

## 膀胱移行上皮癌における PCNA/cyclin, p53, C-erbB-2 の 発現と組織学的悪性度に関する検討

昭和大学藤が丘病院泌尿器科 (主任: 甲斐祥生教授)

吉川 裕康, 池内 隆夫, 井口 宏

小野寺 恭忠, 甲斐 祥生

### EXPRESSION OF PCNA/CYCLIN, p53, C-erbB-2 VERSUS HISTOLOGICAL GRADE IN TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF URINARY BLADDER

Hiroyasu Yoshikawa, Takao Ikeuchi, Hiroshi Iguchi,  
Yasutada Onodera and Yoshio Kai

*From the Department of Urology, Showa University Fujigaoka Hospital*

It is important to know the proliferating ability and the malignant potential of tumor tissues. We have examined the expression of PCNA/cyclin, p53 and C-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder by an immunohistochemical method, and compared the results with the histological grade, stage and survival rate. Immunohistochemical studies, using monoclonal and polyclonal antibodies, on these proteins were performed with formaline fixed-paraffin sections of tumor tissue from 40 patients with bladder cancer.

Generally, a higher grade and higher stage tumors expressed PCNA/cyclin, p53 and C-erbB-2 with a greater frequency than the tumors with a lower grade and lower stage and strongly stained cases had a lower survival rate than weakly stained cases. These findings suggest that the detection of each antigen is useful for estimating the malignant potential of transitional cell carcinoma as the adjuvant studies, because of its applicability to paraffin-embedded tissue sections and its simple, rapid technique.

(Acta Urol. Jpn. 41: 253-258, 1995)

**Key words:** Transitional cell carcinoma, PCNA/cyclin, p53, C-erbB-2, Immunohistochemical method

#### 緒 言

近年, 免疫組織化学的染色法の手技の発達により, 数多くの癌遺伝子関連物質が発見されており, 腫瘍の悪性度や malignant potential および予後との相関について報告がなされている。しかしながら, ほとんどの癌遺伝子関連物質は検出に新鮮凍結標本を必要とし, 臨床検査として応用するには困難があるばかりでなく, retrospective な検討は不可能である。そこでわれわれはホルマリン固定パラフィン包埋標本からも抗原の検出が可能とされる PCNA/cyclin および p-53, C-erbB-2 の各抗体を用いて, ホルマリン固定パラフィン包埋された膀胱移行上皮癌組織における各抗体の発現と悪性度 (grade)・深達度 (stage)・生存率

とを比較し, それぞれの抗体の臨床的有用性について検討を行った。

#### 対 象 と 方 法

##### I 対象

膀胱移行上皮癌 40 例 (grade は G1; 13例, G2; 13例, G3; 14例. stage は pT1 以下; 21例, pT2 以上; 19例) とコントロール群として正常膀胱移行上皮 15 例を対象とした。膀胱移行上皮癌 40 例の年齢は 30 ~ 82 歳 (平均 61.7 ± 14.5 歳) で, 性別は男性; 33 例, 女性 7 例であった。治療法は G1 および G2 症例では全例で TUR-Bt が施行され, G3 症例では全例で根治的膀胱全摘出術が施行された。検体の抽出にあたっては初発症例で, 検体採取前に化学療法や放射線療

法などを受けておらず、病理組織学的検討 (hematoxylin-eosin 染色) で扁平上皮化生など他の組織型は混在しない症例を選択した。また、対象とした組織標本はホルマリン固定条件を一定化するため、術前の膀胱鏡下腫瘍生検組織を使用した。なお、grade・stage は膀胱癌取り扱い規約<sup>9)</sup>に基づいて判定した。

