

## Ras p21の発現と DNA ploidy からみた大腸癌の検討

東邦大学第1外科, \*同 第2病理

船橋 公彦 辻田 和紀 辻本 志朗\*  
渡辺 正志 永澤 康滋 大谷 忠久  
小林 一雄 柳田 謙蔵 吉雄 敏文

大腸癌103例について DNA ploidy pattern と免疫組織学的に ras p21の発現を検索し、病理学的所見および予後との関係について検討を行った。Ras p21の陽性率は癌の進行に伴い増加し、大腸癌の進展に ras p21の関与が考えられた。Ras p21の発現と DNA ploidy pattern との間に相関は認められなかった。Ras p21陽性で aneuploidy の癌は、ras p21陰性で diploidy の癌に比べ壁深達度、リンパ節転移およびリンパ管侵襲所見において進行した症例が多かった ( $p < 0.05$ )。予後の検討では、aneuploidy の癌は diploidy の癌に比べ予後不良で ( $p < 0.01$ )、予後判定に DNA ploidy の検索が有用と考えられた。また同じ DNA ploidy の癌でも ras p21の発現によって予後が異なり、ras p21の発現が大腸癌の予後の良悪を示す指標の1つになりうる可能性が示唆された。

**Key words:** ras p21 expression, DNA ploidy pattern, colorectal cancer

### はじめに

ラットに肉腫をおこすレトロウイルスの癌遺伝子として発見された ras 癌遺伝子は、細胞の分化や増殖に関与する癌遺伝子として注目をあつめてきた<sup>1)2)</sup>。そしてその後の研究で、現在ではヒト癌細胞の癌化 (initiation) に深く関与している可能性が高いと考えられている<sup>3)4)</sup>。しかし甲状腺では転移を起こしやすい濾胞状腺癌の方が、転移を起こしにくい乳頭腺癌より高頻度に ras 癌遺伝子の活性化が認められたと報告されており、癌の転移能との関係も示唆される<sup>5)</sup>。

大腸については、大腸腫瘍の発生過程での関与とは別に、進行が高度で遠隔転移率も高く予後不良であった大腸癌に ras p21の発現が高かったとの報告もあり、ras p21が大腸癌の進展に関与している可能性が考えられる<sup>6)~8)</sup>。

今回著者は、ras p21モノクローナル抗体を1次抗体に使用して免疫組織学的に ras p21の発現を検索するとともに、同一検体の核 DNA 量を測定した。そして DNA ploidy pattern と ras p21の発現との関係、両者からみた病理学的所見および予後との関係について検討を行った結果、大腸癌の進展における ras p21発現の意義について、二、三の知見をうることができたので

