

早期胃癌における神経内分泌細胞の動態

綾部真弥¹, 関 貴行², 迫間隆昭³, 小池盛雄¹

¹ 文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

² 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

³ 東京都保健医療公社 大久保病院

要旨

内視鏡的粘膜下剥離術により切除された胃高分化腺癌に神経内分泌細胞微小胞巣 (Neuroendocrine Cell Micronests: NECMs) が存在した2症例を経験した。2症例間でNECMsの様相が異なっていたため、それらの形態学的特徴および高分化腺癌との関連について、Chromogranin A, CD56, Synaptophysin, Serotonin に対する免疫組織化学を用いて検討した。対照として早期胃癌23病変における神経内分泌細胞 (Neuroendocrine Cell: NEC) の動態の検索も行った。症例1では癌腺管内に多数のNECが存在し、癌腺管とNECMsの連続が確認されたことにより、NECMsが癌腺管に由来する可能性が示唆された。症例2は腺癌とNECMsの関係性は乏しく、腸上皮化生粘膜の萎縮によってNECが集積、残存したものであると考えられた。対照とした早期胃癌の52%にNECの混在を認めた。胃癌におけるNECへの分化を示す癌細胞の混在は、癌幹細胞が多方向性の分化を示したものであると考えた。

キーワード

早期胃癌, 神経内分泌細胞微小胞巣, 免疫組織化学, Chromogranin A, 癌幹細胞

1. 緒言

消化管には神経内分泌細胞 (以下, NEC) が存在する¹⁾。胃ではG細胞や腸クロマフィン様細胞 (Enterochromaffin-like cell: 以下, ECL) が存在し、胃酸分泌に深く関わっている²⁾。稀にECLに由来する腫瘍が発生し、カルチノイド腫瘍として知られている³⁾。また、消化管癌にはNECの性格を有する細胞が混在することも報告されており、時には腺癌と神経内分泌細胞癌の両者の性格を持つ腫瘍も存在する。A型胃炎では胃体部腺粘膜深部にNECが集積し、神経内分泌細胞微小胞巣 (以下, NECMs) を形成する。今回、NECMsを伴った胃高分化腺癌 (m癌) の2切除例を経験し、癌腺管内およびNECMsにおけるNECの動態の検討を本研究の目的とした。対照としてNECMsの観察されない早期胃癌21症例23病変を対照と

して同様の検索を行った。

2. 対象と方法

2.1 対象

内視鏡的粘膜下剥離術によって切除されたNECMsの存在する胃高分化腺癌2例を対象とした。

症例1: 70歳代男性, 胃体下部後壁0-II a病変, 腫瘍径10×6mm, 病変は高分化腺癌で粘膜内に留まり, 脈管侵襲はみられなかった。

症例2: 70歳代男性, 胃体下部後壁0-II a病変, 腫瘍径10×8mm, 病変は高分化腺癌で粘膜内に留まり, 脈管侵襲はみられなかった。

尚, 両者にNECMsの発生要因であるA型胃炎は報告されていない。

対照として、NECMsの観察されない早期胃癌21症例23病変を用いた。(男女比=13:8, 平均年齢65歳)症例は秀和総合病院及び東京都保健医療公社大久保病院の倫理審査を受けて使用した。

