった。胆嚢癌では、ディスプラジアよりさらに高頻度に強く広範囲に発現する傾向があった。非浸潤性胆嚢癌ではむしろディスプラジアに類似した発現パターンを示した。胆嚢粘膜におけるMUC1発現の結果より、胆嚢粘膜では癌化あるいは腫瘍化は段階的に進行し、さらに胆嚢粘膜におけるMUC1は癌化の指標となることが示唆された。

また合流異常症例では、MUC1は、非腫瘍性の胆嚢粘膜で20例中11例 (55%)、ディスプラジアでは、6例全例に発現がみられた。興味深い所見として、生後15日以内の2例で、MUC1は広範囲に強く発現した。Sasakiら⁵⁰⁾が指摘している様にMUC1は肝内胆管系では癌胎児性抗原のひとつであり、新生児では胎生期の表現型が遺残している可能性もある。しかし、MUC1の発現は生後1年以後も高率にみられ、合流異常例では、発癌の危険性の高い状態にあると考えられる。また非合流異常例で、15

例中4例 (27%) にのみみられた上皮の過形成性変化は、合流異常例では、20例中14例 (70%) と高率に認められた。しかしMUC1の発現部位は、合流異常例での過形成性変化を示す上皮とは必ずしも一致せず、MUC1発現の検討からは、合流異常での上皮の過形成性変化と癌化の関連は明かではなかった。

次に胆嚢癌でのMUC1発現の意義に関して検討した。分化度別では、MUC1は、高分化腺癌や中分化腺癌と比べ低分化腺癌で高率にまた広範囲に発現した。しかし、癌内でもその発現は不均一で、ある部位では集簇性に陽性、ある部位では陰性であった。このことは同一腫瘍内での異種性を示しており、サブクローンの出現を示す可能性もある。高分化腺癌では、MUC1発現は主に癌の腺腔あるいは管腔側細胞膜上に線状に発現するか、あるいは癌細胞の胞体内に発現した。しかし分化度の低い症例では、癌細胞基底膜側や周囲あるいは細胞質内にびまん性に認められた。このことは、MUC1の胆嚢癌での発現は、癌細胞での極性の維持と喪失に関連することが示唆された。MUC1は癌の発生のみならず、腫瘍の進展にも関連すると思われる。

また浸潤性胆嚢癌でのMUC1発現は、非浸潤性胆嚢癌より高率であった。さらに同一の胆嚢癌での検討では、興味深いことにMUC1は、癌浸潤部、特に浸潤の先端部で強く広範囲に発現する傾向があった。これらの部分ではMUC1は間質に接する癌細胞全周性に発現があり、さらに癌細胞周囲の結合織に滲みだす様な発現が認められた。このようなMUC1の発現パターンは、非浸潤性胆嚢癌10例ではみられず、MUC1は胆嚢癌の浸潤に関与していることが示唆された。MUC1はムチンコアファミリーのなかでも特異的な存在で、膜貫通型として細胞膜表面に発現するのみならず、分泌型としても知られている¹⁰⁾。浸潤部では、膜型のMUC1の発現が亢進するのみならず、分泌型として産生されたMUC1が癌の浸潤に関与する可能性も考えられた。Hudsonら¹⁰⁾の報告では、MUC1遺伝子を組み入れたヒト腺癌細胞では、サイトケラチン発現の変化と、コラーゲンとの接着力の低下がみられたとしている。同様に胆嚢癌でも、浸潤の先端部ではMUC1が発現することで、癌周囲の基質との接着性が低下し、より浸潤しやすくなる可能性が考えられる。またRegimbaldら⁵⁵⁾によれば、MUC1は細胞間接着分子1 (intercellular adhesion molecule 1) を介して内皮細胞と接着し、腫瘍細胞の進展や転移に重要な役割を示すとしている。MUC1の過剰な発現は周囲結合織へ浸潤するだけでなく、転移を促進する働きをもっているのかもしれない。これらについては今後究明していくべき重要な問題点と思われる。

