

移行上皮癌におけるトランスフェリンリセプターの 発現についての検討

新潟大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 佐藤昭太郎教授)

富田 善彦, 西山 勉, 佐藤昭太郎

新潟大学医学部医動物学教室 (主任: 藤原道夫教授)

藤原 道夫

EXPRESSION OF TRANSFERRIN RECEPTOR ON TRANSITIONAL CELL CANCER

Yoshihiko Tomita, Tsutomu Nishiyama and Shotaro Sato

From the Department of Urology, Niigata University School of Medicine

Michio Fujiwara

From the Department of Immunology, Niigata University School of Medicine

We examined the expression of transferrin receptor (TR) in transitional cell cancer (TCC) immunohistologically, to clarify its implication in tumor malignancy. Forty eight out of 51 tumors expressed TR while TR was not detected on the normal transitional epithelium of renal pelvis, ureter and urinary bladder. In general, a higher grade and more invasive TCC expressed TR more frequently and more intensely. Furthermore, recurrent tumors treated with transurethral resection significantly more frequently expressed TR than the initial tumor. These results indicate that the detection of TR on the tumor cells is useful for estimating the degree of their malignancy.

(Acta Urol. Jpn. 37: 11-16, 1991)

Key words: Transitional cell cancer, Transferrin receptor

緒 言

生体内において鉄はそのほとんどが赤血球中のヘモグロビン, 筋細胞中のミオグロビン中に存在するが, 一般の細胞ではチトクロームCなどのヘム酵素中に含まれ, 細胞呼吸に重要な役割をしている。この鉄の血中での輸送はおもに β 1 グロブリンに属するトランスフェリンにより行われており, 鉄と結合したトランスフェリンは細胞膜に存在するトランスフェリンリセプター (TR) と結合し, 細胞内に取り込まれる¹⁾。培養細胞を用いた研究により細胞の増殖, 分裂には培養液中のトランスフェリンの存在が不可欠であることが見いだされ^{2,3)}, TR はまた分裂, 増殖する細胞に多く表現されていることも報告された⁴⁾。TR は正常細胞では皮膚の表皮基底層, 脾臓ラ氏島細胞, 肝細胞, 睪丸, 下垂体等に発現されており, 活性化リンパ球で強く発現されていることも知られている⁵⁾。また, 乳癌^{6,7)}, 悪性リンパ腫⁸⁾, 線維肉腫⁹⁾ などの腫瘍細胞やいろいろな腫瘍細胞株上にも発現されており⁹⁾, 膀胱

の移行上皮癌では高い組織学的悪性度, 浸潤度を示す腫瘍で高率に発現されていることが報告されている¹⁰⁾。今回われわれは TR の発現を膀胱だけでなく腎盂および尿管の移行上皮癌について免疫組織学的に検索し, 臨床的, 病理組織学的因子との関係について検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象患者および組織標本

新潟大学附属病院およびその関連病院で膀胱癌 (BT) に対し膀胱全摘術あるいは経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-B) をうけた38例, 腎盂腫瘍 (PT) に対し腎尿管全摘術を受けた6例, 尿管腫瘍 (UT) に対し腎尿管全摘術あるいは尿管部分切除術を受けた7例の合計51例を対象とし, 平均年齢は67.9歳であった。これらの症例は術前に化学療法や放射線療法, 免疫療法剤の投与を受けていないことを条件とした。また, TUR-B での腫瘍の採取はコールドパンチで行った。手術切除標本は OCT コンパウンド中に包埋した,

後、あらかじめドライアイス-アセトンで冷やしたインペンタン中で凍結し、クリオスタットを用いて $5\mu\text{m}$ の連続凍結切片を作成した。また正常移行上皮での TR の表現を検討するために前立腺肥大症にたいする経尿道的前立腺切除術の際に膀胱粘膜をコールドパンチにより採取したものと、腎細胞癌に対し腎摘除術を施行した摘除標本の腎盂または尿管を採取した標本を用い、腫瘍と同様の処理を行った。病理組織学的検討はヘマトキシリンエオジン染色の標本により行い、組織学的悪性度については膀胱癌取扱規約に準じ判定した。また複数の組織学的悪性度が存在する場合は優勢なものをそのグレードとし、TR に対する染色も同部分に対して評価を行った。また組織学的深達度については UICC の TNM 分類に従ったが、臨床的に筋層浸潤が明かな例に対し、姑息的 TUR を施行した場合には臨床的な T ステージにより分類した。

