

原 著

食道扁平上皮癌における HSC73, RB, Ki-67の 発現に関する免疫組織学的検討

日本大学医学部第1外科学教室

桜井 健一 秦 怜志 天野 定雄 福澤 正洋

腫瘍局所における熱ショック蛋白発現の意義を細胞周期の側面から探索する目的で、食道扁平上皮癌71例を対象として HSC73, RB, Ki-67の蛋白発現を免疫組織染色により検索し、予後を含めた臨床病理学的因子と比較検討を行った。HSC73は66.2%, RB は73.2%, Ki-67陽性率の平均は53.3%であった。HSC73陽性率は高分化型癌, リンパ節転移陰性群, low stage の群に高かった。また, HSC73陽性群は陰性群に比べて Ki-67発現率が低く, 陰性群に比べて術後累積生存率が良好であった。RB の発現は臨床病理学的因子, 術後累積生存率と関連がなかったが, RB と HSC73の同時陽性群がその他の群と比べて Ki-67発現率が低かった。食道扁平上皮癌における HSC73の発現は分化度, リンパ節転移, stage, 術後累積生存率と相関し, 細胞周期制御蛋白を安定化させるものと思われた。

Key words : esophageal cancer, heat shock protein, heat shock cognate protein 73, retinoblastoma protein, Ki-67 antigen

はじめに

熱ショック蛋白(heat shock protein: 以下, HSP)は発熱やささまざまなストレスにより誘導される一群の蛋白質として発見され¹⁾, 蛋白質の新生, 成熟, 輸送, 機能全般の介助などの分子シャペロンとしての機能²⁾, 免疫監視機構への関与³⁾, 細胞増殖制御機構への関与などの機能⁴⁾を持つとされる。HSPの多くは非ストレス下でも構成的に発現しているが, HSP70ファミリーのうち HSP73も, 細胞内に構成的に出現しており, ストレス誘導性の HSP70と区別して heat shock cognate 73(以下, HSC73)と呼ばれる。この HSC73を過剰発現させると細胞増殖が抑制されるといった報告から細胞増殖抑制機構への関与が示唆されている⁵⁾。

一方, 細胞周期の進行は cyclin と cyclin dependent kinase(以下, CDK)によって制御され, G₁/S 期においてはこれらの複合体が retinoblastoma protein(以下, RB)をリン酸化することで細胞周期を進行させていることが知られている⁶⁾。

最近, HSC73と RB が分子レベルで会合することが明らかになり, 細胞周期制御と密接に関わっている可能

性が示唆された⁷⁾。

本研究では食道扁平上皮癌における HSC73と RB の発現を免疫組織学的に検索し, 細胞増殖の指標とされる Ki-67⁸⁾の発現率および予後を含めた臨床病理学的因子と比較検討し, HSC73が腫瘍の増殖・進展に関与している可能性を細胞周期の側面から探索することを目的とした。

対 象

1988年から1998年の間に当教室にて切除した他病死・術死を除いて予後調査が可能であり, 治癒切除が可能であった食道扁平上皮癌71例を対象とした。性別は男性62例, 女性9例であり, 年齢は42歳から81歳までで平均61.5歳であった。占居部位はCe 4例, lu 4例, lm 36例, Ei 21例, Ea 6例であり, 病理組織型では高分化型癌16例, 中分化型癌37例, 低分化型癌18例であった。臨床病理学的進行度では stage 0 15例, I 3例, II 8例, III 25例, IV 20例であった⁹⁾。

方 法

すべての食道切除標本について, 10%緩衝ホルマリンにて24時間以上固定した後, パラフィン包埋し, 4 μmの連続切片を作製した。免疫組織化学染色には streptavidin-biotin complex (SAB)法を用いた。脱パラフィン後 HSC73と RB は microwave にて抗原賦活

<1998年12月9日受理> 別刷請求先: 桜井 健一
〒173 8610 東京都板橋区大谷口上町30 1 日本大学医学部第1外科学教室

を10分間行った。その後、 H_2O_2 加 PBS にて12分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行った。非特異反応のブロッキングは PBS にて洗浄後、10%家兎正常血清を室温で30分間反応させて行った。1次抗体として HSC73 α 018 15551: 和光純薬工業社), RB (RB-1: DAKO 社), Ki-67 (MIB-1: IMMUNOTECH 社)を用い、4 で24時間反応させた。PBS にて洗浄後 biotin 化抗 mouse IgG を反応させ、再度 PBS にて洗浄し、peroxidase-conjugate streptavidin と反応させた。発色は H_2O_2 加 diaminobezidine にておこなった。positive control として各実験毎に HSC73, RB, Ki-67染色が強陽性に認められる組織を同時染色した。また negative control として10%mouse 正常血清を反応させた。