報告する。

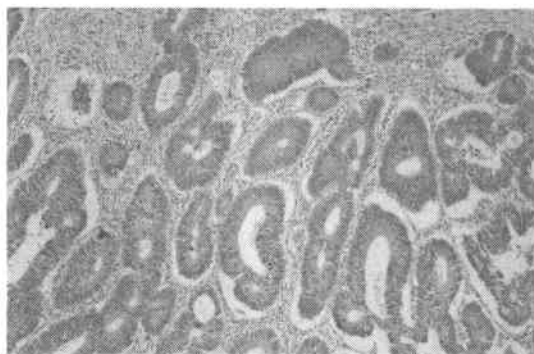
### 研究対象および方法

対象は Turnbull ら<sup>9)</sup>による病期分類で、stage A 12例、B 32例、C 32例、D 27例の計103例であった。方法は、手術摘出標本のパラフィン包埋ブロックより4  $\mu\text{m}$  と50  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、前者を ras p21の免疫組織染色に、後者を核 DNA 量の測定に使用した。Ras p21の免疫組織染色手順は、1次抗体に ras p21モノクローナル抗体を使用して avidin biotin complex (ABC) 法でおこなった (Fig. 1)。判定は癌部を視野として40倍で検鏡し、半分以上染色されているものを陽性とした (Fig. 2)。また核 DNA 量の測定については、Hedley ら<sup>10)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、50  $\mu\text{m}$  のパラフィン包埋切片を xylene にて脱パラ後、100%、95%、70%の ethanol 系列で親水化した。蒸留水で洗浄後、0.5% pepsin 液にて37°Cで90分処理し、細胞単離、裸核化を行った。蒸留水による洗浄と遠沈を繰り返し、1mg/ml RNase を加えて37°C30分処理した後、遠沈し上清を捨て50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の propidium iodide にて30分蛍光染色した。これらの試料を40  $\mu\text{m}$  の nylon mesh で濾過し、flow cytometer (Becton Dickinson 社 FACStar) にて1検体につき  $1.5 \times 10^6$  個の核 DNA 相対量を測定し、ヒストグラムを作製した。内部標準には検体中に含まれる間質のリンパ球をとり、単一の  $G_0G_1$  peak からなるものを diploidy、それ以外を

**Fig. 1** Procedure of immunohistological staining with anti-ras p21 monoclonal antibody

- ① mount 4 $\mu$ m thick paraffin section on the slide glass.
- ② deparaffinize the sections in xylene.
- ③ place the sections in 100%, 95%, 75% ethanol in the order and wash in distilled water.
- ④ for blocking endogenous peroxidase activity, place the sections in 50% ethanol containing 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ⑤ washing in tris buffer.
- ⑥ incubate the sections with a 1:50 dilution of anti-ras p21 monoclonal antibody (MCC-RAS-001) for 48hrs at 4 $^{\circ}$ C.
- ⑦ washing in tris buffer.
- ⑧ incubate the sections with biotinylated antimouse IgG for 24hrs at 4 $^{\circ}$ C.
- ⑨ the sections are treated with ABC for a hour at room temperature.
- ⑩ the sections are treated for 3 minutes with 0.1% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride.
- ⑪ washing in water.
- ⑫ counterstain with hematoxylin for nuclei.

**Fig. 2** Colorectal cancer cells which are reactive immunohistologically with anti-ras p21 monoclonal antibody ( $\times 100$ )



aneuploidy とし, peak 値の比を DNA index (D.I.) とした. なお coefficient of variation (CV) 値が 8 以下を検討対象とした (**Fig. 3**). 病理学的所見および予後との関係については, ras p21発現の有無と DNA ploidy pattern から下記の 4 群に分けて検討も行った.

- I 群 : ras p21陽性で aneuploidy
- II 群 : ras p21陽性で diploidy

III 群 : ras p21陰性で aneuploidy  
 IV 群 : ras p21陰性で diploidy  
 統計学的検定には  $\chi^2$ 検定を用い, 生存曲線は Kaplan-Meier 法にて求め, generalized Wilcoxon 法にて生存率の検定を行った.

#### 成績

##### (1) ras p21の発現と DNA ploidy pattern

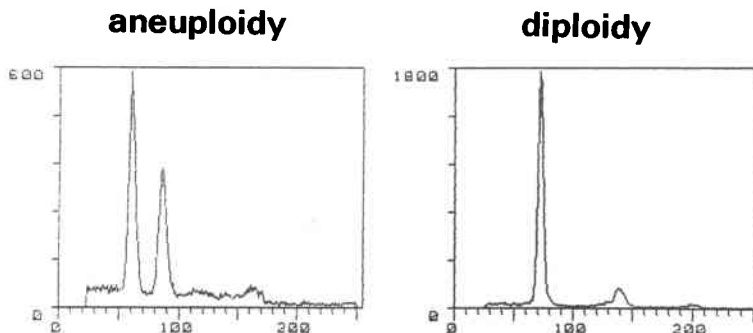
Ras p21の発現は癌部を中心とした細胞質に染色され, その陽性率は51.5% (53/103) であった. 一方, DNA ploidy は103例中の70例 (68.0%) に aneuploidy が認められ, 33例 (32.0%) が diploidy であった (**Fig. 2**).

