

胆道癌の新規診断マーカーの探索

-S100 タンパク質ファミリーに着目して

林 一樹 (医学部医学科 5年)

指導教員

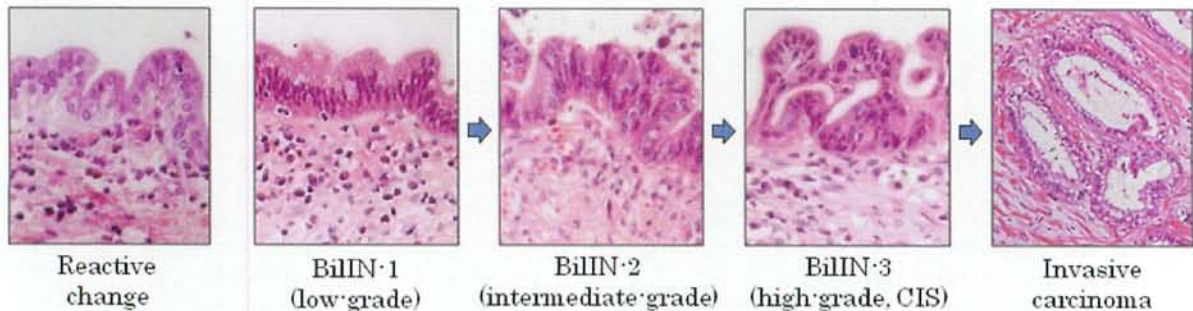
中沼安二 教授 (医薬保健研究域医学系形態機能病理学教授)

佐藤保則 講師 (医薬保健研究域医学系形態機能病理学講師)

1. 研究概要

(1) 研究目的:

慢性胆管上皮傷害を基盤として発生する胆管癌は、胆管上皮層内腫瘍(biliary intraepithelial neoplasia, BillN)から浸潤癌が発生する多段階の過程を経る。BillN は上皮の細胞異型、構造異型の程度により BillN-1 (low-grade), BillN-2 (intermediate-grade), BillN-3 (high-grade) にグレード分類される。



通常、BillN のグレード分類は HE 染色組織標本で行われるが、しばしば分類困難な病変があり、グレード分類に補助的に使用する組織染色マーカーの同定が望まれている。また、胆管癌は発見時、既に進行した症例が大部分であり、BillN を含めた早期癌病変の検出が胆管癌の診療上、極めて重要であるが、BillN は画像では検出できない顕微鏡的な病変であり、現在まで BillN を早期に検出するマーカーは知られていない。

S100 ファミリータンパク質は細胞種特異的に発現するカルシウム結合性タンパク質であり、現在まで 20 種類のサブファミリーが確認されている。その機能は複雑で多岐にわたり、未解明の部分が多く残されているが、例えば S100P は乳癌を含む様々な癌細胞株で発現が亢進しており、RAGE を介して ERK や NF- κ B を活性化し、細胞の不死化に関与することが報告されている。胆管癌や膵管癌では S100 ファミリータンパク質のうち、S100A2 や S100A4, S100A6, S100A11, S100P の発現亢進があることが文献的に報告されているが、胆管癌の多段階発癌過程 (BillN) に着目した研究は少ない。本研究は、(1)胆管癌の多段階発癌過程における S100 ファミリータンパク質の発現動態を検討し発癌への関与を明らかにすること、および(2)S100 ファミリータンパク質が BillN の組織学的グレード分類や胆管癌の診断に有用かどうかを明らかにすることを研究目的とした。

(2)研究方法:

胆管癌の多段階発癌モデルとして肝内結石症を対象疾患とした。肝内結石症の外科的切除材料 40 例(浸潤癌合併 20 例, 浸潤癌非合併 20 例), および組織学的正常肝(病理解剖例)10 例を使用した。肝門部を含むホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し, S100A2, S100A4, S100A6, S100P に対する 1 次抗体を用いた免疫染色を行った。免疫染色で得られた上皮の染色強度を 3 段階で半定量的に評価した。細胞質における染色強度は 2+(強い発現あり), 1+(弱~中程度の発現あり), 0(発現なし), 核における染色強度は 2+(400 倍視野で 10%以上の細胞核が陽性), 1+(400 倍視野で 10%未満の細胞核が陽性), 0(発現なし)とした。総計学的検討は Spearman rank correlation によった。

