

## 腎細胞癌における PCNA 標識率による 増殖能と IL-6 分泌の検討

金沢医科大学泌尿器科学教室 (主任: 鈴木孝治教授)

池田 龍介, 森山 学, 中出 忠宏

津川 龍三, 鈴木 孝治

### THE RELATIONSHIP BETWEEN THE PRODUCTION OF INTERLEUKIN-6 AND THE PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA) EXPRESSION IN RENAL CELL CARCINOMA

Ryosuke IKEDA, Manabu MORIYAMA, Tadahiro NAKADE,

Ryuzo TSUGAWA and Koji SUZUKI

From the Department of Urology, Kanazawa Medical University

The relationship between the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in renal cell carcinoma (RCC) determined by immunohistochemical staining using the PC10 clone, and the preoperative serum interleukin-6 (IL-6) value determined by ELISA was examined. The secretion of IL-6 in RCC was also examined immunohistochemically using an anti-IL-6 antibody.

The PCNA labeling rate was significantly higher in grade 3 tumors than in grade 1 tumors ( $p < 0.05$ ), but there were no significant differences between the other grades or TNM stages. No significant correlation was obtained between the serum level of IL-6 or the positive cell rate of IL-6 and the pathological grade of the RCC. A correlation was observed between the PCNA labeling rate and positive cell rate, and between the serum IL-6 value and CRP or ESR.

In conclusion, the secretion of IL-6 was detected in RCC tissue, and was suggested to be a tumor factor responsible for the growth and spread of RCC. The serum IL-6 value is considered to reflect the total secretion of IL-6 produced by the RCC and accessory cells, i.e., monocyte-macrophage lineage cells, endothelial cells and fibroblasts.

(Acta Urol. Jpn. 44 : 233-238, 1998)

**Key words:** Interleukin-6, Renal cell carcinoma, PCNA

### 緒 言

Interleukin-6 (IL-6) は生体内でおもに単球, B細胞, T細胞, macrophage により産生される。これらの各種細胞は生体防御の最前線を担うものであり, IL-6 の産生分泌は非特異的生体防御反応の結果と考えられている<sup>1)</sup> また, IL-6 は, B細胞に対して免疫グロブリン産生誘導<sup>2)</sup>, T細胞に対してキラーT細胞の誘導や肝細胞からの急性期蛋白産生誘導など様々な機能を有するとされる<sup>1)</sup> 一方では, Castlman's 病におけるBリンパ球や多発性骨髄腫や形質細胞腫の腫瘍自身が IL-6 を過剰産生し, IL-6 が腫瘍の増殖因子として作用することも判明している<sup>3,4)</sup> こうした IL-6 の機能や特定の疾患における病因としての作用から, 腎細胞癌においてみられる paraneoplastic syndrome との関係が予測され, Miki ら<sup>5)</sup> は, IL-6 は腎細胞癌での autocrine growth factor であり, 腎細胞癌における増殖や transformation に影響すると報告している。

今回, われわれは腎細胞癌の摘除標本を用いて抗 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 抗体を用いた腎細胞癌の増殖能と術前の患者血清中 IL-6 値および抗 IL-6 抗体を用いての腎細胞癌組織における IL-6 分泌との関連について検討を行った。

### 対象および方法

#### 1) 対象および組織

1981年1月から1995年12月までに当科および関連病院において腎細胞癌と診断し外科的摘除され, 病理組織学検索により腎細胞癌と診断された29症例を対象とした。

対象症例の性別は男子19例, 女子10例, 各々の年齢分布は男子36歳~79歳 (平均年齢62.1歳) 女子35歳~77歳 (平均年齢62.6歳) である。これら対象症例の観察期間は2カ月~164カ月 (平均観察期間46.4カ月) である。対象症例の stage (TNM 分類による) は, pT1 1症例, pT2 17症例, pT3 9症例, pT4 2症例であり pT1+pT2 を low stage 群, pT3+pT4 を

