

乳がんの病理診断におけるレクチン染色の有用性

森谷卓也*、鹿股直樹*、小塚祐司*、紅林淳一**

【はじめに】

レクチンは細胞膜を構成するタンパク質や糖脂質の糖の部分に結合することによって、細胞凝集・細胞分裂の誘発などを起こす物質の総称である。植物(マメ科など)や菌類において数多くのものが発見されているほか、ヒトも含めて種々の動物種にも存在している。その種類はきわめて多く、現在も新たに発見がなされており、機能的にもかなり多様である。食物由来のレクチンは、体内でヒトの細胞に働いて免疫力を高めたり、逆に細胞を凝集させるなどして疾患の形成に関与することが知られている。

糖鎖レクチンは、細胞表面の糖鎖(多数の糖が結合してきた複合化合物)と特異的に結合するが、ある種の腫瘍において多量に発現していることがあり、腫瘍の診断ツールとしても期待が持たれる。但し、どの腫瘍にどんな糖鎖が多く存在するのか、どのようなレクチンが関係して結合するのかは、十分に解明されているとは言えないのが実情である。

乳癌の罹患者数は増加の一途をたどっており、我が国の女性の20人弱に一人が生涯のうちに罹患する時代になった。確実に乳癌を診断することと、同じ乳癌でも症例ごとの特徴を細かく分析し、適切な治療を行うことが求められており、病理診断が担う意義は大きい。

そこで今回、「レクチン」「乳癌」をキーワードに、免疫組織化学的手法を用いて病理組織学的な検討を行った、すなわち、(1)正常の乳腺組織では発現が低いですが、乳癌になると強く発現するレクチンがあるか、(2)そのようなレクチンが見つかった場合、乳癌症例によって発現に差があるか、もしあるとすれば、どのようなタイプで強く発現しているのか、を検討することを目的とし検討した。その結果から、最終的には、レクチンの発現が乳癌の病理学的確定診

*川崎医科大学 病理学2 **同 乳腺甲状腺外科

断に役立つこと、癌の種類を把握できれば癌の発生機序の解析や治療法開発への参考所見としても期待できるものと思われる。

【材料および方法】

予備検討として、指導教官(森谷)が10種類のレクチンを染色し、正常乳腺と乳癌との染色結果に差がありそうな6種類を選択し、今回の検討対象とした。レクチンの免疫組織染色抗血清は、J-オイルミルズ株式会社および杉山産業化学研究所より供与いただいた。また、以下の研究内容に関しては、川崎医科大学に倫理申請し、承認を得て行った(承認番号632)。

正常乳腺9例と、乳癌39例を含むティッシュマイクロアレイ(TMA)標本(SUPER BIO CHIPS, Seoul South Korea)と、臨床検体として川崎医大付属病院で手術が行われた乳癌症例手術標本19例を検討に用いた。乳癌の組織型は、浸潤性乳管癌が48例、非浸潤性乳管癌が7例、粘液癌が3例であった。癌についてはヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて、核異型度スコア1~3点(1点が軽度、3点が高度)、さらに浸潤性乳管癌については腺管形成スコアを1~3点(1点は腺管形成良好、3点は不良)とし、核異型度スコアと合計し6点満点で組織学的異型度を評価した(表1)。

表1: 検討症例(癌)の異型度

核異型度	1(軽度)	2例
	2(中等度)	23例
	3(高度)	32例
組織学的異型度 (浸潤癌のみ、核異型度+腺管形成性)		
2点:	0例	3点: 3例 4点: 5例
5点:	20例	6点: 21例

TMA標本は既成のものを、臨床検体についてはホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを薄切・脱パラフィン後、いずれも6種類のレクチンを用いてビオチン標識レクチンを用いた(糖鎖)免疫組織染色を実施した。

抗原はECA(デイゴマレクチン)、SBA(ダイズレクチン)、PHA-L4(インゲンマメレクチン)、

LEC2010、LEC0038、LEC1010(注:一部は詳細が非公開である)を用いた。一次抗体はそれぞれDako Antibody Diluentで20倍に希釈した。一次抗体の反応後、緩衝液で洗浄し、VECTASTAIN ABC Reagentを反応させ、緩衝液で洗浄した後、DABで発色させた。

6種類のレクチンについては、上皮細胞の染色結果を以下のようにスコア化した(表2)。細胞質(全体またはゴルジ野と推測される核の周囲)に発色したものを有意ととらえ、腺管の管腔面に膜状陽性を示すのみの場合は評価の対象とはしなかった。合計スコア0点を陰性、2点以上を全て陽性と判定した。

