原著

食道扁平上皮癌におけるCyclinD₁, PCNA発現の免疫組織学的検討

日本大学第1外科

桜井 健一 秦 怜志 天野 定雄
木村 知 坂本 明子

Immunohistochemical Study About the Expression of CyclinD₁ and PCNA in Esophageal Cancer

Kenichi SAKURAI, Satoshi HATA, Sadao AMANO,
Tomo KIMURA and Akiko SAKAMOTO

First Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

術前未治療で術死を除いた食道扁平上皮癌64例において、細胞周期制御因子であるcyclinD₁蛋白、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) 蛋白の発現を免疫組織学的に検索し、予後を含めた臨床病理学的因子と比較検討した。

cyclinD₁蛋白は30例 (46.9%) に発現が見られ、PCNA蛋白は全例に発現が見られた。cyclinD₁蛋白の発現は組織学的分化度において高分化型癌に陰性例が多く、低分化型癌に陽性例が多かった。さらにリンパ節転移陽性症例に陽性例が多く、cyclinD₁蛋白陽性群はPCNA蛋白の発現率が高かった。また、cyclinD₁蛋白陽性群は陰性群に比べて術後累積生存率が不良であった。

cyclinD₁蛋白の発現は、食道扁平上皮癌における予後因子となる可能性が示唆された。

索引用語: 食道扁平上皮癌 (esophageal cancer), cyclinD₁, 増殖細胞核抗原: PCNA (proliferating cell nuclear antigen: PCNA)

はじめに

ヒト染色体11q13上には食道癌において高率に遺伝子増幅が認められているhst-1とint-2がある¹⁾。この両者の増幅群での予後が不良であることから予後規定因子として重要であると考えられてきた²⁾。しかし、両者ともにmRNAや蛋白の過剰発現がみられず³⁾、したがってその近傍にあるcyclinD₁が細胞周期の制御に関与し、食道癌の悪性度と相関するとして、最近注目されて来ている。一方、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: 以下PCNA) はDNA polymerase σ の補助蛋白であり細胞増殖の指標とされている⁴⁾。今

回われわれは、術前未治療の食道扁平上皮癌64例についてcyclinD₁蛋白とPCNA蛋白の発現を免疫組織学的に検索し、予後を含めた臨床病理学的因子と比較検討した。

対 象

1990年より1997年までに当教室において切除した術前未治療で術死を除いた食道扁平上皮癌64症例を対象とした。年齢は48歳から79歳で平均61.3歳であり、表在癌23例、進行癌41例であった。

方 法

パラフィン包埋連続切片を用いてavidin-

biotin complex (ABC) 法にて免疫組織染色を行った。脱パラフィン後Microwaveにて抗原賦活を10分間行い、 H_2O_2 加PBSにて内因性ペルオキシダーゼの不活化を施行した。10%ウサギ正常血清を用いて非特異反応のブロッキングを行った後に一次抗体として cyclinD₁ (14561C: PHARMINGEN社), PCNA (PC-10: DAKO社)を用い、4度で24時間反応させた。PBSにて洗浄後biotin化抗mouse IgGを反応させ、再度PBSにて洗浄し、peroxidase-conjugate streptavidinと反応させた。発色は H_2O_2 加diaminobezidineにておこなった。positive controlとして各実験毎にcyclinD₁, PCNA染色が強陽性に認められる組織を同時染色した。またnegative controlとして10%マウス正常血清を反応させた。染色の判定は光顕的に行い、組織腫瘍部において腫瘍細胞の20%以上が染色されるものをcyclinD₁陽性と判定した。PCNAの判定については、組織背景の非特異的反応を基準としてそれより強く核が染色されているものを陽性とし、1000個以上の細胞を計測してPCNA陽性細胞率 (PCNA-positive cell index以下PCNA-PI) をもとめた。臨床病理学的因子については、食道癌取り扱い規約第8版に従って分類を行い、計16因子について検討を行った。全ての統計学的検討はPower Macintosh 5300csおよびStat View-J4.5を用いて行った。2群間の検定にはStudent's t-testおよびgeneralized Wilcoxon検定を用い、3群以上の検定にはFisher's PLSD法を用いた。また、累積生存率の算出にはKaplan-Meier法を用いた。危険率が5%以下のものを有意差ありと判定した。