2.2 方法

ホルマリン固定パラフィンブロックから3μm連続薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色, pH2.5アルシアン青-PAS(AB-PAS)染色, 免疫組織化学を行った。免疫組織化学にはKi-67, p53, および内分泌関連マーカであるChromogranin A(CgA), CD56, Synaptophysin(Syn), Serotonin(Ser)に対する抗体を使用し(表1), 以下の方法で行った。切片を脱パラフィン, 水洗後, クエン酸緩衝液(pH6.0またはpH9.0)に浸し, オートクレーブ(121℃, 20分), またはマイクロウェーブ(97℃, 40分)で抗原賦活処理を行った後, 1%過酸化水素加メタノールに20分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制した。リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate-buffered saline, 以下PBS, pH7.4)で切片を洗浄した後, 非特異的な反応のブロッキングを目的に, 2.5%正常ウマ血清(VECTOR)またはブロックエース(ニチレイ)を組織切片に滴下し湿潤箱内で15分間放置した。続いてマウスまたはラビットモノクローナル一次抗体を湿潤箱内において4℃下で一晩反応させた。PBSで洗浄後, 抗p53, 抗CgA, 抗Syn抗体を反応させた切片にはシンプルステインMAX-PO(MULTI)(ニチレイ)を湿潤箱内で30分間反応させ, シンプルステインDAB(ニチレイ)で発色した。抗Ki-67, 抗CD56, 抗Ser抗体を反応させた切片はABC kit(VECTOR)を用いてABC法にて発色までの過程を行った。PBSで洗浄し発色を止め, 流水水洗した。さらにマイヤーのヘマトキシリンで核染色を行い, 水洗後, 脱水, 透徹, 封入し観察した。二重免疫組織化学⁴⁾には抗Ki-67, 抗CgA抗体を使用した。抗CgA抗体を

polymer法によりDABで発色させ, 再度抗原の賦活化を行い, 抗Ki-67抗体をABC法にて発色までの過程を行い, Vector Blue(VECTOR)で青く発色させ, 水洗後, 水溶性封入剤で封入した。

2.3 評価

Ki-67, 内分泌関連マーカは病変部から無作為に評価領域を抽出し, 各領域における標識細胞数を全腫瘍細胞数で除した値を標識率として算出した。p53においては標識率が10%以上の病変を(+)とした。内分泌関連マーカについては, 標識された癌細胞が全く無い病変を(-), 10%未満を(+), 10%以上を(++)とした。得られたデータはSPSS(IBM)を用いて統計学的処理を行い, $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

症例1, 2の結果を表2, 3に示す。

3.1 症例1(図1)

組織学的には高分化腺癌で, NECMsが癌腺管の間に介在し, 一部で癌腺管とNECMsの連続が確認された。病変以外の萎縮した腸上皮化生粘膜にNECMsは存在しなかった。癌腺管ではKi-67標識率が47.3%であったが, NECMsではKi-67標識細胞は認められなかった。CgAは癌細胞の16.6%で陽性となり, NECMsではほぼ全ての細胞に発現がみられた。NECMsが多数認められる病変の底部でのCgA標識率は25.6%であったが, NECMsが認められない病変の表層部では3.4%であった。CgA陽性癌細胞が散在する癌腺管ではCgAとKi-67を同時発現する癌細胞も存在し, CgA陽性癌細胞の8.6%でKi-67陽性癌細胞が観察されたが, NECMsにそのような癌細胞はみられなかった。CD56は癌腺管の一部(2.4%)とNECMsのほ

表1 使用した一次抗体

抗体	クローン	希釈倍率	メーカー	検出系
抗Ki-67	MIB-1	×400	DAKO	ABC
抗p53	DO-7	×400	DAKO	MAX-PO
抗Chromogranin A	DAK-A3	×200	DAKO	MAX-PO
抗CD56	CD564	×500	Leica	ABC
抗Synaptophysin	SP11	×1	Diagnostic Biosystems	MAX-PO
抗Serotonin	5HT-H209	×100	DAKO	ABC

表 2 症例 1, 2 における各免疫組織化学の結果 (腫瘍全体)

		Ki-67	p53	CgA	CD56	Syn	Ser
症例 1	腫瘍	47.3%	0%	16.6%	2.4%	11.6%	0.2%
	NECMs	—	—	+	+	+	—
症例 2	腫瘍	58.7%	0%	7.2	2.0%	2.2%	1.4%
	NECMs	—	—	+	+	+	+

表 3 二重免疫組織化学の結果 (NECMs と近接した癌腺管)