悪性腫瘍の発育、進展には細胞増殖活性の亢進が重要である⁴⁸⁾。Leeら⁵⁶⁾によれば、慢性胆嚢炎より胆嚢癌で細胞増殖活性は高く、さらに中分化腺癌よりも低分化腺癌で細胞増殖活性は高いとしている。今回の検討で、MUC1陽性細胞はMUC1陰性細胞に比べ、細胞増殖活性が高いことが示された。MUC1発現が高度な癌細胞ではより高い増殖活性を示し、その活動性が増しているものと考えられた。今回の検討では予後調査はなされなかったが、MUC1ムチンコア蛋白の発現は、胆嚢癌の生物学的活性あるいは予後を評価する上で有用な指標となりうるものと思われた。

次に、分泌型のムチンコア蛋白であるMUC2、MUC5AC、MUC6について述べる。今回の検討で、MUC2発現は非癌非ディスプラジア性胆嚢、ディスプラジア、また胆嚢癌でも杯細胞の形態を示す細胞にみられた。ヒト胆嚢では、杯細胞化生

は前癌病変や癌、特に高分化腺癌で認められることが知られている⁵⁷⁾。これらより、MUC2は癌細胞やディスプラジアにおける杯細胞への分化、腸型の表現型を示すと考えられた。また非癌非ディスプラジア性胆嚢、ディスプラジア、非浸潤性胆嚢癌の順にMUC2の発現が高くなる傾向があった。また胆嚢癌の各分化度における検討では、高分化度では中分化度、低分化度の胆嚢癌と比べより広範に高率に発現していた。さらに、浸潤性胆嚢癌でのMUC2発現率は、非浸潤性胆嚢癌と比べ低率で、癌の浸潤とは負の相関を示した。以上より、胆嚢癌においてMUC2発現で示される腸型の表現型は、癌化の過程で出現し、浸潤過程で消失することが明らかとなった。今回の検討で、MUC2陽性細胞とMUC2陰性細胞での細胞増殖活性には違いがなく、MUC2発現と細胞増殖活性とは関連がなかった。またMUC2陽性細胞はMUC1陽性細胞より、低い細胞増殖活性を示していた。Yonezawaら⁵⁸⁾は、胆管嚢胞腺癌や膵管内乳頭腺癌ではMUC2が高率に発現しており、MUC2は浸潤能、転移能の低い予後良好な腫瘍に関連して発現するとしている。今回の胆嚢癌の検討でも、MUC2は非浸潤性胆嚢癌でより高率に発現し、増殖活性も低いことが示され、同様の傾向を示していた。

また、MUC2ムチンコア蛋白の発現は、粘液癌の2例中1例で強陽性であったが、粘液は陰性であった。Ajiokaら¹⁰⁾によれば、MUC2ムチンコア蛋白は大腸粘液癌では高率に陽性であり、また粘液も陽性であったとしており、胆嚢粘液癌でのムチンコア蛋白の発現とは異なっていた。これは、今回の検討で使用したMUC2ムチンコア蛋白に対する抗体は、Ajiokaら¹⁰⁾が使用した抗体とは異なるエピトープを認識しているためと思われる。

胆嚢癌では、MUC1ムチンコア蛋白とMUC2ムチンコア蛋白の発現形式は相反しており、このことはMUC1とMUC2発現の相違は、組織型だけではなく生物学的な違いを表していると考えられる。つまり、MUC1の発現は、胆嚢癌では組織学的分化度、浸潤性ならびに細胞増殖活性と、胆嚢ディスプラジアでは悪性変化と関連があると考えられた。一方MUC2は、高分化腺癌や前癌病変での杯細胞化生と関連があり、浸潤性や細胞増殖活性とは関連は乏しいものと考えられた。Yamashitaら¹⁹⁾によれば、MUC1は予後の悪い浸潤性の肝内胆管癌に高率に発現し、MUC2は予後の良い胆管嚢胞腺癌に高率に発現したとしている。またAjiokaら¹⁰⁾によれば、MUC1陰性、MUC2陽性の胆嚢癌では1例にリンパ節転移を認めたのみであり、MUC1陽性の胆嚢癌と比較して予後が良く、MUC1の過剰発現は胆嚢癌の進展、転移の指標になりうるとしている。

