甲状腺癌における p 21 ras 由来蛋白の発現

湯川 尚哉・熊澤 博文・山下 敏夫
福武 知重*・立川 拓也*

Expression of p 21 Ras Protein in Thyroid Cancer

Hisaya Yukawa, Hirobumi Kumazawa and Toshio Yamashita

(Kansai Medical University)

Tomoshige Fukutake and Takuya Tachikawa

(Kishiwada City Hospital)

We studied the expression of p 21, the ras encoded protein, in 30 specimens of thyroid carcinomas obtained from 29 patients. The presence of p 21 ras protein was evaluated by immunohistochemistry using a specific monoclonal antibody (MAb Y-13259). The evaluation was compared with various prognostic factors such as histological type, sex, age, extent of tumor invasion, tumor size and lymph node metastasis. Our data indicated that the incidence of p 21 positive expression in papillary carcinoma was higher than in other types of thyroid cancer, and that tumors limited in extent of tumor invasion and smaller in size typically expressed p 21. In conclusion, our results suggested that expression of p 21 might be related to cell proliferation in the early stages of neoplastic transformation.

Key words : thyroid cancer, immunohistochemistry, p 21 ras oncogene

緒 言

p 21 ras 遺伝子は H-ras, K-ras, N-ras の 3 種類からなる遺伝子ファミリーを形成しており, その各々が遺伝子産物として分子量21000の蛋白質をコードし, この蛋白は細胞膜の内側に局在している. G 蛋白と同様に, GTP に結合し GDP に変換する酵素活性を有し, 細胞内情報伝達に関与している¹⁾²⁾. ras 遺伝子は, ヒトがん遺伝子としては最初に見いだされた遺伝子で, 現在までに大腸癌, 膀胱癌, 胃癌でその発現が高率であることが報告されてきた^{3)~5)}.

甲状腺癌は, 悪性腫瘍のうち比較的進行が緩慢で, 臨床予後良好の症例が多いが, 一部の症例では不幸な転帰をとることがある. 近年 p 21 ras 遺伝子産物は甲状腺

癌における予後因子としての可能性や癌細胞の分化にも関与している可能性が示唆されているが⁶⁾⁷⁾, 本邦での検討はなされていない. 今回我々は甲状腺癌組織における p 21 ras 遺伝子産物の発現を免疫組織学的に検索をすることでその生物学的意義について検討した.

対象および方法

対象は1991年1月から92年5月に手術され, 病理学的に甲状腺癌と確認された摘出標本29例と, このうち未分化癌に移行した1例をあわせて30例とした. 性別は男性5例, 女性25例で, 年齢は13歳から77歳で平均年齢は47.9歳であった. 組織型分類では乳頭癌21例, 濾胞癌8例, 未分化癌1例であった(表1).

表 1 対 象

性	男性 5 例	女性 25 例
年 齢	13歳～77歳(平均47.9歳)	
組織型	乳頭癌	21 例
	濾胞癌	8 例
	未分化癌	1 例

p 21 ras 遺伝子産物は免疫組織学的に, avidin-biotin peroxidase complex method (ABC 法) を行い評価した. すなわちパラフィンブロックから 3 μ m 切片を作成し, 脱パラフィン後 0.3% 過酸化水素加メタノール溶液に浸し 30 分反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性除去を行った. 次に, PBS にて 3 回洗浄後, 正常 10% ラット血清で非特異的吸着を防ぎ, 一次抗体を 12 時間で反応させた. PBS にて 3 回洗浄後, 希釈ビオチン化二次抗体を 30 分反応させ, PBS にて 3 回洗浄後, ABC 試薬 (vectastain ABC キット, vector Laboratories Inc.) を 60 分反応させ, 再度 PBS にて 3 回洗浄後, ペルオキシダーゼ基質溶液を 6 分間反応させた. 最後に洗浄後, ヘマトキシリンで核染色を行った. 一次抗体には, Oncogene science 社製の抗 ras-p 21 (Ab-1) を 50 倍希釈で用いた. 染色標本は光顕的に観察し, 腫瘍細胞の半数以上に染色性が強いものを強陽性 (2+), 陽性と考えられるが染色性の弱いものや, 陽性細胞が腫瘍細胞の半数以下であるものを陽性 (+) とし, 染色性が全くみられないものを陰性 (-) として 3 段階で評価した.

