

〈原著論文〉

通常型膵癌進展における Fibroblast activation protein α 発現に関する臨床病理学的検討

河瀬 智哉¹⁾, 吉田 浩司²⁾, 富山 恭行¹⁾, 仁科 惣治¹⁾, 原 裕一¹⁾,
森谷 卓也³⁾, 中村 雅史⁴⁾, 日野 啓輔¹⁾

1) 川崎医科大学肝胆膵内科学,

2) 川崎医科大学胆膵インターベンション学,

3) 川崎医科大学病理学2,

4) 川崎医科大学消化器外科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 通常型膵癌（以下膵癌）は極めて予後不良な癌であり、病理学的には癌周囲に豊富な間質を伴う。固形癌の間質は癌の増殖、浸潤、転移や抗癌剤に対する抵抗性獲得に重要な役割を果たし、なかでも癌関連線維芽細胞（Carcinoma associated fibroblast: CAF）と呼ばれる癌間質の活性化線維芽細胞は癌進展に深く関与している。今回我々は膵癌組織のCAFに発現するFibroblast activation protein α （以下FAP）の臨床病理学的な意義について検討した。対象は2006年4月から2010年4月の間に当院で切除した膵癌症例30例である。抗FAP抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。FAPは主として癌周囲の間質に検出され、一部には膵癌細胞にも認められたが、今回の検討ではFAP陽性の線維芽細胞をCAFとみなし、線維芽細胞のFAP発現強度と臨床病理学的因子を比較検討した。FAP陽性線維芽細胞は28/30例（93%）に認められた。FAP発現強度の内訳は、1+: 8例, 2+: 16例, 3+: 4例であった。陰性/弱陽性群（陰性・1+）と強陽性群（2+・3+）での生存率を比較したところ、それぞれの全生存日数の中央値は862日と352日であり強陽性群の生存率は有意に低かった（ $P < 0.05$ ）。またFAPの発現強度と膵癌細胞の分化度は有意な関連性を示し、FAPの発現が強いほど有意に低分化であった。さらに多変量解析ではFAPの強陽性は膵癌患者の予後を規定する独立因子の一つであった。以上の成績から膵癌組織の線維芽細胞におけるFAPの発現は膵癌患者の予後を規定する重要なバイオマーカーであることが明らかとなり、膵癌細胞の分化度と相関することを初めて明らかにした。

doi:10.11482/KMJ-J41(1)9 (平成26年10月11日受理)

キーワード：通常型膵癌, Fibroblast activation protein α , 微小環境, 細胞外基質,
膵星細胞, 線維芽細胞

緒言

固形癌の発育を考えていく上で、癌細胞は種々の間質細胞の共存なくしては生存出来ない事が判明しており¹⁾、癌と間質細胞の間では

様々なサイトカインならびにケモカインを主体としたパラクライン機構が存在し局所の微小環境（microenvironment）を形成している²⁾。正常の免疫状態であれば、造血幹細胞由来間葉細胞

(Tリンパ球・Bリンパ球・好中球・貪食細胞)が炎症を惹起して癌細胞を排除し、非造血幹細胞由来間質細胞(線維芽細胞・血管内皮細胞)が炎症組織を修復する wound and healing 機構が働くはずであるが³⁾、癌組織内では独自のパラクライン機構により周囲の線維芽細胞の機能を変化させる⁴⁾。これらの線維芽細胞は癌関連線維芽細胞(Carcinoma-Associated Fibroblast: CAF)とよばれ、一旦CAFに変化すると静止期の線維芽細胞では発現されないサイトカインや成長因子などの様々な生理活性物質が発現される。

Fibroblast Activation Protein α (以下FAP)は95kDaの膜蛋白質で、セリンプロテアーゼスーパーファミリーの1種であり、CAFに発現する生理活性物質のひとつであることが明らかにされている。CAFに発現するFAPは癌細胞周囲の免疫応答細胞の機能を低下させたり³⁾、癌の血管新生を促進したりすることが報告されている¹⁾。このようにCAFにおけるFAPの発現は癌の発育に有利な微小環境を形成する上で重要な働きを果たすことが推測される。

通常型膵癌(以下膵癌)は生物学的悪性度も高く、5年生存率は5%未満と報告されている⁶⁾。一方、病理学的には癌周囲に豊富な間質を伴うことが特徴的である。そこで今回我々は膵癌組織の間質におけるFAPの発現を検討し臨床病理学的因子と比較検討することで、ヒト膵癌進展におけるFAP発現と予後との関連性を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