次に、MUC5ACムチンコア蛋白に関して述べる。今回の検討で、非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮は、MUC5ACムチンコア蛋白を発現することが明らかとなった。MUC5ACは、胃表層上皮に生理的に発現するムチンコア蛋白であり²⁴⁾²⁵⁾、胆嚢の非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮も、胃表層上皮と同様の表現型を示すことが明らかとなった。Reisら²²⁾の胃癌での検討によれば、MUC5ACは正常胃粘膜、早期胃癌では全例に発現がみられ、進行胃癌ではその組織型に関係なくその発現率は低下し、癌化への初期の段階では、胃型の表現型を保持しているとしている。今回の検討でMUC5ACは、非癌非ディスプラジア性胆嚢、ディスプラジア、胆嚢癌の順に高率に発現がみられ、組織型・分化度との関係はなかった。さらに浸潤性胆嚢癌では、非浸潤性胆嚢癌より発現率は低下した。よって、今回の胆嚢における検討でも、MUC5ACは、胃と同様の発現傾向

を示したといえる。また症例によっては、癌細胞が浸潤する胆嚢壁深部で、癌細胞の胞体全体、細胞膜全周性あるいは癌巣周囲結合組織へ染み出すような強い発現がみられ、浸潤部でも胃表層上皮型の表現型を保持しているものと考えられた。このような浸潤部でMUC5ACの発現がみられる症例では、MUC5ACはMUC1と同様に癌の浸潤に関与する可能性も示唆された。

またKushimaら³⁰⁾の胃上皮や腸上皮に反応するモノクローナル抗体を用いた検討では、胆嚢癌22例中12例は胃型、腸型の両方の表現型を有し、胆嚢癌の多方向性への分化を示唆している。胃型、腸型の両方の表現型を示す理由として、腸上皮化生(あるいは偽幽門腺化生)から発生した腸型(胃型)の胆嚢癌が、胃型(腸型)への分化を示すか、あるいは癌発生初期の段階からすでに胃型と腸型両方への分化をしているかのいずれかの理由が考えられる。今回の検討で、胆嚢ディスプラジアでは20例中14例(70%)、また非浸潤性胆嚢癌では10例中9例(90%)にMUC2(腸型)、MUC5AC(胃型)が同時に発現していた。すなわち、癌発生初期の段階では胃型と腸型両方への分化をしているものが多いと考えられた。しかし胆嚢癌浸潤部では、MUC2は発現は殆どなく、MUC5ACも発現率は低下するものの、強く広範に発現する症例も多いことから、浸潤性胆嚢癌では、胃型の表現型を保持しているものが優位になるものと思われた。

次に、MUC6ムチンコア蛋白に関して述べる。今回の検討では、MUC6は、非癌非ディスプラジア性胆嚢、胆嚢ディスプラジア、胆嚢癌のいずれにおいても、殆どの偽幽門腺化生部(病変部、背景部)で高率に強い染色性を示した。胆嚢癌では、55例中49例(89%)と高率にMUC6の発現がみられ、その発現形式は、分化度・組織型と発現範囲には明らかな傾向はみられなかった。しかし、高分化度の胆嚢癌ではより強い染色性を示し、分化度が低くなるにつれて弱くなる傾向がみられた。特に高分化腺癌の場合、胆嚢内腔に面する表層部の癌細胞より腺頸部に強く発現した。また偽幽門腺化生は、腸上皮化生と同様に胆嚢癌発生母地となるとの報告もある³¹⁾。今回の検討では、偽幽門腺と胆嚢癌に共通してMUC6発現がみられ、偽幽門腺化生部が発生母地となっている癌も存在することが考えられた。