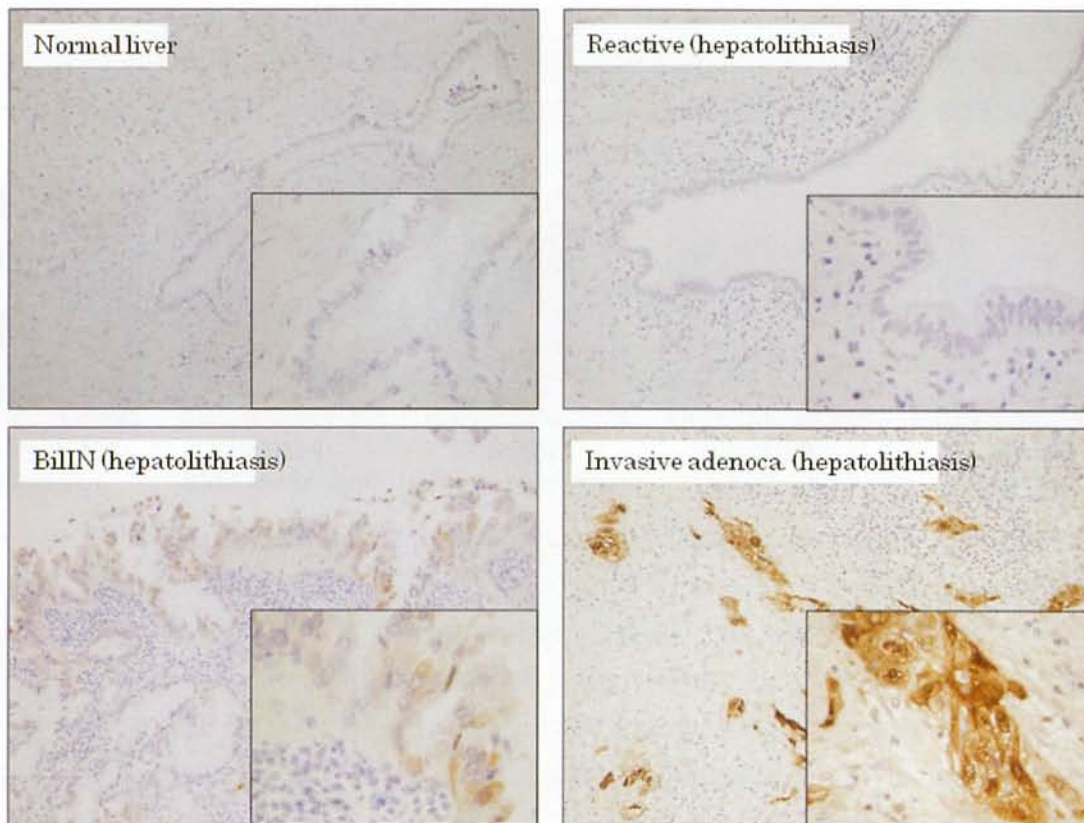
血清および胆汁の S100P は市販の ELISA キットを用いて測定した。統計学的検討は t-test によった。Reserver operating characteristics (ROC) curve analysis は, 統計解析ソフト(IBM SPSS Statistics 19)を使用して行った。