2. 免疫組織染色

使用したモノクローナル抗体は抗ヒト TR 抗体 (LO1.1)¹¹⁾ で Becton Dickinson Co., Burlingame, CA, USA より購入した。免疫組織染色は Table 1 に示すごとくストレプトアビジン-ビオチン法¹²⁾ を用いペルオキシダーゼによる酵素抗体法で行った。抗 TR の至適希釈濃度の決定は以下のごとく行った。活性化リンパ球の誘導のため、二人の正常人末梢血をヘパリン加採血し、PBS で2倍に希釈した後、Ficoll-Paque 液 (Pharmacia) に重層、400 G で40分間遠心し、末梢血単核球 (PBM) を得た。これら PBM を一対一の割合で混合し 2.0×10^6 cell/ml の濃度で 10% ウシ胎児血清加 RPMI1640 溶液に浮遊し 2 ウェイのリンパ球混合反応を行った。さらにリンパ球の増殖を促すために培養液中に concanavalin-A を $5\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた。37°C の CO₂ インキュベーター中で5日間培養後、細胞浮遊液をエッペンドルフチューブで遠心し、得られた沈渣を OCT コンパウンド中に包埋して、凍結切片を作製した。この切片を種々の濃度に希釈した抗 TR 抗体で免疫染色を行い、至適希釈濃度を決定した (Fig. 1A)。さらに正常移行上皮の内因性対照としては、Fig. 1B に示すごとく粘膜下層に浸潤するリンパの染色性をチェックした。染色の陰性対照としては特異性の異なる同じサブクラスのモノクローナル抗体である抗 Leu12 (CD 19) を一次抗体として染色した。TR に対する染色の評価は陽性細胞の腫瘍全体に占める割合を%で表し、TR 陽性細胞 0%, 陽性細胞を認めるがその数が 50% 以下、50~90% および 90% を越える群の 4 群に分け各因子との関係を調べた。

Table 1. Procedures of immunohistochemical staining

1. air dry	30 min
2. fixed in cold acetone	10 min
3. 20% normal horse serum	30 min
4. first mouse monoclonal antibodies	60 min
5. biotinylated horse anti-mouse Ig antibodies (Vector Laboratories)	30 min
6. streptavidin peroxidase (Amersham International)	45 min
7. 0.05% diaminobenzidin and 0.01% H ₂ O ₂	3~5 min

Each step was followed by washing in PBS with three changes of the buffer.

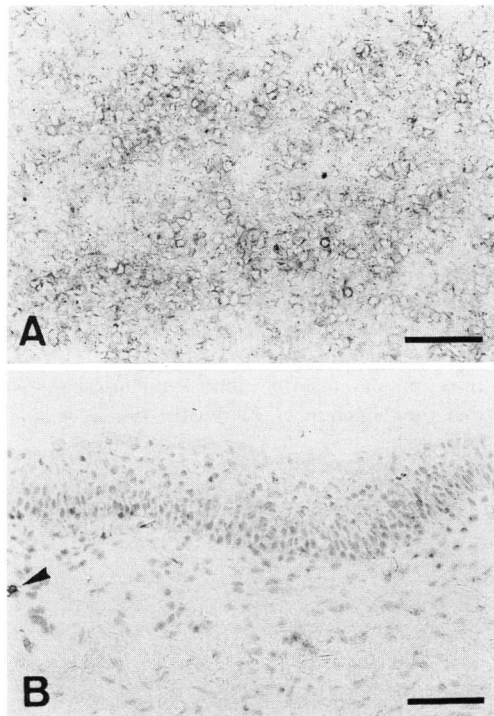


Fig. 1. (A) Transferrin receptor (TR) expression on lymphoblast induced by two-way mixed lymphocyte culture with addition of concanavalin-A ($5\mu\text{g}/\text{ml}$ in culture medium). Positive cells are scattered. (B) Normal transitional epithelial cells of urinary bladder stained with anti-transferrin receptor. No positive cells were detected. Note the intense staining of lymphocytes in submucosal layer (arrow head). Bar = $75\mu\text{m}$.