最後に、本研究でMUC1が胆嚢癌の発生、増殖と浸潤に深く関連することが膵・胆管合流異常例、非合流異常例を用いて明らかとなった。最近Takahashiら³²⁾は、多発性骨髄腫患者末梢血リンパ球よりMUC1エピトープに対するヒトリンパ球抗原(cytotoxic T lymphocyte, CTL)を樹立した。通常のCTLは、HLA型の異なる細胞に対しては、全く障害活性を持たないが、MUC1を導入した細胞は非常によく傷害され、元の細胞やMUC1の相補的遺伝子(アンチセンス遺伝子, anti-sense gene)を導入した細胞は傷害を受けなかったとしている。このようなMUC1エピトープの免疫原性に注目し、合成ペプチドや組換え蛋白による能動的特異免疫療法や、CTLを生体外で増殖させ、患者体内に戻す受身自家移入が基礎的に検討されつつある^{33)・32)}。胆嚢癌においてもMUC1を用いた免疫療法は応用可能であると思われ、さらに膵・胆管合流異常の症例では、発癌予防が可能となるかもしれない。

結 論

非癌非ディスプラジア性胆嚢、胆嚢ディスプラジア、胆嚢癌、膵・胆管合流異常症例を用い、胆嚢癌発生の過程をムチンコア

蛋白発現の観点から免疫組織化学およびISH法で検討し、以下の結論を得た。

1. MUC1は非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮では発現がなく、胆嚢ディスプラジア、胆嚢癌の順に高率に発現がみられた。ディスプラジアでは胆嚢癌合併例で、非合併例より高率であった。MUC1の発現は胆嚢粘膜の癌化に関連する現象であることが示唆された。胆嚢癌では、MUC1は非浸潤癌より浸潤癌で、また高分化より低分化で発現が亢進した。MUC1陽性細胞では高い増殖活性を示した。MUC1は胆嚢癌の進展、増殖に関連していた。またMUC1は浸潤の先端部で特に強く広範に発現し、癌細胞周囲の結合織に滲みだす様な発現が認められた。MUC1は胆嚢癌の浸潤に関与していることが示唆された。

2. 膵・胆管合流異常例では、非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮に高率にMUC1の発現がみられた。生後1年以降の胆嚢やディスプラジアでも高率にMUC1の発現があり、癌化の高リスク状態にあることが示唆された。

3. MUC2は非癌非ディスプラジア性胆嚢、ディスプラジア、また胆嚢癌でも杯細胞の形態を示す細胞にみられ、癌細胞やディスプラジアにおける杯細胞への分化、腸型の表現型を示すと考えられた。また非癌非ディスプラジア性胆嚢、ディスプラジア、非浸潤性胆嚢癌の順にMUC2の発現が高くなる傾向があった。また胆嚢癌の各分化度における検討では、高分化度では中分化度、低分化度の胆嚢癌と比べより広範に高率に発現していた。さらに、浸潤性胆嚢癌でのMUC2発現率は、非浸潤性胆嚢癌と比べ低率で、癌の浸潤とは負の相関を示した。胆嚢癌においてMUC2発現で示される腸型の表現型は、癌化の過程で出現し、浸潤過程で消失することが明らかとなった。

4. MUC5ACは非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮、ディスプラジア上皮、胆嚢癌で高率に発現し、胃表層上皮と同様の表現型を示すことが明らかとなった。胆嚢癌では、組織型・分化度に関係なく、非浸潤性胆嚢癌では、浸潤性胆嚢癌と比べ高率に発現した。しかし症例によっては、癌細胞が浸潤する胆嚢壁深部で、MUC5ACの強い発現がみられ、浸潤性胆嚢癌では、胃型の表現型を保持しているものが優位になるものと考えられた。