1. 研究結果要旨

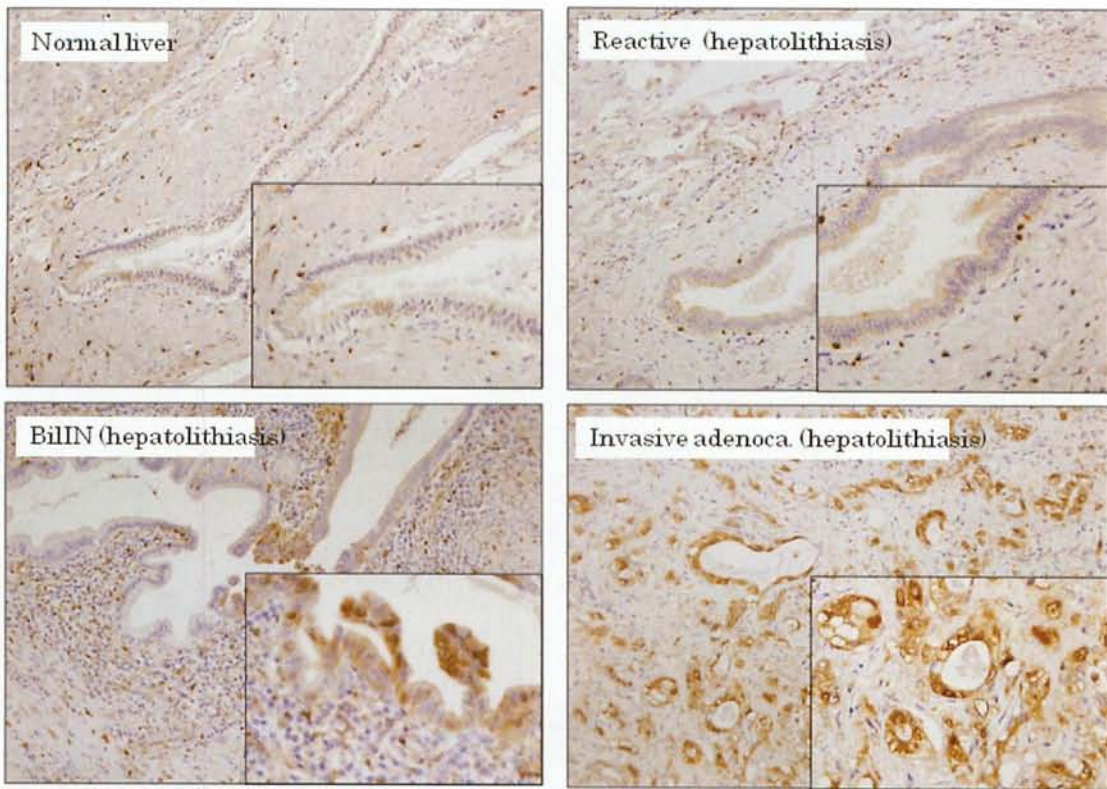
免疫染色による検討の結果, 正常肝の大型胆管上皮において, 細胞質における S100A2, S100A6, S100P の発現はほとんどみられず, S100A4 は半数以上の症例が弱く陽性を示した。正常大型胆管上皮の核における発現は, 検討した 4 つの S100 ファミリータンパク質のいずれについてもほとんど認めなかった。

肝内結石症では, S100A2, S100A4, S100A6, S100P の細胞質もしくは核における発現は, BillN-1,2,3 から浸潤癌へと異型度が増すにしたがって増加する傾向を示した。

