

フローサイトメトリーを用いた大腸癌ならびに 大腸腺腫におけるアポトーシスの検討

鳥取大学医学部第1外科

木村 修 山根 成之 菅村 健二
牧野 正人 前田 迪郎 貝原 信明

大腸癌の進展とアポトーシスとの関連を検討するため、大腸腺腫24病巣、大腸癌69病巣、ならびに転移巣37病巣（肝転移巣21, リンパ節転移巣16）、計130病巣におけるアポトーシスの発現をフローサイトメトリーを用いて測定した。アポトーシスは Apoptotic Index (AI) を算出して検討し、AI 値は正常粘膜 27.0 ± 16.8 、腺腫 28.2 ± 26.0 、大腸癌 15.2 ± 12.0 と、大腸癌では正常粘膜、腺腫に比べてアポトーシスが有意に低下し、進行度、脈管侵襲が高度なものほど低値を示した。また、AI 値が低値を示す症例は高値を示すものに比べて有意に予後不良であった。一方、原発巣と転移巣との比較では、転移巣の AI 値は原発巣に比べてより低値を示す傾向にあり、同一症例の比較においても同様の結果が得られた。

これらのことから、アポトーシスは大腸癌の発育、進展のみならず、その予後にも密接に関与するとともに、大腸癌の悪性度を示す有用な指標の1つになりうると考えられた。

Key words: apoptosis of colorectal carcinoma, apoptosis of adenoma, apoptosis of metastatic lesion, apoptosis and prognosis of colorectal carcinoma

はじめに

アポトーシスは組織発生、形態形成のみならず、癌の増殖、進展にも深く関与することが明らかとなりつつあり¹⁾²⁾、また、抗癌剤投与による癌巣内におけるアポトーシス誘導、ならびにそのメカニズムに関する研究も盛んに行われている³⁾⁴⁾。

一方、アポトーシスの検索には従来、光学顕微鏡における細胞核の形態学的変化が用いられて来たが、近年、断片化されたDNA鎖の3'末端を terminal-deoxynucleotidyl-transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法を用いて容易に検出できるようになった⁵⁾。さらに、最近では、この TUNEL 法をフローサイトメトリー (FCM) に応用し、アポトーシスをより客観的、定量的に測定する方法が確立され注目を集めている⁶⁾⁷⁾。

そこで、本研究では大腸腺腫、大腸癌ならびに転移巣のアポトーシスを TUNEL 法を応用した FCM によって測定し、アポトーシスと大腸癌の進展、転移と

の関連を検討したので報告する。

対象および方法

1983年1月より1990年12月までの間に、鳥取大学第1外科で切除された大腸癌347例中、FCMによるアポトーシスの検索が可能であった原発巣69例、肝転移巣21病巣、リンパ節転移巣16病巣、ならびに同時期に経験した大腸腺腫24病巣（軽度異型12、中等度異型5、高度異型7）の計130病巣を対象とし、対照として正常粘膜5例を用いた。

アポトーシスの検索部位は各病巣の中心部をとる組織切片において、周辺の正常組織を除く病巣全体とした。

1. 組織切片を用いた TUNEL 法による染色

ホルマリン固定パラフィン包埋標本より $3\mu\text{m}$ 薄切切片を作製し、TUNEL法⁸⁾にてアポトーシス細胞の検索を行った。薄切標本を脱パラフィン、親水後、2%過酸化水素水加メタノール液で室温、20分間反応して内因性ペルオキシダーゼをブロックした。流水にて水洗し、100mM Tris buffer に室温、3分間浸した。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K にて除蛋白後、流水にて水洗し、TdT 緩衝液(100mM カコシル酸カリウム, 2mM 塩化

コバルト, 0.2mM ジチオトレイトール, pH 7.2) に 3 分間浸した。次いで, TdT 緩衝液に 0.3U/ μ l TdT

(Gibco Brl. Life Technologies Inc., USA) と 0.04 nmol/ μ l ビオチン標識 dUTP (Boehringer Mannheim, Germany) を加えた TdT 反応液で 37°C, 90 分間反応後, 緩衝液 (0.3M 塩化ナトリウム, 30mM クエン酸ナトリウム) に 15 分間浸して TdT 反応を停止した。リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄し, 10% 正常ウサギ血清 (生化学工業, 東京) で 10 分間反応後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (生化学工業) を 30 分間反応させた。PBS で洗浄の後, 過酸化水素水を添加した 3'3'-ジアミノベンチジン基質 (生化学工業) で発色, メチルグリーンで後染色を行った。Apoptotic Index (AI) は細胞核 1,000 個中の TUNEL 染色陽性細胞の割合で現した。