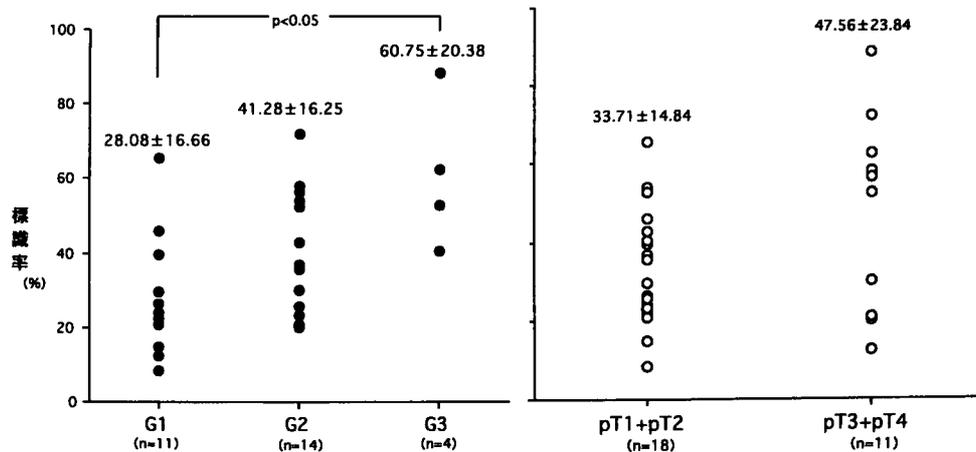


Fig. 1. Relationship between grade (left side), stage (right side) and PCNA index.

high stage 群の2群に分類した。grade (腎癌取り扱い規約<sup>6)</sup>により、種々の grade の混在する症例は最も high grade の病理診断を用いた) は、grade 1 11 症例、grade 2 14 症例、grade 3 4 症例である。各摘除標本は約24時間、10%ホルマリン液にて固定後にパラフィン包埋ブロックとして保存され、この包埋ブロックより厚さ  $5\mu\text{m}$  の切片を作製し、Hematoxylin-eosin 染色により壊死組織を含まない腎細胞癌組織の部位を選択し、1 症例の5ないし6標本を以下の検討に使用した。

#### 2) 抗 PCNA 抗体による免疫組織化学染色

パラフィン包埋ブロックより厚さ  $5\mu\text{m}$  の切片を作製し、脱パラフィン後マイクロウェーブ処理し抗原を賦活化、0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  により内因性ペルオキシダーゼ処理、一次抗体として150倍に希釈した抗 PCNA 抗体 (PC10, Novocastra Labs.) と  $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。二次抗体としてビオチン化抗マウス IgG にて処理後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンに反応させ、diamino benzidine (DAB)- $\text{H}_2\text{O}_2$  にて発色させた。核染色は hematoxylin 染色にて行った。陰性コントロールは一次抗体として PBS を用い、その他の手技は抗 PCNA 抗体による免疫組織化学染色と同様にて行った。PCNA 発現率は、image cytometry (CAS 200) を用いて、同一標本の陰性コントロールで subtraction を行ない1 標本あたり10ないし15視野内の500個から800個の細胞について sorting を行い、標識核面積/全核面積  $\times 100$  (% positive area) として算出し、各々の症例における検討標本数で平均した。

#### 3) 抗 IL-6 抗体による免疫組織化学染色

抗 PCNA 抗体による免疫組織化学染色に用いたと同じ部分のパラフィン包埋組織切片を用い、一次抗体として50倍に希釈した抗 IL-6 抗体 (Genzyme, Boston) を、陰性コントロールは一次抗体として PBS を用いて、抗 PCNA 抗体による免疫組織化学染