症例

組織学的検討として、2006年4月から2010年4月までに川崎医科大学附属病院で切除された膵癌患者30人の膵癌組織を対象とした。また、慢性膵炎4症例ならびに胆道癌切除の際に得られた正常膵組織8症例をコントロールとした。なお、本研究は川崎医科大学倫理審査委員会の承認が得られており(倫理委員会承認番号894)、切除病理標本の検査および管理に関する

説明同意書が得ている。なお、喫煙歴はブリンクマン係数で1,000以上、飲酒歴はエタノール換算にて1日37.5g以上摂取しているものとした。術前化学療法を受けた症例はなかったが、23例は術後化学療法を受けた。膵癌の診断から死亡あるいは2012年8月31日までの期間における最終受診日までを生存期間と定義した。更に膵癌の病期分類は日本膵臓学会膵癌取扱い規約第6版補訂版を用いた⁷⁾。

免疫染色

抗FAP抗体を用いた免疫染色は川崎医科大学組織・電子顕微鏡センターにおいてCohenらの方法に準じて実施した^{8,9)}。切除検体を脱パラフィン後、0.01Mクエン酸緩衝液pH6.0(20倍希釈液、三菱化学メディエンス、東京)ならびに家庭用電子レンジを用い抗原賦活化を行い、PBSで3%に希釈した過酸化水素水で内因性peroxidase阻止した。その後水道水で洗浄したプレパラートをカバープレートに装着し、0.05%のTris-Buffered NaCl Solution with Tween 20, pH7.6(Dako North America, Inc. CA USA)での界面活性剤処理ならびにVectastain Universal Elite ABC kit(Vector Laboratories, Inc Burlingame, CA, USA)での蛋白ブロッキングを施した上で1:100のRabbit由来抗ヒトFAP α 抗体(Abcam ab053066)を4℃で16時間反応させた。2次抗体についても前述のVectastain Universal Elite ABC kitの抗Rabbit IgG抗体を使用し、最後にDako Liquid DAB+ Substrate Chromogen system(Dako North America, Inc, CA USA)で発色した。FAP発現強度は、膵癌組織を400倍でランダムに観察した視野内の全線維芽細胞にしめるFAP陽性細胞の割合が1/3未満を1+、1/3以上2/3未満を2+、2/3以上を3+とした。

統計処理

すべての統計処理においてIBM SPSS statistics 21.0を用い、全症例の生存曲線にはKaplan-Meier法を用い、有意差に関する検定に

Log-Rank 検定を使用した. さらに生存期間に
関与する因子の解析に Cox 比例ハザードモデル
の変数増加法を, 2 群間の比較には χ^2 検定
を用いた. またいずれの解析も $P < 0.05$ で有意
差ありと判定した.

結 果

患者背景

30 症例の臨床病理学的背景を表 1 に示す. 平
均年齢 69 歳 (68.8 ± 7.51), 性別は男性 17 例, 女
性 13 例で, 飲酒歴, 喫煙歴, 糖尿病はそれぞれ
6 例 (2%), 10 例 (3%), 11 例 (3.7%) であった.
膵癌の発生部位は頭部が 15 例, 体部が 8 例およ
び尾部が 7 例であり, Stage 別には Stage I, II,
III, IVa および IVb がそれぞれ 2 例, 1 例, 12 例,
10 例そして 5 例であった. 膵切除の方法は膵頭
十二指腸切除術が 19 症例, 膵尾部切除術が 11 症
例であり, 全症例の生存期間中央値は 515 日で
あった. 病理組織学的には管状腺癌 28 例, 腺扁
平上皮癌が 1 例, 乳頭腺癌が 1 例で, 分化度は
高分化 7 例, 中分化 21 例, 低分化 2 例であった.
術後抗癌剤治療の内訳は塩酸ゲムシタピン単剤
17 例, S-1 単剤 4 例, 塩酸ゲムシタピンと S-1 併
用 2 例であった.