2. TUNEL 法を応用した FCM によるアポトーシスの検索

Hedley ら⁹⁾の方法に準じて 100 μ m パラフィン切片より細胞核を単離し, PBS にて洗浄後, TdT 緩衝液に 3 分間浸した。次いで, TdT 緩衝液に 0.3U/ μ l TdT と 0.04nmol/ μ l FITC 標識 dUTP (Cambridge Research Biochemicals Ltd, UK) を加えた TdT 反応液で 37°C, 90 分間反応した。PBS にて洗浄後, 細胞核 10,000 個の蛍光量を FCM を用いて測定した。陰性対照は, 0.04nmol/ μ l FITC 標識 dUTP 加 TdT 緩衝液で 37°C, 90 分間反応させた。蛍光量は, 対象と陰性対照の平均蛍光量 (チャンネル数) の差を陰性対照の平均蛍光量で除した値を Apoptotic Index (AI) として算出し検討した (Fig. 1)。

なお, 用語および臨床病理学的所見は大腸癌取扱い規約¹⁰⁾ならびに Dukes 分類¹¹⁾に従い, 統計学的処理は χ^2 検定および t 検定を用いて行い, $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

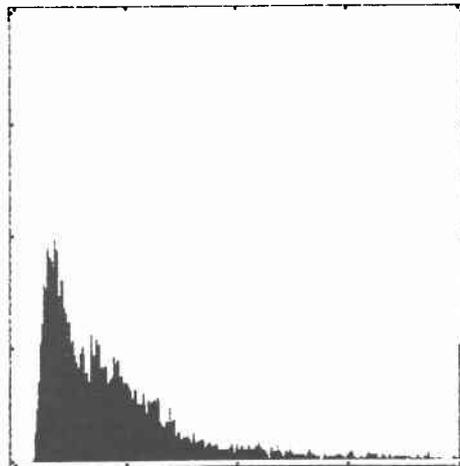
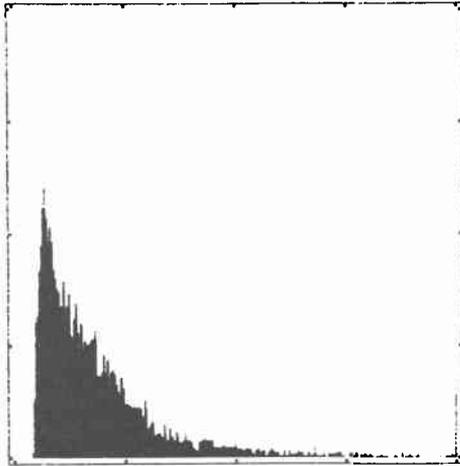
結 果

1. FCM と免疫組織化学的染色法による AI 値の比較

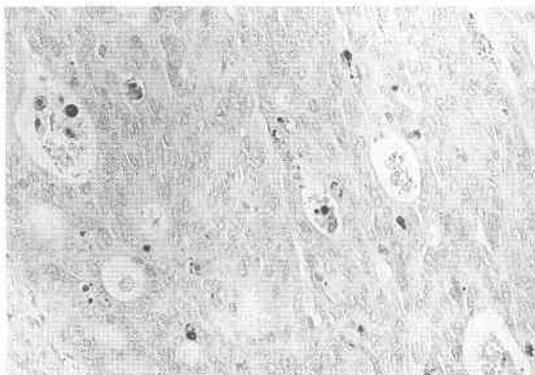
Fig. 1 The FITC-dUTP incorporation histograms detected by flowcytometry (both use linear scales) (A) and immunohistochemical staining by TdT reaction of same case ($\times 200$) (B).

A. The upper inset represents unlabeled cells (mean channel is 47.39) and lower inset represents labeled cells (mean channel is 56.25). AI calculated by this histograms is 18.7%. B. AI calculated by immunohistochemical staining is 8.55%.