5. 非合流異常例の胆嚢ディスプラジアでは20例中14例(70%)、また非浸潤性胆嚢癌では10例中9例(90%)にMUC2(腸型)、MUC5AC(胃型)が同時に発現し、癌発生初期の段階では胃型と腸型両方への分化をしているものが多いと考えられた。

6. MUC6は、胆嚢粘膜上皮の偽幽門腺化生に関連して発現していた。胆嚢癌のMUC6の発現形式は、分化度・組織型、発現範囲には明らかな傾向はみられなかったが、高分化度の胆嚢癌ではより強い染色性を示し、分化度が低くなるにつれて弱くなる傾向がみられた。

以上より、非癌非ディスプラジア性胆嚢粘膜上皮からの胆嚢癌の発生および浸潤増殖過程でMUC1の発現が深く関連していることが示された。MUC2は癌化の過程に関連している可能性があると思われた。MUC2、MUC5AC、MUC6は、胆嚢粘膜の腫瘍性、非腫瘍性上皮での表現型に関連していた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、直接御指導、御校閲を賜りました恩師 病理学第二講座中沼安二教授に深謝いたします。また、本研究に貴重な御意見を

賜りました外科学第一講座 渡辺洋宇教授に感謝いたします。本研究に御協力、御助言を戴きました佐々木素子講師をはじめ、金沢大学医学部病理学第二講座の諸先生に厚く御礼申し上げます。また金沢大学外科学第一講座の諸先生、国立金沢病院臨床検査科の渡辺麒七郎博士および技師の方々、ならびに石川県立中央病院病理科の車谷 宏博士および技師の方々に深く感謝いたします。さらに胆嚢組織材料収集に御協力を賜りました福井県立病院の津田昇志院長、木谷榮一副院長、山道 昇先生ならびに外科の諸先生、技師の方々、国立金沢病院の小島靖彦先生、石川県立中央病院の大浜和憲先生ならびに関連病院の外科の諸先生方にも深く感謝いたします。なお、本論文の一部は、第42回日本病理学会秋季特別総会(沖縄、1996)で発表した。

文 献

- 1) Lamont JT. Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. *Ann NY Acad Sci* 664: 190-201, 1992
- 2) Peat N, Gendler SJ, Lalani N, Duhig T, Taylor-Papadimitriou J. Tissue-specific expression of a human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mice. *Cancer Res* 52: 1954-1960, 1992
- 3) Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, Kim YS. Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* 49: 197-204, 1989
- 4) Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 265: 15286-15293, 1990
- 5) Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lamport DT, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* 264: 6480-6487, 1989
- 6) Gum JR, Hicks JW, Swallow DM, Lagace RL, Byrd JC, Lamport DT, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 407-415, 1990
- 7) Porchet N, Dufosse J, Audie JP, Duperat VG, Perini JM, Nguyen VC, Degand P, Aubert JP. Structural features of the core proteins of human airway mucins ascertained by cDNA cloning. *Am Rev Respir Dis* 144: S15-18, 1991
- 8) Toribara NW, Robertson AM, Ho SB, Kuo WL, Gum E, Hicks JW, Gum JR, Jr., Byrd JC, Siddiki B, Kim YS. Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *J Biol Chem* 268: 5879-5885, 1993
- 9) Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J Biol Chem* 268: 20563-20569, 1993
- 10) Chang SK, Dohrman AF, Basbaum CB, Ho SB, Tsuda T, Toribara NW, Gum JR, Kim YS. Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology* 107: 28-36, 1994
- 11) Ajioka Y, Allison LJ, Jass JR. Significance of MUC1 and MUC2 mucin expression in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 49: 560-564, 1996

