

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) の表在性膀胱癌組織における発現

—パラフィン切片での応用—

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 内藤克輔教授)

和田 尚, 島袋 智之, 栗栖 弘明, Isteaq A. Shameem

吉弘 悟, 松山 豪泰, 内藤 克輔

小郡第一総合病院泌尿器科 (部長: 橋本 治)

橋 本 治

山口大学医学部病理学第二講座 (主任: 高橋 学教授)

田 中 一 成

EXPRESSION OF PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN IN SUPERFICIAL BLADDER CANCER

—APPLICATION TO PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE SECTIONS—

Takashi Wada, Tomoyuki Shimabukuro, Hiroaki Kurisu,

Isteaq A. Shameem, Satoru Yoshihiro,

Hideyasu Matsuyama and Katsusuke Naito

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine

Osamu Hashimoto

From the Department of Urology, Ogori Daiichi General Hospital

Kazunari Tanaka

From the Second Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine

It is important to know the proliferating ability and the malignant potential of each tumor. We studied 56 cases of pTa to pT1 superficial bladder tumors using immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and compared the results with the clinical course of each patient. We obtained the following results. 1) We detected the PCNA positive nuclei in all cases, and the PCNA positive rates varied within a range of 1.1~77.5% with a mean of 34.0%. 2) The PCNA positive rate showed no correlation with age, sex, duration of paraffin-embedded, or pathological stage, but showed a significant correlation with the number of tumors, pathological grade of malignancy, or non-recurrence rate. PCNA positive rate of Grade 1 cases (n=19, 15.6%: mean) was significantly lower than those of Grade 2 cases (n=27, 39.9%) or Grade 3 cases (n=10, 53.1%) ($P<0.01$). The recurrence rate of the cases with PCNA positive rates of more than 34% (n=24) was significantly higher than that of the cases with a PCNA positive rate of less than 34% (n=32) ($P<0.05$).

In conclusion, the method of counting the rate of PCNA positive nuclei is considered to be very useful because of its applicability to paraffin-embedded tissue sections and the simple and rapid techniques. Our results in bladder cancer tissues suggest that this method may also be useful for investigating the proliferating ability and the malignant potential of tumors in general.

(Acta Urol. Jpn. 39: 313-319, 1993)

Key words: PCNA, Bladder cancer, Paraffin-embedded tissue, Immunohistochemistry

緒 言

癌を特徴付けるのは、抑制を欠いた旺盛なその増殖能である。それゆえ、癌の細胞増殖能を解析し、生物学的悪性度を推測する一助にしようと、従来より種々の方法が研究されている。すなわち、thymidine analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) を *in vitro* あるいは *in vivo* で標識する方法^{1,2)}や Ki-67 反応性抗原を利用する方法³⁾等である。しかし、いずれも検体として新鮮材料を必要とし、retrospective な検討ができないという欠点があった。

1978年、Miyachi らにより報告された PCNA⁴⁾は、その後の研究で G1 後期から S 期にかけて合成される DNA polymerase- δ の補助蛋白質であり⁵⁾、細胞増殖能と密接に関連していることが示された。しかも、その抗原性はホルマリン固定後のパラフィン包埋組織においても失われずに保持されていることが報告されている^{6,7)}。従って、PCNA に対するモノクローナル抗体を用い、通常の病理標本を使って免疫組織化学染色を行えば、容易に細胞増殖能の解析が可能になるうえ、えられた情報をすでに臨床結果の判明している症例と対比することも容易で、その有用性はきわめて高いといえる。

この観点から、今回われわれは膀胱癌パラフィン包埋組織切片を用いて、PCNA の発現様式を検討し、得られた結果を個々の症例の臨床経過と対比させ、検討したので報告する。

対 象 と 方 法

1985年1月より1991年12月末までに山口大学医学部附属病院泌尿器科および小郡第一総合病院泌尿器科を受診した膀胱癌症例のうち、未治療で経尿道的腫瘍切除術が施行された56例のパラフィン包埋標本を用いた。全症例とも10%ホルマリン液にて約12~24時間固定後にパラフィン包埋処理されていた。

56症例の内訳は、男性48例、女性8例で、年齢は41歳から89歳の平均66.9歳であった。腫瘍数は単発が22例、2個以上の多発が34例であった。全例とも組織学的に移行上皮癌であることが確認され、組織学的異型度分類では grade 1 が19例、grade 2 が27例、grade 3 が10例で、組織学的深達度分類では、pTa が19例、pT1 が37例であった。術後観察期間は、2カ月から73カ月、平均14.5カ月であった。

