抗 PCNA 抗体ならびに抗 Ki67抗体による腫瘍増殖の評価に関する検討

——ヌードマウス移植ヒト扁平上皮癌を用いて——

吉濱泰斗・新谷 悟・船山高明

竹林俊明・大山和彦・衛藤洋平

上山吉哉・松村智弘

An experimental study of tumor growth of squamous cell carcinoma
as assessed with the use of anti-PCNA antibody and anti-Ki67 antibody

——Studies of squamous cell carcinomas transplanted to nude mice——

Yasuto YOSHIHAMA・Satoru SHINTANI・Takaaki FUNAYAMA

Yoshiya UHEYAMA・Toshiaki TAKEBAYASHI・Kazuhiko OHYAMA

Yohei ETOH・Tomohiro MATSUMURA

Abstract: Evaluation of tumor growth is essential when assessing the malignancy of cancer. It is difficult to evaluate tumor growth in oral cancer by measuring tumor size on the basis of imaging studies, such as computed tomography and magnetic resonance imaging because oral cancer often invades complex structures consisting of bone, muscle, and salivary glands.

Some authors reported that it is useful to evaluate tumor proliferation by immunohistochemical methods using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki67. In this study, we surgically transplanted oral squamous cell carcinomas resected from patients and the established cell lines in nude mice. When the transplanted tumor grew, we evaluated the correlation between tumor growth by measuring tumor size and cell growth activity, evaluated by cell proliferation markers (PCNA, Ki67) using immunohistochemical methods.

We obtained good signals on PCNA and Ki67 immunostaining. It was easy to calculate the labeling indices with an image analyzer.

Both PCNA labeling index and Ki67 labeling index correlated with transplanted tumor growth, evaluated by measuring tumor size, in the nude mice. Ki67 labeling index reflected tumor growth better than PCNA labeling index.

Key words: tumor growth (腫瘍増殖), PCNA, Ki67, nude mouse transplanted tumor (ヌードマウス可移植腫瘍)

緒 言

腫瘍増殖の評価は、癌の悪性度を知る上で重要な因子の一つである。種々の腫瘍において腫瘍倍加時間 (Doubling time: DT) あるいは増殖率 (Growth rate) が予後因子として有用であるとの報告がなされている¹⁻³⁾。肺癌など一部の癌においては胸部X線写真あるいはCTなどの画像上

で、腫瘍の大きさを計測することで容易に増殖能が判定され得る^{3, 4)}。しかし、口腔癌ではCT, MRIなどの画像上による腫瘍の大きさの計測が顎骨、筋、唾液腺などの解剖学的な構造により困難な場合があり、腫瘍増殖能の腫瘍径計測による直接的評価が十分に行い得ないのが現状である。

一方、腫瘍増殖能を細胞増殖活性など細胞レベルで検索しようとする試みがなされてきており、増殖関連抗原に対する免疫組織化学的検討の報告も多くみる⁵⁻⁷⁾。中でもProliferating cell nuclear antigen (PCNA) ならびにKi67については、免疫組織化学的検索で、染色性が安定し、陽性率の評価がしやすく、また、細胞周期での発現時期についても詳細な検討があることから、腫瘍増殖活性の指標とし

岡山大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任: 松村智弘教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery II,
Okayama University Dental School (Chief: Prof.
Tomohiro Matsumura)

受付日: 平成11年8月20日

写真1 NIHimage1.56による画像解析

- A, 画像の取り込み C, 核シルエットの描出
B, 強調処理 D, 陽性細胞の算定

写真2 抗PCNA抗体による免疫染色(×200)

写真3 抗Ki67抗体による免疫染色(×200)

表1 各症例における腫瘍倍加時間(DT)と標識率

	DT (day)	PCNA LI. (%)	Ki67 LI. (%)
症例1	4.5±0.3	30.1±3.9	40.9±4.6
症例2	24.7±1.5	19.7±3.6	26.4±4.1
症例3	10.3±0.5	20.6±1.7	21.3±1.4
症例4	26.7±2.6	12.7±1.3	15.6±3.3
症例5	3.0±0.5	26.4±4.0	46.2±5.0
症例6	2.5±0.4	41.6±0.9	54.5±1.2
A431	4.4±0.4	30.4±4.1	43.4±5.1
SAS1	4.5±0.6	46.1±1.8	49.8±6.3
Ca9	25.3±2.3	22.7±4.2	25.2±6.2

て用いられている^{5~7)}。

そこで今回われわれは、これらPCNAならびにKi67の免疫組織化学的指標が実際の腫瘍増殖能を的確に評価するか否かについて、ヌードマウス移植腫瘍を用いて検討したので報告する。