A



B



無作為に抽出した原発巣16例を対象に、組織切片とFCMによるAI値を同一病巣において比較検討した(Fig. 2).

両者には有意な相関が認められ(p<0.05), FCMによるAI値の算出は組織切片と同様の傾向を示した.

2. 大腸腺腫のAI値

大腸腺腫のAI値は平均28.2%であり, 正常上皮の27.0%とほぼ同様の値を示し, 大腸癌の15.2%に比べて有意に高値を示した. また, 異型度別の検討では, 軽度異型19.9%, 中等度異型42.4%, 高度異型32.4%と, 軽度異型では中等度, 高度異型に比べて低値を示したが有意差はみられず, 異型度とAI値との間には一定の傾向は認められなかった (Table 1).

3. 大腸癌原発巣のAI値と臨床病理学的所見との比較

大腸癌原発巣のAI値と臨床病理学的所見との関連を比較検討した (Table 2). 組織型別では, 中分化腺癌で6.3%と高分化ならびに低分化腺癌に比べて有意に低値を示した (p<0.001, p<0.05). また, 深達度別に比較すると, m, sm 20.3%, mp, ss 12.4%, s, si 14.2%と深達度が深くなるにつれてAI値が低下する傾向にあったが有意差は認められなかった. しかし, 進行度別では, Dukes A, B 症例は Dukes C, D 症例に比べてAI値が高値を示し, 両者の間に有意な差が認められ, 進行度が進むにつれてアポトーシスは減少する傾向にあった. さらに, 脈管侵襲との関連では, リンパ管侵襲ならびに静脈侵襲陽性例のAI値は陰性例に比べて有意に低値を示した (p<0.05).

一方, アポトーシスと予後との関連を検討するため, AI値が10%以下をアポトーシス低値群, 11%以上を高値群として術後5年生存率を比較検討した (Fig. 3). ただし, 同時性多発癌9例はこの検討から除外した. 全症例では, アポトーシス高値群89.1% (n=28), 低値群41.7% (n=32) と両群の間に有意差が認められ (p<0.01), アポトーシス高値例の予後は低値例に比べて良好であった. また, 治癒切除例を対象に, 進行度別の検討を行うと, 最も対象症例, 再発例の多いDukes C 症例では, 高値群100% (n=5), 低値群46.7% (n=12) と, 有意差は認められないものの, 高値群の予後は低値群に比べて極めて良好であった.

4. 原発巣と転移巣の比較

肝転移巣21病巣, リンパ節転移巣16病巣とその原発巣におけるAI値を比較検討した (Table 3). 肝転移例では原発巣8.8%, 転移巣5.5%, リンパ節転移例では

Fig. 2 Comparison between AI calculated by flow cytometry and immunohistochemical staining of paraffin sections.

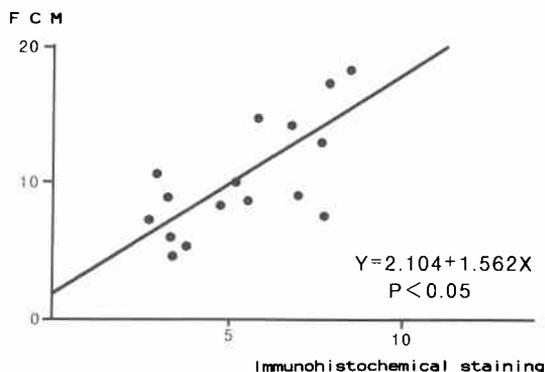


Table 1 AI of the normal mucosa, adenoma and colorectal carcinoma

	Apoptotic Index (%)
Normal mucosa (n= 5)	27.0±16.8 ^{a)}
Adenoma (n=24)	28.2±26.0 ^{b)}
Mild atypia (n=12)	19.9±15.2
Moderate atypia (n= 5)	42.4±40.4
Sever atypia (n= 7)	32.4±21.8
Carcinoma (n=69)	15.2±12.0 ^{c)}

a vs c: p<0.05, b vs c: p<0.01

Table 2 Relationship between AI and clinicopathologic characteristics in colorectal cancer

