

大腸絨毛状腫瘍成分における p53蛋白発現と Ki-67を指標とした増殖能の検討 —腺腫内癌, 進行癌と比較して—

北里大学医学部外科学教室

池永 誠 大谷 剛正 内藤 修
笹本 浩 比企 能樹 柿田 章

大腸絨毛状腫瘍成分の生物学的特性を検索する目的で, 絨毛状腫瘍成分を50%以上を有する腺腫10症例を p53蛋白発現と Ki-67標識率を指標とする増殖能の視点から, 免疫組織化学的検討を行った. 対照として大腸腺腫内癌18例, 深達度 mp 以上の進行癌39例を用いた. p53蛋白発現率は絨毛状腫瘍成分の腺腫部では0%, 癌部では20%であり, 腺腫内癌の腺腫部では33%, 癌部では61%であった. Ki-67標識率では絨毛状腺腫成分はそれぞれの癌に比べ, 有意に低く, また, 腺腫内癌の腺腫部に比べても有意に低値であった. それに反し, 絨毛状癌成分では腺腫内癌の癌部とほぼ類似していた. 絨毛状腺腫成分は p53蛋白発現と Ki-67標識率の視点からは, 腺腫内癌の腺腫部に比べ, より低悪性度と推定され, 癌成分では, p53蛋白に関しては, 腺腫内癌の癌部よりは低悪性度であるが, Ki-67標識率に関しては腺腫内癌の癌部に類似するものと考えられた.

Key words: villous tumor, p53, Ki-67

緒 言

大腸絨毛状腫瘍は水平方向への増殖傾向が強く, その肉眼形態は主としてカーペット状を呈し, 孤立性に大きくなる傾向があり, また, 組織学的にも狭い間質を軸として異型上皮が絨毛状に伸長する特徴がある. 本腫瘍は悪性度が高いとされ, その癌化率は組織学的診断基準の相違により施設間でさまざまではあるが, 21~89.2%^{1)~3)}とされている. 一般に癌化率と大きさは相関するといわれている²⁾⁴⁾. しかしながら1980年および1977年の論文で, Yamagiwa ら⁴⁾, Muto ら⁵⁾は腺腫の大きさをそろえれば, 癌化率は同じであると述べている. さらに, 柳沢ら⁶⁾は絨毛状腺腫に癌合併率が高いのは大きさの因子が強く働いているためであり, 大きさをそろえると絨毛状腺腫よりむしろ腺管状腺腫のほうが癌化率が高いと述べている.

今回, われわれは絨毛状腫瘍成分を腺腫成分と癌成分に分け, 腺腫内癌の腺腫部と癌部, さらに進行癌とを細胞増殖能の指標となる Ki-67⁷⁾と癌遺伝子としての

作用の観点から, p-53蛋白⁸⁾⁹⁾に対する免疫組織化学的検索を行い絨毛状腫瘍の生物学的特性を検討し, 興味ある結果が得られたので報告する.

I. 研究の対象と方法

1. 対象

1988年より1992年まで北里大学東病院にて手術的あるいは内視鏡的に切除され, 病理組織学的に絨毛状腫瘍成分を50%以上有する腺腫(以下, 絨毛状腫瘍成分と略記)10症例, 15病変(Fig. 1, 2, 3, 4)と癌の占拠率が30%以下の大腸の腺腫内癌18例(Fig. 5, 6), 深達度 mp 以上の大腸進行癌39例を検索対象とした. 絨毛状腫瘍成分の内訳は絨毛状腺腫6病変, 腺管絨毛腺腫4病変および絨毛状癌5病変であった. また, 腺腫内癌の腺腫の異型度はすべて中等度以上の異型を示していた.

2. 方法

10%ホルマリン固定パラフィン包埋検体を検索に用いた. 検体は4 μ mに薄切し, 病理組織学の検討のために通常のヘマトキシリン-エオジン染色と今回の研究のために免疫組織化学的染色を行った. 病理組織学的検討は経験のある病理医によって行われ, 診断の一致

Fig. 1 Histology of villous adenoma components villous projections ramify through a long and papillary growth. (H&E, $\times 100$)