	症例 1	症例 2
Ki-67(+)	32.9%*	38.3%*
CgA(+)	41.3%*	9.3%*
Ki-67(+)CgA(+)	3.9%	0.0%
Ki-67(-)CgA(-)	21.3%	52.3%
Ki-67(+)CgA(+)/CgA(+)	8.6%	0.0%

* : NECMs に隣接する癌腺管における標識率のため、全体の標識率とは異なる。

ほ全ての細胞に発現がみられた。Syn は癌腺管の 11.6%、NECMs の細胞のほぼ全てで発現しており、CgA と同様に分布の偏りがみられ、病変の底部では 13.2%、病変の表層では 3.2% であった。Ser は癌腺管内でごくわずか (0.2%) で、NECMs ではみられなかった。病変部、NECMs の p53 は (-) であった。

3.2 症例 2 (図 2)

組織学的には高分化腺癌で、NECMs は病変の存在する深部の粘膜筋板付近に散在していた。Ki-67 標識率は 58.7% であり、NECMs に標識細胞は観察されなかった。癌細胞の CgA 標識率は 7.2%、NECMs では全ての細胞で陽性であったが、症例 1 とは異なり NEC への分化を示す癌細胞に細胞増殖能は認められず、癌腺管と NECMs が連続する像もみられなかった。CD56, Syn, Ser の癌腺管での発現はそれぞれ 2.0%, 2.2%, 1.4% で、NECMs では Ser を含む全ての内分泌関連マーカーが陽性であった。症例 1 とは異なり、癌腺管における内分泌関連マーカーの分布の偏りはみられなかった。病変部、NECMs の p53 は (-) であった。

3.3 対照とした早期胃癌

対照とした早期胃癌の結果を表 4 および 5 に示す。23 病変は分化型癌 (管状腺癌, 乳頭状腺癌) が 17 病変, 未

分化型癌 (低分化腺癌, 印環細胞癌) が 6 病変であった。Ki-67 標識率は平均 52.2% であった。p53 陽性病変は 9/23 (39.1%) であった。内分泌関連マーカーの陽性病変は、CgA では 12/23 (52.2%), CD56 では 0/23, Syn では 8/23 (34.8%), Ser では 3/23 (13.0%) であった。各マーカー陽性細胞は病変の一部の領域に散在し、平均標識率はそれぞれ 2.9%, 0%, 2.2%, 1.5% であった。二重免疫組織化学において標識された NEC への分化を示す癌細胞に細胞増殖能は観察されなかった。統計学的な有意差は無かったものの、CgA と Syn は未分化型癌に比べて分化型癌で陽性となる傾向がみられた。(カイ二乗検定 CgA: $p=0.069$ Syn: $p=0.058$)

4. 考察

胃には G 細胞や ECL といった NEC が存在している。G 細胞から分泌されるガストリンは ECL に作用してヒスタミンの放出を促し、更にヒスタミンは壁細胞に作用して胃酸分泌に決定的な役割をしている²⁾。稀に ECL に由来するカルチノイド腫瘍が発生する³⁾。その発生要因から萎縮性胃炎を伴う Type 1, Multiple Endocrine Neoplasia に合併する Zollinger Ellison Syndrome による Type 2, 孤発性の Type 3 に分けられ、Type 1, 2 ではガストリンの過剰分泌が認められる⁵⁾。肉眼形態は粘膜下腫瘍で、粘膜固有