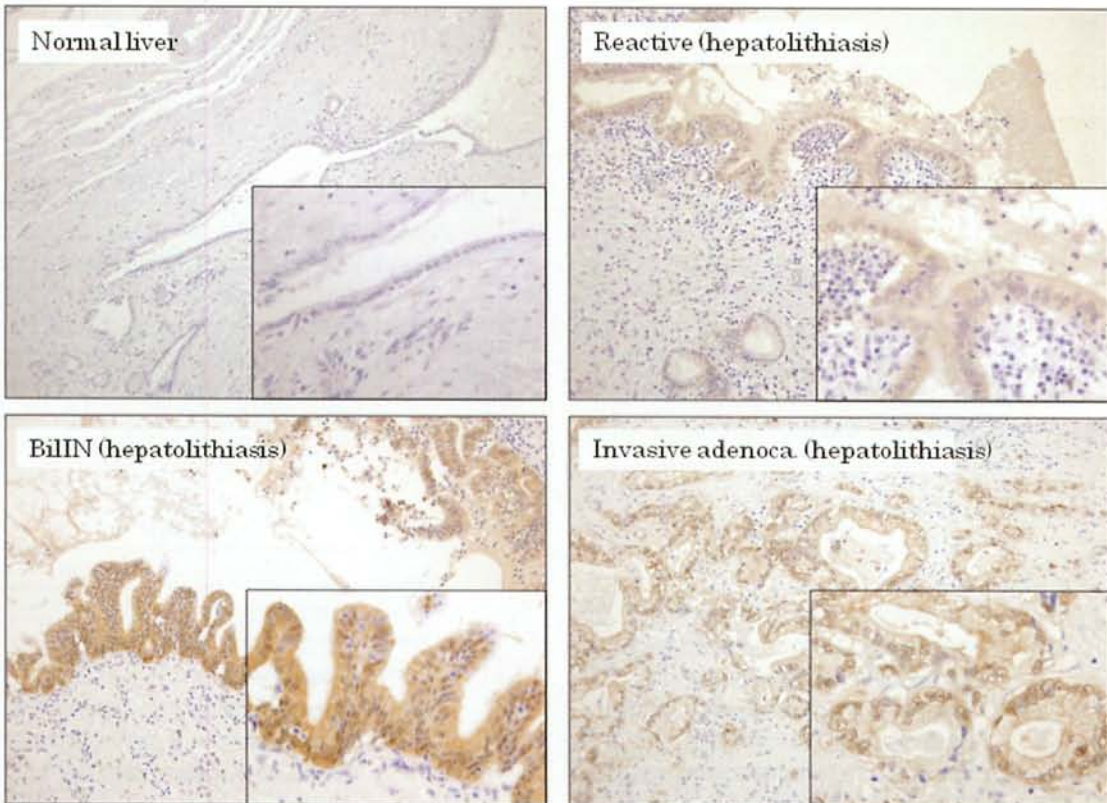
S100A2 免疫染色結果



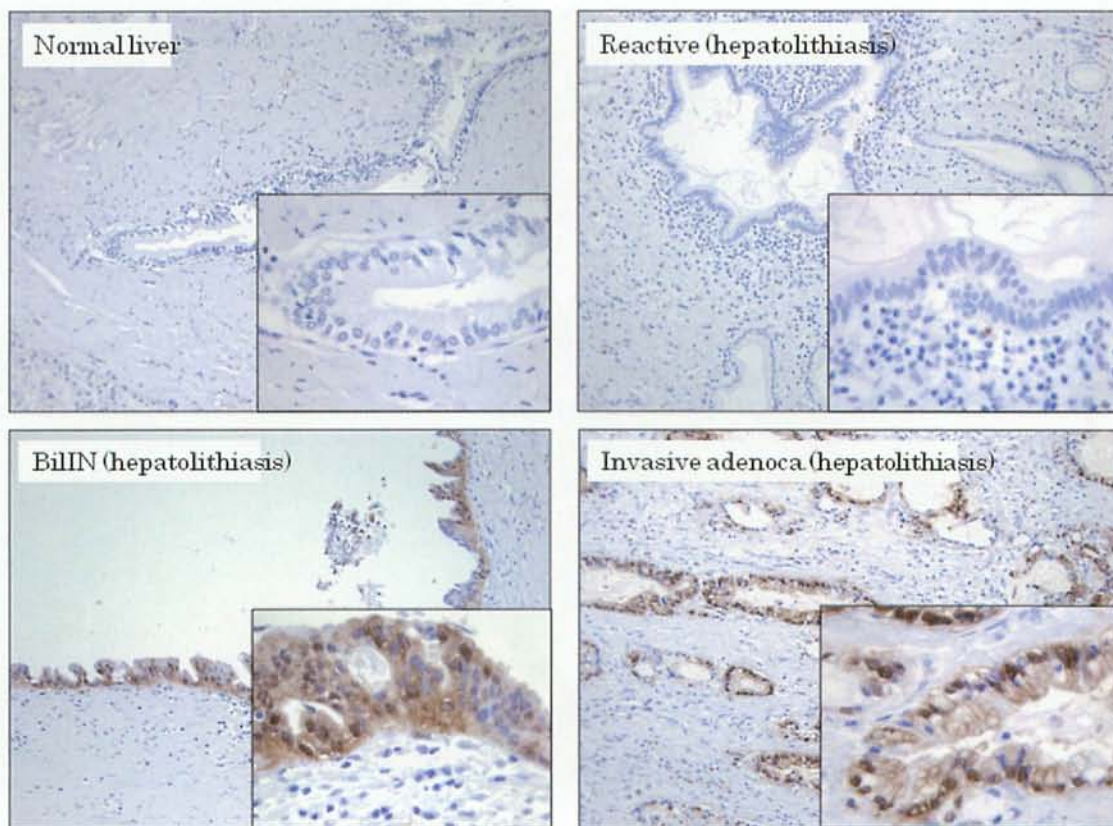
S100A4 免疫染色結果



S100A6 免疫染色結果

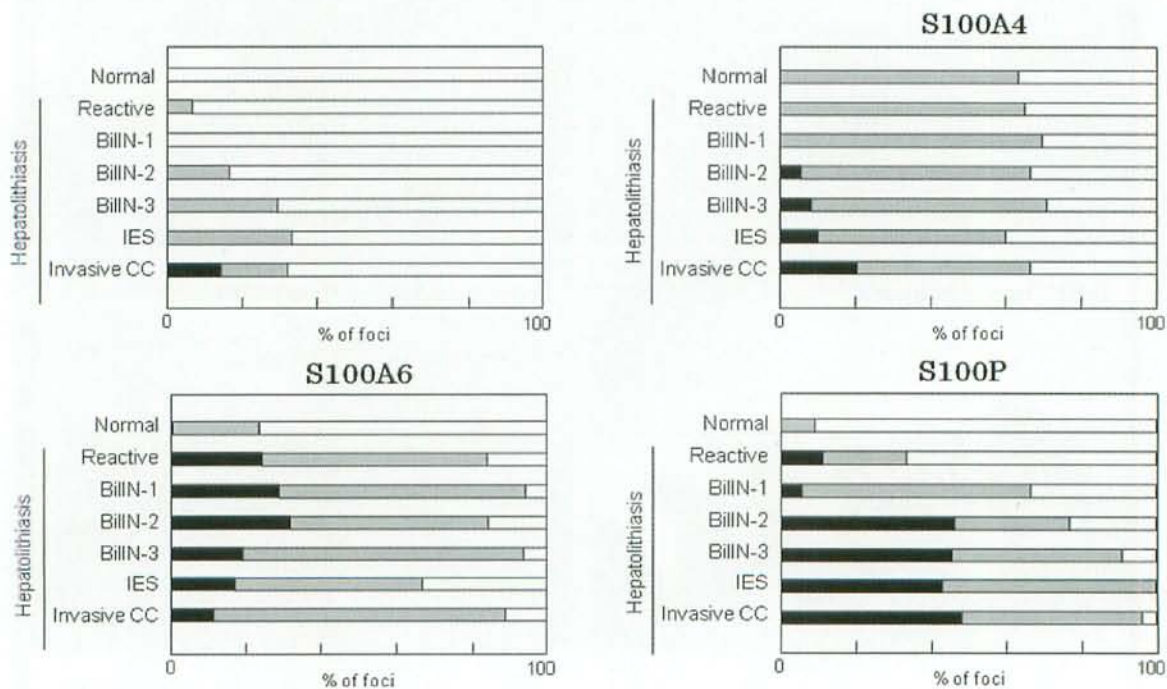


S100P 免疫染色結果



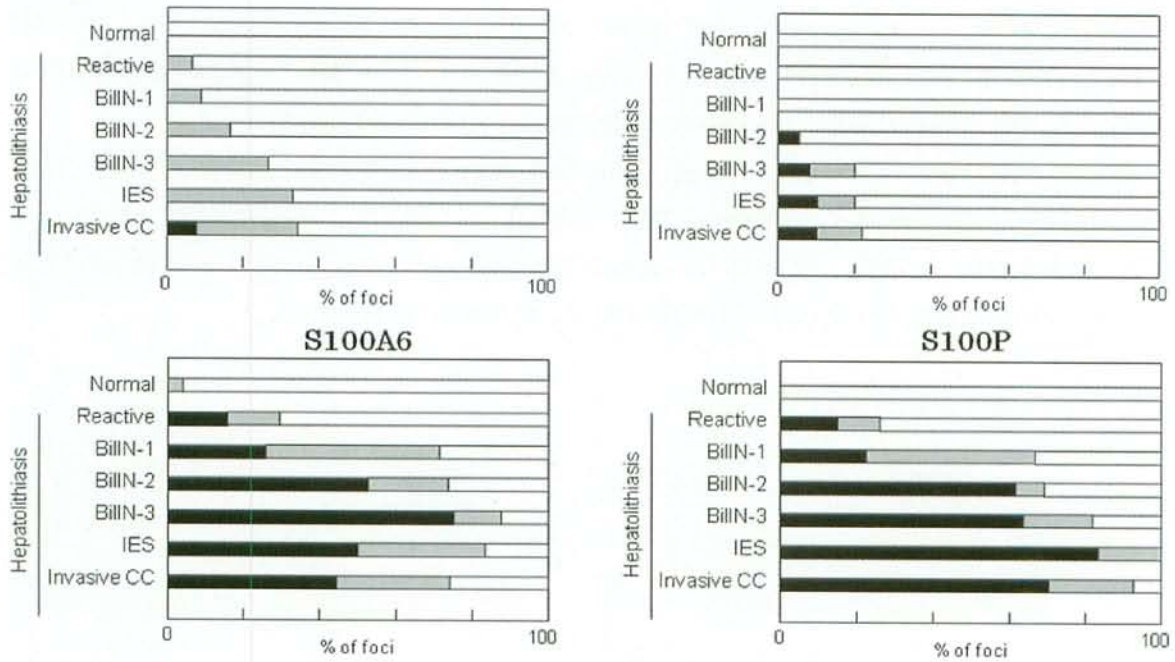
免疫染色 の半定量的評価結果