- 12) Blank M, Klusmann E, Kruger Krasagakes S, Schmitt Graff A, Stolte M, Bornhoeft G, Stein H, Xing PX, McKenzie IF, Verstijnen CP, et al. Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. *Int J Cancer* 59: 301-306, 1994
- 13) Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 106: 353-361, 1994
- 14) Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 53: 641-651, 1993
- 15) Sasaki M, Nakanuma Y. Expression of mucin core protein of mammary type in primary liver cancer. *Hepatology* 20: 1192-1197, 1994
- 16) Lalani EN, Berdichevsky F, Boshell M, Shearer M, Wilson D, Stauss H, Gendler SJ, Taylor-Papadimitriou J. Expression of the gene coding for a human mucin in mouse mammary tumor cells can affect their tumorigenicity. *J Biol Chem* 266: 15420-15426, 1991
- 17) Yamashita K, Yonezawa S, Tanaka S, Shirahama H, Sakoda K, Imai K, Xing PX, McKenzie IF, Hilken J, Kim YS, et al. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 55: 82-91, 1993
- 18) Hudson MJ, Stamp GW, Hollingsworth MA, Pignatelli M, Lalani EN. MUC1 expressed in PanC1 cells decreases adhesion to type 1 collagen but increases contraction in collagen lattices. *Am J Pathol* 148: 951-960, 1996
- 19) Osako M, Yonezawa S, Siddiki B, Huang J, Ho JJ, Kim YS, Sato E. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors. *Cancer* 71: 2191-2199, 1993
- 20) Yonezawa S, Byrd JC, Dahiya R, Ho JJ, Gum JR, Griffiths B, Swallow DM, Kim YS. Differential mucin gene expression in human pancreatic and colon cancer cells. *Biochem J* 276: 599-605, 1991
- 21) Dahiya R, Kwak KS, Byrd JC, Ho S, Yoon WH, Kim YS. Mucin synthesis and secretion in various human epithelial cancer cell lines that express the MUC-1 mucin gene. *Cancer Res* 53: 1437-1443, 1993
- 22) Reis CA, David L, Nielsen PA, Clausen H, Mirgorodskaya K, Roepstorff P, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody. *Int J Cancer* 74: 112-121, 1997
- 23) De Bolos C, Garrido M, Real FX. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* 109: 723-734, 1995
- 24) Ho SB, Robertson AM, Shekels LL, Lyftogt CT, Niehans GA, Toribata NW. Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology* 109: 735-747, 1995
- 25) Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Cherwitz DL, Niehans GA. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res* 55: 2681-2690, 1995
- 26) Yonezawa S, Sueyoshi K, Nomoto M, H. K, Nagata K, Arimura Y, Tanaka S, Michael A. MUC2 gene expression is found in noninvasive tumors but not in invasive tumors of the pancreas and liver: its close relationship with prognosis of the patients. *Human Pathol* 28: 344-352, 1997
- 27) Sakamoto H, Yonezawa S, Utsunomiya T, Tanaka S, Kim YS, Sato E. Mucin antigen expression in gastric carcinoma of young and old adult. *Hum Pathol* 28: 1056-1065, 1997
- 28) 岡崎伸生. 胆道癌の症候論. 日本臨床増刊, 肝胆疾患(下), 862-864頁, 1988
- 29) 岡田周市. 胆石と胆嚢癌. 胆石症(大藤正雄編), 228-232頁, 南江堂, 東京, 1990
- 30) 木村邦夫, 篠崎正美. 膵管胆道合流異常-胆嚢癌との関係. 消化器セミナー 27: 153-160頁, 1987
- 31) Yamagiwa H. Dysplasia of gallbladder: Its pathological significance. *Acta Pathol Jpn* 37: 747-754, 1987
- 32) Yamagiwa H, Tomiyama H. Intestinal metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the gallbladder. *Acta Pathol Jpn* 36: 989-997, 1986
- 33) 稲田章夫, 小西二三男, 山道 昇, 伊藤 博. 胆嚢癌の組織発生-特に胆嚢粘膜の化生性変化, および上皮性粘液, CEA等の分布の特徴について 日外会誌 90: 894-906頁, 1989
- 34) 糸井隆夫, 渡辺英伸, 柏谷和彦. 胆嚢前癌病変の病理 胆と膵 16: 1-12頁, 1995
- 35) Sasaki M, Nakanuma Y, Kim YS. Characterization of apomucin expression in intrahepatic cholangiocarcinomas and their precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hepatology* 24: 1074-1078, 1996
- 36) Albores-Saavedra J, Henson DE, Sobin LH, eds. *Histological Typing of Tumours of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts. World Health Organization International Histological Classification of Tumours*, 2nd ed, p9-10, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1991
- 37) Albores-Saavedra J, Henson DE, Sobin LH. *The WHO Histological Classification of Tumors of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts. A commentary on the second edition.* *Cancer* 70: 410-414, 1992
- 38) 日本胆道外科研究会. 外科・病理 胆道癌取扱い規約 改訂第4版, 55-59頁, 金原出版株式会社, 東京, 1997
- 39) The Japanese study group on pancreaticobiliary maljunction (JSPBM), The committee of JSPBM for diagnostic criteria. Diagnostic criteria of pancreaticobiliary maljunction. *J Hep Bil Pancr Surg* 1: 219-221, 1994
- 40) Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
- 41) Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, Kufe D. Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2320-2323, 1988