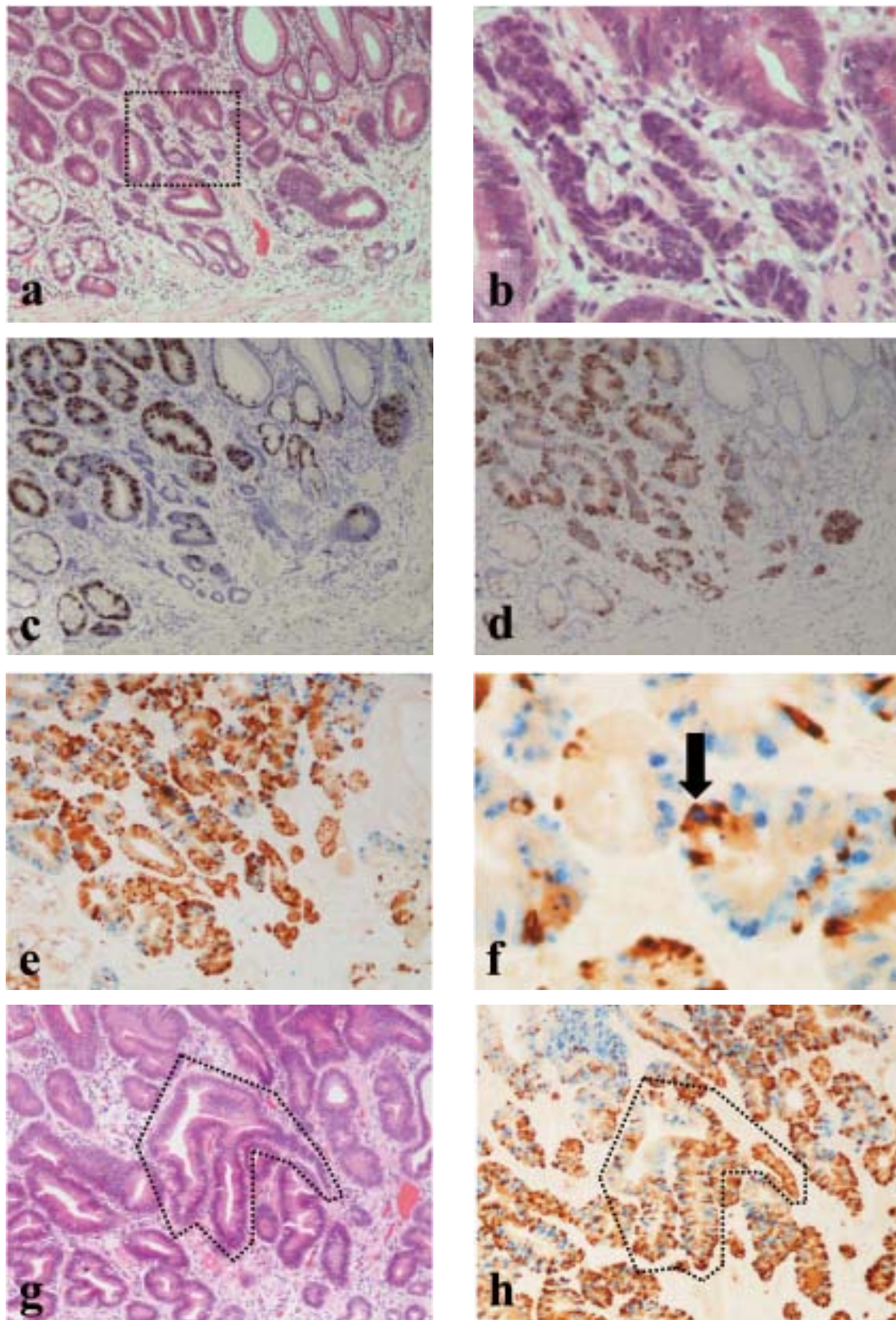


図1 a, b: HE 染色 (b: a で示した破線領域の拡大), c: Ki-67, d: CgA, e, f: 二重免疫組織化学, g, h: 癌腺管と NECMs の連続像 (g: HE 染色, h: 二重免疫組織化学 破線で同じ領域を示す)
二重免疫組織化学では, f で矢印が示す Ki-67 と CgA を同時発現する癌細胞が観察されたが, その標識率は CgA 陽性癌細胞のうち 8.6% であった. (a, c, d, e, g, h: 原図倍率 100 倍, b, f: 原図倍率 400 倍)