色と同様にて行った。染色後、顕微鏡下に標本全範囲を観察し、IL-6 染色陽性細胞が2個以上集合する部位を1コロニーとして、標本全範囲に占めるコロニー数を IL-6 分泌指数とし、各々の症例における検討標本数により平均値を求めた。

#### 4) 末梢血中の IL-6 値の測定

対象患者の術前末梢血を検体として Amersham 社の IL-6 ELISA SYSTEM を用いて測定を行った。正常コントロールとして当科における生体腎移植の donor の測定結果および亀本<sup>7)</sup>の報告より  $3.2\text{ pg/ml}$  以下を測定限界とした。

さらに、急性相反応性物質 (acute phase reactants) である CRP (ラテックス免疫比濁法)、ESR (Westergren 法) も同時に測定した。

#### 5) 統計学的処理

統計解析は Stat View 4.0<sup>®</sup> を使用し、2 群間の比較には Mann-Whitney 法、3 群間の比較には Scheffé 法を用いた。各項目間の相関分析は Spearman の順位相関を用いた。検定結果は  $p < 0.05$  を有意水準とした。本文中と表中の数値は特に断りのないかぎり平均値  $\pm$  標準偏差とした。

## 結 果

### 1) PCNA 標識率と各 grade および stage との関係

PCNA 標識率は最低値8.23%から最高値88.16%、平均  $38.96 \pm 19.58\%$  であった。PCNA 標識率は、grade 上昇に伴い高値となる傾向がみられ grade 1 における PCNA 標識率に対して grade 3 の PCNA 標識率は有意 ( $p < 0.05$ ) に高値の結果が認められた (Fig. 1)。2つの stage 群間においては、high stage 群ほど PCNA 標識率は高値となる傾向がみられたが2群間に有意な差は認められなかった。

2) IL-6 の分泌陽性細胞のコロニー数 (以下, 陽性コロニー数) と各 grade および stage との関係  
 抗 IL-6 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果を Fig. 2 に示した. Fig. 2 は63歳の女性例であり,

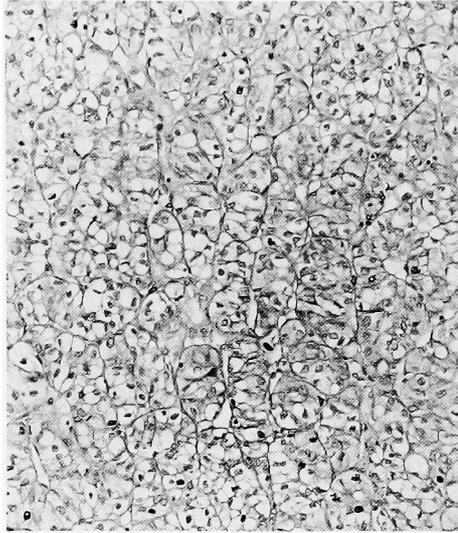


Fig. 2. Immunohistochemical staining of anti-IL-6 monoclonal antibody (63-year-old female, pT2pN0M0, grade 1 plasma IL-6 concentration: 17.4 pg/ml).

pT2N0M0, grade 1 の病理診断であった (Fig. 2). 陽性コロニー数は最小値 3 個/標本から最大値49個/標本, 平均17.7個/標本の結果を認めた. 各 grade 間における陽性コロニー数において一定の傾向は認められず (Fig. 3), また, 2つの stage 群間においては high stage 群ほどコロニー数が増加する傾向がみられた. しかし, 各 grade および stage 群間における陽性コロニー数には有意な差は認められなかった.

3) 血清 IL-6 値と各 grade および stage との関係  
 血清 IL-6 値の測定結果は最低値 3.2 pg/ml から最高値 126.0 pg/ml, 平均  $14.88 \pm 24.41$  pg/ml であった. 血清 IL-6 値と grade および stage の関係において, grade においては一定の傾向は認められなかったが, high stage 群において高値を示す症例がみられた (Fig. 4). しかし, 各 grade および stage 群間における血清 IL-6 値において有意な差は認められなかった.