Aneuploidy 癌における ras p21の発現は, ras p21陽性が34例, 陰性が36例で, DNA ploidy pattern によって ras p21の発現に差は認められなかった. また D.I. の平均値は, それぞれ1.472 $\pm$ 0.231, 1.374 $\pm$ 0.232で, D.I. 値にも ras p21の発現で差はなかった (**Table 1**).

さらに対象を ras p21の発現と DNA ploidy pattern から I ~ IV群に分類したところ, **Table 2**のごとく I 群34例, II群19例, III群: 36例, IV群14例で各群の症例数に差はなかった.

##### (2) 病理学的所見との関係

**Fig. 3** DNA ploidy pattern



**Table 1** Relationship between ras p21 expression and DNA ploidy pattern

	Aneuploidy			Diploidy		total
	No.	%	D.I.	No.	%	
ras p21 positive	34	64.2*	1.472±0.231 <sup>+</sup>	19	35.8	53
ras p21 negative	36	72.0**	1.374±0.232 <sup>++</sup>	16	28.0	50

\*vs\*\* : not significant

<sup>+</sup>vs<sup>++</sup> : not significant**Table 2** Classification into I~IV groups by ras p21 expression and DNA ploidy pattern

	No.
group I : ras p21 positive and aneuploidy	34
II : ras p21 positive and diploidy	19
III : ras p21 negative and aneuploidy	36
IV : ras p21 negative and diploidy	14

大腸癌の臨床病理学的所見は、大腸癌取扱い規約<sup>11)</sup>に従って記載した。壁深達度については深達度がpm以下とss(a<sub>1</sub>)以上とに大別して、前述のI~IV群の分類にしたがって検討を行った。I群とIV群の2群間において、壁深達度とリンパ節転移およびリンパ管侵襲でそれぞれ有意差を認めた(p<0.05)。さらに壁深達度では、II群とIV群間でも差を認め(p<0.05)、リンパ節転移はras p21陰性のIII群に比べ、ras p21陽性のI群に多い傾向にあった。組織型は、高分化腺癌60/103例(58.3%)、中分化腺癌34/103例(33.0%)でムチン産生癌や印環細胞癌は少なく、組織型によりras p21やDNA ploidy patternに差はなかった。また病期分類との関係では、対象をstage A+Bとstage C+Dにわけて検討をおこなったところ、I群とIII群、I群とIV群の間でそれぞれに有意差を認め、進行大腸癌にaneuploidy癌やras p21陽性癌が多く認められた(**Table 3**)。

### (3) 予後との関連について

予後との関連については、治癒切除症例73例につき検討を行った。ras p21陽性群と陰性群の5年生存率はそれぞれ55.3%、70.2%でras p21陽性群は陰性群に比べ予後不良であったが、統計学的に差はなかった(**Fig. 4**)。これに対しDNA ploidy pattern別の5年生存率は、diploidy群の88.0%に比べaneuploidy群は50.6%と有意に低かった(p<0.01)(**Fig. 5**)。

さらにras p21の発現とDNA ploidy patternを組

合わせて分類したI~IV群の生存率は**Fig. 6**のごとくで、各群の5年生存率はIV群91.7%、II群84.6%、III群60.7%、I群35.1%の順に不良で、統計学的にI群とII群、I群とIV群、III群とIV群の間でそれぞれ有意差を認めた。