染色の判定は光顕的に行った。組織標本上腫瘍最深部の腫瘍先端部において200倍の倍率にて5視野を観察し、すべての視野で腫瘍細胞の20%以上が染色されるものを HSC73陽性、RB 陽性と判定した。Ki-67の判定については、組織背景の非特異的反応の基準としてそれより強く核が染色されているものを陽性とし、1,000個以上の細胞を計測して陽性細胞の100分率をもって Ki-67陽性細胞率 (Ki-67-positive cell index: 以下、Ki-67-PI) とした。

臨床病理学的因子については食道癌取扱い規約第8版⁹⁾に従って分類を行った。年齢は、性別、部位、分化度、内眼型、境界、増殖様式、深達度、リンパ節転移、リンパ節転移个数、腹膜転移、肝転移、ie 因子、ly 因子、v 因子、腫瘍径、stage の計17因子について検討を行った。

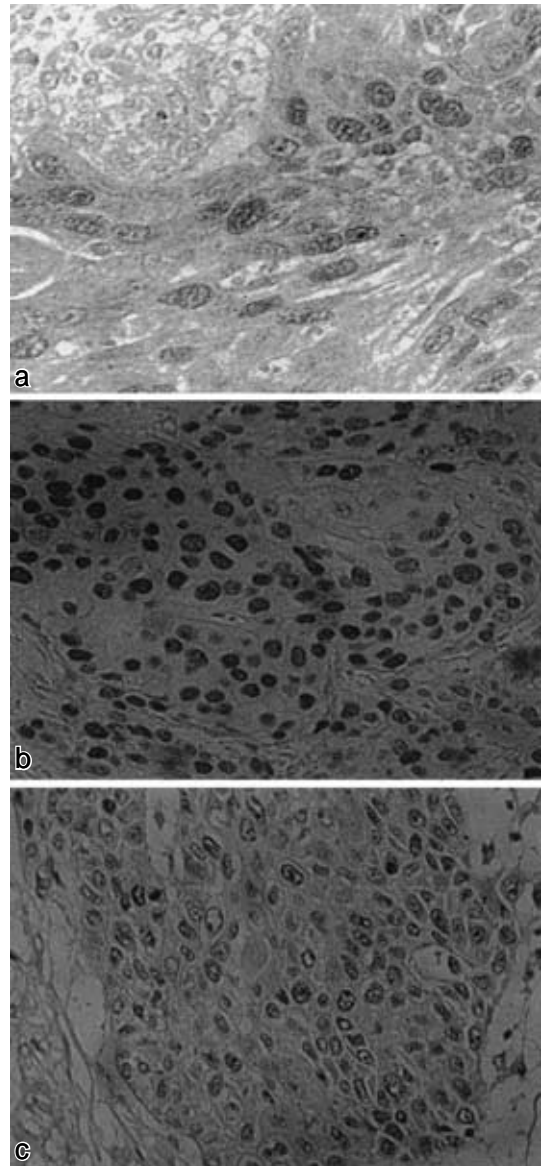
統計学的検定には t 検定および χ^2 検定を用いた。また、累積生存率の算出には Kaplan-Meier 法を用い、累積生存率の検定には generalized Wilcoxon 検定を用いた。危険率が5%以下のものを有意差ありと判定した。

結 果

HSC73は47例 (66.2%)に陽性で、腫瘍細胞の細胞質および核に局在が見られた (Fig. 1a)。RB は52例 (73.2%)に陽性で、腫瘍細胞の核に局在が見られた (Fig. 1b)。また、MIB1抗体を用いた Ki-67は全例に発現が見られた (Fig. 1c)。HSC73と RB の同時陽性例は26例 (36.6%)あり、両者の発現部位が一致している症例は13例 (18.3%)で、そうでない症例は13例 (18.3%)存在し、その割合は同数であった。

臨床病理学的因子との比較では、高分化型癌に HSC

Fig. 1 (a) Immunostaining with anti-HSC73 protein monoclonal antibody ($\times 600$)(b) Immunostaining with anti-RB protein monoclonal antibody($\times 400$) . (c) Immunostaining with anti-Ki-67 protein polyclonal antibody ($\times 400$) .



73陽性率が高く、低分化型癌に HSC73陽性率が低かった ($p<0.05$)(Fig. 2)。また、リンパ節転移陽性例に HSC73陽性率が低く、陰性群に HSC73陽性率が高かったが ($p<0.05$)(Fig. 3)、リンパ節転移个数との相関は認めなかった。臨床病理学的進行度との比較では HSC73陽性

Fig. 2 Relations between HSC73 expression and histologic classification
The expressions of HSC73 were more prominent in well differentiated or moderately differentiated carcinomas in comparison with those in poorly differentiated cancers. The probability values were calculated by χ^2 model.