免疫組織化学染色 (PCNA 法) はすでに報告した、ABC (avidin-biotin peroxidase complex) 法を若干修飾して行った⁸⁾。すなわち、パラフィン包埋標本

より厚さ 5 μ m の切片を作製し、脱パラフィン後、0.3% H₂O₂ 水溶液にて内因性ペルオキシダーゼを阻害した。一次抗体は、抗 PCNA モノクローナル抗体 (Dako 社) を用い、10%正常血清と 0.04% Triton X-100 を含む PBS (抗体希釈液) にて100倍に希釈し、湿室内室温で2時間反応させた。冷 PBS にて洗浄後、抗体希釈液で同様に100倍に希釈したビオチン化抗マウス IgG 二次抗体 (Vector Lab.) を室温にて1時間、ついで、調整済みの ABC complex (Vector Lab.) を1時間反応させた。発色は 3,3'-D-AB/H₂O₂ 液を用い、イミダゾール (0.01 M, 和光純薬) を増感のため添加した。核染色はマイヤーのヘマトキシリン液を用いた。対照は一次抗体の代わりに同量の PBS を反応させ、以後まったく同様に処理したものとした。判定は、ミラー切片の HE 染色を行い、癌組織であることを確かめた後、光学顕微鏡400倍下で、PCNA 染色性が最も高い領域を選択し、異なる数視野で、腫瘍細胞核約2,000個を観察し、全観察細胞に対する陽性細胞の割合より PCNA 陽性率 (%) を算出した。算出された PCNA 陽性率と年齢、パラフィンブロック保存期間、腫瘍数、組織学的異型度、組織学的深達度、非再発率との関連につき検討した。

非再発率の算出には Kaplan-Meier 法を用い、非再発率曲線の差の検定には Cox-Mantel test を用いた。その他の有意差検定、相関係数の検定には Wilcoxon test, Kruskal-Wallis test もしくは Spearman's correlation coefficient を用いた。

結 果

I PCNA 染色性 (Fig. 1A & B)

PCNA 陽性細胞の核は、Fig. 1A & B に示すように茶褐色に一樣に染まるものが大多数であったが、顆粒状に染色されるものも認められた。対照標本の非特異的染色強度に比較して、より強く染まる核を陽性と判定し、核がヘマトキシリンにより青紫色にのみ染まっているものを陰性と判定した。

II. PCNA 陽性率と症例背景因子との関係

対象とした表在性膀胱癌全症例において、PCNA 陽性細胞を検出可能であり、PCNA 陽性率は、1.1~77.5%の範囲で認められ、平均34.0 $\pm$ 22.0% (mean $\pm$ SD) であった。

1) 年齢および性

年齢および性の PCNA 陽性率におよぼす影響を検討した。年齢と PCNA 陽性率の間には統計学的に有意な相関は認められなかった ($R=0.036$)。性別では、男性48例は 34.1 $\pm$ 22.0% (mean $\pm$ SD)、女性8例は

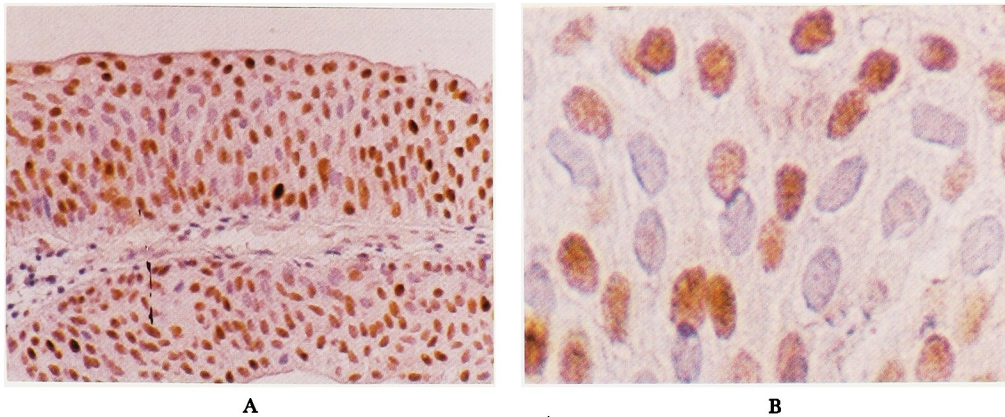


Fig. 1. Transitional cell carcinoma of the bladder (grade 2, pTa). Most nuclei in this field are positively stained for PCNA. (A, $\times 100$) (B, $\times 400$)