### 考 察

Ras癌遺伝子の活性化は、その他の癌遺伝子の活性化や発癌抑制遺伝子の不活化などとともに癌細胞の発癌や進展に大きく関与するものと考えられている<sup>12)</sup>。Fabrizioら<sup>7)13)</sup>のRAP-5モノクローナル抗体を使用した検討によれば、ras p21の発現は腺腫によって異なり、発現の高い腺腫ほど将来癌化の可能性が高く、ras p21の発現が大腸腺腫の悪性化を知る指標の一つとなる可能性を報告した。またさらにras p21が大腸癌の悪性度に関与している可能性を示唆するものとして、ras p21の発現の高い直腸癌は遠隔転移が多く、予後不良であったとする報告もある<sup>13)</sup>。本邦においては、中郷<sup>14)</sup>が大腸癌の最大腫瘍径、壁深達度および病期分類とras p21の陽性率が良く相関し、さらにその発現が癌細胞の進展能力の獲得の指標として大きな意味をもっているとしている。今回われわれが行った検索においても、ras p21の発現は大腸癌の進行とともに増加し、癌部を主体とした細胞質にras p21が強く染色された。また症例によっては癌の先進部分にras p21染色細胞が多く認められたものもあり興味ある知見と考えている。しかしその一方でras p21がほとんど染色されないものも見られ、癌細胞の増殖能とras p21発現の関係についてはさらに検討を要するものも思われた。

癌の核DNA量は、1983年にHedleyら<sup>10)</sup>が試料にパラフィン包埋ブロックを使用した測定方法を報告してから、各施設で簡単にその測定が行えるようになった。そして各種癌のretrospectiveな検討が重ねられて、癌における核DNA量測定の意義に関する報告も散見されるようになった。そしてこれらの報告によれば、一般にaneuploidy癌はdiploidy癌に比べ予後不

**Table 3** Pathological findings in view of ras p21 expression and DNA ploidy pattern

	group I	II	III	IV
Depth of invasion				
≤ pm	3	1	6	5
≥ ss(a <sub>1</sub> )	31(91.2)*	18(94.7)**	30(83.3)	9(64.3)***
Lymphnode metastases				
n (-)	11	11	20	10
(+)	21(65.6)+	7(38.9)	15(42.9)	4(28.6)++
unknown	2	1	1	0
Lymphatic vessel invasion				
ly (-)	6	5	12	7
(+)	27(81.8)⊗	14(73.7)	22(64.7)	7(50.0)⊗⊗
unknown	1	0	2	0
Venous invasion				
v (-)	15	6	16	8
(+)	17(53.1)	12(66.6)	17(51.5)	6(42.9)
unknown	2	1	3	0
Histological type				
wel	20(60.6)	11(57.9)	20(57.1)	9(64.3)
mod	10(30.3)	8(42.1)	13(37.2)	3(21.4)
others	3(9.1)	0	2(5.7)	2(14.3)
unknown	1	0	1	0
Stage <sup>9)</sup>				
A	1 ] 8	1 ] 9	5 ] 18	5 ] 9
B	7 ]	8 ]	13 ]	4 ]
C	13 ] 26	4 ] 10	11 ] 18	4 ] 5
D	13 ] (76.5)#	6 ] (52.6)	7 ] (50.0)##	1 ] (35.7)###
Total	34	19	36	14

Stage A: Tumor confined to the colon and its coat

B: Tumor extension into pericolic fat

C: Tumor metastasis to regional mesenteric lymphnodes

D: Tumor metastasis to liver, lung, bone, seeding of tumor, irremovable because of parietal invasion; adjacent organ invasion

\* vs \*\*\*: p<0.05

⊗ vs ⊗⊗: p<0.05

\*\* vs \*\*\*: p<0.05

# vs ##: p<0.05

+ vs ++: p<0.05

# vs ###: p<0.01

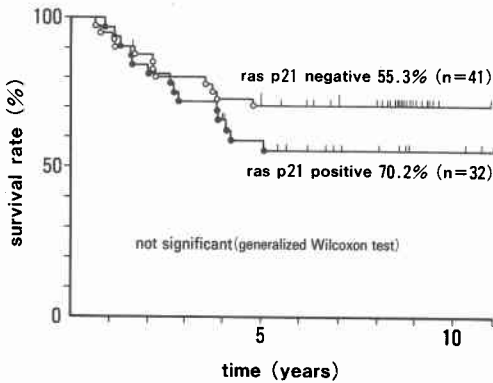
良で、予後判定の重要な因子の一つとも考えられている<sup>15)~17)</sup>。そこで今回著者は、癌の増殖能に関与すると思われる ras p21 に対して、感受性の高いモノクローナル抗体を 1 次抗体として免疫組織学的にその発現を検索し、さらに同連続切片を使用して DNA ploidy pattern の測定を行った。そして DNA ploidy pattern と ras p21 の発現との関係および両者からみた病理学的所見と予後について検討を行った。