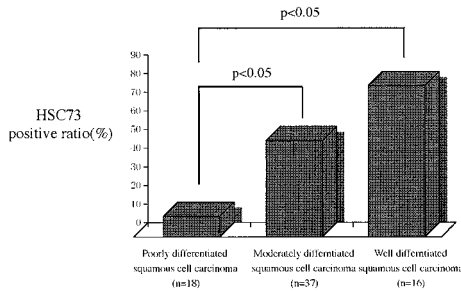


Fig. 3 Relations between HSC73 expression and lymph node metastasis
The HSC73 positive ratio of the part of Lymph node negative group was high in comparison with the Lymph node positive group. The probability values were calculated by χ^2 model.

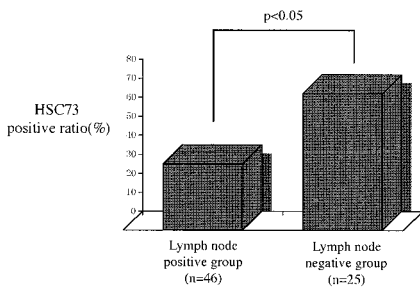


Fig. 4 Relations between HSC73 expression and histological stage
The expression of HSC73 did not relate to clinical stage. The probability values were calculated by χ^2 model.

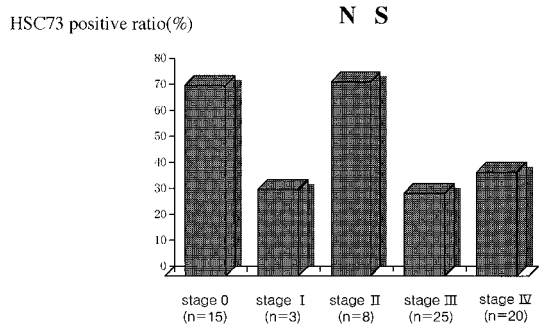
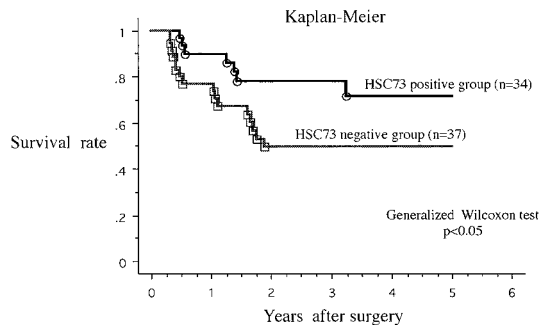


Fig. 5 Survival rate for HSC73
Survival rate was significantly worse in the patients with HSC73 negative tumors than in those with HSC73 positive tumors. The probability values were calculated by Generalized Wilcoxon test.



率と Stage との間に相関は認めなかった (Fig. 4). 術後累積生存率と HSC73 の関係では , HSC73 陽性群は陰性群と比較して予後良好であった (Fig. 5). また , HSC73 陽性群は陰性群に比べて Ki-67-PI が低かった (p < 0.05).

RB の発現は臨床病理学的因子 , 術後累積生存率と関連がなかったが , RB 陽性群に限って HSC73 と Ki-67-PI の発現を見てみると , 同時陽性群は RB 陽性かつ HSC73 陰性群に比べて Ki-67-PI が低かった (Fig. 6) .

考 察

Heat shock protein (HSP) は , 熱によって誘導される一群の蛋白質であり , 幅広い生物種の細胞に共通に保存されている . 最近熱以外の種々の環境ストレスに

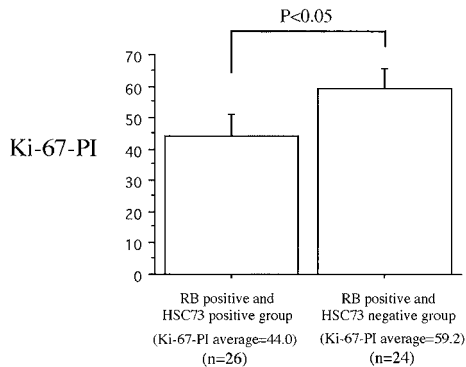
より誘導されることが明らかとなり , 注目されるようになった¹⁰⁾ . HSP はその分子量より10数種類のファミリーに分類され¹⁰⁾ , 分子シャペロンとしての機能²⁾ , 抗原提示機能³⁾ , 免疫抑制剤との結合機能¹¹⁾ , 抗癌剤耐性に関する機能¹²⁾ , 感染抵抗性に関する機能¹³⁾ , 細胞周期制御への関与⁴⁾ などさまざまな働きをもつとされる .