4) 各測定項目の相関  
 (Spearman の順位相関分析による)

PCNA 標識率, 血清 IL-6 値および陽性コロニー数と CRP および ESR との相関係数による検討からは, PCNA 標識率と陽性コロニー数, 血清 IL-6 値と CRP および ESR の間に有意な相関が認められた

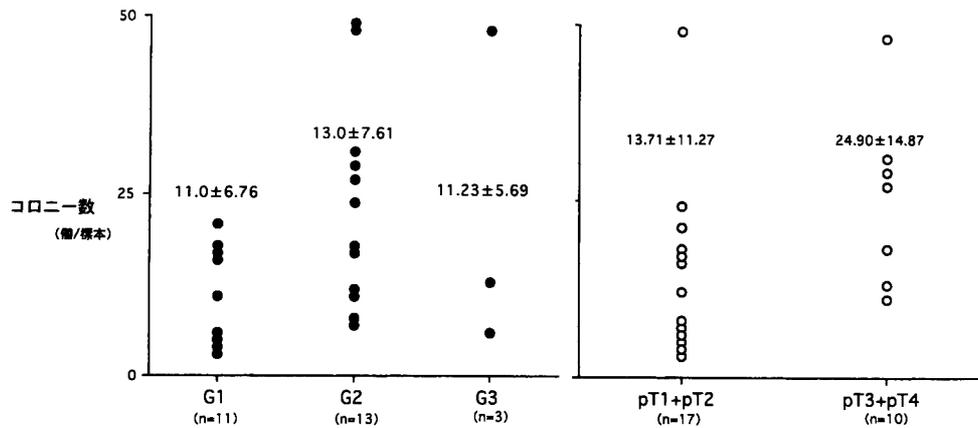


Fig. 3. Relationship between grade (left side), stage (right side) and IL-6 positive cells.

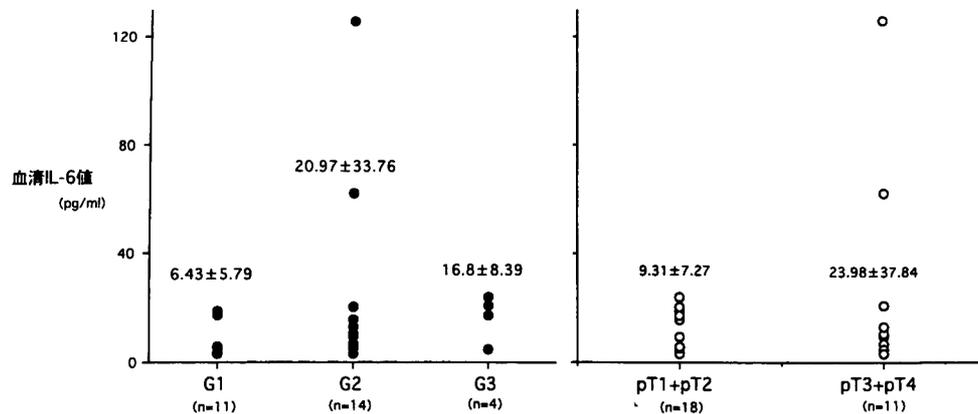


Fig. 4. Relationship between grade (left side), stage (right side) and plasma IL-6 concentration.

Table 1. Correlation rate of each factors in this study

	PCNA 標識率		血清 IL-6 値		Colony 数		ESR
血清 IL-6 値	0.304 (n=29) (p=0.061)	Colony 数	0.148 (n=27) (p=0.4901)	ESR	0.190 (n=27) (p=0.1175)	CRP	0.812 (n=29) (p<0.0001)
Colony 数	0.416 (n=27) (p=0.034)	ESR	0.558 (n=29) (p=0.0034)	CRP	0.242 (n=27) (p=0.1308)		
ESR	0.446 (n=29) (p=0.0183)	CRP	0.590 (n=29) (p=0.0031)				
CRP	0.495 (n=29) (p=0.0142)						

(Table 1).