Aneuploidy は対象の 68.0% に認められ、aneuploidy および diploidy 症例の ras p21 の陽性率はおのおの 64.2%, 72.0% であった。統計学的には ras p21 の発現と DNA ploidy pattern の両者の間に一定の関係は認められなかった。さらに DNA ploidy pattern と

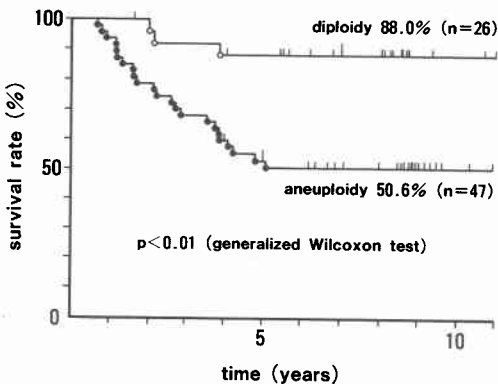
ras p21 の発現から対象を I 群—ras p21 陽性で aneuploidy, II 群—ras p21 陽性で diploidy, III 群—ras p21 陰性で aneuploidy, IV 群—ras p21 陰性で diploidy の 4 群に分類し検討を行ったところ、I 群は IV 群に比べ壁深達度とリンパ節転移所見において有意に進行した症例が多く認められた。また同じ DNA ploidy pattern を示した症例でも、ras p21 陰性に対し陽性症例で壁深達度やリンパ節転移が進んだ症例が多く認められる傾向にあり、大腸癌の生物学的悪性度の判定に ras p21 の発現の検索が意味あるものと考えられた。

予後との関係では、aneuploidy 癌は diploidy 癌に比べ有意に予後不良で、予後判定に核 DNA 量の検索が有用であることが示唆された。また ras p21 の発現の

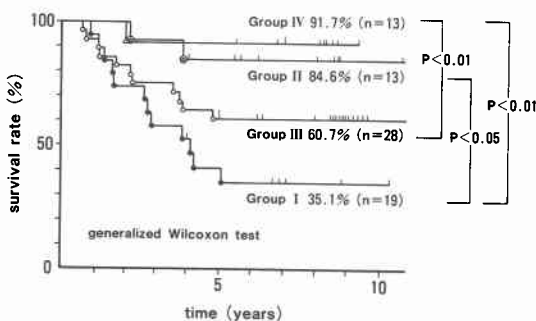
**Fig. 4** Relationship between ras p21 expression and survival rates Ras p21 negative group showed better survival rate than positive group, but there is no significance between two groups.



**Fig. 5** Relationship between DNA ploidy pattern and survival rates Diploidy group showed better survival rate than aneuploidy group, significantly ( $p < 0.01$ ).



**Fig. 6** Survival rates according to ras p21 expression and DNA ploidy pattern There are significant differences between four groups: I vs II ( $p < 0.05$ ), I vs IV ( $p < 0.01$ ) and III vs IV ( $p < 0.01$ ).



