

膀胱癌組織における p53, Ki-67 抗原の免疫組織学的検討

日本大学医学部駿河台病院泌尿器科 (主任: 滝本至得教授)

弓削 文一, 平方 仁, 五十嵐 洋

児玉 雅仁, 川田 望, 滝本 至得

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF p53 AND Ki-67
ANTIGEN EXPRESSION IN BLADDER CARCINOMAFumikazu YUGE, Hitoshi HIRAKATA, Hiroshi IGARASHI,
Masahito KODAMA, Nozomu KAWATA and Yukie TAKIMOTO
*From the Department of Urology, Nihon University School of Medicine,
Surugadai Nihon University Hospital*

We examined the relationship between the expression of mutant p53 and Ki-67 antigens in urinary bladder transitional cell carcinoma and the pathological and clinical findings. Tissues were obtained from 28 patients with bladder carcinoma who underwent total or partial cystectomy. An ABC immunostaining method and two primary antibodies (DO-7 and MIB-1 antibodies) were used. The percentages of p53 and Ki-67 antigen-positive cells to the total number of cells were regarded as the p53 and Ki-67 labeling indices (LI) respectively. There were no statistically significant correlations between p53 LI and the histological grade or stage, although p53 LI increased slightly in the high grade and high stage group. There was a statistically significant correlation between Ki-67 LI and the histological grade and stage ($p < 0.05$). The correlation between p53 LI and Ki-67 LI was linear. Some cases had a p53 LI below the mean even though the Ki-67 LI was higher.

The clinical course was characteristic of superficial bladder carcinoma initially, but progressed to invasive bladder carcinoma over the next several years. These results suggest that even cases initially diagnosed as superficial bladder carcinoma with a low p53 LI may progress to invasive bladder carcinoma in subsequent years. Therefore, it is important that the patient be followed-up.

(Acta Urol. Jpn. 45 : 453-456, 1999)

Key words: Bladder carcinoma, p53, Ki-67 antigen

緒 言

膀胱癌の病理組織診断に客観的な評価を加え、さらに補助診断の1つとして、最近遺伝子発現異常や核内増殖関連蛋白を免疫組織学的に検索することが行われている。p53 蛋白は細胞核内に存在し、種々の癌において変異、欠失が報告されている癌抑制遺伝子である¹⁾ Ki-67 抗原は核内増殖関連蛋白で、増殖期細胞の核を認識し、他の種々の癌の悪性度の指標にされており²⁾、パラフィン包埋切片でも優れた再現性を有するとされている。今回、膀胱癌組織における両者の発現性を免疫組織学的に検索し、臨床病理学的項目および臨床経過との関連性について検討してみた。

対 象

1990年から1996年までの間に当科において膀胱全摘除術および膀胱壁部分切除術を行った28例が対象で、内訳は男性20例、女性8例である。年齢は50歳から86歳、平均年齢64歳であった。組織学的分類は膀胱癌取

り扱い規約に準じた³⁾ 組織型は全例が移行上皮癌で、組織学的異形度は grade 1 が2例、grade 2 が10例、grade 3 が16例であった。組織学的深達度は pT1 が3例、pT2 が9例、pT3 が16例であった。リンパ管および壁内静脈侵襲において、pL (-), pV (-) を脈管侵襲なしとし pL, pV いずれか (+) を脈管侵襲有りとした。その結果脈管侵襲なしが7例、脈管侵襲有りが21例であった。

手術施行までの臨床経過の違いにおいて2群に分類できた。すなわち、初発時表在性の腫瘍と診断され再発を繰り返したのち浸潤性となり膀胱全摘術を施行した5例と、初発時浸潤性で直ちに摘除術を施行した23例に分けてそれぞれ検討した。

方 法

免疫組織学的染色方法は avidin-biotin-peroxidase complex 法を用いて行った。ホルマリン固定後、パラフィン包埋した標本から薄切片を作成し、脱パラ後、クエン酸 Buffer にて加熱処理し抗原の賦活化を

行った. 0.3% H_2O_2 加95%メタノールで30分間反応させ, 内因性ペルオキシダーゼを除去し, 一次抗体として p53 (DO-7, DAKO 社), Ki-67 (MIB-1 抗体, DAKO 社) を100倍希釈し, ビオチン化マウス Ig-G を二次抗体とし反応, 洗浄後 avidin-biotin-peroxidase complex と室温で反応させた. 続いて diaminobenzidine-tetra-hydrochloride (DAB) にて発色させ, メチルグリーンにて核染色を行った. この染色標本を検鏡, 800~1,000個の腫瘍細胞から陽性細胞をカウントし陽性率を labeling index (LI) として算出した. 統計学的手法においては, 群間の有意差に Mann-Whitney の U-test を用い, LI の相関性の検定には Spearman の順位相関係数による検定法を用いた.