材料ならびに方法

1) 実験動物

ヌードマウス: BALB/c-nu/nuの雄(日本チャールズリバー)4週令を用いた。

2) 移植材料

培養細胞株として外陰部由来ヒト扁平上皮癌細胞株A431

図1 DT と PCNA 陽性率との関係

図2 DT と Ki67陽性率との関係

図3 PCNA 陽性率と Ki67陽性率との関係

(岡山大学口腔生化学教室より供与) および舌由来ヒト扁平上皮癌細胞株 SAS1, 歯肉由来ヒト扁平上皮癌細胞株 CA9 (いずれも JCRB Cell Bank より供与) の3種類を, また, 臨床材料としては6例の口腔扁平上皮癌患者(舌癌3例, 歯肉癌2例, 口底癌1例)より原発巣切除手術時に採取した腫瘍組織を用いた。

3) 移植方法

細胞株は100 IU/mg ペニシリン G, 100mg/ml ストレプトマイシンならびに10%FBS 含有ダルベッコ変法 MEM イーグル培地とハム F12培地の当量混合培地で37℃, 5% CO₂ 存在下で培養し, 10⁷個/0.2ml を18Gの注射針にて鼠径部皮下に注射移植した。

臨床材料は腫瘍摘出後, 3mm³の角片とし, 100 IU/mg ペニシリン G, 100mg/ml ストレプトマイシン含有ダルベッコ変法 MEM イーグル培地とハム F12培地の当量混合培地で洗浄後, 鼠径部および背部に剪刀にて皮切, 剥離を加え, 皮下に移植した。

移植腫瘍は3種の細胞株をおのおの2匹4部位に, また, 6例の臨床材料はおのおの3匹6部位に移植し, 腫瘍体積が500mm³以上になった時点で腫瘍を摘出した。なお, 細胞株移植腫瘍は全部位で安定した増殖を示したが, 臨床材料移植腫瘍では3部位のみが安定した増殖を示した例もあったため, 細胞株, 臨床材料ともに, 移植ならびに腫瘍増

殖の安定した3部位の腫瘍(細胞株3種, 各3部位, 合計9腫瘍, 臨床材料6例, 各3部位, 合計18腫瘍)を選択し検討に供した。

4) 腫瘍増殖の検討

ヌードマウス移植後, 経時的に腫瘍の長径および短径を計測し, Schwartz⁸⁾の方法に準じて体積を算定し, DT を検討した。計算式はCollinら⁹⁾の仮説に基づく $TD = t \log 2 / \log Vt_2 - \log Vt_1$ とし算定した。

5) 免疫組織化学的検討

ヌードマウス移植腫瘍は摘出後, ただちに10%中性緩衝ホルマリン溶液にて室温で24時間固定し, 通法に従い4μmのパラフィン薄切切片を作製し, ENVISION システム (Dako) により免疫組織化学染色を行った。すなわち, 通常通り脱パラフィン後, 内因性ペルオキシダーゼ阻止を行い, 一次抗体として抗PCNA抗体 (Novocastra Lab. Newcastle, UK.) ならびに抗Ki67抗体 (Immunotech, Marseille, France) を200倍希釈にて, 4℃で16時間反応させた。次にEnvision ポリマー試薬を室温で30分間反応後, DAB (3-3'-diaminobenzadine · 4HCl) にて発色させ, メチルグリーンにて対比染色後, 脱水, 透徹, 封入し検鏡した。なお, Ki67の染色に際しては, 前処理として Target Retrieval Solution (Dako) 中でマイクロウェーブ処理 (マイクロウェーブオープン: シャープ社製出力500W) を100℃20分間の条件

で行った。

6) 陽性細胞率の算定ならびに統計学的検討

陽性細胞率の算定は、画像解析用ソフト NIH image 1.56を用いた。すなわち、各腫瘍とも無作為に選んだ3視野以上の部分において画像を取り込み、茶褐色の陽性細胞が強調されるように処理した後、ノイズの除去、核のシルエット描出を行い、有核細胞1000個以上に対する陽性細胞数の割合として算定を行った(写真1)。統計学的検討では回帰分析により、相関係数を算出し、PCNA 陽性率、Ki67 陽性率ならびに DT の相関を分析した。

結 果

1) 移植腫瘍の DT

各移植腫瘍の DT は培養細胞株で4.4~25.3日、また、臨床材料移植腫瘍は2.5~26.7日であった。

2) 免疫組織化学的所見

各移植組織において PCNA と Ki67 の陽性細胞は、癌細胞巢に散在性に認められた。PCNA と Ki67 の局在については、癌細胞巢の周囲に認められるなど、ほぼ同様の局在を示したが、Ki67 でやや陽性細胞が多く認められた(写真2, 3)。