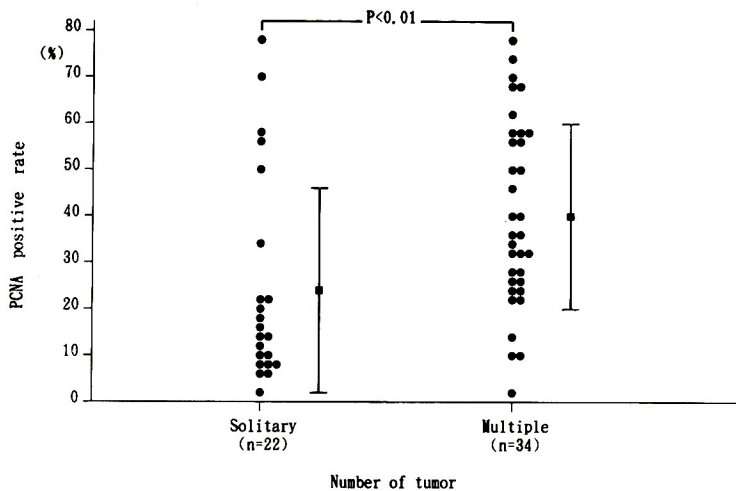


Fig. 2. Relationship between PCNA positive rate and number of tumors

33.2 $\pm$ 22.1%であり、有意差は認められなかった ($P=0.952$)。

2) パラフィンブロック保存期間

内視鏡的に標本を採取し、ホルマリン固定後にパラフィン包埋を行うが、パラフィン包埋保存期間がPCNA染色性および陽性率におよぼす影響について検討した。パラフィン包埋保存期間は、2カ月から84カ月の平均40.9カ月であった。PCNA陽性率と保存期間の間に統計学的に有意な相関は認められなかった ($R=0.112$)。また、染色性についても保存期間による差は認められなかった。

3) 腫瘍数 (Fig. 2)

単発腫瘍群と2個以上の多発腫瘍群に分けて、PCNA陽性率を比較した。単発腫瘍群は24.8 $\pm$ 22.1%

(mean $\pm$ SD)であったのに対して、多発腫瘍群は40.0 $\pm$ 19.7%と有意に高値を示した ($P<0.01$)。

4) 組織学的異型度 (Fig. 3)

grade 1群では、15.6 $\pm$ 9.8% (mean $\pm$ SD)とPCNA陽性率は低かったのに比較して、grade 2群は39.9 $\pm$ 20.8%、grade 3群は53.1 $\pm$ 15.6%と統計学的に有意に高値を示した ($P<0.01$)。また、grade 2群に比較して、grade 3群のPCNA陽性率は高くなる傾向が認められた ($P=0.078$)。

5) 組織学的深達度 (Fig. 4)

pTa群とpT1群に分けて、PCNA陽性率を比較した。pTa群は28.5 $\pm$ 19.3% (mean $\pm$ SD)であったのに対して、pT1群は36.8 $\pm$ 22.7%と高値を示したが、両群間に有意差は認められなかった ($P=$