結 果

p53 および Ki-67 の陽性反応は核内に限局し, 陽性細胞の核は褐色に染色され陰性細胞との鑑別は容易であった. 各症例の染色例を Fig. 1 に示した.

1. p53 染色結果

p53 の LI は 0~71% (中央値19%) で grade, stage 別における LI の結果を Table 1 に示した. 両者とも grade, stage が進むにつれ LI が上昇する傾向はみられたが統計学的に有意差は認めなかった. 尿管侵襲の有無においても同様の傾向をみせたが有意差は認めなかった.

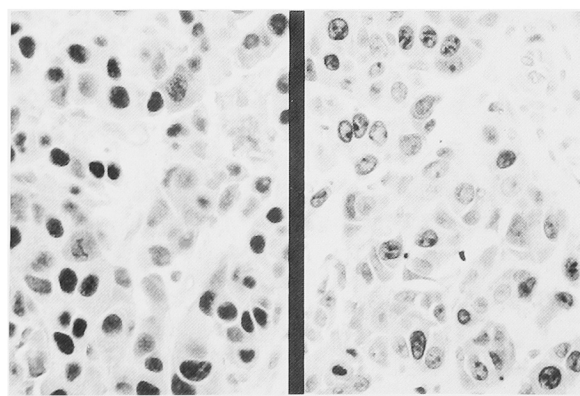


Fig. 1. Positive immunoreactivity for p53 and Ki-67 of bladder carcinoma. Both nuclei are strongly stained.

Table 1. p53 labeling index according to the histological grade and pathological stage

		Cases	LI range (median)
Grade	G1	2	negative
	G2	10	3-53 (15)
	G3	16	2-71 (39)
Stage	pT1	3	0-18 (6)
	pT2	9	4-63 (22)
	pT3	16	2-71 (25.5)

Table 2. Ki-67 labeling index according to the histological grade and pathological stage

		Cases	LI range (median)
Grade	G1	2	4-21 (15)
	G2	10	2-29 (18)
	G3	16	0-51 (21)
Stage	pT1	3	4-26 (21)
	pT2	9	2-51 (8)
	pT3	16	0-46 (29)

G2 vs. G3 $p < 0.05$, pT2 vs. pT3 $p < 0.05$.

2. Ki-67 染色結果

Ki-67 の LI は 0~51% (中央値23%) で, grade, stage 別における LI の結果を Table 2 に示した. Grade が進むにつれ LI は上昇傾向を示し grade 2, 3 間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認めた. 深達度においては pT1 が中央値が高い傾向を示した. 統計学的有意差においては pT2, pT3 間で認められ ($p < 0.05$), 尿管侵襲の有無では, 侵襲なしで 2~27% (中央値10%), 侵襲有りで 0~51% (中央値27%) と上昇傾向がみられたが統計学的有意差は認めなかった.

3. 臨床経過による染色結果

初発時表在性で最終的に浸潤性となった5例と初発時より浸潤性であった23例の LI の結果を Table 3 に示した. p53 の LI において両者の間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認め, Ki-67 も同様に調べると両者の値はほぼ変わらず有意差は認めなかった.

4. LI の相関性について

p53, Ki-67 の LI の相関性を Fig. 2 に示した. 両

Table 3. p53 and Ki-67 labeling indices according to the difference of clinical course

	Superficial type	Invasive type	p value
p53 LI	2-18 (7)	0-71 (28)	$p < 0.05$
Ki-67 LI	0-37 (29)	2-51 (21)	NS

range (median)

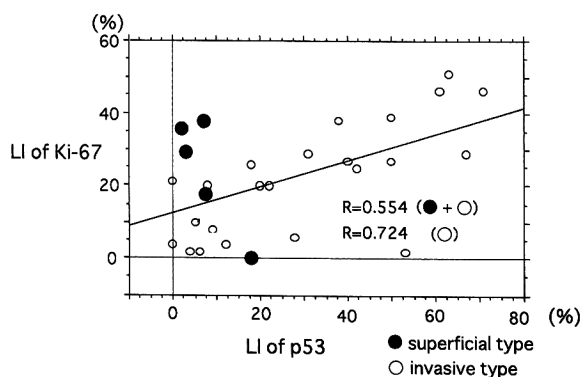


Fig. 2. Correlation between p53 and Ki-67 labeling indices for 28 tumors studied.