結 果

14561C抗体を用いたcyclinD₁蛋白の免疫組織染色は腫瘍細胞の核に一致して認められ (Fig. 1), 30例 (46.9%) に陽性であった。PC-10抗体を用いたPCNA蛋白の免疫組織染色は腫瘍細胞の核および一部細胞質に見られ (Fig. 2), 全症例に発現が認められた。

cyclinD₁蛋白の発現と臨床病理学的因子との比較では、組織学的分化度においてcyclinD₁蛋白の発現陰性例は高分化型癌に多く (15例中15例)

Fig. 1 Immunostaining with anti-cyclinD₁ protein monoclonal antibody.

Fig. 2 Immunostaining with anti-PCNA protein monoclonal antibody.

($P < 0.05$), 低分化型癌に少なかった (17例中3例) ($p < 0.05$) (Fig. 3)。また、リンパ節転移陰性群にはcyclinD₁蛋白発現陰性例が多く (42例中25例) ($p < 0.05$), 逆にリンパ節転移陰性群にはcyclinD₁蛋白発現陰性例が多かった (22例中17例) ($p < 0.05$) (Fig. 4)。cyclinD₁蛋白発現とPCNA-PIとの関係は、cyclinD₁蛋白発現陰性群よりもcyclinD₁蛋白陽性群の方がPCNA-PIが高かった ($p < 0.05$) (Fig. 5)。累積生存率とcyclinD₁蛋白発現との関係ではcyclinD₁陽性群に比べて陰性群の方が有意に累積生存率が高かった ($p < 0.05$) (Fig. 6)。

考 察

食道癌における遠隔成績は、種々の手術法の進歩などにより向上してきたが、いまだに満足できるものではない。よって早急にその病態を解明し、治療に活かすことが重要である。最近の分子生物

Fig. 3 Relations between cyclinD₁ expression and histologic classification.

Fig. 4 Relations between cyclinD₁ expression and lymph node metastasis.

学の進歩により、従来より用いてきた臨床病理学的因子とは異なる種々の遺伝子マーカーが報告されてきている^{5),6),7),8)}。本研究では細胞周期制御因子として知られるcyclinD₁蛋白と細胞増殖の指標とされるPCNA蛋白の発現を免疫組織染色から検索し、その意義を明らかにするために従来の臨床病理学的因子および予後と比較検討した。

cyclinD₁蛋白は295のアミノ酸よりなるG₁ cyclinの一つで、G₁期の核内に出現し⁹⁾、cyclin dependent kinase (以下cdk) 2, 4, 5と複合体を形成して¹⁰⁾Rb遺伝子の不活化を通してS期への

進行を促進する働きを持つ¹¹⁾。またこの複合体は、癌抑制遺伝子であるp21¹²⁾、p16¹³⁾により働きがブロックされて細胞周期におけるG₁ arrestを起こして、細胞分裂が抑制されることが知られている¹⁴⁾。

今回のわれわれが行った検討では、cyclinD₁蛋白発現は組織学的分化度と関連し、低分化型癌に陽性例が多く、高分化型癌に陰性例が多かった。このことは、低分化型癌では細胞周期回転が速く、高分化型癌では遅いことを示唆していると考えられた。また、従来の食道癌の臨床病理学的因子の

Fig. 5 Relations between cyclinD₁ expression and PCNA-PI

中で悪性度の最も良い指標とされる¹⁵⁾リンパ節転移について見てみると、リンパ節転移陽性症例においてcyclinD₁蛋白陽性例が多く、術後の累積生存率についてもcyclinD₁蛋白陰性群が陽性群よりも累積生存率が高かったことよりcyclinD₁蛋白の発現は食道扁平上皮癌における予後不良因子である可能性が示唆された。