FAP の免疫染色

30 症例中 28 症例 (93%) において FAP の発

現を認めた. FAP は主として癌周囲の間質に検
出され, 一部には膵癌細胞にも認められた. 今
回の検討では FAP 陽性の線維芽細胞を CAF と
みなし, 間質線維芽細胞の FAP 発現率を前述
の発現強度判定基準に従い図 1 に示すように
1+, 2+, 3+ と分類した. 一方で図 2 に示すよ
うに非癌症例の膵組織 (コントロール) では
FAP は 12 例全例陰性であった. FAP の発現強度
は 1+ が 8 例, 2+ が 16 例, 3+ が 4 例であった.
FAP の発現強度 (陰性 / 弱陽性群 [陰性・1+]
と強陽性群 [2+・3+]) と膵癌細胞と分化度と
の関係は陰性 / 弱陽性群で, 高分化 5 例, 中・
低分化 5 症例, 強陽性群で高分化 2 例, 中・低
分化 18 例となり, FAP の発現が強いほど, 病理
学的に低分化であった (表 2).

FAP 発現強度と膵癌症例の予後との関係

膵癌組織の線維芽細胞における FAP 発現強
度別にみた生存曲線を図 3 に示す. 生存期間中
央値は, FAP 陰性 / 弱陽性群で 862 日, 強陽性
群で 352 日であり Log-Rank test において FAP 陰
性 / 弱陽性群に比べ強陽性群が有意に生存期間
は短かった. 更に, 通常型膵癌の手術症例に
おいて予後と関連する因子について Cox 比例
ハザードモデルでの多変量解析を行ったところ
(表 3), 膵癌組織が中 / 低分化度であること,
FAP の発現が挙げられた.

表 1 通常型膵癌 30 症例の臨床病理学的背景

| | | | | | |
|--------------|------------------------|--------|------|-----|-----|
| 平均年齢 | 69 (68.8 ± 7.51) | | | | |
| 性別 (男性 / 女性) | 17/13 | | | | |
| 喫煙歴 | 10 (3%) | | | | |
| 飲酒歴 | 6 (2%) | | | | |
| 糖尿病 | 11 (3.7%) | | | | |
| 占拠部位 | 頭部 | 体部 | 尾部 | | |
| | 15 | 8 | 7 | | |
| JPS Stage | I | II | III | IVa | IVb |
| | 2 | 1 | 12 | 10 | 5 |
| 生存期間中央値 | 515 日 | | | | |
| 組織 | 管状腺癌 | 腺扁平上皮癌 | 乳頭腺癌 | | |
| | 28 | 1 | 1 | | |
| 分化度 | 高分化 | 中分化 | 低分化 | | |
| | 7 | 21 | 2 | | |
| 術後抗癌剤 | Gemcitabine | S-1 | 併用療法 | | |
| | 17 | 4 | 2 | | |

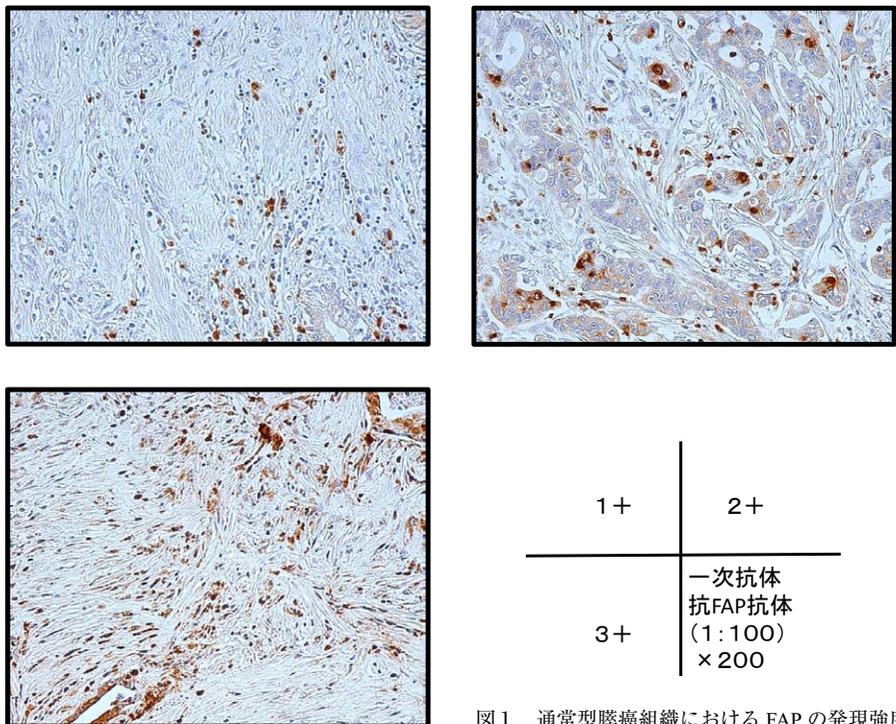
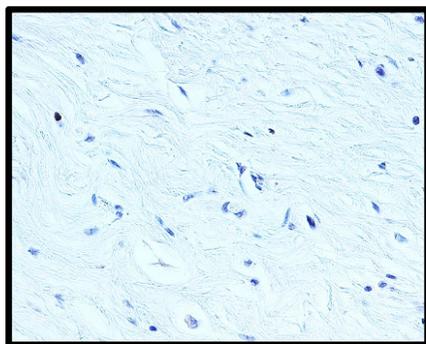
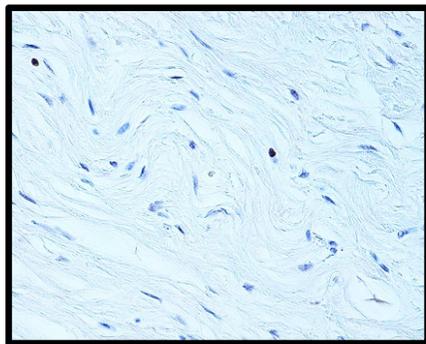