	Apoptotic Index (%)
Histologic type	
well (n=47)	18.1±12.7 ^{a)}
mod. (n=15)	6.3±3.2 ^{b)}
poor. (n= 7)	12.6±8.3 ^{c)}
Depth of invasion	
m, sm (n=15)	20.3±14.8
mp, ss (n=19)	12.4±8.6
s, si (n=35)	14.2±11.7
Dukes' stage	
A (n=21)	20.1±13.5 ^{d)}
B (n=13)	21.1±12.5 ^{e)}
C (n=17)	9.5±8.7 ^{f)}
D (n=18)	10.7±6.9 ^{g)}
Lymphatic invasion	
Negative (n=48)	17.1±12.9 ^{h)}
Positive (n=21)	10.2±7.9 ⁱ⁾
Venous invasion	
Negative (n=31)	18.6±12.6 ^{j)}
Positive (n=38)	12.1±10.7 ^{k)}

a vs b: p<0.001, d vs g, e vs f, e vs g: p<0.01, b vs c, d vs f, h vs i, j vs k: p<0.05

Fig. 3 Survival curves for patients with low AI and high AI.

A, Overall cases. B, Cases with colorectal carcinoma at Dukes stage C.

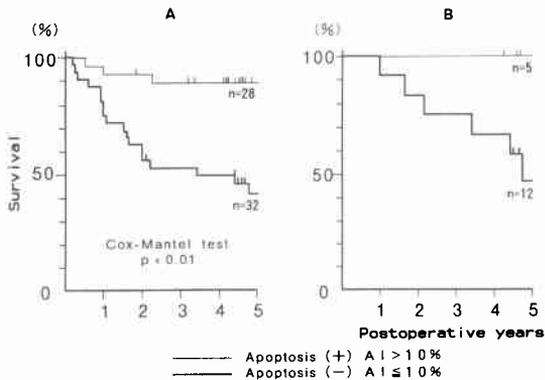


Table 3 AI of primary and metastatic lesion

	Apoptotic Index (%)	AI ≥ 5% (%)
Liver metastases		
Primary lesion (n=21)	8.8 ± 6.8	14 (67) ^{a)}
Metastatic lesion (n=21)	5.5 ± 5.0	7 (33) ^{b)}
Lymph node metastases		
Primary lesion (n=16)	9.8 ± 8.6	10 (63)
Metastatic lesion (n=16)	5.1 ± 5.9	7 (44)

a vs b: $p < 0.05$

Table 4 Relationship between primary and metastasized tumors in terms of occurrence of apoptosis

Primary tumor	→	Metastatic tumor	Liver metastases	Lymph node metastases
(-)	→	(-)	5[24]	4[25]
(-)	→	(+)	2[9] ^{a)}	2[13]
(+)	→	(-)	9[43] ^{b)}	5[31]
(+)	→	(+)	5[24]	5[31]

[] : %

(+) : AI ≥ 5%, (-) : AI < 5%, a vs b: $p < 0.01$

原発巣9.8%, 転移巣5.1%と、いずれも転移巣のAI値は原発巣に比べて低値を示す傾向にあったが有意差は認められなかった。また、AI値が5%以上を示した症例の割合を検討すると、AI値と同様、転移巣では原発巣に比べて低値を示すものが多い傾向にあり、肝転移例では有意差が認められた ($p < 0.05$)。

さらに、AI値が5%以上を(+), 5%未満を(-)として、同一症例における原発巣から転移巣へのAI値の変化を検討した (Table 4)。原発巣から転移巣へとアポトーシスが陰性化するものは、肝転移例で43%, リンパ節転移例で31%と高率であったのに対し、陽性化したものは、肝転移例9%, リンパ節転移例13%と低率であり、肝転移例では陰性化するものが陽性化するものより有意に多かった ($p < 0.01$)。

考 察

腫瘍の発育, 進展は細胞の増殖と死滅のバランスの上に成り立っており, アポトーシスはその腫瘍の細胞死をコントロールする因子の1つとして注目を集めている。また, 癌腫においては, bcl-2を代表とする遺伝子によりアポトーシス, 細胞死が抑制され, 癌細胞を長期間生存せしめていると考えられている¹²⁾。このため, アポトーシスの解明は癌の発育, 転移を探る上に極めて重要であり, その検索方法も急速に進歩している^{6)~8)}。