## II. 免疫組織化学染色

10%非緩衝ホルマリン固定パラフィン切片を用い切片を型のごとく脱パラフィンし、0.3%  $H_2O_2$  加メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼを除去した。ついで二次抗体と同種非免疫血清を用い非特異反応をブロックした。一次抗体には抗 PCNA/cyclin マウスモノクローナル抗体 (NOVOCASTRA 社製; PC10; 200倍希釈・4°C・18時間)、抗 p53 ウサギポリクローナル抗体 (NOVOCASTRA 社製; CMI; 10,000倍希釈・4°C・18時間)、抗 C-erbB-2 ウサギポリクローナル抗体 (DAKO 社製; A485; 200倍希釈・4°C・18時間) を用い、PCNA/cyclin, p53 は酵素抗体法 (labelled streptavidin-biotin 法; LSAB 法)、C-erbB-2 は間接法にて検出した。なお、発色は 3,3'-diaminobenzidine, tetra-hydrochloride (DAB 基質液) を用い、核染色は 2.5% メチルグリーンにて行った。

判定方法は、PCNA/cyclin と p53 の labelling index (LI; %) では、まず光学顕微鏡弱拡大 (100倍) にて標本全体を観察し、染色性が最も平均的な視野を選択して、強拡大 (400倍) にて約1,000個の細胞を対象に算出した。C-erbB-2 染色では細胞膜周囲が明らかに染色されるものを陽性と判定した。

## III. 検討方法

全症例における各抗体の発現 (PCNA/cyclin, p53 は LI, C-erbB-2 は陽性検体数) と grade・stage・生存率との関係について検討を行った。また、各抗体

間の相関性についても検討を行った。なお、有意差検定には Chi-square test, Wilcoxon test, Kruskal-Wallis test, Student t-test を用い、5% の棄却率をもって有意差とした。

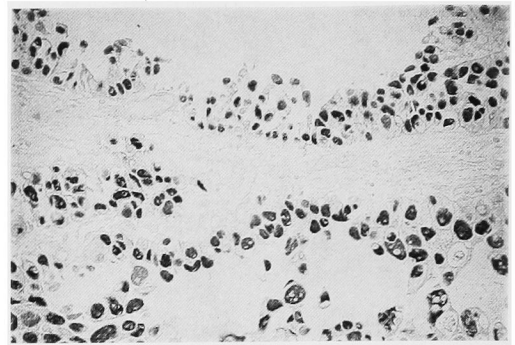


Fig. 2. Transitional cell carcinoma of the bladder (grade 3, pT3) in which many of the nuclei are positive for p53 staining ( $\times 200$ ).

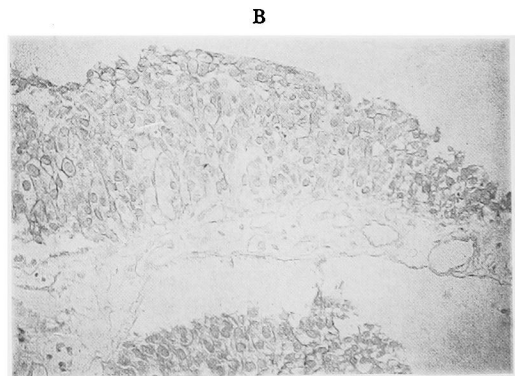
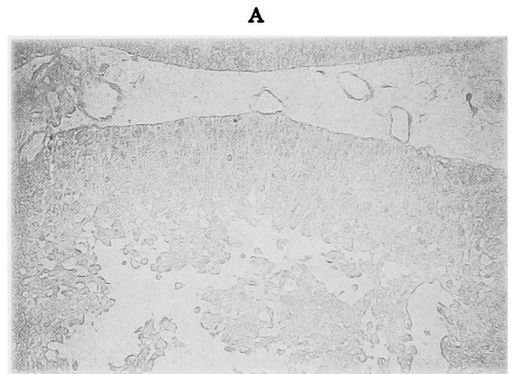


Fig. 3. Immunohistochemical staining for C-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the bladder. A: The tumor cells show no staining for the C-erbB-2 (grade 1, pT1,  $\times 200$ ). B: The tumor cells show strong staining for the C-erbB-2 (grade 3, pT3,  $\times 200$ ).