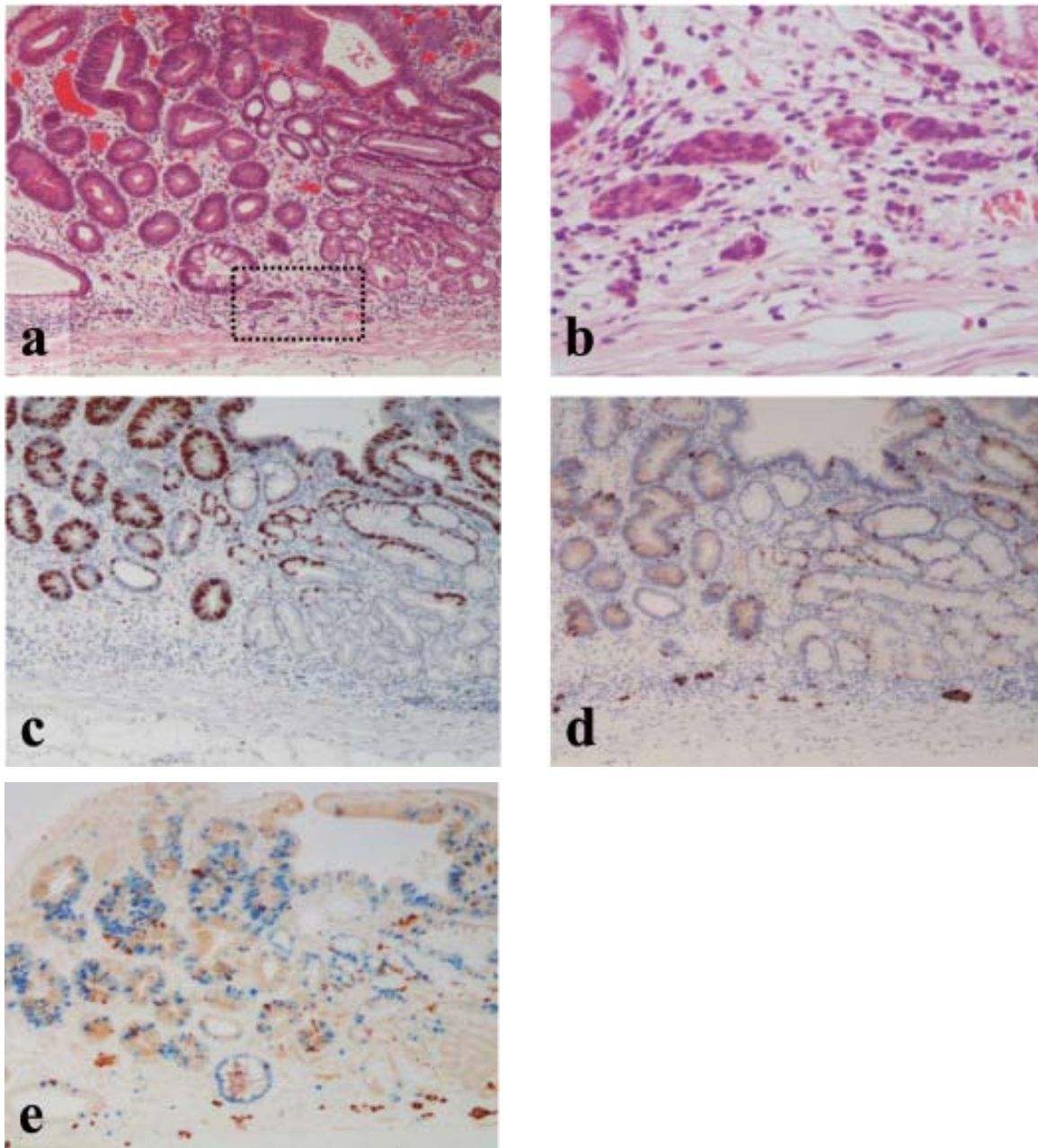


図2 a, b: HE 染色 (b: a で示した破線領域の拡大), c: Ki-67, d: CgA, e: 二重免疫組織化学

症例 1 とは異なり, NECMs は粘膜筋板付近に散在していた. 二重免疫組織化学では両者を同時発現する癌細胞は存在しなかった. (a, c, d, e: 原図倍率 100 倍, b: 原図倍率 400 倍)