有無からの検討では、ras p21陽性癌は陰性癌に比べ予後は不良であったが、統計学的には有意差は得られなかった。さらにI～IV群に分類して予後を検討してみると、I群、III群、II群、IV群の順に予後不良で、統計学的にはI群とII群、III群とIV群、I群とIV群間で有意差を認めた。この差は主にDNA ploidyによるものが大きいと考えられたが、DNA ploidy patternが同じ症例でもras p21陽性癌は陰性癌に比べ予後不良であった。したがってras p21の発現が大腸癌の予後の推定因子になりうる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 湯浅保二: ras癌遺伝子. Bio-Medica 3: 127-132, 1988
- 2) 杉山武敏, 石川二郎: ras癌遺伝子と細胞分化. 医のあゆみ 46: 875-877, 1988
- 3) Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S et al: Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med 319: 525-532, 1988
- 4) 安藤 潔, 半田 宏: 大腸がんのがん遺伝子. 日臨 46: 137-144, 1988
- 5) Lemonie NR, Mayall ES: Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. Cancer Res 48: 4459-4463, 1988
- 6) Thor A, Hand PH, Wunderlich D et al: Monoclonal antibodies define differential ras gene expression in malignant and benign colonic disease. Nature 311: 562-565, 1984
- 7) Fabrizio M, Luca EV, Anthony M et al: Ras oncogene expression as a prognostic indicator in rectal adenocarcinoma. J Surg Res 45: 15-20, 1988
- 8) 船橋公彦, 辻田和紀, 渡辺正志ほか: Ras癌遺伝子産物からみた大腸癌の検討. 日本大腸肛門病会誌 44: 160-164, 1991
- 9) Turnbull RB, Kyle K, Watson FR et al: Cancer of colon: the influence of the notouch technic on survival rate. Ann Surg 166: 420-427, 1967
- 10) Hedley DW, Friendlander ML, Taylor IW et al: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31: 1333-1335, 1983
- 11) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 改訂第3版, 金原出版, 東京, 1983
- 12) 中村祐輔: Dr. Vagelsteinらの大腸癌における複数の癌遺伝子異常の蓄積についての研究. Oncologia 23: 134-136, 1990
- 13) Fabrizio M, Steve L, Mark L et al: Ras oncogene p21 levels parallel malignant potential

- of different human colonic benign conditions.  
Arch Surg 122 : 1414—1416, 1987
- 14) 中郷俊五: 大腸癌における ras oncogene 産物の免疫組織学的検討. 日消病会誌 87 : 2358—2365, 1990
- 15) 石川 啓, 田川 泰, 中越 享ほか: 多変量解析による大腸癌核 DNA 量の予後因子としての評価. 日消外会誌 22 : 1806—1810, 1989
- 16) 安藤善郎, 土屋敦雄, 関川浩司ほか: Flow-cytometryによる核 DNA 量からみた大腸癌の生物学的悪性度の検討. 日外会誌 90 : 1571—1575, 1989
- 17) 西森武雄, 奥野匡有, 長山正義ほか: 核 DNA 量測定による大腸癌の悪性度の検討. 日臨外医会誌 50 : 264—269, 1989

### Study of Ras p21 Expression and DNA Ploidy Pattern in Colorectal Cancer

Kimihiko Funahashi, Kazunori Tsujita, Masashi Watanabe, Yasushige Nagasawa, Tadahisa Ohgai,  
Kazuo Kobayashi, Kenzo Yanagita and Toshifumi Yoshio  
First Department of Surgery, Toho University School of Medicine  
Shiro Tsujimoto  
Second Department of Pathology, Toho University School of Medicine

We studied ras p21 expression immunohistologically and DNA ploidy in 103 colorectal cancer patients. There was no correlation between the incidence of ras p21 expression and DNA ploidy pattern. Ras p21 was detected with higher frequency in advanced colorectal cancers. In the patients with both positive ras p21 expression and DNA aneuploidy, deep invasion, lymph node metastasis and lymphatic vessel invasion was revealed more frequent than in those who were negative for both parameters ( $p < 0.05$ ). Patients with negative ras p21 expression had a better outcome than those with positive ras p21 expression in the same DNA ploidy pattern. These results suggest that the prognosis of colorectal cancer is related to the presence or absence of ras p21 expression.

**Reprint requests:** Kimihiko Funahashi First Department of Surgery, Toho University School of Medicine  
6-11-1 Omorinishi, Ota-ku, Tokyo, 143 JAPAN

---