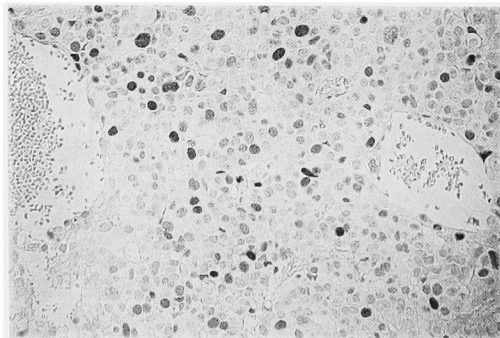


Fig. 1. Transitional cell carcinoma of the bladder (grade 3, pT3) in which many of the nuclei are positive for PCNA/cyclin staining ( $\times 200$ ).

## 結 果

## I. PCNA/cyclin 染色

PCNA/cyclin 染色は細胞核内に限局しており (Fig. 1), 膀胱移行上皮癌40例全例 (100%) で陽性細胞が検出され, 全体の LI の平均は  $40.5 \pm 4.7\%$  (mean  $\pm$  SD) であった. 正常膀胱移行上皮では15例中4例 (26.7%) に陽性細胞が検出され, 陽性群の LI の平均は  $2.5 \pm 4.4\%$  であり, 移行上皮癌群に比して明らかに低値であった ( $p < 0.01$ ).

## II. p53 染色

p53 染色も同様に細胞核内に限局し (Fig. 2), 膀胱移行上皮癌40例中29例 (72.5%) で陽性細胞が検出され, 40例の LI の平均は  $27.4 \pm 5.3\%$  (mean  $\pm$  SD) であった. 正常膀胱移行上皮では15例全例が染色は陰性であった.

## III. C-erbB-2 染色

C-erbB-2 染色では細胞膜周囲が染色され (Fig. 3) 移行上皮癌40例中11例 (27.5%) で陽性細胞が検出された. 正常移行上皮では p53 染色と同様に15例全例が染色は陰性であった.

## IV. 各抗体間での相関性の検討

PCNA/cyclin と p53 の LI の相関性を student T-test にて検定したが, 両抗体間での染色性には相関性は認められなかった. また, PCNA/cyclin の LI は C-erbB-2 陽性群では  $45.8 \pm 9.0\%$  で, 陰性群では  $38.5 \pm 5.5\%$  (Wilcoxon test; N.S.) であり, p53 の LI は陽性群では  $31.5 \pm 9.3\%$  で, 陰性群では  $25.8 \pm 6.4\%$  (Wilcoxon test; N.S.) であり, PCNA/cyclin, p53, C-erbB-2 の三者での発現の間には相関性は認められなかった.

Table 1. Labelling index values for PCNA/cyclin staining

| <Grade>                         |        |                     |
|---------------------------------|--------|---------------------|
| Grade                           | Number | Labelling index (%) |
| G1                              | 13     | $15.4 \pm 4.4$      |
| G2                              | 13     | $40.8 \pm 6.2$      |
| G3                              | 14     | $63.6 \pm 7.3$      |
| (mean $\pm$ SD)                 |        |                     |
| Kruskal-Wallis test; $p < 0.01$ |        |                     |
| <Stage>                         |        |                     |
| Stage                           | Number | Labelling index (%) |
| pT1 $\geq$                      | 21     | $24.1 \pm 4.7$      |
| pT2 $\leq$                      | 19     | $58.6 \pm 6.2$      |
| (mean $\pm$ SD)                 |        |                     |
| Wilcoxon test; $p < 0.01$       |        |                     |

## V. 各抗体の発現と組織学的悪性度・進達度との関係

Grade および stage と PCNA/cyclin の発現 (Table 1) との関係では, 両者とも相関が認められ, Grade や Stage の高い組織ほど LI は高値を示していた ( $p < 0.01$ ). 同様に, p53 の発現 (Table 2) との関係でも, grade や stage の高い組織ほど LI は増加を認めた ( $0.02 < p < 0.05$ ). C-erbB-2 の発現 (Table 3) でも grade や stage の高い組織ほど陽性となる割合が増加していた ( $p < 0.01$ ).