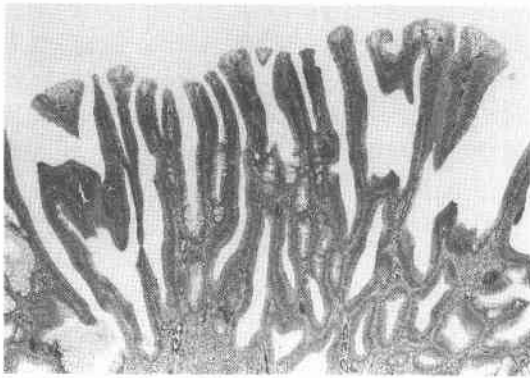


Fig. 2 Ki-67 immunohistochemical staining of villous adenoma components in the same field as figure 1. Villous adenoma components is apparently lower than carcinomas and adenomas of cases of cancer in adenoma on Ki-67 LI. ($\times 100$)

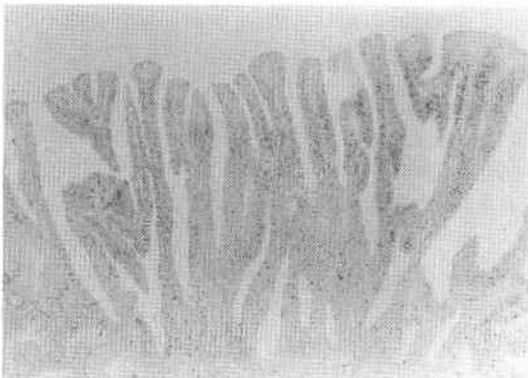


Fig. 3 Villous carcinoma components (left side indicated by arrow heads), showing severe cellular and structural atypia, adjacent to villous adenoma components. (H&E, $\times 100$)

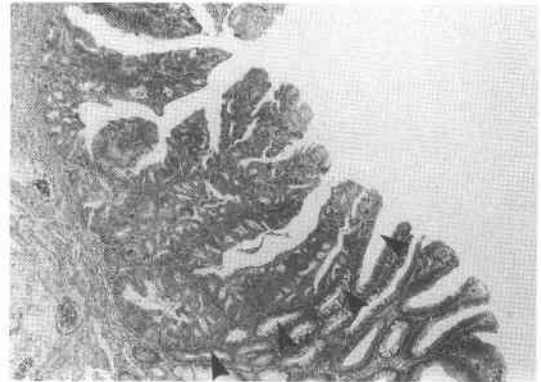
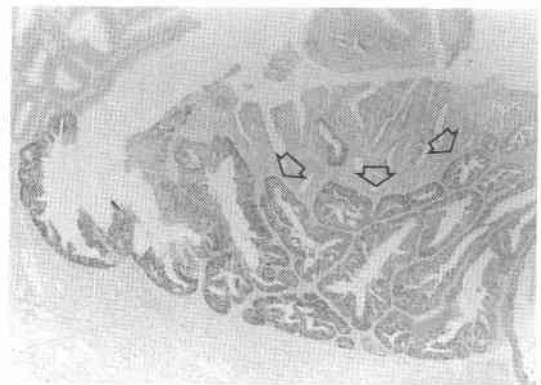


Fig. 4 Strongly positive staining of p53 can be seen in villous carcinoma cells (below white arrows) of the same field as figure 3. ($\times 40$)



をみた症例のみを今回の研究に用いた。

免疫組織化学的染色の方法は以下の方法で行った。

脱パラフィン処理後、0.3%過酸化水素加メタノールにて、内因性ペルオキシダーゼ失活処理を20分間行い、0.01M phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後、0.1 M citrate buffer に標本を浸して、microwave oven 熱処理(500w, 5分 \times 3回)をおこなった。さらに、PBSで洗浄後、非特異的反応を阻止するために20%正常ブタ血清 (Vecter 社、以下、NSS と略記) を20分間反応させた。

1次抗体として、抗 Ki-67ウサギポリクローナル抗体 (DACO-PC, DACO 社、以下、Ki-67と略記) と抗

p-53蛋白抗体, CM1 (Novocastra Laboratories Ltd. 以下、p-53と略記) を用い、それぞれ2%NSS・PBSにて200倍と1,000倍に希釈した。反応は4°Cで12時間行い、PBSで洗浄後、2次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (ニチレイ、東京) を室温で30分反応させ、さらに、PBSで洗浄後、酵素試薬ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ) を室温で20分反応させた。PBSで洗浄後、0.03%過酸化水素加3,3-diamino benzidine (DAB) を加えて発色後、1%メチルグリーンにより核染色を行った。

Ki-67の判定は、光学顕微鏡撮影装置 (Axiophot, カールツアイス社製、ドイツ) にて、200倍で撮影し、核内が明瞭に褐色顆粒状に染色された細胞を Ki-67陽