図1 通常型膵癌組織における FAP の発現強度



慢性膵炎



下部胆管癌で切除された膵頭部非腫瘍部

一次抗体 抗FAP抗体
× 400

図2 非癌症例の膵実質における FAP の染色

表2 FAP の発現強度と臨床病理学的特徴

| 特徴 | FAP 陰性 1+ | FAP α 2+ 3+ | χ^2 検定 |
|------------------|-----------|--------------------|-------------|
| 年齢 65歳以上 | 8 | 14 | $P=0.884$ |
| 65歳未満 | 2 | 6 | |
| T 因子 T1 T2 | 1 | 2 | $P=0.519$ |
| T3 T4 | 9 | 18 | |
| N 因子 N0 | 5 | 8 | $P=0.518$ |
| N1-3 | 5 | 12 | |
| M 因子 M0 | 10 | 18 | $P=0.338$ |
| M1 | 0 | 2 | |
| 病期 Stage I - III | 5 | 10 | $P=0.699$ |
| Stage IVa / IVb | 5 | 10 | |
| 分化度 高分化 | 5 | 2 | $P=0.015$ |
| 中・低分化 | 5 | 18 | |

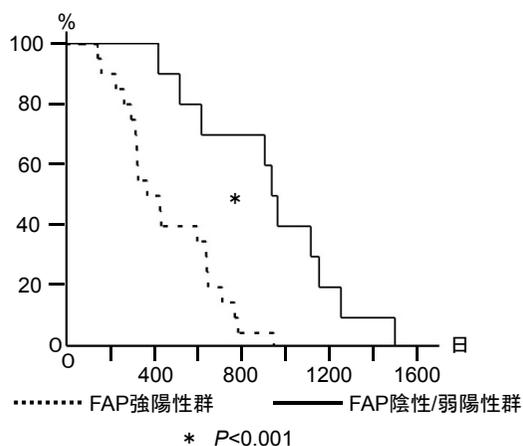


図3 FAP の発現強度による生存曲線

表3 通常型膀胱癌症例30症例における生存期間に及ぼす因子

| 因子 | 単変量解析 | | | 多変量解析 | | |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | P | Hazard ratio | 95%CI | P | Hazard ratio | 95%CI |
| 年齢(65歳以上) | 0.659 | | | | | |
| 性別 | 0.705 | | | | | |
| 喫煙歴 | 0.554 | | | | | |
| 飲酒歴 | 0.649 | | | | | |
| 糖尿病の既往 | 0.651 | | | | | |
| T3/4 | 0.150 | | | | | |
| N1-3 | 0.225 | | | | | |
| M1 | 0.160 | | | | | |
| Stage III以上 | 0.103 | | | | | |
| リンパ管浸潤 | 0.164 | | | | | |
| 脈管浸潤 | 0.748 | | | | | |
| 神経浸潤 | 0.235 | | | | | |
| FAP | <u>0.001</u> | 8.171 | 2.321-28.762 | <u>0.005</u> | 6.723 | 1.798-25.173 |
| 分化度(中/低分化) | <u>0.008</u> | 4.392 | 1.473-13.093 | <u>0.047</u> | 3.212 | 1.017-10.142 |
| 抗癌剤治療の有無 | 0.186 | | | | | |