- 細胞質での発現 -



免疫染色の半定量的評価結果

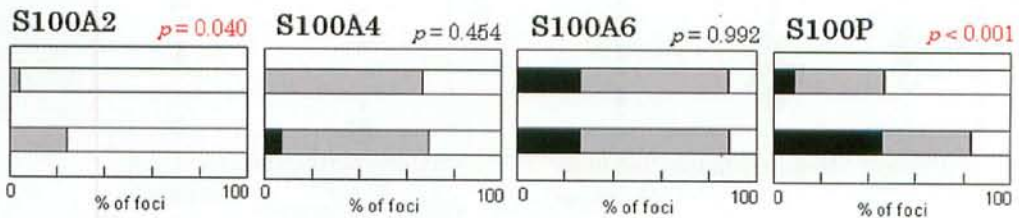
- 核での発現 -



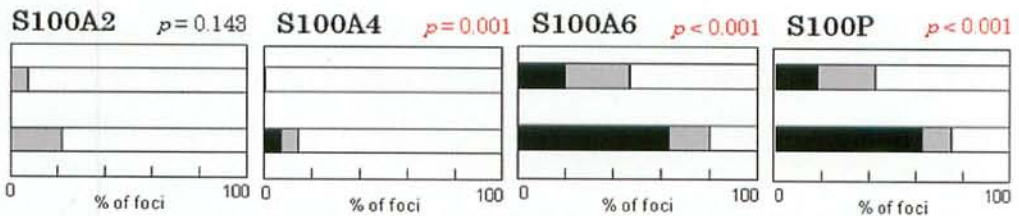
免疫染色の半定量的評価結果



細胞質での発現



核での発現



肝内結石症症例での免疫染色結果の半定量的評価は、大型胆管上皮にみられる反応性異型・過形成と BillN-1 を一つの群, BillN-2・BillN-3 を一つの群として, この2群間で比較検討した. 細胞質における S100A2, S100P の発現, および核における S100A4, S100A6, S100P の発現は BillN-2・BillN-3 において, 反応性異型・過形成と BillN-1 の群より有意に高かった. 特に S100P の発現に関しては, 細胞質と核ともに BillN-2・BillN-3 の群で有意に発現が亢進しており, S100P の免疫染色が BillN の組織診断マーカーとして最も有用と考えられる結果を得た.