者の間で相関性があることが認められ、臨床経過で分類した初発時表在性で浸潤性に移行した5症例(クローズサークル)を除外すれば相関係数は0.724となりさらに強い相関性があることが認められた。

考 察

膀胱癌の発生や進展には p53 遺伝子の関与が指摘されており⁴⁾、泌尿器科領域では膀胱癌の他、前立腺癌でも関与が指摘され^{5,6)}、腎癌、精巣腫瘍では p53 遺伝子異常の頻度は非常に低いとされている⁷⁾

特に膀胱では p53 の変異は high-grade, high-stage の腫瘍に多く認められるとの報告が多く、CIS との関与も指摘されている⁸⁾

Ki-67 抗原は核内増殖関連蛋白であり⁹⁾、現在 bromodeoxyuridine (BrdU)¹⁰⁾、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)¹¹⁾、argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR)¹²⁾ などと比較し、MIB-1 抗体はパラフィン包埋切片で優れた再現性があり、煩雑な手技を必要とせず腫瘍細胞の増殖能を検定できるため¹³⁾今回 Ki-67 を使用した。

膀胱全摘術の適応は浸潤性膀胱癌であることは言うまでもないが、さまざまな臨床病理学的因子があり、また異なった臨床経過を経て手術に至ることがある。今回、浸潤性膀胱癌の診断を得た28例の p53, Ki-67 との関連性を① p53 と病理学的因子の関係、② Ki-67 抗原と病理学的因子の関係、③ 両者の LI の相関性および p53, Ki-67 抗原と臨床経過との関係について以下の検討を行った。

① p53 における膀胱癌と異形度との関係は grade が高くなるほど LI は高い値を示すが有意差は認めなかった。深達度、脈管侵襲の有無においても病期が進むにつれ LI が高くなる一定の傾向が見られたが有意差はなかった。今回 p53 の陽性反応の判定には Ki-67 と同様に LI を採用した。諸家によると20%以上陽性細胞所見が見られれば陽性と判定したり^{14,15)}、陽性細胞が一部にでも見られれば陽性と判定したり¹⁶⁾と判定法の一致をみていない。このことも G1 症例の少なかったことなどのほか、有意差の見られなかった要因かと考えられた。

② Ki-67 については grade 2, 3 間で有意差を認め、増殖能細胞の増加の可能性を考慮すれば細胞異形度と相関することは矛盾しないと思われた。また深達度においては pT2, pT3 間において有意差を認めた。脈管侵襲の有無においても侵襲有りの LI が高い傾向を見せたが有意差としては認めなかった。以上より臨床病理学的因子との関連性は、今回の検討で p53 においては病期の進展とともに LI の上昇を認め、一定の傾向は見せるも統計学的有意差は認めず、Ki-67 の LI は細胞異形度、深達度において相関し、悪性度の

指標として有用で諸家の報告とほぼ同様の結果であった^{17,18)}

③ 臨床経過においては、5例は初発時表在性で最終的に浸潤性となり手術を施行、23例は初発時すでに浸潤性でありただちに手術を施行した経過をたどっている。前者における5例中4例の p53 の LI は23例に比べ様に低く、Ki-67 においては両者ともほぼ同様の増殖能を示した。両者の悪性度は最終的に同様であるが p53 の発現性の違いについては、今回の検討では臨床経過の相違のみで有意差があった。すなわち、5例の浸潤癌にいたる平均経過年数は6.6年と長期にわたっており、その間に再発を繰り返し進展していったものと思われる。長い経過の間にこれらの症例は全摘にいたるまで、全例に MVAC 療法を行っている。p53 の抗癌剤感受性の関連については十分な検討はなされていないが、朝田らによれば MVAC 療法前の原発巣に存在した p53 の染色性が剖検組織で消失し、MVAC により p53 陽性細胞の死滅、p53 陰性細胞の残存等の可能性も指摘されており¹⁹⁾、これらの因子との関連により発現性が低下した可能性も考えられる。今回の検討では、p53 がこの5症例の経過において癌化のどの段階で関わっていたのかは不明だがこれらの症例においては initiation のみに関わり progression には関連がなかったことは予想される。しかし、症例数も少なくさらに症例を増やし検討する必要もあると思われた。しかし今回の結果からたとえ表在性であっても p53 と Ki-67 の間に相関の見られない症例については術後も注意深い観察が必要であることが示唆された。