## 考 察

Interleukin-6 (IL-6) は、B細胞に対して免疫グロブリン産生誘導<sup>2)</sup>、T細胞に対してキラーT細胞の誘導、さらには肝細胞からの急性期蛋白産生誘導など様々な機能を有するサイトカインとされる<sup>1)</sup> IL-6と腎細胞癌の関係について、Mikiら<sup>5)</sup>は、腎細胞癌の培養により培養液中にIL-6の産生がみられ、抗IL-6抗体の培養液中への添加により癌細胞の増殖が抑制されたことなどから腎細胞癌がIL-6を産生し、IL-6が腎細胞癌自身のautocrine増殖因子として作用していると報告した。また、腎細胞癌においては、以前より赤沈亢進、発熱、CRP陽性などのparaneoplastic syndromeを併発する症例がみられ、rapid typeとして予後不良とされている<sup>8)</sup>が、IL-6の機能に肝細胞からの急性期蛋白産生誘導が存在することから、腎細胞癌自身がIL-6の分泌を行い、その結果としてparaneoplastic syndromeの発現が考えられる<sup>9)</sup> さらに、Takenawaら<sup>10)</sup>は腎細胞癌原発巣43例中22例(51.2%)にIL-6 geneの発現を認め、IL-6 receptorの発現も43例中11例(25.6%)に認められたことより、腎細胞癌がIL-6を自己分泌し自身の増殖やtransformationに関与していると述べている。以上のようにIL-6は従来から判明している働き以上に腎細胞癌の増殖などに関して重要な役割を果たすとされる。

しかし、浜尾ら<sup>11)</sup>はIL-6 geneの発現は15例中2例(13.3%)と低率でIL-6 receptorの強い発現は認められなかったと報告し、Kooら<sup>12)</sup>も腎細胞癌株の検討から細胞株すべてに対してIL-6がgrowth factorとしての作用は示さず、IL-6による腎細胞癌の増殖促進はあまり顕著ではなかったと報告しており、腎細胞癌の全例においてIL-6 geneやIL-6 receptorが発現しているものではなく、IL-6分泌と腎細胞癌の関係について明白かつ一定の結果は得られていない。

そこで、われわれはIL-6の分泌と腎細胞癌の増殖能の関係についてパラフィン包埋腎細胞癌組織を用いた免疫組織学的手法にて、retrospectiveな臨床例における両者の検討を試みた。IL-6の分泌に関しては、

1. 細胞の癌化や癌の進展に伴う癌細胞自身が分泌する場合、2. 癌細胞に対する宿主の免疫応答として免疫担当細胞が分泌する場合、3. 癌細胞に刺激され宿主側の細胞(リンパ球、マクロファージ、線維芽細胞など)で分泌が誘導される場合が考えられる<sup>11)</sup>とされ、1に関しては、摘除腎細胞癌のパラフィン包埋組織を用いて抗IL-6抗体免疫染色により、1、2および3に関して患者血清中IL-6値の測定から、腎細胞癌の増殖能は癌組織中のPCNA標識率から検討を行った。

なお、PCNAはSLE患者の血清中に発見された細胞周期のG1後期からS期にかけて出現するDNA polymerase  $\delta$ の補助蛋白質とされ<sup>13)</sup>、PCNAの発現量の測定により癌細胞増殖能を示す指標として有用とされる<sup>14)</sup> 腎細胞癌における、PCNA標識率は最低値0.9%から最高値95%、平均値 $4.93 \pm 2.84\%$ から $45.17 \pm 24.67\%$ と報告されており、いずれの報告もPCNA標識率は腎細胞癌のgradeやstageの上昇とともに標識率も上昇し、悪性度の重要な指標となると述べている<sup>15-17)</sup>