結 果

検討した 30 例のうち強陽性は 2 例 (6.7%), 陽性は 7 例 (23.3%), 陰性が 21 例 (70.0%) で計 30.0% の陽性率であった. 陽性を示す腫瘍細胞は細胞質が茶褐色に染色されている (図 1). 組織型分類による染色性を比較すると陽性例はすべて乳頭癌でみられ, 濾胞癌, 未分化癌では陰性であった (表 2). 乳頭癌より未分化癌に移行したと考えられる 1 例は, 初回手術時の甲状腺腫瘍で乳頭癌の組織診断を得たが, その術後約 1 年目に急速に増大する頸部腫瘍のため再手術を行ったところ, リンパ節内に未分化傾向の強い甲状腺乳頭癌由来と考えられる腫瘍細胞が認められた (図 2). 甲状腺乳頭癌から未分化癌への移行変化前後においてもともに陰性であった. 性差による染色性を比較すると, 男性はすべて陰性で, 女性の 25 例

図 1 染色の強陽性例 (ras-p 21 免疫染色 $\times 400$)
細胞質が茶褐色に染色されている.

表 2 組織型による染色性の比較

	2+	+	-
乳頭癌	2	8	11
濾胞癌	0	0	8
未分化癌	0	0	1

図 2 乳頭癌より未分化癌に移行した 1 例の病理
(H-E 染色 $\times 400$)

表 3 性による染色性の比較

	2+	+	-
男 性	0	0	5
女 性	2	7	16

中 9 例 (36.0%) が陽性を示した (表 3). 年齢での比較において, 10 代での陽性例はなく, 20 代 28.6%, 30 代ではみられず, 40 代 50.0%, 50 代 33.3%, 60 代 25.0%, 70 代では 33.3% が強陽性あるいは陽性を示した (図 3). 45 歳以上と 45 歳未満との陽性率を比較しても前者が 30.8%, 後者が 22.2% と明らかな相関はなかった. UICC の pTNM 分類による染色性の比較では, pT1 の 7 例のうち 1 例が強陽性, 3 例が陽性で, 合計 57.1% に陽性, pT2 の 8 例中 3 例 (37.5%) が陽性で, pT3 の 7 例全てにおいて陰性であった. また, pT4 で 8 例のうち 1 例が強陽性, 1 例が陽性で計 25.0% の陽性染色を認めた (図 4). リンパ節転移の有無による原発巣での染色率の比較では, pN0 の 15 例中 5 例 (33.3%) が陽性, pN1a の 11 例中 2 例が強陽性, 1 例が陽性で合計 3 例 27.3% に陽性染色があり, pN1b の 4 例中 1 例 (25%) で陽性であった (図 5).

図 3 年齢による染色性の比較

図 4 pT 分類による染色性の比較

図 5 pN 分類における染色性の比較

考 察

临床上, 甲状腺癌は増殖が遅く, 他臓器の癌に比べると予後がよいとされている⁷⁸⁾. しかし, 分化癌のうち 3~5% が未分化癌に変化するとされており, いったん未分化傾向を呈すると腫瘍は急速に増大し, 気管を圧迫, 閉塞し, また全身に転移することが多い. あらゆる治療を行っても, その予後はきわめて不良であるとされる. この甲状腺腫瘍の発生, 腫瘍の悪性化のおこるメカニズムとして, 癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子の異常がいくつか合わさって進展していくことが示唆されている⁹⁾.

大腸において, 正常粘膜から腺腫を経て癌に至る過程多段階発癌 (multi-step carcinogenesis) を Vogelstein ら¹⁰⁾ は提唱した. これは, 正常大腸粘膜上皮において 5 番染色体が欠失すると増殖活性状態となる. ここには, 最近クローニングされた APC 遺伝子が座位しており, その変異が証明されている. 腺腫が発生すると DNA メチル化の減少, ras 遺伝子の点突然変異が生じ, 腺腫は 1 cm をこえる. 次に 18 番染色体が欠失すると 2 cm を越えた腺腫となり, さらに染色体 17 番 (17p, p 53 遺伝子) が欠失すると浸潤癌になり, 種々の遺伝子変異が加味され, 大腸癌が転移するとした.

本邦においても, 大腸癌は, 高分化型腺癌の方が低分化型腺癌に比べて p 21 の発現が高率であること, 進行度が進むにつれて発現の頻度が減少すること, また高異型度腺腫にも高度にみられる報告から, p 21 の発現は腺腫細胞から癌細胞への進展する過程で変化し, その過程とともに p 21 の発現が減少する可能性が示唆されている¹¹⁾. また, 胃癌においても同様に, 高分化型腺癌では低分化型腺癌に比べ p 21 発現頻度が高いとする報告