Fig. 5 Histology of carcinoma and adenoma components in a cases of cancer in adenoma. Carcinoma components is present in the left side indicated by arrows. (H&E, $\times 100$)

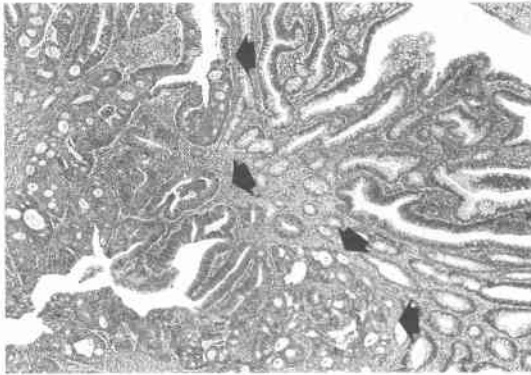
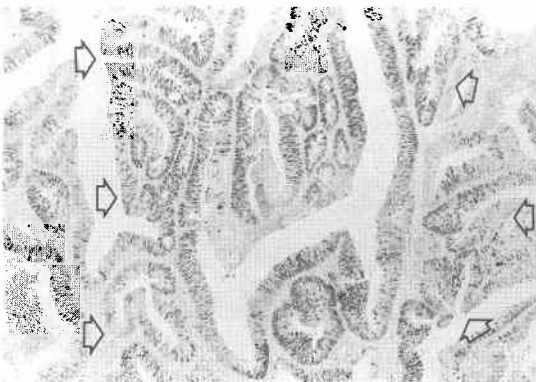


Fig. 6 Ki-67 immunohistochemical staining in the same field as figure 5. ($\times 200$) Carcinoma component (surrounded by white arrows), shows more intensive Ki-67 LI than adjacent adenoma components.



性細胞とし、Ki-67陽性細胞率は腫瘍細胞1,000個中のKi-67陽性細胞数から算出、その百分率をKi-67 labeling index (Ki-67 LI) とした。Ki-67 LIの値は平均 \pm 標準誤差 (SE) で表した。

p53異常発現の判定は、光学顕微鏡にて検鏡し、核が明瞭に褐色に染色された細胞のみを陽性とした。

統計処理として、Yatesの補正を加えた χ^2 検定を用いた。2群間の検定には、Mann-Whitney検定を用いた。

II. 結 果

1. 性別、年齢、腫瘍径

絨毛状腫瘍成分は性別では男性7例、女性3例、年齢は39歳より89歳、平均 62 ± 17 歳で腫瘍径は最小で14mm、最大で80mm、平均 32 ± 27 mmであった。このなかで特に絨毛癌が併存する5症例の性別は男性4例、女性1例、年齢は40歳より89歳、平均 65 ± 22 歳であった。腫瘍径は最小で14mm、最大で80mm、平均 35 ± 29 mmであった。これに対して、癌を合併しない絨毛状腺腫成分の腫瘍径は最小で14mm、最大で60mm、平均 29 ± 12 mmであった。

大腸の腺腫内癌18例の内訳では、性別は男性13例、女性5例、年齢は46歳より76歳、平均 61 ± 10 歳で、腫瘍径は最小で8mm、最大で20mm、平均 13 ± 3 mmであった。

深達度 mp 以上の進行度39例の内訳では、性別は男性26例、女性13例、年齢は24歳より85歳、平均 63 ± 14 歳で、腫瘍径は最小で15mm、最大で100mm、平均 41 ± 19 mmであった。

2. p-53蛋白発現

p-53蛋白発現例は、絨毛状腫瘍成分では腺腫成分10例中0例(0%)、癌成分5例中1例(20%)で、腺腫内癌では腺腫部18例中6例(33.3%)、癌部18例中11例(61.1%)で、大腸進行癌では39例中28例(71.8%)であった。

p-53蛋白発現の頻度は、絨毛状腺腫成分と腺腫内癌の腺腫部の間に有意に差を認めた($p < 0.05\%$)。また、絨毛状癌成分では大腸進行癌との間に有意差を認めたものの腺腫内癌の癌部との間には有意差を認めなかった (Table 1)。

3. Ki-67標識率

Ki-67 LIは、絨毛状腫瘍成分では腺腫成分 $13.6 \pm 2.7\%$ 、癌成分 $58.6 \pm 2.2\%$ で、腺腫内癌では腺腫部 $26.9 \pm 3.0\%$ 、癌部 $60.2 \pm 4.3\%$ で、大腸進行癌では $73.8 \pm 4.7\%$ であった。Ki-67 LIでは、絨毛状腺腫成分はそれぞれの癌に比べ、有意に低く、また、腺腫内癌の腺腫部に比べても有意に低値であった。それに反し、絨毛状癌成分では腺腫内癌の癌部とほぼ類似していた (Table 2)。