層から粘膜下層に髄様に増殖し, 組織学的には比較的均一な小型の細胞からなり, 円形の核を有する. この細胞は様々な内分泌物質を分泌しており, 特に CgA は多くのカルチノイド腫瘍で発現が認められ, 血清 CgA 値はカルチノイド腫瘍の診断マーカーや予後判定に用いられることがある⁶⁾. 稀に腺癌と神経内分泌細胞腫瘍が共存する癌も存在し, それらは Composite Tumor と呼ばれている. Composite Tumor では両者の比率が 2:1 ~ 1:1 で, 腺

癌細胞と神経内分泌腫瘍細胞が共通の細胞に由来して発生すると報告されている⁷⁻⁹⁾. また, 腺癌においても NEC は約 40% の症例で陽性であるとされている^{10, 11)}. 神経内分泌細胞の腫瘍における Ki-67 標識率はカルチノイド腫瘍で低く, 癌細胞が神経内分泌細胞へ分化した悪性度の高い神経内分泌細胞癌では高いとされ, Ki-67 は悪性度の指標として用いられている^{12, 13)}.

症例 1 において, 癌腺管の約半数の細胞で活発な細胞増

表4 対照症例の結果

症例	組織型	深達度	Ki-67	p53	CgA	CD56	Syn	Ser
1	tub	sm	54.5%	-	4.9%	-	3.2%	2.4%
2	pap	sm	47.7%	-	6.2%	-	1.7%	-
3	tub	m	79.9%	+	-	-	-	-
4	tub	m	43.6%	-	0.4%	-	0.9%	-
5-1	por sig	m	23.8%	-	-	-	-	-
5-2	tub	sm	50.6%	+	4.7%	-	2.3%	1.0%
6	sig	m	14.9%	-	-	-	-	-
7	por sig	sm	27.2%	+	-	-	-	-
8	tub	sm	88.3%	-	4.0%	-	-	-
9	tub	sm	78.9%	+	-	-	-	-
10	tub	sm	33.8%	-	4.0%	-	1.4%	-
11	sig	m	27.6%	-	-	-	-	-
12	por	sm	51.8%	+	-	-	-	-
13	tub	sm	69.3%	-	1.8%	-	-	-
14-1	tub	sm	24.0%	-	1.5%	-	1.8%	1.0%
14-2	pap	sm	37.0%	-	-	-	-	-
15	tub	sm	52.2%	+	5.7%	-	4.2%	-
16	tub	m	19.1%	-	1.0%	-	-	-
17	por	sm	77.1%	+	0.3%	-	-	-
18	tub	sm	93.5%	+	0.6%	-	-	-
19	tub	m	80.2%	-	-	-	-	-
20	tub	m	46.2%	+	-	-	1.9%	-
21	tub	sm	79.2%	-	-	-	-	-
陽性病変				9/23	12/23	0/23	8/23	3/23
標識率平均			52.2%		2.9%	0%	2.2%	1.5%

tub (tubular adenocarcinoma) : 管状腺癌, pap (papillary adenocarcinoma) : 乳頭状腺癌, por (poorly differentiated adenocarcinoma) : 低分化型腺癌, sig (signet ring cell carcinoma) : 印環細胞癌, m: 粘膜固有層, sm: 粘膜下層

表5 対照症例における内分泌関連マーカー

	CgA		CD56		Syn		Ser	
	+	-	+	-	+	-	+	-
分化型癌	11	6	0	17	8	9	3	14
未分化型癌	1	5	0	6	0	6	0	6

