

論文内容の要旨

氏名 石丸 英三郎 (いし まる えいざぶろう)

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 医 第 9 4 7 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 術後肝転移のリスク要因としての大腸癌間質における osteopontin 陽性 tumor-associated macrophage の局在

論文審査委員 (主査) 教授 大 柳 治 正

(副主査) 教授 伊 藤 浩 行

(副主査) 教授 工 藤 正 俊

【はじめに】

進行大腸癌術後の異時性肝転移発生は予後を大きく左右するため、その high risk 群を選別することが重要である。Osteopontin (以下、OPN) は腫瘍の転移・増殖などに関与する細胞接着配列を有するリン酸化糖タンパクである。そこで、大腸癌における肝転移と OPN の発現の関連について免疫組織化学的に検討した。

【対象と方法】

進行大腸癌切除症例を同時性肝転移群 30 例、異時性肝転移群 17 例と非肝転移群 54 例の 3 群に対して抗 OPN、CD68、CD105 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。

【結果】

OPN の主な発現は腫瘍細胞ではなく、腫瘍周囲間質に浸潤するマクロファージ (tumor associated macrophage: 以下、TAM) の一部に認められた。TAM における OPN 陽性 TAM の割合 (以下、OPN/TAM)、ならびに微小血管密度 (以下、MVD) を腫瘍周囲間質の局在別に検討したところ、異時性肝転移群を対象とした単変量解析の結果、中心部の MVD ならびに先進部と中心部の OPN/TAM の 3 因子に有意差を認めた。この 3 因子を用いた多変量解析では、先進部間質および中心部間質の OPN/TAM が異時性肝転移の危険因子である可能性が示唆された。

【考察】

進行大腸癌術後異時性肝転移発症の high risk 群選別の一助として、切除標本の腫瘍先進部間質ならびに中心部間質の OPN/TAM の検討の有用性が示唆された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成 19 年 6 月 日 公表予定	出版物名 日本消化器外科学会雑誌
	公 表 内 容	平成 19 年 6 月 日 発行予定
	全 文	

## 論文審査結果の要旨

【背景】進行大腸癌に対して根治手術が行われても 40%の患者に再発が生じ、その中でも特に肝転移の発生は 33%にも及ぶ。肝転移巣非切除例の5年生存率が 5%以下であるのに対し、肝切除後の5年生存率は 25~50%である。したがって、進行大腸癌術後の予後を向上させるためには異時性肝転移発生のハイリスク群を選別し、厳重な観察を行う必要がある。

Osteopontin (以下、OPN) は骨芽細胞、腎尿細管細胞、マクロファージ、活性化された T 細胞および血管平滑筋細胞を含む多くの細胞によって分泌される分子量約 32,000 のポリペプチドを骨格に持つリン酸化糖タンパクである。GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) 細胞接着配列を有し、 $\alpha v \beta 3$  等のインテグリンと結合し、骨吸収、細胞接着・遊走・増殖、癌転移、血管新生等に関与することが知られている。また、胃・大腸・乳腺・肺など種々の腫瘍細胞でも発現しており、これら腫瘍細胞が産生する OPN は腫瘍の転移・増殖に関連しているとされている。さらに、腫瘍細胞以外での OPN の発現は主に腫瘍間質に浸潤するマクロファージと報告されている。

一方、腫瘍間質のマクロファージは、腫瘍に随伴するマクロファージ (tumor associated macrophage ; TAM) と呼ばれる。TAM は種々の血管新生促進因子を産出するが、特に先進部の TAM は腫瘍免疫を介して血行性転移を抑制するなどその局在部位で多様な働きをする。

そこで、学位申請者は大腸癌肝転移の局所要因の一つとして大腸癌間質における Osteopontin 陽性 tumor-associated macrophage の役割を検討し、TAM における OPN の発現が異時性肝転移のリスクを示す指標になるか否かを免疫組織化学的に調べた。