- 42) Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi Wheeler H, Schlom J. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma* 3: 223-232, 1984
- 43) Abe M, Kufe D. Characterization of cis-acting elements regulating transcription of the human DF3 breast carcinoma-associated antigen (MUC1) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 282-286, 1993
- 44) Sekine H, Ohno T, Kufe DW. Purification and characterization of a high molecular weight glycoprotein detectable in human milk and breast carcinomas. *J Immunol* 135: 3610-3615, 1985
- 45) Xing PX, Prenzoska J, Layton GT, Devine PL, McKenzie IF. Second-generation monoclonal antibodies to intestinal MUC2 peptide reactive with colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 84: 699-703, 1992
- 46) Sasaki M, Nakanuma Y, Ho SB, Kim YS. Cholangiocarcinoma arising in cirrhosis and combined-hepatocellular-cholangiocellular carcinoma share apomucin profile. *Am J Clin Pathol* (in press)
- 47) Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748, 1991
- 48) Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168: 357-363, 1992
- 49) Szekeres G. Detection of the Ki-67 antigen in fixed proliferating cells [letter]. *Anal Cell Pathol* 5: 249-250, 1993
- 50) Curran RC, Gregory J. The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin. *Experientia* 33: 1400-1401, 1977
- 51) 影下登志郎, 中島 孝, 森永正二郎, 円谷 勝, 下里幸男, 石原和之, 荒尾龍喜. Avidin-Biotin-Alkaline Phosphatase Complex法を用いた免疫組織化学—二重染色への応用 病理と臨床 3: 803-805頁, 1985
- 52) Wood GS, Warnke R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* 29: 1196-1204, 1981
- 53) Balague C, Audie JP, Porchet N, Real FX. In situ hybridization shows distinct patterns of mucin gene expression in normal, benign, and malignant pancreas tissues. *Gastroenterology* 109: 953-964, 1995
- 54) Sasaki M, Nakanuma Y, Terada T, Kim YS. Biliary epithelial expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC5/6 apomucins during intrahepatic bile duct development and maturation: an immunohistochemical study. *Am J Pathol* 147: 574-579, 1995
- 55) Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res* 56: 4244-4249, 1996
- 56) Lee CS. Differences in cell proliferation and prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen immunoreactivity in in situ and invasive carcinomas of the extrahepatic biliary tract. *Cancer* 78: 1881-1887, 1996
- 57) Koga A, Momii S, Eguchi M, Makino T. Ultrastructure of well-differentiated adenocarcinoma of the gallbladder. *Ultrastruct Pathol* 15: 41-48, 1991
- 58) Kushima R, Lohe B, Borchard F. Differentiation towards gastric foveolar, mucopeptic and intestinal goblet cells in gallbladder adenocarcinomas. *Histopathology* 29: 443-448, 1996
- 59) Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J Immunol* 153: 2102-2109, 1994
- 60) Henderson RA, Nimgaonkar MT, Watkins SC, Robbins PD, Ball ED, Finn OJ. Human dendritic cells genetically engineered to express high levels of the human epithelial tumor antigen mucin (MUC-1). *Cancer Res* 56: 3763-3770, 1996
- 61) Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J Surg Res* 63: 298-304, 1996
- 62) Pecher G, Finn OJ. Induction of cellular immunity in chimpanzees to human tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC-1 cDNA-transfected Epstein-Barr virus-immortalized autologous B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1699-1704, 1996