Bromidge ら⁶⁾は Digoxigenin 標識 dUTP を, Grczyca ら⁷⁾は Biotin 標識 dUTP を単離細胞における TdT 反応に応用して FCM によるアポトーシスの測定を行った。我々は, FITC を標識した dUTP を TdT 反応に応用して FCM によるアポトーシスの測定を行い, 組織切片を用いたアポトーシスの測定結果と良好な相関を得ることができ, 本検査法がアポトーシスの測定に有用な方法であることを確認した。

正常上皮, 腺腫のアポトーシスに関しては, 発現が少ないとする報告¹³⁾¹⁴⁾も見られるが, Bedi ら¹⁵⁾は, 大腸の正常上皮, 腺腫, 癌腫のアポトーシスを生検材料の FCM を用いて比較し, 正常上皮, 腺腫, 癌腫の順にアポトーシスが高値を示したと報告し, また, Tsujitani ら¹⁶⁾は de novo 癌, 腺腫内癌, 腺腫内癌における腺腫成分におけるアポトーシスを比較検討し, 癌腫では腺腫に比べてアポトーシスが有意に低値を示すことを報告している。本研究においても, 正常上皮, 腺腫のアポトーシスは癌腫に比べて有意に高値を示し, 癌腫においてはアポトーシスによる細胞死が有意に減少していると考えられた。

Kasagi ら¹⁷⁾は胃癌症例を対象に, 進行の遅いと考えられる高分化腺癌と進展の早い低分化腺癌のアポトーシスを検索し, 高分化腺癌では低分化腺癌に比べてアポトーシスが有意に高値を示すことを報告している。また, 菊地ら¹⁸⁾は, 進行が遅く, 生物学的悪性度が低いとされる甲状腺癌では大腸癌, 胃癌, 乳癌などに比較

して、アポトーシスがより強く発現していたと報告している。自験例でも、従来、悪性度が低いとされる高分化腺癌では中分化腺癌に比べてアポトーシスが有意に多く、癌の増殖速度にもアポトーシスによる細胞死の多寡が関与しているものと考えられた。

癌のリンパ節転移、進行度とアポトーシスとの関連について、Ikenaga ら¹⁹⁾は、リンパ節転移陽性の大腸癌では陰性のものに比べてアポトーシスが有意に低値を示し、また、腫瘍径が2cm以上のものは2cm以下のものに比べて有意に低値を来したと報告している。また、Sierra ら²⁰⁾は、乳癌において、アポトーシスを抑制すると考えられる Bcl-2 の発現を検索し、リンパ節転移陽性例では陰性例に比べて Bcl-2 蛋白が有意に高値を示し、癌腫の進行度が進むにつれて Bcl-2 の発現が強くなる傾向にあったと報告している。今回の検索においても、リンパ節転移、遠隔転移を有する高度進行例、ならびに脈管侵襲陽性例では、アポトーシスが有意に低値を示した。また、アポトーシスの少ない症例の予後は多いものに比べて有意に不良であり、同一進行度で比較しても同様の傾向であった。これらのことから、アポトーシスの少ない癌腫は細胞増殖が旺盛で、リンパ節転移、遠隔転移を来しやすく、予後不良であると考えられた。

また、転移巣のアポトーシスに関する報告は極めて少なく唯一、Tatebe ら²¹⁾は、大腸癌のリンパ節転移巣、肝転移巣のアポトーシスを原発巣と比較し、転移巣では原発巣に比べてアポトーシスが有意に亢進すると報告している。しかし、転移巣においては、原発巣に比べ種々の遺伝子異常が増強し、癌腫の悪性度も亢進しているものと考えられるが²²⁾、FCM を用いた自験例の検索では、転移巣のアポトーシスは原発巣に比べて低値を示す傾向にあり、転移巣にはアポトーシスの少ない悪性度の高い細胞が多いのではないかと考えられ、今後、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

以上のことより、アポトーシスは大腸癌のリンパ節転移、遠隔転移、ならびに予後との密接な関連が認められ、大腸癌の悪性度を示す有用な 1 指標になりうる事が示唆される。