## VI. 各抗体の発現と生存率 (予後) との関係

PCNA/cyclin の染色性が予後と関係するかを検討する方法の一つとして PCNA/cyclin 染色の LI が平均値 (40.5%) 以上を A 群 (18例), 平均値未満を B 群 (22例) とし, A 群と B 群での生存率を Kaplan-

Table 2. Labelling index values for p53 staining

| <Grade>                                |        |                     |
|----------------------------------------|--------|---------------------|
| Grade                                  | Number | Labelling index (%) |
| G1                                     | 13     | $9.8 \pm 4.4$       |
| G2                                     | 13     | $18.4 \pm 5.2$      |
| G3                                     | 14     | $52.0 \pm 11.0$     |
| (mean $\pm$ SD)                        |        |                     |
| Kruskal-Wallis test; $0.02 < p < 0.05$ |        |                     |
| <Stage>                                |        |                     |
| Stage                                  | Number | Labelling index (%) |
| pT1 $\geq$                             | 21     | $13.7 \pm 3.8$      |
| pT2 $\leq$                             | 19     | $42.5 \pm 9.2$      |
| (mean $\pm$ SD)                        |        |                     |
| Wilcoxon test; $0.02 < p < 0.05$       |        |                     |

Table 3. Relationship between pathological finding and C-erbB-2 staining

| <Grade>                     |                   |     |                   |
|-----------------------------|-------------------|-----|-------------------|
| Grade                       | C-erbB-2 staining |     | Positive rate (%) |
|                             | (+)               | (-) |                   |
| G1                          | 0                 | 13  | 0%                |
| G2                          | 2                 | 11  | 15.4%             |
| G3                          | 9                 | 5   | 64.3%             |
| Total                       | 11                | 29  | 27.5%             |
| Chi-Square test; $p < 0.01$ |                   |     |                   |
| <Stage>                     |                   |     |                   |
| Stage                       | C-erbB-2 staining |     | Positive rate (%) |
|                             | (+)               | (-) |                   |
| pT1 $\geq$                  | 1                 | 20  | 4.8%              |
| pT2 $\leq$                  | 10                | 9   | 52.6%             |
| Total                       | 11                | 29  | 27.5%             |
| Chi-Square test; $p < 0.01$ |                   |     |                   |

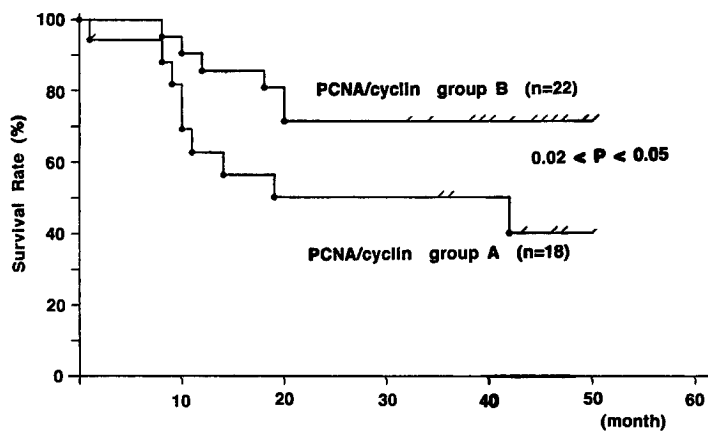


Fig. 4. Survival rate according to the degree of PCNA/cyclin staining (group A: LI $\geq$ 40.5%, group B: LI<40.5%).