それぞれの結果について以下のことを検討した。(1)正常乳腺と乳癌組織における陽性症例の頻度の比較、(2)浸潤性乳管癌における核異型度、あるいは組織学的異型度と、レクチン発現の頻度・スコア点数との比較
統計学的処理は χ^2 乗検定、またはWelchのt検定を用いた。

表2:レクチン染色の評価法(スコア)

細胞質の染色性
発色範囲: 0%(0点) 10%未満(1点) 50%未満(2点) 50%以上(3点)
発色強度: 0点:発色なし 1点:弱陽性 2点:中等度陽性 3点:強陽性
染色スコア=発色範囲+発色強度 陰性:0点 陽性:2~6点

【結果】

染色結果について、主要なものを示す。

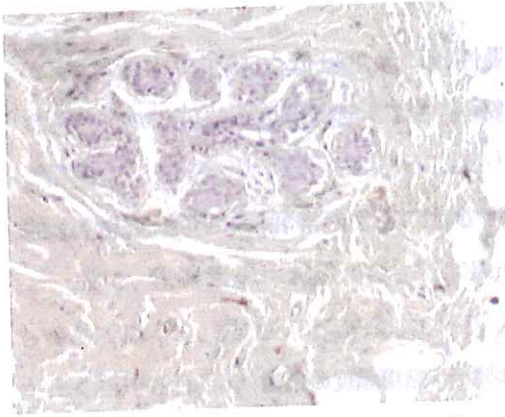


図1 陰性、スコア0点(0+0)(正常乳腺)

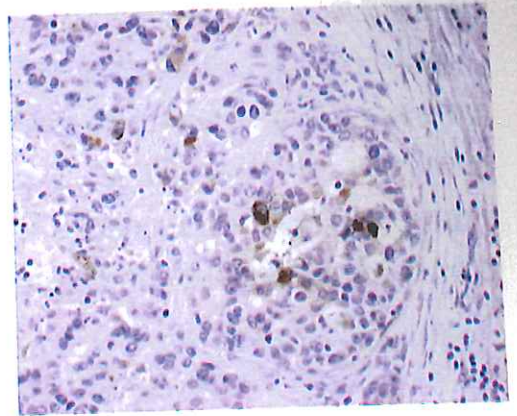


図2 陽性、スコア3点(1+2)

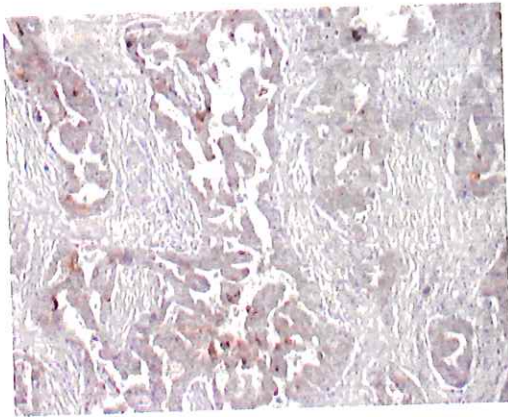


図3 陽性、スコア4点(2+2)

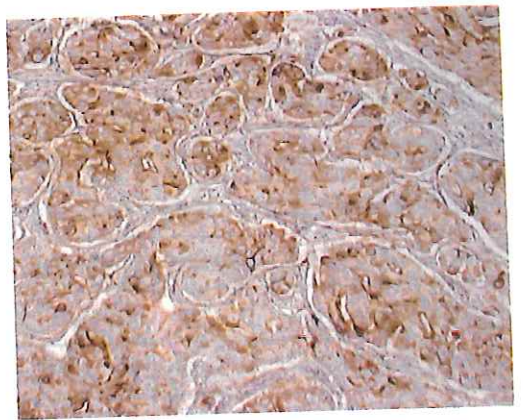


図4 陽性、スコア5点(3+2)

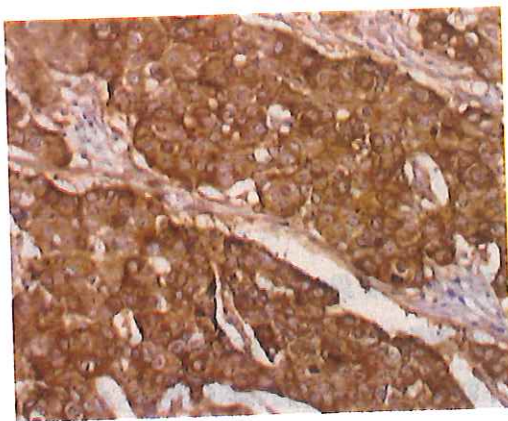


図5 陽性、スコア6点(3+3)

(1) 正常乳腺と乳癌における染色性の比較

6種類のレクチンはいずれも正常乳腺における陽性例の頻度は低く、陽性例も低スコアが主体であった。一方、癌組織では陽性発現例が多く見られ、発現程度も強いものがみられた。