考 察

通常型膵癌は今なお最も予後不良な癌腫のひとつであると同時に、その病理学的特徴として癌周囲に豊富な間質を伴う。これらの間質は癌細胞の増殖、浸潤、転移や抗癌剤に対する抵抗性獲得を支持する微小環境として注目されており、また重要な治療標的とも考えられている¹¹⁾。CAFは癌微小環境としての間質を構成する活性化された線維芽細胞であり、種々のサイトカインなどの生理活性物質を発現する。膵星細胞は炎症や癌のない状態では静止期の状態にあるが、膵癌組織においては癌細胞からの刺激により活性化されCAFに変化すると考えられている⁹⁾。

FAPはCAFで発現されるセリンプロテアーゼスーパーファミリーに属する膜蛋白質であり¹²⁾、KramanらはFAPの発現を排除できるようにしたトランスジェニックマウスに膵癌細胞を移植したところ、Tumor necrosis factor α や Interferon γ を介して腫瘍細胞と間質細胞の両者が低酸素状態となって細胞死に至ることを報告している¹⁾。これらの成績はFAPが抗腫瘍免疫を抑制していることを示すものであり、膵癌の進展に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、ヒト膵癌組織におけるFAPの発現が膵癌患者の予後にどのような影響を与えているのかについてはいまだ十分な解析が行われていないのが現状である。今回われわれは膵癌の切除標本を用いてFAPを免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子と比較検討した。ヒト膵癌組織におけるFAPの局在を検討したこれまでの報告によると、CAFを中心とする線維芽細胞のみに発現するとする報告⁸⁾とCAFならびに癌細胞に発現するとの報告⁹⁾があり、いまだ一定の結論は得られていない。今回のわれわれの検討ではFAPは主として間質の線維芽細胞に認められたが、一部には膵癌細胞にも認められた。本研究ではFAPを発現している線維芽細胞をCAFと定義し、CAFがヒト膵癌の予後にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で、FAP陽性の線維芽細胞に注目し臨床

病理学的因子と比較検討を行った。線維芽細胞におけるFAPの陽性率は93%と高率であったため、FAP発現の有無ではなく、発現強度の違いにより比較検討をおこなったところ、FAPが強く発現している症例では生存期間が有意に短く、より分化度の低い膵癌細胞のしめる割合が多いことが明らかとなった。さらには膵癌間質の線維芽細胞におけるFAPの発現は膵癌組織の分化度と関連がみられたとともに両者が膵癌患者の予後を規定する独立因子であることが示された。

膵癌組織におけるFAPの発現と患者予後との関係についてはCohen⁸⁾やShi⁹⁾らも過去に報告しており、今回のわれわれの成績はこれらの成績と一致するものであった。しかし膵癌細胞の分化度とFAP発現との関係はこれまでに報告がなく、FAP発現線維芽細胞が多いほど膵癌細胞がより低分化であった成績は、膵癌におけるFAP発現と予後の関係を考えるうえで興味深いと考えられた。また、Shiらの報告では134例の膵管腺癌のうち102例で膵癌細胞もFAPが発現しており、BxPC-3、AsPC-1、MiaPaCa-1ならびにSW1990といった膵癌細胞株にもFAPが発現していることが確認されている。本研究においても膵癌細胞にもFAPの発現が観察される症例が一部に認められた。したがって、CAFにおけるFAPの発現のみでなく、膵癌細胞におけるFAPの発現が膵癌の進展にどのような影響を及ぼしているかを明らかにしていくことは今後の重要な研究課題と考えられる。

本研究の限界はCAFの評価にあると考えている。先に述べたようにCAFは種々の生理活性物質を発現するが、そのひとつに α -smooth muscle actin (α SMA)が挙げられる。従来癌組織において α SMAを発現している線維芽細胞をCAFと定義している報告が散見される¹¹⁾。今回の検討ではFAPを発現している線維芽細胞を活性化線維芽細胞とみなしCAFと定義したが、 α SMAとFAPの発現は一致しているのか、 α SMAを発現しているCAFのなかにもFAPを発現していないものがどの程度存在する