結 果

対象症例の組織学的悪性度 (グレード) による分類ではグレード 1 が 12 例, グレード 2 が 21 例, グレード 3 が 18 例であった。組織学的深達度 (T) により, T1

Table 2. Expression of transferrin receptor (TR) in relation to tumor stage and grade

	% of transferrin receptor positive cell			
	0	~50%	50~90%	90%~
Grade				
G1	2 (2, 0, 0)*	8 (5, 1, 2)	2 (2, 0, 0)	0
G2	1 (1, 0, 0)	15 (10, 4, 1)	5 (4, 0, 1)	0
G3	0	4 (1, 0, 3)	2 (2, 0, 0)	12 (11, 1, 0)
Stage				
-T1	2 (2, 0, 0)	17 (13, 2, 2)	5 (4, 0, 1)	4 (4, 0, 0)
T2+	1 (1, 0, 0)	10 (3, 3, 4)	4 (4, 0, 0)	8 (7, 1, 0)

a: Figures in parentheses are the number of cases with transitional cell cancer of urinary bladder, ureter and renal pelvis, respectively. Tumor grade is correlated with the expression of TR significantly (chi square=31.4, $p<0.01$).

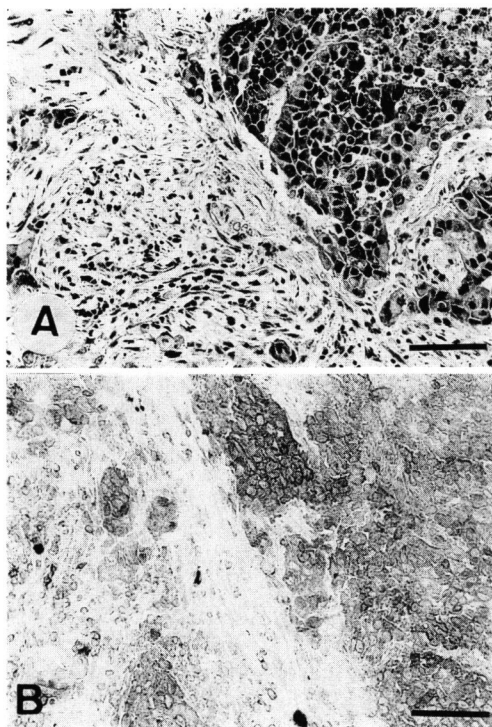


Fig. 2. (A) Grade 3 invasive (pT3) nodular tumor of urinary bladder. Hematoxylin and eosin-stained section. (B) Stained with anti-transferrin receptor. Nearly all tumor cells are positive. Bar=75 μ m.

までの群と(-T1), T2 (T2+)以上の群にわけると-T1が28例, T2+は23例であった(Table 2). 膀胱, 尿管, 腎盂の正常移行上皮ではTR陽性細胞は全く認められなかったが(Fig. 1B), 移行上皮癌では51例中48例(94%)の症例にTRの発現を認め, その程度はさまざまであった. TRの発現とグレード