が多く^{12)~14)}, 大腸癌と同様に多段階発癌が推測されている。

甲状腺腫瘍は, 良性腫瘍から比較的悪性度の低い高分化癌や極めて悪性度の高い未分化癌といった様々な形態を示す。そして組織学的所見より, 未分化癌組織中に高率に分化型腫瘍が存在することや, しばしば分化癌と未分化癌の間に形態学的移行が認められることより, 甲状腺未分化癌は, 濾胞腺腫や, 濾胞癌, 乳頭癌を, 先行病変として発生することが知られている¹⁵⁾。また, 甲状腺癌における ras 遺伝子点突然変異の頻度に関しては, さまざまの報告があり^{16)~19)}, 意見の一致をみない。すなわち, 免疫組織染色に用いた抗 ras 抗体が ras 癌遺伝子の変異型のみを認識するか, 野生型と変異型の双方を認識するかによって, p 21 の発現頻度に差があると考えられている。今回用いた p 21 に対する抗体は活性型 p 21 と不活性型 p 21 の両方を認識するため, 著者らの結果よりこの点に関して言及はできない。しかしながら, これらの報告によると ras 遺伝子変異は腺腫, 濾胞癌, 乳頭癌, 未分化癌など, いずれにおいても検出されること, 良性の腺腫の段階でかなり高率に変異していることより, 腺腫, 高分化癌への癌化進展の段階の 1 つに関与していると考えられている^{6)8)17)20)~22)}。著者らの結果では, 甲状腺乳頭癌21例中9例(42.9%)において p 21 の発現がみられ, 濾胞癌には発現がみられなかった。著者らの抗体と同じ正常型と点突然変異を生じた ras 遺伝子産物の両者を認識する抗体を用いた春田¹⁹⁾の検討でも濾胞癌での発現の頻度はわずかであり, 使用した抗体の特異性によるものと考ええる。

甲状腺癌の予後因子として, Lahey Clinic の Cady ら²³⁾は retrospective study で甲状腺分化癌の予後は A (Age), M (Metastasis), E (Extra-thyroidal invasion), S (Size) の4項目 (AMES) により予後良好と予後不良とのグループに分けている(表4)。同様に Mayo clinic の Hay ら²⁴⁾は乳頭癌症例を retrospective に解析し, A

表4 AMES Differentiated thyroid carcinoma risk group definition²³⁾

low-risk group

- A. 年齢; 男性40歳以下女性50歳以下
- B. 上記の年齢より高齢の患者で以下の3つの条件を全て満たすもの
 - 1. 乳頭癌—甲状腺内にとどまるもの
 - 濾胞癌—微小な被膜浸潤
 - 2. 腫瘍径 5 cm 未満
 - 3. 遠隔転移のないもの

high-risk group

- A. 遠隔転移のあるもの
- B. 高齢患者で以下の条件を満たすもの
 - 1. 乳頭癌—甲状腺外への浸潤
 - 濾胞癌—著明な被膜浸潤
 - 2. 腫瘍径 5 cm 以上

(Age), G (Grade), E (Tumor extent), S (Tumor size) の AGES という計4つの因子をスコア化して予後良好と予後不良とを分類可能であるとしている(表5)²⁴⁾。これらのいずれの報告も腫瘍径の大きなものほど予後が悪いという点で一致しており, 甲状腺腫瘍の大きさは予後因子として重要であることが示唆される。甲状腺癌患者の予後因子と腫瘍細胞における p 21 の発現の関係において, Basolo ら⁹⁾は甲状腺癌の p 21 の発現と生存率とが有意に相関することを報告した。今回の著者らの臨床病期と腫瘍細胞における p 21 の発現頻度の検討では, pT1 および pT2 の甲状腺癌に p 21 ras 遺伝子の発現頻度が高い傾向にあり, pT3 の腫瘍での p 21 発現はみられず, pT4 の症例でも p 21 の発現がみられたのは8例中2例で比較的少なく, 甲状腺癌の p 21 蛋白の発現はその腫瘍の大きさが小さいほど高率であると考えられた。このことは臨床病期の初期において p 21 が関与する可能性を示唆している。今後, p 21 の甲状腺癌患者の予後因子としての有用性について検討を行いたい。

表5 AGES score—甲状腺乳頭癌の予後スコア²⁴⁾

prognostic score = 0.05 × 年齢(40歳以上)または +0 (40歳未満),
 +1 (tumor grade 2) または +3 (tumor grade 3 または 4),
 +1 (甲状腺外への浸潤) または +3 (遠隔転移),
 +0.2 × 腫瘍径 (cm),
 minimal-risk : ≤ 3.99 higher-risk : > 3.99