PCNAはDNA polymerase σ を補助する非ヒストン蛋白であり¹⁶⁾、細胞周期におけるG₁後期からS期にかけて細胞の核内に出現し、DNA polymerase σ と結合してDNA鎖伸長に関与し¹⁷⁾、細胞増殖能を反映すると考えられている¹⁸⁾。今回われわれが行った検討ではcyclinD₁蛋白陽性群が陰性群よりも有意にPCNA-PIが高く、cyclinD₁蛋白陽性群は細胞増殖が盛んであること

が示唆された。

以上より食道扁平上皮癌においてcyclinD₁蛋白陽性症例は、細胞増殖能が強く、リンパ節転移をおこしやすく予後不良であると考えられた。よってこれらの発現を術前に同定することにより、リンパ節郭清程度を含めた、手術術式の決定や化学療法および放射線療法の補助療法の選択などに活かし、癌の個性に応じたQOLを考慮した治療を行うことが必要と思われた。

結 語

1. 術死を除いた術前未治療の食道扁平上皮癌64症例におけるcyclinD₁蛋白、PCNA蛋白の発現を免疫組織染色から検討した。

2. cyclinD₁蛋白の発現は30例(46.9%)にみられ、PCNA蛋白の発現は全症例に見られた。

3. cyclinD₁蛋白発現の有無は組織学的分化度、リンパ節転移、累積生存率と関連がみられた。

4. cyclinD₁蛋白陽性群は陰性群に比べてPCNA-PIが高く、陽性群では細胞増殖力が高い可能性が示唆された。

5. 食道扁平上皮癌においてcyclinD₁蛋白の発現は悪性度の指標となる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G et al: High incidence of coamplification of the hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas.

Fig. 6 Survival rate for cyclinD₁

- Cancer Res49 : 5505-5508, 1989
- 2) Kitagawa Y, Ueda M, Ando N et al : Significance of int-2/hst-1 coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. Cancer 51 : 1504-1508, 1991
 - 3) 服部隆則, 内藤弘之, 梅田朋子 : 食道癌の遺伝子異常とcyclinD₁. 消内視鏡82 : 21-26, 1996
 - 4) 白野純子, 中村 毅, 中江史朗, 他 : 大腸癌におけるPCNA標識率とその臨床的評価. 日外会誌96 : 787-791, 1995
 - 5) 川口 晃, 柴田純祐, 小玉正智, 他 : 上皮成長因子の発現からみた食道癌の進展と予後. 日消外会誌23 : 1977-1983, 1990
 - 6) 石崎寛治, 和形隆志, 柴垣一夫 : 食道癌におけるp53遺伝子の変異. 実験医10 : 2172-2178, 1992
 - 7) 西平哲郎, 赤石 隆, 標葉隆三郎, 他 : ヒト食道癌における“悪性度”を示す指標の探求. Oncologia 15 : 148-156, 1985
 - 8) 斉藤貴生 : 食道癌の遺伝子異常. 医のあゆみ176 : 931-935, 1996
 - 9) Matsushima H, Roussel MF, Ashmun RA et al : Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. Cell 65 : 701-713, 1991
 - 10) Xiong Y, Zhang H, Beach D : D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. Cell 71 : 505-514, 1992
 - 11) 前田 清, 康 純明, 小川正文, 他 : cyclinD₁の発現からみた大腸癌の悪性度. 癌と化療24 : 259-262, 1997
 - 12) Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K et al : Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. Mol Biol Cell 6 : 387-400, 1995
 - 13) Serrano M, Hannon GJ, Beach D : A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 366 : 704-707, 1993
 - 14) 井上勝一 : cyclinと細胞周期. 癌と化療24 : 909-918, 1997
 - 15) 嶋田 裕, 渡辺 剛, 加納正人, 他 : 食道癌の遺伝子診断. 外科59 : 929-936, 1997
 - 16) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR et al : Identify of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature 309 : 374-376, 1984
 - 17) 丸森健司, 河村正敏, 高村光一, 他 : 大腸癌におけるProliferating cell nuclear antigenおよびangryophilic nucleolar organizer regions染色法を用いた細胞増殖能の検討. 日消外会誌28 : 813-818, 1995
 - 18) Bravo R, Frank R, Blundell PA et al : Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. Nature 326 : 515-517, 1987