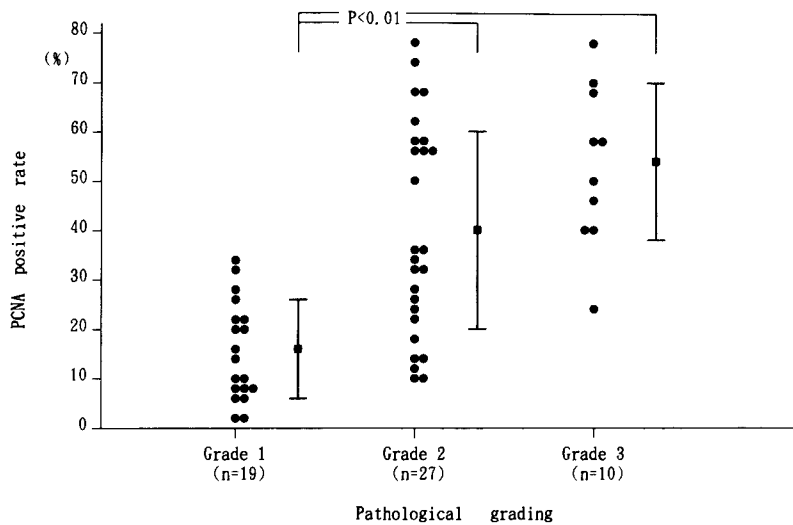


Fig. 3. Relationship between PCNA positive rate and pathological grading

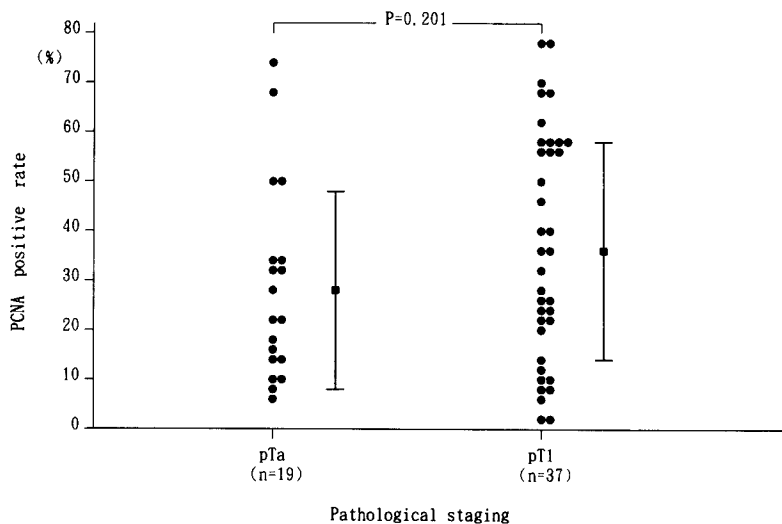


Fig. 4. Relationship between PCNA positive rate and pathological staging

0.201).

6) 再発率 (Fig. 5)

56例の PCNA 陽性率の値は正規分布を示したため、全症例の平均値の 34.0% を境界として 2 群に分け、再発率との関連につき検討した。PCNA 陽性率 34.0% 以上の群 24 例では、PCNA 陽性率 34.0% 未満の群 32 例に比較して、有意に再発率が高かった ($P < 0.05$)。なお、経尿道的腫瘍切除後に再発防止法として抗癌剤膀胱内注入法が施行された 39 例にて検討したと

ころ、PCNA 陽性率が 39 例の平均値 39.1% より高い群では、低い群に比べて有意に再発率が高かった ($P < 0.05$)。予後については、現在、癌あり生存は 8 例、癌死は 2 例であり、推計学的検討は行いえなかった。

考 察

proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は G1 後期から S 期にかけて合成される分子量 36 kd の酸性核蛋白である⁹⁾。最近の研究結果では、PCNA

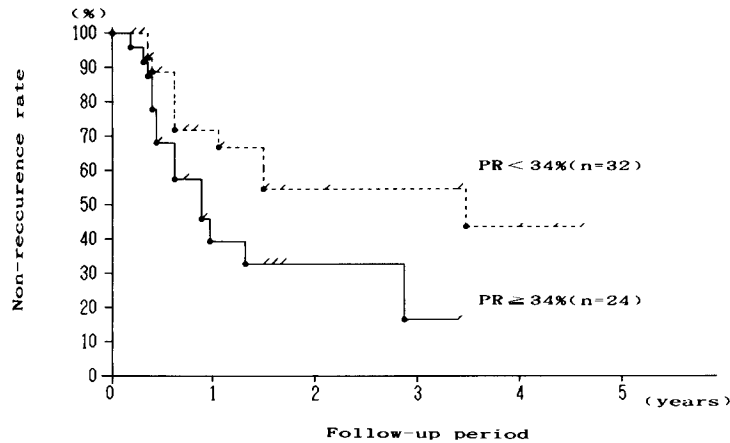


Fig. 5. Relationship between PCNA positive rate and non-recurrence rate

は cyclin と同じ性質を有する蛋白で DNA 複製時には DNA polymerase- δ の補助蛋白として働くことが報告されている⁵⁾。PCNA の正確な役割はまだ解明されていないが、DNA 合成の抑制因子を中和し、細胞の DNA 合成を刺激することが示唆されている¹⁰⁾。近年、癌の生物学的悪性度の解析を目的として、細胞増殖能の測定が各種の方法で行われているがこれまでの検出法では、生組織や新鮮組織の凍結切片が必要であったため、一般的に広く用いられることはなかった。これらに対して、PCNA 法は、ホルマリン固定後のパラフィン包埋標本を検体として使用できるため^{6,7)}、通常の病理標本を用いて、簡単に細胞増殖能の解析が可能であり、きわめて有用な方法といえる。