ま と め

我々は、甲状腺癌患者29人の手術摘出標本30例における、腫瘍細胞の p 21 ras 遺伝子産物の発現について、特異的モノクローナル抗体 MAb Y-13259 を用いて免疫組織学的検索を行った。p 21 ras 遺伝子産物の染色性と病理診断、性別、年齢、腫瘍進展、大きさ、リンパ節転移とを比較を行い検討した。Y-13259 に対する陽性染色は乳頭癌にみられ、濾胞癌、未分化癌ではみられなかった。進展範囲が小さく、腫瘍が小さいものに、Y-13259 陽性染色がみられる傾向にあった。以上の結果より、甲状腺癌において p 21 の発現は、臨床病期の初期の段階で陽性染色がみられる傾向にあり、このことは発癌初期の細胞分化、増殖に関与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Shih T and Weeks M : Oncogenes and cancer ; the p 21 ras genes. *Cancer Invest* **2** : 109~123, 1984.
- 2) McGraph JP, Capon DJ, Goeddel DV, et al : Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p 21 protein. *Nature* **310** : 644~649, 1984.
- 3) Thor S, Obara M, Hirano H, et al : Monoclonal antibodies define differential ras expression in malignant and benign colonic disease. *Nature* **311** : 149~152, 1982.
- 4) Michelassi F, Grad G, Roncella M, et al : Relationship between ras oncogene expression and clinical and pathological features of colonic carcinoma. *Hepatogastroenterology* **37** : 513~516, 1990.
- 5) Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, et al : Ras oncogene p 21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. *J Exp Med* **161** : 1213~1218, 1985.
- 6) 井藤久雄 : がんとかん遺伝子, 甲状腺癌を含めて. *内分泌外科* **10** : 189~200, 1993.
- 7) 伊藤 敬, 瀬山敏雄, 林 雄三, 他 : 甲状腺癌進展と p 53 遺伝子変異. *日本臨床* **52** : 1069~1074, 1994.
- 8) 難波裕幸, 松尾圭一, 山下俊一 : 甲状腺未分化癌と p 53. *臨床医* **119** : 2418~2420, 1993.
- 9) Basolo F, Pinchera A, Fugazzola L, et al : Expression of p 21 ras protein as a prognostic factor in papillary thyroid cancer. *Eur J Cancer* **30A** : 171~174, 1994.
- 10) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al : Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319** : 525~532, 1988.
- 11) 山崎弘資, 佐藤啓介, 平田 哲, 他 : 大腸癌の分子腫瘍学的研究. *日外会誌* **95** : 242~247, 1995.
- 12) 草野公博 : ヒト胃癌における ras p 21 および smg p 21 の免疫組織化学的検討. *消化器癌の発生と進展* **2** : 441~444, 1990.
- 13) Nakajima K, Kuzumaki N, Oda A, et al : Immunohistochemical study of ras p 21 expression in human gastric cancers and benign lesions. *Oncology* **46** : 260~265, 1989.
- 14) 野地みどり : 胃癌の発生と進展および予後における ras p 21 oncoprotein の意義に関する免疫組織化学的研究. *日臨外医会誌* **54** : 600~606, 1993.
- 15) 林 雄三 : 未分化癌 一疾患概念と生物学的態度一. *病理と臨床* **6** : 765~771, 1988.
- 16) Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, et al : Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res* **48** : 4459~4463, 1988.
- 17) Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, et al : High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* **4** : 159~164, 1989.
- 18) Karga H, Lee JK, Vickery AL, et al : Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* **73** : 832~836, 1991.
- 19) 春田るみ : ヒト甲状腺癌における増殖因子, 癌遺伝子産物およびエストロゲンレセプターの発現とその生物学的意義. *広島大医誌* **39** : 319~342, 1991.
- 20) Wirght PA, Lemoine NR, Mayall ES, et al : Papillary and follicular thyroid carcinomas show a different pattern of ras oncogene mutation. *Br J Cancer* **60** : 576~577, 1989.
- 21) 山下俊一, 難波裕幸, 松尾圭一, 他 : 甲状腺腫瘍の分子生物学. *内分泌の進歩* **11** : 73~92, 1993.
- 22) Nanba H, Gutman RA, Matsuo K, et al : H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* **71** : 223~229, 1990.
- 23) Cady B and Rossi R : An expanded view of risk group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* **104** : 947~953, 1988.
- 24) Hay ID, Grant CS, Tayler WF, et al : Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobal resection in papillary thyroid carcinoma. *Surgery* **102** : 1088~1095, 1987.

(原稿受付: 平成9年7月15日
原稿採択: 平成9年9月3日
別刷請求先: 湯川尚哉
〒570-8506 守口市文園町10-15
関西医科大学耳鼻咽喉科学教室)