3) PCNA 陽性率ならびに Ki67陽性率と DT

移植した27腫瘍(細胞株3種、各3部位、合計9腫瘍、臨床材料6例、各3部位、合計18腫瘍)における陽性率は、PCNA で12.7~46.1% (平均±SD: 27.8±10.6%)、Ki67 で15.6~54.5% (平均±SD: 35.9±13.9%) であった(表1)。

PCNA 陽性率ならびに Ki67陽性率と DT を回帰分析にて検定したところ、PCNA では相関係数0.763であり、また、Ki67では相関係数0.931で相関を認め、Ki67陽性率でより良好な相関関係を示した(図1, 2)。

4) PCNA と Ki67の陽性率の関係

PCNA 陽性率と Ki67陽性率の回帰係数は1.48であり、良好な相関関係 ($R^2=0.956$) を示した(図3)。

考 察

PCNA は細胞周期依存性非ヒストン核内蛋白質で細胞周期の G1 後期から S 期にかけて核内に存在するものであり、DNA 合成に重要な役割を果たす DNA polymerase δ の補助蛋白である¹⁰⁾。また、Ki67は増殖細胞中に存在する抗原で連続的にサイクリングしている G1, S, G2 および M 期細胞の核に発現する蛋白である¹¹⁾。

これまで細胞動態から腫瘍の増殖能を評価する試みは、³H-thymidine 標識法、フローサイトメトリーによる S 期細胞の解析、BrdU 標識法、DNA polymerase α 、PCNA、

Ki67など各種増殖関連抗原の検索などが用いられてきた^{5~7, 12~14)}。しかし、³H-thymidine 標識法や BrdU 標識法は新鮮組織細胞にこれらを取り込ませる必要があり、また、DNA polymerase α は凍結切片を用いなければならないなど日常の検査法として簡便さに欠ける点があった。

その中で PCNA、Ki67はパラフィン包埋標本を使用した免疫組織化学的検索が可能で他の方法にくらべ細胞の増殖能を評価するには簡便で有用な増殖マーカーと考えられている^{15, 16)}。このため各分野で PCNA、Ki67はその抗体を用いた免疫組織化学的手法による腫瘍の細胞動態の研究がなされ、腫瘍の大きさや、リンパ節転移、再発、予後などの臨床所見との関連や核分裂像、細胞異型性、腫瘍浸潤など組織学的悪性度との関連が報告されている¹⁷⁾。一方、これら腫瘍増殖マーカーが適切な評価となり得ていないとの報告もある^{18, 19)}。その原因として同じ部位や組織型でも研究者によって PCNA、Ki67の免疫組織化学的検索における陽性率の差が生じるということが挙げられる。すなわち、PCNA 陽性率に関して、扁平上皮癌の報告で臓器の種類によって5.1%~95.4%^{20~22)} とかなりの差があり、また、Ki67 陽性率でも6.1%~77.7%^{6, 21~23)} と差が認められる。これらの差が生じる理由として、免疫組織化学的検索における陽性細胞の判定に際しての問題が指摘されている。

たとえば PCNA ではその染色性に濃淡の差が認められ、評価基準によっては陽性率に2倍もの差が生じたという報告もある²²⁾。また、10%ホルマリンに48時間以上浸漬したものや1年以上固定されたものでは PCNA の染色性が悪くなるなど^{21, 24)}、固定条件も陽性率判定の際の問題となるとの報告もある。

今回、われわれは腫瘍の悪性度の重要な指標の一つである腫瘍増殖能について、免疫組織化学的に PCNA ならびに Ki67陽性率を指標とした評価が実際の腫瘍増殖能と関連するか否かについて検討し、その有用性について評価した。

本研究では、(1) 口腔扁平上皮癌および扁平上皮由来の培養細胞をヌードマウスに移植し、生体内に近い条件で腫瘍の大きさの変化を経時的に測定して、その DT を評価し、(2) 移植腫瘍摘出後の腫瘍のホルマリン固定ならびに免疫染色を同一条件下で行い、(3) 抗 PCNA 抗体と抗 Ki67 抗体による免疫組織化学的検索に画像解析を用い、免疫組織化学的検索に影響を及ぼす条件、すなわち、固定条件や染色方法、陽性細胞率の画像解析による評価など、より客観的に統一し行った。なお、細胞株と臨床材料で移植方法が異なるが DT の評価は腫瘍の増殖が安定した時期に行ったため異なる移植法で得られた結果を比較検討に供しても影響はないと思われる。

その結果、PCNA ならびに Ki67陽性率による腫瘍増殖能の評価は安定し、実際の腫瘍増殖と相関し、本評価方法

が画一化された条件で用いられた場合, 的確で有用であると考えられた。

また, PCNA 陽性率と Ki67 陽性率の比較では, Ki67 陽性率の方がより DT と相関を示したという結果から, PCNA 陽性率に比較して Ki67 陽性率が腫瘍の増殖能をより反映するものと思われた。