今回、われわれのPCNA標識率の結果もCroninら<sup>15)</sup>のそれと類似するものであり、grade 1とgrade 3のPCNA標識率の間には有意な差が認められPCNA標識率は腎細胞癌の増殖能を表す指標として有用と考えられる。こうしたPCNA標識率と抗IL-6抗体に対する陽性コロニー数(すなわちIL-6分泌動態)との間に相関が存在すれば、腎細胞癌においてIL-6の分泌がautocrineな増殖因子として作用していると考えられる。今回の検討では、PCNA標識率と陽性コロニー数両者の間には有意な相関が認められ、Mikiら<sup>5)</sup>やTakenawaら<sup>10)</sup>の結果と同様と考えられる。さらに、stageの上昇とPCNA標識率の間には一定の傾向はみられなかったが、high stage群ほどIL-6の陽性コロニー数が増加する傾向があり、このことは腎細胞癌の新たな血管新生を基本とする侵潤や転移における、一部の癌細胞群のgrade upすなわち増殖能の増大に伴う結果と考えられ、IL-6分泌が腎細胞癌の侵潤や転移に影響しているとも予想される。

しかしながら、一方では、Kooら<sup>12)</sup>の報告のよう

に IL-6 が腎細胞癌の増殖能に影響しないとする報告もあり, この点に関して, 腎細胞癌における heterogeneity の存在が無視できず, 今後さらに症例数を増やし検討を要するものと考えられる。

次に, 血清 IL-6 値と PCNA 標識率との間には有意な相関は認められず, 陽性コロニー数との間においても同様の結果であった。各 grade 間および2つの stage 群においても一定の傾向は認められなかった。しかし, high stage 群11例中2例で IL-6 値が low stage 群のその最高値を凌駕する結果がみられた。この点に関しては, Dosquet ら<sup>18)</sup>は78例の腎細胞癌患者について, リンパ節転移や遠隔転移を有する症例において, 有意に高値を示し転移の指標として有用であるが血清 IL-6 値の分泌動態は不明と述べている。また, Tsukamoto ら<sup>9)</sup>は71例の腎細胞癌症例の18例(25%)に血清 IL-6 値上昇を認め, 血清 IL-6 値の上昇は腫瘍の大きさや grade には相関せず stage の上昇に相関し, 上昇例の予後は不良と述べている。こうした報告やわれわれの検討でも high stage 群に高値を示した症例もあることから, 血清 IL-6 値は stage と相関するものと考えられる。また, その分泌動態は high stage 群ほど IL-6 の陽性コロニー数が増加する傾向がみられたことより腎細胞癌からの分泌が基本であると考えられる。しかし, 本論文中にデータは示していないが, 今回の検討にて腎細胞癌領域に隣接する正常腎組織中のメサングウム細胞や尿管上皮より IL-6 分泌が認められたが, これは腎の炎症性病変でもみられるとされ<sup>19)</sup>。癌病変以外の腎組織からも分泌されていることを示すものである。また, 血清 IL-6 値と CRP との間に有意な相関がみられたことは, 腎細胞癌から分泌された IL-6 あるいは宿主の腫瘍に対する免疫反応や生理反応の結果誘導された IL-6 が肝細胞を刺激し, 急性期蛋白産生誘導が促進された結果とも考えられ, 腎細胞癌患者の血清中 IL-6 値の上昇は, 先に述べた1から3までの因子の総合的な分泌動態によるものと考えられる。

## 結 語

腎細胞癌における PCNA 標識率, grade, stage と術前血清中 IL-6 値および抗 IL-6 抗体を用いた腎細胞癌組織の IL-6 分泌動態との関連について検討を行った。

1) PCNA 標識率は grade の上昇に伴い有意 ( $p < 0.05$ ) に高値を示した。low stage 群と high stage 群においては有意な差は認めなかった。