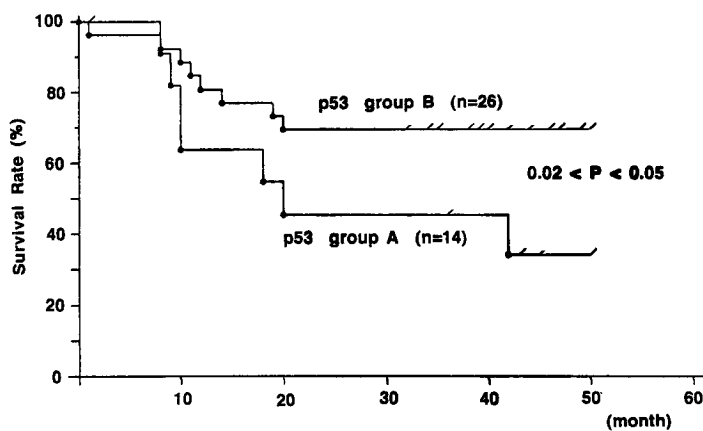


Fig. 5. Survival rate according to the degree of p 53 staining (group A: LI $\geq$ 27.4%, group B: LI<27.4%).

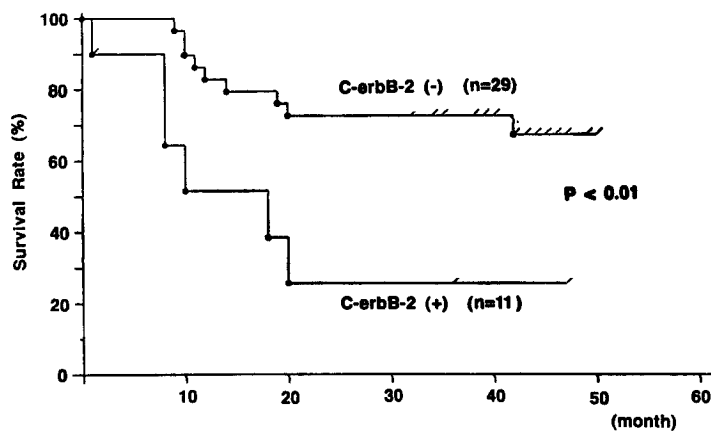


Fig. 6. Survival rate according to the degree of C-erbB-2 staining.

Meier 法にて比較検討した (Fig. 4). 50ヵ月後の生存率はA群で44.4%, B群で72.7%であり, PCNA/cyclin 染色陽性率の高い群で生存率は低下を認めた ( $0.02 < p < 0.05$ ).

p53 染色も同様に LI が平均値 (27.4%) 以上をA群 (14例), 平均値未満をB群 (26例) とし, A群とB群での生存率を比較検討した (Fig. 5). 50ヵ月後の生存率はA群で35.7%, B群で69.2%であり, p53 染色陽性率の高い群で生存率は低下を認めた ( $0.02 < p < 0.05$ ).

C-erbB-2 染色陽性群 (11例) と陰性群 (29例) での生存率を比較 (Fig. 6) すると, 50ヵ月後の生存率は陽性群27.3%, 陰性群69.0%であり, C-erbB-2 染色陽性群で生存率は低下を認めた ( $p < 0.01$ ).

Stage が予後と密接に関与することも考慮し, pT1  $\geq$  群 (21例; 生存率90.5%) と pT2  $\leq$  群 (19例; 生存率26.3%) ( $p < 0.01$ ) に分けて50ヵ月後の生存率を検討すると, PCNA/cyclin 染色において pT1  $\geq$  群では平均値 (24.1%) 以上群 (11例) で90.9%, 平均値未満群 (10例) で90.0%であり, pT2  $\leq$  群では平均値 (58.6%) 以上群 (10例) で20.0%, 平均値未満群 (9例) で33.3%であり, 明らかな差は認められなかった. p53 染色においては pT1  $\geq$  群では平均値 (13.7%) 以上群 (8例) で87.5%, 平均値未満群 (13例) で92.3%であり, pT2  $\leq$  群では平均値 (42.5%) 以上群 (9例) で33.3%, 平均値未満群 (10例) で20.0%で, 有意差は認めなかった. C-erbB-2 染色においては pT1  $\geq$  群では陽性群 (1例) で100%, 陰性群 (20例) で90.0%, pT2  $\leq$  群では陽性群 (10例) で30.0%, 陰性群 (9例) で22.2%であり, 有意差は認めなかった.