結 語

1. 膀胱癌組織28例を用いて、p53, Ki-67 の発現性をモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行い検討した。
2. Ki-67 の LI は組織学的異形度、深達度と関連した。
3. p53, Ki-67 の LI に相関性を認めた。しかし、初発表在性で再発を繰り返し、浸潤性に移行した症例のなかに両者の LI に相関性を認めない症例があり浸潤癌に至る p53 の関与に多様性があることが示唆された。

本論文の要旨は、第6回泌尿器科細胞解析研究会、第62回日本泌尿器科学会東部総会において発表した。

文 献

- 1) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al.: p53 mutations in human cancer. *Science* **253**: 49-53, 1991
- 2) Fontana D, Belina M, Gubetta L, et al.:

- Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J Urol* **148**: 1149-1151, 1992
- 3) 日本泌尿器科学会 日本病理学会編: 泌尿器科・病理 膀胱癌取扱い規約. 第2版, 金原出版, 1993
 - 4) Esrig D, Elmajian D, Groschen S, et al.: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* **331**: 1259-1264, 1994
 - 5) Konishi N, Hiasa Y, Matsuda H, et al.: Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *Am J Pathol* **147**: 1112-1122, 1995
 - 6) Fox SB, Persad RA, Royds J, et al.: p53 and c-myc expression in stage A1 prostatic adenocarcinoma: useful prognostic determinants? *J Urol* **150**: 490-494, 1993
 - 7) Peng HQ, Hogg D, Malkin D, et al.: Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* **53**: 3574-3578, 1993
 - 8) 八十嶋仁, 桜井一成, 山田章彦, ほか: 膀胱上皮内癌の免疫組織学的検討. *癌の臨* **42**: 525-529, 1996
 - 9) Gerdes J, Lemke H, Baishe H, et al.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**: 1710-1715, 1984
 - 10) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**: 474-475, 1982
 - 11) 住吉義光, 井上善雄, 秋山昌範, ほか: 膀胱癌における Proliferating Cell Nuclear Antigen の免疫組織学的検討. *日泌尿会誌* **84**: 1643-1648, 1993
 - 12) Lipponen PK and Eskelinen MJ: Argyrophilic nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in transitional cell bladder tumours related to established prognostic factors. progression and independent prognostic value. *Oncology* **49**: 152-157, 1992
 - 13) 藍沢茂雄, 古里征国, 菊池 泰, ほか: 泌尿器疾患における免疫染色の意義. *臨泌* **46**: 97-107, 1992
 - 14) Raitanen MP, Tammela TLJ, Kallionen M, et al.: p53 accumulation deoxyribonucleic acid ploidy and progression of bladder cancer. *J Urol* **157**: 1250-1253, 1997
 - 15) Ick K, Schultz M, Stout P, et al.: Significance of p53 overexpression in urinary bladder transitional cell carcinoma in situ before and after bacillus calmett-guerin treatment. *Urology* **49**: 541-547, 1997
 - 16) 山際裕史, 大西信行, 西井宗男, ほか: 胆嚢の dysplasia, 癌における EGF, EGFR, c-erbB-2, p53, PCNA の免疫組織学的検討. *癌の臨* **42**: 520-524, 1996
 - 17) Bush C, Price P and Norton J: Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labeling: Its potential clinical importance. *Br J Cancer* **64**: 357-360, 1991
 - 18) Mazerolles C, Rishhann P, Chopin D, et al.: Usefulness of MIBI monoclonal antibody in assessing the proliferative index in human bladder carcinoma. *Histopathology* **25**: 563-568, 1994
 - 19) 朝田裕志, 加藤幹雄, 岡田耕市: 尿路上皮癌に対する M-VAC 療法の臨床評価およびその抗腫瘍効果と変異型 p53 染色性に関する検討. *西日泌尿* **59**: 865-868, 1997

(Received on December 14, 1998)
(Accepted on June 13, 1999)