陽性例の頻度については、LEC0038を除く5種類では、癌は正常乳腺に比して統計学的有意に陽性となる頻度が高かった(表3)。

表3: 正常乳腺と乳癌組織におけるレクチン発現頻度の比較

(a) ECA: 有意差あり(p<0.025)

	0(-)	2~6(+)	合計
正常	6	3	9
癌	14	43	57
合計	20	46	66

(b) SBA: 有意差あり(p<0.001)

	0(-)	2~6(+)	合計
正常	9	0	9
癌	2	56	58
合計	11	56	67

(c) PHA-L4: 有意差あり(p<0.001)

	0(-)	2~6(+)	合計
正常	7	1	8
癌	3	54	57
合計	10	55	65

(d) LEC2010: 有意差あり(p<0.001)

	0(-)	2~6(+)	合計
正常	7	2	9
癌	3	55	58
合計	10	57	67

(e) LEC0038: 有意差なし

	0(-)	2~6(+)	合計
正常	3	6	9
癌	17	41	58
合計	20	47	67

(f) LEC1010: 有意差あり(p<0.001)

	0(-)	2~6(+)	合計
正常	8	1	9
癌	10	48	58
合計	18	49	67

(2) 浸潤性乳管癌における核異型度、組織学的異型度とレクチン発現強度の比較

核異型度については1~2点と3点の間で、組織学的異型度については5点以下と6点で、6種類それぞれのレクチンの発現強度を比較したが、いずれも有意差は得られなかった。

【考察】

レクチンの中には、正常組織での発現がない、または弱い、その組織に由来する癌では細胞内に強く発現するものがあることが知られている。このようなレクチンは、正常組織と癌を病理組織学的に鑑別することのできるマーカーとして使用することが可能である。

一般に、乳腺疾患においては、病理組織検査で、正常乳腺と乳癌を鑑別するのが必ずしも容易ではなく、病理の中でも診断が難しい領域といわれている。最近では特に、針生検法が広く利用されるようになり、病変の一部だけを採取して癌かどうか、癌であればどのような性質の癌かを診断することが求められるようになってきた。ヘマトキシリン・エオジン染色のみでは診断が難しい症例において、レクチンの染色を加えることによって確定診断を得ることができるとすれば、大変有用な診断ツールとして利用できるものと期待される。

今回検討を行った6種類の新しいレクチンにおいては、5種類(ECA、SBA、PHA-L4、LEC2010、LEC1010)が癌で有意に強く発現しており、そのような条件を満たす可能性が示唆された。しかし、今回は正常乳腺と明らかな癌の症例のみを検討したため、今後良性の疾患や、良性～悪性の鑑別が難しかった症例における発現の様子を観察し、5種類の中からさらに特異性の高いマーカーを絞り込む作業が必要であると思われた。

次に、レクチンのもう一つの利用法として、癌の予後予測するマーカーとしての意義が指摘されている。すなわち、同じ乳癌でも症例によってレクチンの発現の様子が異なるため、その染色態度と治療反応性や予後との関連性が得られれば、診療を行う上でも大変有用な情報源となりうることを期待される。このような観点から、今回は癌の悪性度の指標の一つである核異型度や組織学的異型度と染色スコアとの関連性を調査した。しかし、いずれも有意差を認めることができなかった。

その理由として、一つには検討したレクチンが本当に乳癌の種類によって染色態度に大きな差がない可能性も考えられるが、一方で検討症例の大半が核異型度2～3、浸潤癌は組織学的異型度が5点以上と、異型の強い癌例の割合が圧倒的に多かったため、選んだ癌のタイプに偏りがあったために十分な結果が得られなかった可能性が否定できない。従って悪性度の低い乳癌症例の数を増やして再検討することが望ましいと思われた。

【結語】

1. 正常乳腺と乳癌を、病理組織学的に判別可能と思われるレクチン染色を5種類発見した。
2. これらのレクチンを染色、および組み合わせて使用することにより、乳腺病変の良悪性鑑別診断(がんの確定診断)やがんの悪性度による差を客観的に示すことができる可能性がある。今後は、臨床症例を用いてさらに検討する予定である。

参 考 文 献

- 1) 神奈木玲児、瀬古 玲:糖鎖を介した細胞接着の癌進展における意義. 永井克孝監修、未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂、京都、2005: 294-298.
- 2) 有広光司、井内康輝、Khatum N、ほか:乳癌の予後判定因子としてのHPAレクチンの結合性. 乳癌の臨床1991、**6**: 369-379.
- 3) 森谷卓也、笠島敦子、宇佐美 伸、ほか:乳癌におけるC2GnT発現の意義 免疫組織学的検討. 第12回日本乳癌学会総会プログラム抄録集2004、175.