Expression of Mucin Core Protein in Gallbladder Carcinoma and Dysplasia and its Pathologic Significances - An Immunohistochemical Study Taro Yamato, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., **106**, 627 — 643 (1997)

Key words mucin, mucin core protein, gallbladder, carcinoma, pancreatobiliary maljunction

Abstract

Mucins, which are composed of a mucin core protein and abundant carbohydrates, play a role in lubrication and defense of the normal mucosa in humans. At present, 9 mucin core proteins have been cloned, and their tissue- and cell-specific expressions and distributions suggest their unique roles. In this study, the expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 mucin core protein was examined at protein and mRNA level, and cell proliferative activity was evaluated by Ki-67 immunostaining. Gallbladder tissue specimens from 15 patients with non-neoplastic, non-dysplastic gallbladder, 20 with dysplasia, 55 patients with gallbladder carcinoma (10 with *in situ* carcinoma, 45 with invasive carcinoma) and 27 with pancreatobiliary maljunction including 4 with dysplasia and 3 with carcinoma. In non-maljunction, MUC1 was not expressed at non-dysplastic epithelia and focally expressed in a half of dysplasia. MUC1 was expressed heterogeneously in 80% of carcinoma. Frequency and extent of MUC1 expression increased with histologic dedifferentiation of the carcinoma and MUC1 was preferentially found on the luminal surface and the cytoplasm in the well-differentiated adenocarcinoma, and the cell border in the poorly-differentiated ones. In infiltrative regions, MUC1 was predominantly expressed, showing expression on basal cell border and leakage around carcinoma cells. Cell proliferative activity was higher in MUC1 positive carcinoma cells than in negative ones. In maljunction, MUC1 was preferentially found on the luminal surface in a half of non-dysplastic gallbladder and all of dysplasia. MUC2 was expressed at "goblet type cells" in non-dysplastic epithelia, dysplasia and carcinoma. Frequency and extent of MUC2 expression increased in order of non-dysplastic gallbladder, dysplasia and *in situ* carcinoma. MUC2 was focally expressed in all *in situ* carcinoma and 58% of invasive carcinoma. MUC5AC was frequently expressed in non-dysplastic epithelia, dysplasia and carcinoma, suggesting that the phenotype of gallbladder epithelium resemble that of gastric surface epithelium. MUC5AC was more frequently expressed in *in situ* carcinoma than in invasive carcinoma. In 70% of dysplasia and 90% of *in situ* carcinoma, both MUC2 and MUC5AC were expressed. That is, gallbladder carcinoma have both intestinal and gastric phenotype at an early stage and gastric phenotype become dominant in invasive carcinoma. MUC6 was expressed frequently at the pseudopyloric gland metaplasia of non-dysplastic epithelia, dysplasia and carcinoma. These results suggest that MUC1 expression is related to carcinogenesis, histologic differentiation and infiltrative abilities and a risk of carcinogenesis increases in gallbladder epithelium with maljunction.