## 考 察

膀胱移行上皮癌の予後決定因子に関しては数多くの報告があるが, いまだに grade や stage を上回る因子は指摘されていない. しかしながら, その中では補助的な手段として最近免疫組織化学的染色法が注目されており, 細胞構成要素や細胞間隙物質などを同定することで, 悪性度や malignant potential, さらに予後の判定に利用されてきている.

現在, 膀胱移行上皮癌の grade と相関するといわれている癌遺伝子関連物質として EGFR, C-erbB-2, p53, ras, c-myc などが, また細胞増殖因子として Ki-67, PCNA/cyclin, BrdU, AgNOR などが報告<sup>2)</sup>されている. しかし, そのほとんどは検出のためには新鮮凍結標本が必要であり, 臨床応用上での

障害となっている. 最近では, PCNA/cyclin および p53, C-erbB-2 はパラフィン包埋標本からもその検出が可能となってきたので, 膀胱癌での臨床応用の可能性を検討する目的で, 各抗体を用いて膀胱移行上皮癌を染色し, grade と stage および生存率との関係を比較検討した.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は1978年に Miyachi ら<sup>3)</sup> によりはじめて報告され, DNA polimerase- $\delta$  の補助蛋白質で<sup>4)</sup> 分子量 36kd の酸性核蛋白であること<sup>5)</sup> も明らかにされており, 最近では PCNA/cyclin と称するのが一般的である. G1 後期からS期にかけて合成され, 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<sup>6)</sup> が, 鈴木ら<sup>7)</sup> は陽性細胞の DNA ploidy マッピングの結果から, PCNA の発現そのものは増殖細胞の大半をマークしていると述べている. あくまでも増殖因子であることから, 正常膀胱移行上皮でも染色陽性細胞は認められる. 和田ら<sup>8)</sup>, 吉川ら<sup>9)</sup> も膀胱移行上皮癌での免疫染色を施行して grade・stage との比較検討を行っているが, 今回われわれもほぼ同様の結果をえている.

p53 癌抑制遺伝子は染色体 17p に位置しており, 核内に存在し細胞増殖を制御している分子量 53kd の蛋白質をコードしている<sup>10)</sup> 一対の相同染色体上での一方の遺伝子の欠失とともに, 残存する対立遺伝子の点突然変異が起こり変異型 p53 の出現が生じる. この変異型 p53 が癌抑制として作用している正常型 p53 遺伝子を不活化させることにより, 発癌が生じるといわれている<sup>11)</sup>. 膀胱腫瘍における p53 の発現についての報告は数少なく, そのほとんどが DNA の解析を用いた点突然変異と grade・stage との相関を報告している<sup>12,13)</sup>. ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学的な検討は, われわれが調べたかぎりでは消化器癌において散見される<sup>14)</sup> のみで, 膀胱癌での報告は認められなかった. 今回の免疫組織化学的手法による検討においても grade・stage・生存率との相関がえられたことから, 膀胱癌においても検討が可能であると思われた.