CgA: $p=0.069$ Syn: $p=0.058$

殖が行われていたが、NECMsでは観察されず、強い増殖能を持つ癌腺管とは増殖態度が異なっていた。さらに、癌腺管内のNECは癌腺管の底部やNECMsに近接する領域で多く、一部で癌腺管とNECMsの連続がみられたことから、強い増殖能を持つ癌細胞から増殖能を持たないNECへの分化を示す癌細胞が取り残される形でNECMsが生じるものと考えられた。Ambeら¹⁴⁾はNECMsが存在した早期胃癌を報告し、NECMsが癌に由来するものであるとしているが、細胞増殖能の検討はされておらず、検索した範囲では今回の報告が癌腺管と連続するNECMsの細胞増殖能についての最初の報告である。NECMsに細胞増殖能はなく、細胞に増殖能が認められるものとしてComposite TumorやAdenocarcinoidがあるが症例1はそれらと異なる病態と考えた。Soga¹⁵⁾は癌幹細胞が多方向性の分化をして腺癌やComposite tumorになる仮説を論じており、症例1では、癌幹細胞が通常の癌細胞に比較して増殖能の乏しいNECの形質を有するCgA陽性癌細胞に分化し、CgA陽性癌細胞が集積し、Cell cycleに入っていない細胞集団として、NECMsとなった可能性が考えられた。正常粘膜あるいは腸上皮化生粘膜ではNECは腺底部に存在しているが、癌腺管においても同様の傾向を示して癌腺管の底部に相当する部位にNECへの分化を示す癌細胞が増殖したものと考えた。

症例2では、NECMsは粘膜筋板付近のみに存在し、癌腺管との連続は観察されなかった。腺癌とNECMsの関係性は低く、Serが陽性であったことから、腸上皮化生粘膜の萎縮や消失の後にNECが集積、残存しNECMsを形成したものと考えられた。

また、対照とした早期胃癌23病変中52.2%に神経内分泌細胞の混在がみられ、これは一般的に言われている40%よりわずかに多かった。胃癌におけるNECへの分化を示す癌細胞の混在は、癌幹細胞が多方向性の分化をしたものである可能性が示唆された。

胃癌は多種多様な組織像を示すがNECMsを伴う症例は稀であり、今後更なる検討が必要である。

5. 謝辞

本検討を行うにあたり、検体を提供して下さった東京都保健医療公社大久保病院病理部、春日部秀和総合病院外科、ご指導いただいた東京医科歯科大学医学部附属病院病理部の皆様に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 藤田尚男, 藤田恒夫, 標準組織学 各論 第3版, 医学書院, 東京, 1992, p.347
- 2) Burkitt MD, Pritchard DM: Review article: Pathogenesis and management of gastric carcinoid tumors. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 (9) 1305-1320.
- 3) Itsuno M, Watanabe H, Iwafuchi M, Ito S, Yanaihara N, Sato K et al: Multiple carcinoids and endocrine cell micronests in type A gastritis. *Cancer* 1989; 63: 881-890.
- 4) 名倉 宏, 長村義之, 堤 寛編集, 特殊技法, “渡辺・中根 酵素抗体法”, 改訂四版, 東京: 学際企画, 2005, p191-198.
- 5) Rindi G, Luinetti O, Cornaggia M, Capella C, Solcia E: Three subtypes of gastric argyrophil carcinoid and the gastric neuroendocrine carcinoma.: a clinicopathological study. *Gastroenterology* 1993; 105 (4) : 944-1006.
- 6) Nikou GC, Lygidakis NJ, Toubanakis C, Pavlatos S, Tseleni-Balafouta S, Giannatou E et al: Current diagnosis and treatment of gastrointestinal carcinoids in a series of 101 patients: the significance of serum chromogranin-A, somatostatin receptor scintigraphy and somatostatin analogues. *Hepatogastroenterology* 2005; 52 (63) : 731-41.
- 7) Levendoglu H, Cox CA, Nadimpalli VA: Composite (adenocarcinoid) tumors of the gastro-intestinal tract. *Dig Dis Sci* 1990; 35 (4) : 519-25.
- 8) Adhikari D, Conte C, Eskreis D, Urmacher C, Ellen K: Combined adenocarcinoma and carcinoid tumor in atrophic gastritis. *Ann Clin Lab Sci*. 2002; 32 (4) : 422-7.
- 9) Ishida M, Hosokawa M, Genba K, Daikuhara H, Ishihama H, Ishida Y et al: A case of gastric carcinoid tumor with coexisting adenocarcinoma in the same tumor. *Gan No Rinsho* 1989; 35 (14) : 1687-92.
- 10) Yao GY, Zhou JL, Lai MD, Chen XQ, Chen PH: Neuroendocrine markers in adenocarcinomas : an investigation of 356 cases. *World J Gastroenterol*. 2003; 9 (4) : 858-61.
- 11) Eren F, Celikel C, Güllüoğlu B: Neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinomas; correlation