III. 考 察

Villous という用語は1860年 Holmesが大腸の上皮性良性腫瘍を villous papilloma と adenomatous polyp に分類して以来広く使われ、villous tumor, villous adenoma, villous papilloma などの名称が使われ、他の腺腫と別に扱われることが多い。しかしその診断基準はあいまいであり肉眼的所見を重視する立場

Table 1 Comparison of p53 expression between villous tumors components, carcinoma and adenoma components in cases of cancer in adenoma and advanced cancer

| | p53(+) | p53(-) | total | p53 positive rate(%) |
|-----------------------------|--------|--------|-------|----------------------|
| Villous tumor component | | | | |
| Villous adenoma component | 0 | 10 | 10 | 0% |
| Villous carcinoma component | 1 | 4 | 5 | 20% |
| Carcinoma in adenoma | | | | |
| Adenoma | 6 | 12 | 18 | 33.3% |
| Carcinoma | 11 | 7 | 18 | 61.1% |
| Advanced cancer | 28 | 11 | 39 | 71.8% |

*p=0.0394 **p=0.1035 ***p=0.0214

Table 2 Comparison of Ki-67 expression between villous tumors components, carcinoma and adenoma components in cases of cancer in adenoma and advanced cancer

| | Ki-67LI(Mean ± SE) |
|-----------------------------|--------------------|
| Villous tumor component | |
| Villous adenoma component | 13.6 ± 2.7 (n=10) |
| Villous carcinoma component | 58.6 ± 2.2 (n=5) |
| Carcinoma in adenoma | |
| Adenoma | 26.9 ± 3.0 (n=18) |
| Carcinoma | 60.2 ± 4.3 (n=18) |
| Advanced cancer | 73.8 ± 4.7 (n=39) |

*p=0.0009 **p=0.0003 ***p=0.0186 ****p<0.0001 *****p=0.0164

と組織学的所見を重視する立場とあり、また組織学的な絨毛成分の割合についても一致していない。今回われわれは、病理組織学的に絨毛状腫瘍成分を50%以上有する腺腫を用い、生物学的特性の検索を試みた。

臨床病理学的検討では、絨毛状癌成分の腫瘍径は平均35 ± 29mm、腺腫内癌では平均13 ± 3mmで、深達度mp以上の進行癌では平均41 ± 19mmであり、腺腫内癌に比べて絨毛状成分の腫瘍径は深達度mp以上の進行癌に近く、明らかに大きかった。その結果、柳沢ら⁶⁾の絨毛状腺腫に癌を合併する率が高いのは、絨毛状腫瘍全体の大きさが大きくなっているので癌化率が高いとの説を支持するものと考えられた。

p-53遺伝子は、最初、SV40による変異細胞にみられる蛋白として同定され⁸⁾⁹⁾、ヒトではその遺伝子は17pに存在し¹⁰⁾、「癌遺伝子」と考えられていたが、その後、変異細胞内に貯留するのは変異したp53蛋白(mutant p53 protein, mp53)であることがわかった¹¹⁾。正常p53蛋白(wild p53 protein, wp53)は細胞増殖を負の方向へ制御し、mp53は反対に正の方向へ制御するとされた¹³⁾。現在では「癌抑制遺伝子」と考えられている。ヒ

トの癌では17pの部分欠失を有するものはそのほとんどで残ったほうのp53遺伝子の変異も伴っており、mp53が産生されず、それと相反する機能を有するwp53が産生されることより、細胞が「癌化」の方向へ進むと考えられている。p53蛋白は細胞周期のG1期に細胞質内で合成され、G1/S境界で核内に移行し、S期には再び細胞質に出て、すみやかに分解される。その半減期はおよそ20分といわれる¹⁴⁾。それに反して、mp53では半減期は著しく長い¹⁵⁾¹⁶⁾。パラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学染色ではwp53は正常細胞にはほとんど検出されず、大腸癌の細胞ではその6割近くで、核内にp53蛋白の貯留がみられる¹⁷⁾。これはそのほとんどがmp53と考えられる。