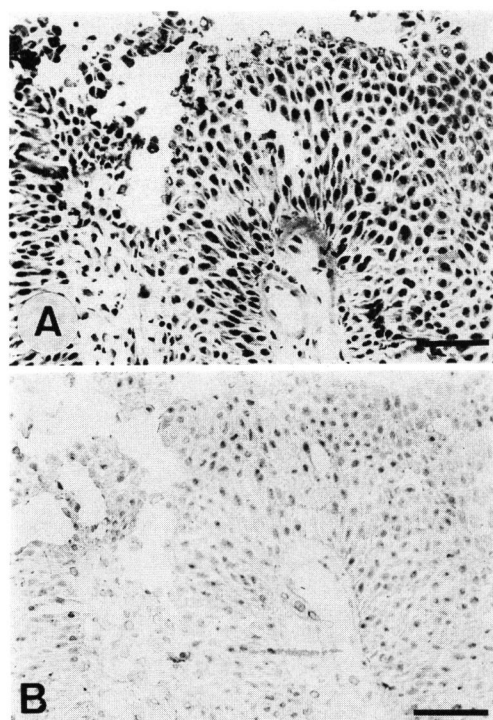


Fig. 3. (A) Grade 2 non-invasive (pT1) papillary tumor of urinary bladder. Hematoxylin and eosin-stained section. (B) Stained with anti-transferrin receptor. None of the tumor cells was positive. Bar=75 μ m.

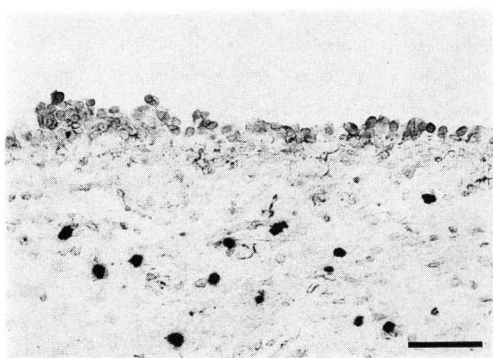


Fig. 4. Grade 3 carcinoma in situ revealed high positivity of transferrin receptor. Bar=75 μ m.

との関係を調べるとグレードが高くなるにつれてTRの発現も高度となる有意な関係を認めた(Table 2, Fig. 2, 3). また有意差は認めなかったが, -T1よりT2+の群でより高度に表現されていた. BTの症例の中にはグレード3の上皮内癌が2例含まれていたが, いずれも90%以上の細胞が陽性であった(Fig. 4). TRの発現を腫瘍の部位別にみると, BTは上述

Table 3. Comparison of transferrin receptor expression between initial and recurrent tumor treated by transurethral resection

	% of transferrin receptor positive cell			
	0	~50%	50~90%	90%~
Initial	4	10	1	1
Recurrent	1	1	4	1

Recurrent tumor more frequently expressed TR than initial tumor significantly (chi square = 8.78, $p < 0.05$).

の様な関係を示したが、UT、PT ではグレード3やT2+でもTR陽性細胞はやや少ない傾向がみられた(Table 2)。BTについて初発例と再発例との間で比較してみると、全摘症例では明かな差はみられなかったが、TUR症例では再発例の方がTR陽性細胞が有意に多かった(Table 3)。腫瘍径や腫瘍個数、患者の性別や年齢とは一定の関係を認めなかった。TR陽性細胞の腫瘍内局在という点では、腫瘍の表層に陽性細胞を多くみるものもあれば、逆に基底層に多くみるものもあり一定の傾向は認められなかった。また、H-E染色上では同一の組織型でありながら陽性の部分と全く染色されない部分が同一切片上に見られる例もあった。

考 察

TRは正常細胞では、皮膚の表皮基底層、脾臓ラ氏島細胞、肝細胞、睪丸、下垂体等で発現され、また、活性化リンパ球でも強く発現されており⁵⁾、細胞の分裂増殖の指標とも考えられている⁴⁾。さらに多くの腫瘍細胞や腫瘍細胞株にも発現されているが、造血系由来の腫瘍としては非ホジキンリンパ腫で、より悪性の組織像を示す症例に高率に発現されているという報告がある⁸⁾。また、造血系以外では、正常乳腺では見られないTRが乳癌で高率に発現されたり^{6,7)}、正常線維芽細胞では一定の培養条件で発現されるTRが線維肉腫では常時発現されるといった報告がなされている⁹⁾。Seymourらは、膀胱の移行上皮癌についてTRの発現を免疫組織学的に調べたところ68例中43例(63%)にTRの発現を認め、高いグレードや高い深達度を示す例で陽性例が多くみられたとの報告をしている¹⁰⁾。今回のわれわれの検討では51例中48例(94%)とSeymourらより高い陽性率を示し、膀胱のみならず腎盂や尿管の移行上皮癌でもTRの発現がみられた。この相違の原因は明かではないが、使用したモノクローナル抗体や染色法の違いによるものかも知れない。これらTRの発現に対する定量的解析