C-erbB-2 遺伝子はラット神経芽細胞腫の癌遺伝子 neu に対する protooncogene で, その遺伝子産物は分子量 185,000 の糖蛋白であり<sup>15)</sup>, 顎下腺癌組織での増幅<sup>16)</sup> が報告されて以来, 各種腺癌組織での増幅が報告されている. 膀胱癌では Coombs ら<sup>17)</sup> が本遺伝子の増幅と腫瘍悪性度や再発率との間に相関があることを報告し, さらに遺伝子産物の発現亢進は遺伝子増殖に先行して認められたことから, 免疫組織化学的検索

の臨床的有用性を示唆している。木村ら<sup>18)</sup>は移行上皮癌の新鮮凍結切片37例を用い、C-erbB-2の発現を検討し、G2で50%、G3で71%の症例に発現が認められ、G3の方がG2よりも発現頻度が高く、浸潤度の高いものや膀胱癌では再発例に発現が多くみられたと報告している。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた今回の検討でも木村らの報告と同様の結論であったことから、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いても同様な検討が可能であることが示唆された。

膀胱移行上皮癌でのホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた grade と遺伝子関連物質との免疫組織化学的な比較検討はまだ少なく、PCNA/cyclin において最近数編の論文が散見されるのみで、p53やC-erbB-2についてはいまだに稀少である。

通常ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた今回の検討でも各抗体の陽性率は grade や stage および生存率とも相関を認めている。しかしながら、生存率では stage 群別に分けてさらに検討を行ったところ、染色性による差は認められなかった。生存曲線の比較は単に stage との比較をしているにすぎない可能性があるが、それだけ Stage と密接に相関していることを考えるならば、免疫組織化学的手法により迅速かつ簡便に測定できることから、PCNA/cyclin, p53, C-erbB-2 の染色は膀胱癌の生物学的悪性度を示す新しい補助的な指標として期待できるものと思われる。

稿を終えるにあたり、研究に御協力いただいた昭和大学藤が丘病院組織化学研究室の鈴木孝夫、岸本浩次、家泉桂一の諸氏に深く感謝いたします。なお、本論文の要旨は第30回日本癌治療学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編 泌尿器科・病理膀胱癌取り扱い規約, 第一版, 金原出版, 東京, 1980
- 2) 藍沢茂雄, 古里征国, 菊地 泰: 泌尿器疾患における免疫染色の意義. 臨泌 46: 97-107, 1992
- 3) Miyachi K, Fritzler MJ and Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 121: 2228-2234, 1978
- 4) Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . Nature 326: 515-517, 1987
- 5) Takasaki Y, Deng JS and Tan EM: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. J Exp Med 154: 1899-1909, 1981
- 6) 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
- 7) 鈴木孝夫, 岸本浩次, 家泉桂一, ほか: 増殖細胞核抗原 (PCNA) の基礎的検討. 臨検 36: 81-84, 1992
- 8) 和田 尚, 島袋智之, 栗栖弘明, ほか: 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〜. 泌尿紀要 39: 313-319, 1993
- 9) 古川正隆: 膀胱癌, 膀胱全摘標本における PCNA 発現に関する免疫組織学的検討とその臨床的意義. 西日泌尿 55: 681-687, 1993
- 10) Finlay CA, Hinds PW and Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 57: 1083-1093, 1989
- 11) Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al.: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. Cancer Res 50: 7717-7722, 1990
- 12) Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, et al.: Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. Cancer Res 52: 1393-1398, 1992
- 13) Miyamoto H, Kubota Y, Shuin T, et al.: Analyses of p53 gene mutations in primary human bladder cancer. Oncol Res 5: 245-249, 1993
- 14) 西村和彦: ヒト大腸癌の発生と進展に伴う細胞増殖の変化と p21ras および p53 の発現について. 京府医大誌 102: 597-610, 1993
- 15) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, et al.: Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 319: 230-234, 1986
- 16) Semba K, Kamata N, Toyoshima K, et al.: A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 82: 6497-6501, 1985
- 17) Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, et al.: Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Br J Cancer 63: 601-608, 1991
- 18) 木村元彦, 富田善彦, 西山 勉, ほか: 尿路移行上皮癌における epidermal growth factor receptor および c-erbB-2 product の発現. 日癌治療誌 27: 1132-1138, 1992

(Received on September 7, 1994)

(Accepted on January 24, 1995)

(迅速掲載)