PCNA の免疫染色性に関する今回のわれわれの検討結果から、多くの細胞核は一樣に強く染色されていたが、やや淡く顆粒状に染まる核も散見された。PCNA は G1 後期から S 期にかけて合成されるが、その半減期は約 20 時間であることより¹¹⁾、細胞増殖周期の全相において PCNA が存在する可能性が考えられる。また、守内らは二次元電気泳動法にて PCNA のスポットが S 期だけでなく、G1 期と G2 期にも薄いながらも存在することを実際に証明しており¹²⁾、細胞増殖周期によって、PCNA の抗原量が変化するため、染色性に差異が生じたとも推察される。したがって、われわれは淡く染まった核も、増殖関連細胞として陽性に判定した。

全視野のうち陽性細胞の最も多い領域を選択したことに関しては、癌組織内に heterogeneity がある場合、癌の悪性度や予後との関連が深いのは増殖細胞の

最も多い領域であると考えたことによる。

今回われわれが検討した表在性膀胱癌全症例にて PCNA 陽性細胞が検出可能であり、PCNA 陽性率は平均 34.0% であった。従来の BrdU 標識率¹³⁾に比較して PCNA 陽性率が高値となった理由は、前述したように PCNA は、G1 後期から S 期にかけて合成され、その半減期は約 20 時間であることより、S 期だけでなく、細胞増殖周期の全相において存在していると考えられる。このため、S 期細胞のみの比率をあらわす BrdU 標識率に比較して PCNA 陽性率が高値を示したものと考えられる。また、他領域の PCNA 陽性率の検討では、胃癌 93 例で平均 40.7%¹⁴⁾、乳癌 54 例で平均 10.2%¹⁵⁾、悪性リンパ腫 24 例で平均 54%¹⁶⁾等の報告があり、これら PCNA 陽性率の違いは組織型による癌細胞の増殖活性または doubling time の差異を示すことが推測される。細胞増殖能は年齢や性にも影響される可能性が考えられるが、今回の検討から年齢や性によって、表在性膀胱癌組織における PCNA 陽性率に差異は認められなかった。

パラフィン包埋期間の PCNA 染色性におよぼす影響に関しては、包埋後約 20 年経過した胃癌手術標本にても良好な染色結果がえられたという報告もある⁷⁾。今回の結果から、膀胱癌については、7 年間保存された検体においても PCNA の抗原性は保持されていることが明らかとなったが、それ以上保存された検体についても現在検討中である。

今回の検討結果では、PCNA 陽性率と組織学的深達度 pTa と pT1 との間に明らかな相関は認められなかったものの、組織学的異型度との関係では grade 1 群に比較して、grade 2 群、grade 3 群は有意

に高値であった。乳癌¹⁵⁾、悪性リンパ腫¹⁶⁾、血管周囲細胞腫¹⁷⁾等の検討において、組織学的異型度が高い症例ほど、PCNA 陽性率も有意に高値を示したと報告されている。このことは、PCNA 陽性率が癌の悪性度を測る客観的指標として応用できる可能性が示唆されている。

再発率と PCNA 陽性率との関係では、PCNA 陽性率高値群は、低値群に比較して、有意に再発率が高かったことから、表在性膀胱癌において、PCNA 陽性率は再発の推測因子となりうる可能性が示唆された。

なお、grade 2 (n=27) 症例についても、再発率と PCNA 陽性率との関係を検討したところ、PCNA 陽性率が高率の群では再発率が高いものの有意差は認められなかった (P=0.271)。

今回の検討では、pTa 群と pT1 群の間に PCNA の発現率には有意な相関は認められなかったが、基底膜下にまで浸潤した腫瘍の予後は不良との報告もあり¹⁸⁾、基底膜周囲の癌細胞のみの PCNA 陽性率を検討すれば pTa 群と pT1 群の間に有意な差が認められるかもしれない。さらに詳細な検討を加えたい。

PCNA 陽性率と予後との関係については、Yu らの血管周囲細胞腫25例の検討では、PCNA 陽性率14%未満11例の群では全例が生存しているのに比較して14%以上の群では14例中7例が癌死しており、有意に予後が悪かったとの報告もある¹⁷⁾。今回われわれの検討では表在性癌より浸潤性癌へと移行し死亡した症例が少なく、今後、観察期間を延ばし検討したい。