はアイソトープ標識トランスフェリン等を用いたバインディングアッセイが必要であるが、われわれは発現の程度をTR陽性細胞が腫瘍塊に占めるパーセントであらわすことで半定量的に評価し、他の因子との比較検討を試みた。その結果、症例全体としてはTRの発現とグレードとの間に有意な関係を認めた。また有意差は認めなかったもののより高度に浸潤している群でTRが多く発現される傾向がみられた。部位別に見ると、腎盂や尿管のTCCは膀胱原発のものにくらべ若干TRの発現が弱い傾向が認められたが、どの様な原因によるものかは不明である。さらに、TUR症例中で初発と再発例との間で比較すると、再発例でTRの発現が高い傾向がみられた。現時点では初発例に対して十分な経過観察を行っておらず、それぞれの群の背景因子も異なるので推測の境をでないが、初発例のうちTRの陽性率の高い症例は再発しやすいのかも知れない。いずれにしても、以上の結果はTCC上でのTRの発現が腫瘍の悪性度と密接な関係があることを示唆しているものと思われる。また、グレードや深達度以外の病理学的あるいは臨床因子との比較検討では、いずれも一定の傾向は認めなかった。Hemmingsenらの報告によれば高いグレードの腫瘍が存在する例では尿中のトランスフェリン濃度が高くなる傾向にあるとされており¹³⁾、尿中のトランスフェリンが腫瘍上のTR発現を増強している可能性も考えられる。しかし、今回のわれわれの結果からは、特に腫瘍の表層でTRの発現が強いといった傾向や、腫瘍の形態、浸潤度あるいは悪性度とTR発現のパターンとの間にも一定の傾向は認められず、トランスフェリンがTRの発現に影響を与える可能性はあるにしろ、発現を決定する主要な因子ではないと思われる。

TRは上述のように、多くの腫瘍細胞上に発現されているため、抗TR抗体とricin¹⁴⁻¹⁶⁾、geloninといった細胞毒¹⁷⁾やpseudomonas毒素¹⁸⁾、また抗癌剤のmethotrexateとの結合物¹⁹⁾のin vitroでの抗腫瘍効果が示され、治療への応用の可能性が探られてきた。実際、ヌードマウスを用いた実験系で、in vivoでも抗腫瘍効果を示すことが報告されている^{17,20)}。これまでTCCの細胞株を用いた研究はみられないが、TCCでもより悪性度の高い腫瘍に高率にTRの発現を見ることから、TCCに対する抗TR抗体を用いた治療の可能性が考えられる。しかし、これら抗TR抗体は、いずれもマウス由来のモノクローナル抗体で異種蛋白であり、TRを発現する正常細胞への影響も考えると、ヒトへの投与は問題

が残る。今回の対象症例の中に隆起性病変を認めないグレード3の上皮内癌の2例があるが、いずれもTRを高率に発現していた。この様な症例に対しては抗TR抗体と細胞毒などとの結合物を膀胱内注入することで、全身投与による問題を回避し、治療に応用することも可能と思われる。

結 語

移行上皮癌(TCC)51例についてトランスフェリンリセプター(TR)の表現を免疫組織学的に検討し以下の結果を得た。

1. 51例中48例にTRの発現が見られ、高いグレードや浸潤度を示す腫瘍でその発現が高度であった。
2. 経尿道的切除を行った症例では初発例より再発例の腫瘍で陽性細胞数が多く見られた。