本研究の一部は文部省科学研究費(課題番号08671443)の援助を受けた。

文 献

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239—257, 1972
- 2) Kerr JFR, Winterford CM, Hamon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013—2036, 1994
- 3) Eastman A: Activation of programmed cell death by anticancer agent: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2: 275—280, 1990
- 4) Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456—1462, 1995
- 5) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 439—451, 1992
- 6) Bromidge TJ, Howe DJ, Johnson SA et al: Adaptation of TdT assay for semiquantitative flow cytometric detection of DNA strand breaks. *Cytometry* 20: 257—260, 1995
- 7) Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53: 1945—1951, 1993
- 8) 笠城典子, 安達博信, 石田雅人ほか: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法によるパラフィン包埋切片上でのアポトーシス細胞の可視化: 蛋白分解酵素処理の検討を中心として. *米子医誌* 45: 413—423, 1994
- 9) Hedley DW, Friendlander ML, Taylor IW et al: Method for analysis of cellular DNA content of paraffinembedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31: 1333—1335, 1983
- 10) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 改訂第 5 版. 金原出版, 東京, 1994
- 11) Whittaker M, Goligher JC: The prognosis after surgical treatment for carcinoma of the rectum. *Br J Surg* 63: 384—388, 1976
- 12) Steck KD, McDonnell TJ, El-Naggar AK: Flow cytometric analysis of apoptosis and bcl-2 in human solid neoplasms. *Cytometry* 20: 154—161, 1995
- 13) Saegusa M, Takano Y, Wakabayashi T et al: Apoptosis in gastric carcinomas and its association with cell proliferation and differentiation. *Jpn J Cancer Res* 86: 743—746, 1994
- 14) Baretton GB, Diebold J, Christoforis G et al: Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Cancer* 77: 255—264, 1996

- 15) Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ et al: Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 1811-1816, 1995
- 16) Tsujitani S, Shirai H, Tatebe S et al: Apoptotic cell death and its relationship to carcinogenesis in colorectal carcinoma. *Cancer* 77(Suppl): 1711-1716, 1996
- 17) Kasagi N, Gomyo Y, Shirai H et al: Apoptotic cell death in human gastric carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Jpn J Cancer Res* 85: 939-945, 1994
- 18) 菊地勝一, 平出星夫, 玉熊正悦ほか: 甲状腺腫瘍の p53 癌抑制遺伝子の発現とアポトーシスに関する検討. *日外会誌* 96: 588, 1995
- 19) Ikenaga M, Takano Y, Saegusa M et al: Apoptosis of colon cancers assessed by in situ DNA nick end-labeling method. *Pathol Int* 46: 33-37, 1996
- 20) Sierra A, Lloveras B, Castellsague X et al: Bcl-2 expression is associated with lymph node metastasis in human ductal breast carcinoma. *Int J Cancer* 60: 54-60, 1995
- 21) Tatebe S, Ishida M, Kasagi N et al: Apoptosis occurs more frequently in metastatic foci than in primary lesions of human colorectal carcinomas: analysis by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Int J Cancer* 65: 173-177, 1996
- 22) Ding SF, Delhanty JD, Zografos G et al: Chromosome allele loss in colorectal liver metastases and its association with clinical features. *Br J Surg* 81: 875-878, 1994

Flow Cytometric Analysis of Apoptosis in Colorectal Adenomas and Carcinomas

Osamu Kimura, Nariyuki Yamane, Kenji Sugamura, Masato Makino,
Michio Maeta and Nobuaki Kaibara
First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Tottori University

We assessed the occurrence of apoptotic cell death in 24 colorectal adenomas, 69 colorectal carcinomas and 37 metastatic lesions, which included 21 of the liver and 16 of lymph nodes, in order to investigate the possible relation between apoptosis and clinicopathological features and to evaluate apoptosis as a possible prognostic factor. The apoptotic index (AI) was calculated by flowcytometry using terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. The median values of AI were 27.0 in normal mucosas, 28.2 in adenomas and 15.2 in colorectal carcinomas. The AI was significantly lower in colorectal carcinomas than in normal mucosas and adenomas. Apoptosis of colorectal carcinomas was less frequently observed in tumors with higher malignant potential, such as tumors at advanced stages and with venous and lymphatic invasion. Moreover, the patients with a low AI had significantly poorer survival than those with a high AI. In comparing apoptosis between primary and metastatic lesions, AI was significantly lower in the latter. These results suggest that less apoptosis might result in greater progression of colorectal carcinomas and that the rate of apoptosis might be an indicator of the degree of malignancy.

Reprint requests: Osamu Kimura First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Tottori University
36-1 Nishimachi, Yonago, 683 JAPAN