以上報告したごとく、PCNA 法は通常のパラフィン包埋病理標本を用いて簡便に細胞増殖能の解析が可能でありきわめて有用な方法といえる。また、PCNA 陽性率は組織学的異型度と高い相関が認められたことから、膀胱癌の生物学的悪性度を示す新しい指標となりえると考えられた。

結 語

抗 PCNA モノクローナル抗体を用いて膀胱癌パラフィン包埋組織の免疫組織化学染色を行い、以下の結果をえた。

- 1) 全56症例において PCNA 陽性細胞を検出でき、PCNA 陽性率は平均34.0%であった。
- 2) PCNA 陽性率と腫瘍数との関係では、単発群 (n=22) の平均 24.8%に比較して、多発群 (n=34) は 40.0%と有意に高値であった ($P<0.01$)。
- 3) PCNA 陽性率と組織学的異型度との関係では、grade 1 群 (n=19) の平均15.6%に比較して grade 2 群 (n=27) は39.9%、grade 3 群 (n=10) は53.1

%と有意に高値であった ($P<0.01$)。一方、組織学的深達度と PCNA 陽性率との間には、有意な関連性は認められなかった。

4) PCNA 陽性率と再発率との関係では、PCNA 陽性率34%以上の群では、PCNA 陽性率34%未満の群に比較して有意に再発率が高かった ($P<0.05$)。

5) PCNA 陽性率は、腫瘍数、組織学的異型度と高い相関を認めることより、膀胱癌の生物学的悪性度を表す新しい指標となりえる可能性が示唆された。

本論文の要旨は第43回日本泌尿器科学会西日本総会にて報告した。また本研究の一部は文部省科学研究費、一般研究 (C) (課題番号02670709) による。検体の整理にご援助いただいた研究室の升田千代子嬢に感謝します。

文 献

- 1) 島袋智之, 山本光孝, 三井 博, ほか: In vitro BrdU 標識法と抗 BrdU 抗体を用いた尿路性器腫瘍の細胞動態学的研究. 泌尿紀要 35: 1285-1290, 1989
- 2) Hoshino T, Nagashima T, Murovic J, et al.: Cell kinetic studies of in situ human brain tumors with bromodeoxyuridine. Cytometry 6: 627-632, 1985
- 3) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 31: 13-20, 1983
- 4) Miyachi K, Fritzler MJ and Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 121: 2228-2234, 1978
- 5) Bravo R, Flank R, Blundell PA, et al.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . Nature 326: 515-517, 1987
- 6) Robbins BA, Vega D, Ogata K, et al.: Immunohistological detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 111: 841-845, 1987
- 7) 田中一成: 抗 PCNA 抗体による増殖細胞核の染色 —パラフィン切片への応用—. 病理と臨 9: 791-798, 1991
- 8) 島袋智之, 和田 尚, 升田千代子, ほか: 抗 PCNA 抗体を用いた増殖細胞検出法の基礎的検討. Cytometry Res 2: 18-23, 1992
- 9) Takasaki K, Deng JS and Tan EM: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation. J Exp Med 154: 1899-1909, 1981
- 10) Lee SH, Ishimi Y, Kenny MK, et al.: An inhibitor of the in vitro elongation reaction

- of simian virus 40 DNA replication is overcome by proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 9469-9473, 1988
- 11) Bravo R and Bravo HM: Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* **105**: 1549-1554, 1987
 - 12) 守内哲也, 和泉伸一 : PCNA (DNA ポリメラーゼ δ 補助蛋白質). *細胞* **21** : 27-31, 1989
 - 13) Tachibana M, Deguchi N, Jitsukawa S, et al.: Quantification of cell kinetic characteristics using flow cytometric measurements of deoxyribonucleic acid and bromodeoxyuridine for bladder cancer. *J Urol* **145**: 963-967, 1991
 - 14) Jain S, Filipe MI, Hall PA, et al.: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* **44**: 655-659, 1991
 - 15) Dawson AE, Norton JA and Weinberg DS: Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* **136**: 1115-1124, 1990
 - 16) Kamel OW, Lebrun DP, Davis RE, et al.: Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/Cyclin 19A2. *Am J Pathol* **138**: 1471-1477, 1991
 - 17) Yu CC, Hall PA, Fletcher CD, et al.: Haemangiopericytomas: the prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Histopathology* **19**: 29-33, 1991
 - 18) Anderstrom C, Johansson S and Nilsson S: The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumors. *J Urol* **124**: 23-26, 1980

(Received on October 8, 1992)
(Accepted on December 18, 1992)