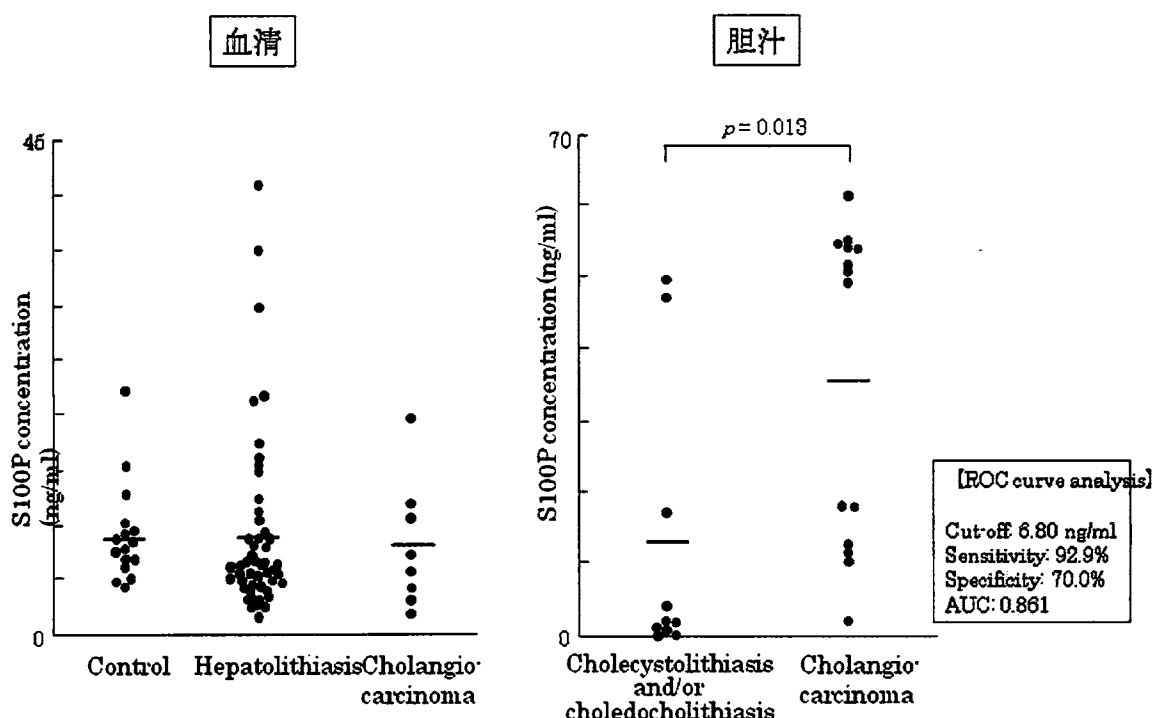
免疫染色で検討した4つの S100 ファミリータンパク質のうち, S100P が最も良好な結果を示したことから, 血清およ

胆汁の S100P の ELISA 法による測定を行った。

血清検体を用いた測定は、健康人 (n = 16)、肝内結石症 (胆管癌の合併なし; n = 49)、肝内結石症 (胆管癌の合併あり; n = 8) を対象として行った。その結果、血清 S100P の測定値は、健康人 9.0 ± 4.5 ng/ml、肝内結石症 (癌合併なし) 9.1 ± 8.2 ng/ml、肝内結石症 (癌合併あり) 7.9 ± 5.8 ng/ml であった。この検討した 3 群間で統計学的な有意差はなく、胆管癌を合併した肝内結石症で血清 S100P の測定値が高くなる傾向は認めなかった。

胆汁の S100P の測定は胆石症 (n = 10) と胆管癌 (結石の合併なし; n = 14) を対象として行った。胆汁 S100P は胆石症 12.3 ± 19.7 ng/ml、胆管癌 35.8 ± 22.0 ng/ml であり、胆管癌症例で胆石症より有意に高値を示した (p = 0.013)。ROC 曲線により解析を行った結果、area under the curve (AUC) は 0.861 であり、カットオフを 6.80 ng/ml に設定した場合、胆汁 S100P の胆管癌マーカーとしての感度は 92.9%、特異度は 70.0% であった。

血清・胆汁の S100P 測定結果 (ELISA)



2. 研究によって得られた成果とその活用

S100 ファミリータンパク質 (S100A2, S100A4, S100A6, S100P) は胆管癌の前癌病変である BiILN において、いずれもその発現が亢進しており、胆管癌の多段階発癌におけるその関与が示唆された。

BiILN の組織診断の観点からは、検討した 4 つの S100 ファミリータンパク質のうち、S100P の免疫染色が組織診断に最も有用であるという成績が得られた。BiILN の組織診断は通常の HE 染色標本のみでは困難なことがあるが、今回の検討結果を踏まえて、今後、S100P の免疫染色を評価項目として加えた BiILN の組織学的な診断基準の作成を試みたいと考えている。

血清 S100P は胆管癌の診断マーカーとして有用ではなかったが、胆汁 S100P は胆管癌診断マーカーとして応用できる可能性が示された。免疫染色による検討結果では、BiILN-2 や BiILN-3 で S100P の発現誘導がみられ、このことは胆汁で S100P を測定、検出することが画像では検出できない BiILN 病変を検出する診断補助の一つになりうる可能性を示唆している。

今回の胆汁の解析は少数例での検討結果であり、今後、臨床応用を目指して多くの症例の胆汁検体を用いた検討を追加していきたい。また、いくつかの測定値を組み合わせることで、胆管癌の診断マーカーとしての感度と特異度が上昇することが期待できることから、その他の S100 ファミリータンパク質に関しても胆汁における値を測定し、診断に最適な組み合わせを見出したいと考えている。