Pignatelliら¹⁸⁾によれば、免疫組織化学的に36例の大腸腺腫のうち15例にp53蛋白の存在を認め、異型度の高いもので陽性所見の頻度が高かったのに対して、化生性ポリープや正常大腸粘膜ではまったく陽性所見が認められなかったとし、小出ら¹⁹⁾も同様に異型度の高いもので陽性所見の頻度が高かったのに対して、正常大腸粘膜ではまったくp53蛋白が認められなかった

としている。これらの p53蛋白は mp53と推定される、われわれの結果もこれらの報告によく一致している。大腸癌組織の p53蛋白陽性率は、40～60%で認められるのに対して腺腫では10～15%にしか検出されず、腺腫に比べて有意に高率であったとの報告もある¹⁷⁾¹⁹⁾。われわれの検討でも大腸癌組織の p53蛋白陽性率は腺腫内癌の腺腫部に比べて有意に高率であり、視点が若干異なるもののこれらの報告に類似していた。また、絨毛状腫瘍成分と腺腫内癌、進行癌との p53蛋白陽性率の相違については、絨毛状腺腫成分と腺腫内癌の腺腫部、絨毛状癌成分と進行癌との間に有意差を認めた。絨毛状癌成分と腺腫内癌の癌部との間に有意差が出なかったのは症例数が少ないことによるものと考えられた。これらのことは、Fearon ら²⁰⁾による大腸腫瘍の多段階発癌説、p53遺伝子変異が良性腫瘍から癌へ移行する後期の段階に主として関与し、また、大腸癌の発生と進展に深く関係するという説からすると、絨毛状腫瘍では、病理組織学的に癌と認識されても、分子生物学的には癌が完成していない場合があることを推定させるものと考えられる。

Ki-67は Hodgkin 病由来の L428細胞を免疫源として作製された抗体であり、その抗原は明らかにされていないが核内に存在する。さらに、Ki-67は増殖期にある細胞で G1後期、S、G2、M 期細胞の核に存在することが判明している⁷⁾。最近になって、免疫組織学的染色によって容易に検出できるようになり、Ki-67が本来持つ増殖能の指標として以外に、Ki-67 LI と腫瘍の進行度あるいは予後との関連が報告されている。大腸癌についてみると、Shepherd ら²¹⁾によれば、年齢、性、手術治癒度、組織学的分化度、Dukes 分類による臨床病期、リンパ節転移、静脈侵襲、壁深達度などの臨床病理学的因子のいずれとも相関しなかったと報告している。また、寺邊ら²²⁾によれば、Ki-67 LI は腫瘍組織では正常大腸粘膜に比べて有意に高い値を示し、m 癌とそれ以外の癌の間で有意な差を見るものの、sm 癌以上では壁深達度あるいはリンパ節転移、すなわち、大腸癌取扱い規約による臨床病期と相関を認めなかったとしている。そして、鈴木ら²³⁾も、Ki-67 LI は正常大腸粘膜に比べて大腸癌組織では有意に高い値であり、細胞回転に入っている細胞の比率が癌では高いことを示すとしている。しかし、腫瘍の増殖と進展に数多くの因子が関与しており、大腸癌にみられる高い Ki-67 LI は potential doubling time にもつぱら反映されるものであって、actual doubling time あるいは腫瘍の

悪性度とは直接関係しないと考えるべきであるとしている。

われわれの検討では、Ki-67標識率では絨毛状腺腫成分はそれぞれの癌に比べて、有意に低く、また、腺腫内癌の腺腫部に比べても有意に低値であった。それに反し、絨毛状癌成分では腺腫内癌の癌部とほぼ類似したものであった。以上の結果から、絨毛状腫瘍の腺腫成分は p53蛋白発現と Ki-67標識率の増殖能の視点からは、腺腫内癌の腺腫部に比べて、より低悪性度の potential を有するものと推定され、癌成分では、p53蛋白に関しては、腺腫内癌の癌部よりは低悪性度であるが、Ki-67標識率に関しては、腺腫内癌の癌部に類似するものと考えられた。