【対象】1990~1999 年までに原発巣が切除された進行大腸癌症例 101 症例を同時性肝転移群 30 例、異時性肝転移群 17 例と非肝転移群 54 例の 3 群に分けた。

男性 59 例、女性 42 例、平均年齢  $63.0 \pm 11.2$  歳であり各群間に差は認めなかった。なお、原発巣切除時に腹部 CT、腹部超音波検査のいずれかの検査で肝に転移を認めた場合を同時性肝転移とした。

【方法】染色方法: 抗 OPN、CD68、CD105 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。切除標本のホルマリン固定・パラフィン包埋連続切片 ( $4 \mu m$ ) を用いて、抗 OPN 抗体、抗 CD68 抗体は ENVISION+法で、抗 CD105 抗体は CSA (Catalyzed Signal Amplification) System 法による免疫組織化学染色を行った。

さらに、抗 OPN 抗体、抗 CD68 抗体を用いた ENVISION+、ENVISION/AP 法に基づく2重免疫組織化学染色を施行した。

検討方法: 連続切片を用いて OPN 染色を行った後、単位面積当たりの腫瘍間質部の OPN 発現細胞数を測定した。抗 CD68 抗体を用いて染色し、OPN 検討部位と同一部位の CD68 発現細胞数を測定した。上記で得られた結果をもとに各測定部位における CD68 発現細胞マクロファージに占める OPN 発現細胞の割合 (%) (OPN/TAM) を求めた。抗 CD105 抗体を用いて連続切片を染色し、標識された微小血管をカウントすることにより、微小血管密度 (Microvessel density ; MVD) を計測した

検討項目: 1) 2重免疫組織化学染色による間質浸潤 OPN 発現細胞の同定、2) 腫瘍間質における CD105 陽性新生血管、3) OPN/TAM と肝転移との関連 4) MVD と肝転移との関連、5) MVD と OPN/TAM との関連、6) 単変量解析および多変量解析による肝転移危険因子の選別

統計処理: 2群間の比較には Mann-Whitney-U 検定を、相関分析には Spearman の相関分析を用いた。単変量・多変量解析にはロジスティック回帰分析を用いた。いずれの検定においても危険率 5%未満で統計学的に有意差ありと判断した。

【結果】大腸癌における OPN の主たる発現は腫瘍細胞ではなく、腫瘍間質に存在する CD68 陽性マクロファージと推察された。

原発巣切除時に肝転移がない症例で間質の OPN/TAM が高値ならば異時性肝転移発症が高率に疑われた。

同時性肝転移群では血管新生はすでに完成しており、CD105 で認識されるような幼弱な血管は少ないと考えられた。一方、異時性肝転移群では幼弱な新生微細血管が増生しており、これを中心部間質に存在する OPN/TAM が促進している可能性が考えられた。

以上より、OPN/TAM ならびに MVD を腫瘍周囲間質の局在別に検討したところ、異時性肝転移群を対象とした単変量解析の結果、中心部の MVD ならびに先進部と中心部の OPN/TAM の3因子に有意差を認めた。この3因子を用いた多変量解析では、先進部間質および中心部間質の OPN/TAM が異時性肝転移の危険因子である可能性が示唆された。

【考察】進行大腸癌術後の異時性肝転移発症のハイリスク群選別の一助として、大腸癌切除標本の腫瘍間質の OPN/TAM の検討が有用であると考えられた。

したがって、本研究は進行大腸癌の局所間質におけるマクロファージの働きを検討するといった学問的価値を有するとともに、肝転移発症のリスクの指標の一つを明らかにした臨床的価値の高いものと思われた。

氏 名	辻 秀 憲
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医 第 9 4 8 号
学位授与の日付	平成 19 年 9 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Urinary concentration of osteopontin and association with urinary supersaturation and crystal formation (尿の過飽和状態と結晶形成に対する尿中オステオポンチン濃度の関与)
論文審査委員 (主 査)	教授 植 村 天 受
(副主査)	教授 西 尾 和 人
(副主査)	教授 濱 西 千 秋