のかについて更に検討していく必要があると考えられる。

引用文献

- 1) Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, Gopinathan A, Tuveson DA, Fearon DT. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- α . *Science*. 330: 827-830, 2010. doi:10.1126/science.1195300.
- 2) Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One* 4: e7965, 2009 doi:10.1371/journal.pone.0007965.
- 3) Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, Chi JT, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol* 2: E7, 2004
- 4) Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner. *Cancer Cell* 17: 135-147, 2010
- 5) Haqq J, Howells LM, Garcea G, Metcalfe MS, Steward WP, Dennison AR. Pancreatic stellate cells and pancreas cancer: current perspectives and future strategies. *Eur J Cancer* 50: 2570-2582, 2014
- 6) Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 68: 918-926, 2008
- 7) 日本膵臓学会 (編集). 膵癌取扱い規約 (第6版補訂版). 東京, 金原出版. 2013
- 8) Cohen SJ, Alpaugh RK, Palazzo I, Meropol NJ, Rogatko A, Xu Z, Hoffman JP, Weiner LM, Cheng JD. Fibroblast activation protein and its relationship to clinical outcome in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 37:154-158, 2008
- 9) Shi M, Yu DH, Chen Y, Zhao CY, Zhang J, Liu QH, Ni CR, Zhu MH. Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 18: 840-846, 2012
- 10) Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Cui L, Kayashima T, Morimatsu K, Moriyama T, Nakata K, Fujita H, Tanaka M. CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 139: 1041-1051, 2010
- 11) Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 380-384, 2010. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.040.
- 12) Liu R, Li H, Liu L, Yu J, Ren X. Fibroblast activation protein: A potential therapeutic target in cancer. *Cancer Bio Ther* 13:123-129, 2012

〈Original Article〉

Clinicopathological investigation of fibroblast activation protein α in the progression of pancreatic adenocarcinoma

Tomoya KAWASE¹⁾, Koji YOSHIDA²⁾, Yasuyuki TOMIYAMA¹⁾,
Souji NISHINA¹⁾, Yuichi Hara¹⁾, Takuya MORIYA³⁾,
Masahumi NAKAMURA⁴⁾, Keisuke HINO¹⁾

1) Department of Hepatology and Pancreatology, Kawasaki Medical School,

2) Department of Interventional Bilio-Pancreatology, Kawasaki Medical School,

3) Department of Pathology 2 Kawasaki Medical School,

4) Department of Digestive Surgery Kawasaki Medical School,

577 Matsushima, Kurashiki, Okayama 701-0192, Japan

ABSTRACT Pancreatic cancer is associated with an extremely poor prognosis, and pathologically shows abundant stroma surrounding cancer cells. The stroma of solid cancer plays an important role in cancer growth, invasion, metastasis, and the acquisition of resistance to anticancer drugs. In particular, activated fibroblasts in the cancer stroma called carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) are closely involved in cancer progression. In this study, we evaluated the clinicopathological importance of fibroblast activation protein α (FAP) that is expressed in CAFs in pancreatic cancer tissue. The subjects consisted of 30 patients with pancreatic cancer who underwent resection in our hospital between April 2006 and April 2010. Immunohistological evaluation was performed using the anti-FAP antibody. FAP was detected mainly in the stroma surrounding pancreatic cancer cells and partly in cancer cells. In this study, FAP-positive fibroblasts were regarded as CAFs, and the associations between the FAP expression level in fibroblasts and clinicopathological factors were evaluated. FAP-positive fibroblasts were observed in 28 (93%) of the 30 patients. The FAP expression level was 1+ in 8 patients, 2+ in 16, and 3+ in 4. The survival rate was compared between the negative/weakly positive group (negative, 1+) and strongly positive group (2+, 3+). The medians of all survival periods were 862 and 352 days in the negative/weakly positive and strongly positive groups, respectively, and the survival rate was significantly lower in the latter ($p < 0.05$). In addition, the FAP expression level was significantly correlated with the differentiation level of pancreatic cancer cells; when the FAP expression level was higher, differentiation was significantly poorer. Multivariate analysis revealed strongly FAP-positive fibroblasts to be an independent prognostic factor in patients with pancreatic cancer. These results show that FAP expression in fibroblasts in pancreatic cancer tissue is an important prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer and correlated with the differentiation level of pancreatic cancer cells.

(Accepted on October 11, 2014)

Key words : Pancreatic adenocarcinoma, Fibroblast activation protein α , Tumor microenvironment, Extracellular matrix, Pancreatic stellate cells, Fibroblasts

Corresponding author

Tomoya Kawase

Department of Hepatology and Pancreatology, Kawasaki
Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192,
Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1196

E-mail : oneworld_traveller@yahoo.co.jp