稿を終えるにあたり、病理学的検討に御教示をいただいた北里大学医学部病理学教室岡安 勲教授、ならびに直接御指導いただいた高野康雄助教授に深甚なる謝意を捧げます。

文 献

- 1) Welch JP, Welch CE: Villous adenoma of the colorectum. *Am J Surg* 131: 185-191, 1976
- 2) Jahadi MR, Baldin A: Villous adenomas of the colon and rectum. *Am J Surg* 130: 723-729, 1975
- 3) 佐々木喬敏, 玉木文彦, 丸山雅一ほか: 大腸 villous adenoma 37例の検討. *胃と腸* 17: 1151-1160, 1982
- 4) Yamagiwa H, Ishihara A, Matsuzaki O et al: Malignant transformation of adenoma in large intestine: Especially on villous adenoma. *Acta Pathol Jpn* 30: 427-435, 1980
- 5) Muto T, Ishikawa K, Kino I et al: Comparative histologic study of the large intestine in Japan and England, with special reference to malignant potential. *Dis Colon Rectum* 20: 11-16, 1977
- 6) 柳沢昭夫, 菅野晴夫, 加藤 洋: Villous adenoma - その臨床病理学的特徴と malignant potential について. *臨床医* 9: 61-69, 1983
- 7) Gerdes J, Schwab U, Lemke H et al: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20, 1983
- 8) Lane DP, Crawford LV: T-antigen is bound to host protein in SV 40 transformed cells. *Nature* 278: 261-263, 1979
- 9) Sarnow P, Ho YS, Williams J et al: Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV 40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed

- cells. *Cell* 28 : 387—394, 1982
- 10) Isobe M, Emanuel BS, Givol D et al: Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. *Nature* 320 : 84—85, 1986
 - 11) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57 : 1083—1093, 1989
 - 12) Levine AL, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351 : 453—456, 1991
 - 13) Milner J, Medcalf EA: Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65 : 765—774, 1991
 - 14) Steinmeyer K, Maacke H, Deppert W: Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I. Regulation of p53 expression. *Oncogene* 5 : 1691—1699, 1990
 - 15) Montenarh M: Biochemical properties of the growth suppressor/oncoprotein p53. *Oncogene* 7 : 1673—1680, 1992
 - 16) Finlay CA, Hinds PW, Tan TH et al: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70-p53 complex with an altered half life. *Mol Cell Biol* 8 : 531—539, 1988
 - 17) Purdie CA, O'Grady J, Piris J et al: p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 138 : 807—813, 1991
 - 18) Pignatelli M, Stamp GWH, Karifi G et al: Overexpression of p53 nuclear oncoprotein in colorectal adenomas. *Int J Cancer* 50 : 683—688, 1992
 - 19) 小出 章: 大腸腺腫, 癌における p53 核蛋白の免疫組織学的研究. *日本大腸肛門病会誌* 46 : 20—26, 1993
 - 20) Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 : 759—767, 1990
 - 21) Shepherd NA, Richman PI, England J: Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol* 155 : 213—219, 1988
 - 22) 寺邊政宏: 大腸癌における Ki-67 標識率(Ki-67 score)と臨床病理学的進行度の関連についての研究. *日本大腸肛門病会誌* 45 : 11—16, 1992
 - 23) 鈴木宏志, 松本好市, 山本純二ほか: 大腸癌における Ki-67 標識率と予後の関連. *日本大腸肛門病会誌* 45 : 851—854, 1992

**Expression of p53 and Ki-67 Proliferative Activity on Colonic Villous Tumors
—Comparison with Cases of Cancer in Adenoma and
Advanced Cancer of the Colon—**

Makoto Ikenaga, Yoshimasa Ohtani, Osamu Naitou, Hiroshi Sasamoto,
Yoshiki Hiki and Akira Kakita
Department of Surgery, Kitasato University School of Medicine

Ten cases of colonic villous tumors composed of 10 villous adenoma components and 5 villous carcinoma components were investigated in terms of p53 expression and Ki-67 proliferative activity to determine their biological characteristics on the basis of comparison with 18 cases of cancer in adenoma and 39 cases of advanced cancer. Over expression of p53 was detected in none of the villous adenoma components, in 20% of the villous carcinoma components and in 33% of adenomas and 61% of carcinomas in patients with cancer in adenoma, Ki-67 labeling indices of the villous adenoma components were significantly lower than those of any carcinomas examined in the present study, and also significantly lower than those of adenomas in patients with cancer in adenoma. However, the villous carcinoma components had an index similar to that of carcinoma of patients with cancer in adenoma. These findings suggested that the villous adenoma component has a low grade malignant potential compared with adenoma in patients with cancer in adenoma in terms of over expression of p53 and the Ki-67 labeling index. In contrast, villous carcinoma has a diverse malignant potential different from that of villous adenoma, but resembling that of carcinoma in patients with cancer in adenoma.

Reprint requests: Makoto Ikenaga Department of Surgery, Kitasato University School of Medicine
1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, 228 JAPAN