結 語

口腔扁平上皮癌の手術摘出材料および扁平上皮由来の培養細胞をヌードマウスに移植し, その DT と PCNA, Ki67 を指標とした細胞増殖の評価について検討したところ, 有意な相関関係を認めた。

このことから, PCNA, Ki67 は腫瘍の細胞増殖活性を知る上で有用なマーカーとなりうることを再確認した。

引 用 文 献

- Mizuno, T., Masaoka, A., et al.: Comparison of actual survivorship after treatment with survivorship predicted by actual tumor volume doubling time from tumor diameter at first observation. *Cancer* 53: 2716-2 1984.
- Charbit, A., Malaise, E.P., et al.: Relation between the pathological nature and the growth rate of human tumors. *Eur J Cancer* 7: 307-315 1971.
- Usuda, K., Saito, Y., et al.: Tumor doubling time and prognostic assessment of patients with primary lung cancer. *Cancer* 74: 2239-2244 1994.
- Arai, T., Shiobara, J., et al.: Discussion of the problems of early detection of peripheral lung cancer from the stand point of the growth rate and the size of the tumor at detection. *J Jpn Lung Cancer Soc* 16: 7-10 1976.
- 岩井正行, 桃 立, 他: 舌扁平上皮癌の増殖細胞核抗原 (PCNA) による免疫組織化学的検討. *日口外誌* 40: 1-5 1994.
- 小宮山和: 舌癌の増殖能に関する免疫組織化学的研究—Ki-67 抗原発現と組織学的悪性度との関連について. *日口外誌* 41: 179-190 1995.
- 佐藤 明, 斉藤 徹, 他: 抗 PCNA 抗体を用いた舌扁平上皮癌の免疫組織学的検討. *日口外誌* 39: 1269-1275 1993.
- Schwartz, M.A.: biomathematical approach to clinical tumor growth. *Cancer* 14: 1272-1294 1961.
- Collins, V.P., Loeffler, R.K., et al.: Observation on growth rates of human tumors. *Am J Pathol* 76: 988-1000 1956.
- Bravo, R., Frank, R., et al.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326: 515-517 1987.
- Gerdès, J., Lemke, H., et al.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Immunol* 133: 1710-1715 1984.
- Strauch, J. and Coplin, M.D.: Thymidine labeling index, flow cytometric S-phase measurement, and DNA index in human tumors. Comparisons and correlations. *Am J Clin Pathol* 86: 586-595 1988.
- Simosato, Y., Asamura, H., et al.: Factors possibly affecting the degree of malignancy in adenocarcinoma of the lung. *Chest* 96: 37S-38S 1989.
- 堀 貞明, 小野田 登, 他: 増殖細胞のマーカーとしての DNA ポリメラーゼ α 免疫反応性—新凍結切片を用いた染色条件の検討とその腫瘍組織への応用—. *病理と臨床* 6: 953-961 1988.
- Hall, P.A., and Woods, A.L.: Immunohistochemical markers of cellular proliferation: Achievements, problem and prospect. *Cell Tissue Kinet* 23: 505-522 1991.
- Cattoretti, G., Becker, M.H.G., et al.: Monoclonal antibodies against recombinant parts of Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168: 357-363 1992.
- Lorz, M., Meyer-Breiting, E., et al.: Proliferating cell nuclear antigen counts as markers of cell proliferation in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 251: 91-94 1994.
- Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G., et al.: Sclerosing epithelioid fibrosarcoma. A variant of fibrosarcoma stimulating carcinoma. *Am J Surg Pathol* 19: 979-993 1995.
- Leonardi, E., Girlando, S., et al.: PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 45: 416-419 1992.
- 小野貞英, 佐々木功典, 他: PCNA (Proliferation cell nuclear antigen) を用いた肺癌細胞の増殖能の評価 (抄). *日本癌学会総会記事* 184 1991.
- 田中一成, 岩本 敦, 他: 抗 PCNA 抗体を用いた重層扁平上皮の腫瘍病変における増殖細胞核の組織学的検討—ホルマリン固定パラフィン切片の応用—. *癌の臨床* 37: 1487-1491 1991.
- 辻 龍雄, 佐々木功典, 他: 増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織染色における問題点. *日口外誌* 38: 21-24 1992.
- Sader, M.H., Doyle, E., et al.: Proliferation index—a comparison between cutaneous basal and squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 49: 549-551 1996.
- 松野吉宏, 向井 清: 増殖細胞核抗原. (PCNA). *病理と臨床* 9: 879-883 1991.