以上の結果はTCC上でのTRの発現は腫瘍の悪性度と密接な関係があることを示唆している。

本稿を終えるに当たり、貴重な症例を提供していただいた小千谷総合病院の高島彰夫先生、新潟市病院の中村章、大沢哲雄の両先生、ガンセンター新潟病院の坂田安之輔、小松原秀一、北村康男、渡辺学の諸先生、厚生連三条総合病院の平岩三雄先生、長岡赤十字病院の森下英夫、中島祐一の両先生、燕労災病院の安藤徹先生、厚生連村上病院の内山武司先生、また研究の遂行にあたりご協力いただいた泌尿器科教室員各位、新潟大学医動物学教室の松本陽、渡部久実の両先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Trowbridge IS, Nawman RA, Domingo DL, et al.: Transferrin receptors: structure and function. *Biochem Pharmacol* **33**: 925-937, 1984
- 2) Hayashi I and Sato GH: Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature* **259**: 132-134, 1976
- 3) Barnes D and Sato G: Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* **22**: 649-655, 1980
- 4) Galbraith GMP, Galbraith RM and Faulk WP: Transferrin binding by human lymphoblastoid cell lines and other transformed cells. *Cell Immunol* **49**: 215-222, 1980
- 5) Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, et al.: Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol* **36**: 539-545, 1983
- 6) Faulk WP, Hsi B and Stevens PJ: Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet* **II**: 390-392, 1980
- 7) Shindelman JE, Ortmeier AE and Sussman

HH: Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue: potential marker for identifying dividing cells. *Int J Cancer* **27**: 329-334, 1981

- 8) Mederios LJ, Picker LJ, Horning SJ, et al.: Transferrin receptor expression by non-Hodgkin's lymphomas: correlation with morphologic grade and survival. *Cancer* **61**: 1844-1851, 1988
- 9) Ekblom P, Thesleff I, Lehto V-P, et al.: Distribution of the transferrin receptor in normal human fibroblasts and fibrosarcoma cells. *Int J Cancer* **31**: 111-117, 1983
- 10) Seymour GJ, Walsh MD, Lavin MF, et al.: Transferrin receptor expression by human bladder transitional cell carcinomas. *Urol Res* **15**: 341-344, 1987
- 11) Phillips JH, Le AM and Lanier LL: Natural killer cells activated in a human mixed lymphocyte response culture identified by expression of Leu-11 and class II histocompatibility antigens. *J Exp Med* **159**: 993-1008, 1984
- 12) Bonnard C, Depermaster DS and Kraehenbuhl JP: The streptavidin-biotin bridge technique: application in light and electron microscope immunocytochemistry. In: *Immunolabelling for electron microscopy*. Edited by Polak JM and Varndell IM. pp. 95-111, Elsevier Scientific Pub., Amsterdam, 1984
- 13) Hemmingsen L, Rasmussen F, Skaarup P, et al.: Urinary protein profiles in patients with urothelial bladder tumors. *Br J Urol* **53**: 324-329, 1981
- 14) Trowbridge IS and Domingo DL: Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumor cells. *Nature* **294**: 171-173, 1981
- 15) Trowbridge IS and Lopez F: Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 1175-1179, 1982
- 16) Taetle R, Honeysett JM and Trowbridge I: Effects of anti-transferrin receptor antibodies on growth of normal and malignant myeloid cells. *Int J Cancer* **32**: 343-349, 1983
- 17) Scott CF Jr, Goldmacher VS, Lambert JM, et al.: An immunotoxin composed of a monoclonal antitransferrin receptor antibody linked by a disulfide bond to the ribosome-inactivating protein gelonin: potent in vitro and in vivo effects against human tumors. *JNCI* **79**: 1163-1172, 1987
- 18) Pirker R, Fitzgerald DJ, Hamilton TC,

- et al.: Anti transferrin receptor antibody linked to pseudomonas exotoxin as a model immunotoxin in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* **45**: 751-757, 1985
- 19) Kanellos J, Pietersz GA and McKenzie FC: Studies of methotrexate-monoelonal antibody conjugates for immunotherapy. *JNCI* **75**: 319-329, 1985
- 20) Fitzgerald DJ, Bjorn MJ, Ferris RJ, et al.: Antitumor activity of an immunotoxin in a nude mouse model of human ovarian cancer. *Cancer Res* **47**: 1407-1410, 1987

(Received on March 5, 1990)
(Accepted on April 7, 1990)