2) 免疫組織学的検討より, IL-6 の分泌陽性細胞のコロニー数は各 grade 間および2つの stage 群間において有意な差は認めなかった。

3) 血清 IL-6 値は各 grade 間および2つの stage

群間において有意な差は認めなかった。

4) 相関係数による検討にては, PCNA 標識率と陽性コロニー数, 血清 IL-6 値と CRP および ESR の間に相関が認められた。

以上から, 腎細胞癌組織内にて IL-6 は分泌され腫瘍の増殖, 進展に関与する腫瘍側因子と推測される。血清 IL-6 値は腎細胞癌をはじめとし, 担癌宿主の免疫担当細胞などの因子も関与した総合的な分泌の結果と考える。

本論文の要旨は第84回日本泌尿器科学会総会(岡山)において発表した。

## 文 献

- 1) 吉崎和幸: IL-6. サイトカイン94, 基礎から最新情報まで. 笠倉新平編. p. 74-81, 日本医学館, 東京, 1994
- 2) Muraguchi A, Hirano T, Tang B, et al.: The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* **167**: 332-344, 1988
- 3) Yoshizaki K, Matsuda T, Nishimoto N, et al.: Pathogenic significance of interleukin 6 (BSF-2/IL-6) in Castman's disease. *Blood* **74**: 1360-1367, 1989
- 4) Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al.: Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma. *Nature* **332**: 83-85, 1988
- 5) Miki S, Iwano M, Miki Y, et al.: Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett* **250**: 607-610, 1989
- 6) 腎癌取扱い規約(第2版). 日本泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会編, 金原出版株式会社, 1994
- 7) 亀本裕徳: 腎細胞癌の診断における血漿インターロイキン-6の意義について. *泌尿紀要* **39**: 301-306, 1993
- 8) 里見佳昭: 腎癌の予後に関する臨床的研究, 特に生体側の因子を中心に— *日泌尿会誌* **64**: 195-216, 1973
- 9) Tsukamoto T, Kumamoto Y, Miyao N, et al.: Interleukin-6 in renal cell carcinoma. *J Urol* **148**: 1778-1782, 1992
- 10) Takenawa J, Kaneko Y, Fukumoto H, et al.: Enhanced expression of interleukin-6 in primary renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **83**: 1668-1672, 1991
- 11) 浜尾 巧, 金山博臣, 菅 政治, ほか: 腎細胞癌におけるインターロイキン  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), インターロイキン 6 (IL-6), 腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の血清値および遺伝子発現. *日泌尿会誌* **85**: 563-570, 1994
- 12) Koo S, Armstrong C, Bochner B, et al.:

- Interleukin-6 and renal cell cancer : production, regulation and growth effects. *Cancer Immunol Immunother* **35** : 97-105, 1992
- 13) Miyachi K, Fritzler MJ and Tan EM : Auto-antibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* **121** : 2228-2234, 1978
- 14) Robbins BA, De la vega D, Ogata K, et al. : Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* **111** : 841-845, 1987
- 15) Cronin KJ, Williams NN, Kerin MJ, et al. : Proliferating cell nuclear antigen : a new prognostic indicator in renal cell carcinoma. *J Urol* **152** : 834-836, 1994
- 16) Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN, et al. : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma : comparison with tumour grade, mitotic index, and silver-staining nuclear organizer region numbers. *J Pathol* **170** : 471-477, 1993
- 17) Larsson P, Roos G, Roger S, et al. : Proliferating cell nuclear antigen expression in renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* **30** : 445-450, 1996
- 18) Dosquet C, Schaetz A, Faucher C, et al. : Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$  and interleukin-6 in patients with renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* **30** : 162-167, 1994
- 19) Fukatsu A, Matsuo S, Tamai H, et al. : Distribution of Interleukin-6 in normal and diseased human kidney. *Lab Invest* **65** : 61-66, 1991

(Received on July 30, 1997)

(Accepted on February 9, 1998)