- with tumor stage and expression of VEGF and p53. Pathology Oncology Research 2004; 10 (1) 47-51.
- 12) Kaizaki Y, Fujii T, Kawai T, Sato K, Kurihara K, Fukayama M: Gastric neuroendocrine carcinoma associated with chronic atrophic gastritis type A. J Gastroenterol 1997; 32: 643-9.
- 13) 田中伸之介, 森寿治, 中村浩, 富田昌良, 梅野寿実, 池田靖洋ら: Proliferating cell nuclear antigen および Ki-67 標識率からみた胃内分泌細胞癌の生物学的悪性度, 日消外会誌, 1996; 29 (4) : 795-799.
- 14) Ambe K, Mori M, Enjoji M: Early gastric carcinoma with multiple endocrine cell micronests. The American journal of surgical Pathology 1987; 11 (4) : 310-315.
- 15) Soga J: Histogenesis of carcinoids in relation to ordinary carcinomas. Acta Medica Biologica 1982; 30 (1) : 17-33.

Neuroendocrine Cells in the Early Gastric Cancer with Special Reference to Two Cases Associated with Neuroendocrine Cell Micronests.

Shinya Ayabe¹, Takayuki Seki², Takaaki Sakoma³, Morio Koike¹

¹Graduate School of Health Care Science, Graduate School of Bunkyo Gakuin University

²Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology,
Bunkyo Gakuin University

³Ohkubo Hospital, Tokyo Metropolitan Health and Medical Treatment Corporation

Abstract

Neuroendocrine cells (NEC) were analyzed in 25 lesions of gastric mucosal cancer. 52.2% of early gastric cancers had NECs by immunostaining for Chromogranin A. Two had neuroendocrine cell micronests (NECMs) :one showed continuity between NECM and NECs in the cancerous glands, where NECs showed less proliferative activity compared to cancer cells without neuroendocrine features, 8.6% among NECs showed Ki-67 labeling index, while 48.3% among cancer cells. On the contrary, NECMs showed no proliferative activity by Ki-67 immunostaining. Such findings indicate that the NECs in the cancerous glands might differentiate from the cancer stem cells, and they proliferate much more slowly than cancer cells, resulting in clustering of NECs in the glands, and might separate into NECMs. In the other case, NECMs were located near the lamina muscularis mucosae apart from the cancerous glands without continuity. Ki-67 was also negative in NECMs. Compared to the former case, serotonin was positive, indicating some remnant of neuroendocrine cells of preexisting intestinal metaplastic epithelium. These cases were different from composite tumor. Type A gastritis was not demonstrated.

Key words —— gastric cancer, neuroendocrine cell micronests, immunohistochemistry, Chromogranin A, cancer stem cell

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.4: 69-76