腫瘍と HSP に関するこれまでの研究では腫瘍細胞における HSP 増加の報告があり , 大腸癌¹⁴⁾ , 乳癌¹⁵⁾ では HSP の発現レベルが低い例では高い例に比較して予後が不良であると報告されている . しかし現在までのところ腫瘍における HSP の発現の意義についてはいまだ明らかなではない .

本研究では HSP の細胞周期抑制への関与に注目し ,

Fig. 6 Relations between HSC73 expression and Ki-67-PI

The RB positive and HSC73 negative group revealed the lower Ki-67-PI than RB positive and HSC73 positive group. The probability values were calculated by ANOVA model.



その意義を明らかにする目的で、HSP70ファミリーのうち細胞に構成的に発現している HSC73 と RB に着目し、細胞増殖力の指標とされる Ki-67 とあわせて、予後を含めた臨床病理学的因子と比較検討を行った。

RB は細胞内で細胞周期の進行を抑制する脱リン酸化型 RB (以下, pRB) と細胞周期を進行させるリン酸化型 RB (以下, ppRB) の 2 種類の形で存在しており、最近 HSC73 が ppRB とは会合せず、pRB とのみ会合することが示された⁷⁾。pRB は ppRB と比べて不安定であり、代謝を受けやすいことが示唆されており、HSC73 は不安定な pRB と結合して pRB の安定化を図って細胞増殖抑制効果を持つものと推測されている⁵⁾。また HSC73 は非ストレス下では細胞質に局在が見られるが、ストレスが加わると核内に移行することが知られている⁵⁾。自験例では細胞質と核内の両方に HSC73 の局在が見られたが、癌細胞も何らかのストレスを受け、HSC73 が核内に移動し、pRB と結合して細胞周期を安定化させてみずからの増殖を制御する可能性も考えられた。

今回の検討では、HSC73 陽性率は低分化型癌に低く、高分化型癌に高かったこと、Ki-67-PI が HSC73 陰性群に高かったこと、リンパ節転移陰性群で HSC73 陽性率が高かったことから癌に対して進行を抑制する働きを持つものと推測される。また、HSC73 の発現は臨床病期と相関せず、陽性群は陰性群に比べて予後良好だったことより、食道扁平上皮癌において、HSC73 の発現は独立した予後因子となる可能性が示唆された。

RB は 52 例 (73.2%) に陽性であったが、このうち HSC73 と同時陽性例は 26 例存在した。そして、その発現部位であるが、連続切片を用いた検索で発現部位が一致しているものとそうでないものの比率はおおの 13 例と同数であった。また、今回使用した抗体は pRB と ppRB の両方を認識しているとされる。RB 陽性かつ HSC73 陽性群は RB 陽性かつ HSC73 陰性群よりも Ki-67-PI が低いという成績から、この同時陽性群では、HSC73 は RB のうち pRB のみと会合しているため、HSC73 が pRB の安定化を介して細胞周期を制御している可能性が示唆された。

以上より、食道扁平上皮癌において HSC73 は癌の進行に対して抑制的に働き、細胞周期を抑制している可能性が示唆された。

今回の検討では HSP の細胞周期制御への関与に着目し、RB, Ki-67, 予後, 臨床病理学的因子と比較した。しかし、HSP の働きは多岐にわたっており、今後細胞周期制御のみならず、腫瘍免疫や恒常性維持の側面からのさらなる検討が必要であると思われる。

文 献

- 1) 須藤隆一郎: HSP-ペプチド複合体を用いた腫瘍ワクチン。臨免疫 29: 799 804, 1997
- 2) 高橋 弘: 腫瘍細胞内の HSP。組織培養工学 23: 123 126, 1997
- 3) 藤原理太郎, 鳥越俊彦, 佐藤昇志: HSP による抗原ペプチドの転送。臨免疫 29: 1131 1137, 1997
- 4) Yehiely F, Oren M: The gene for rat heat shock cognate, hsc70, can suppress oncogene-mediated transformation. Cell Growth Differ 3: 803 809, 1992
- 5) 鳥越俊彦, 吉田 仁, 石井良文: 分子シャペロン熱ショック蛋白質と医学。自衛隊札幌病研年報 37: 7 24, 1996
- 6) 加藤順也: G₁/サイクリンと CDKs。実験医 15: 1911 1916, 1997
- 7) Nihei T, Takahashi S, Sagae S et al: Protein interaction of retinoblastoma gene product pRB110 with Mr 73,000 heat shock cognate protein. Cancer Res 53: 1702 1705, 1993
- 8) 田中伸之介, 森 寿治, 中村 浩ほか: Proliferating cell nuclear antigen および Ki-67 標識率からみた胃内分泌細胞癌の生物学的悪性度評価。日消外会誌 29: 795 799, 1996
- 9) 食道疾患研究会編: 食道癌取扱い規約。第 8 版。金原出版, 東京, 1992
- 10) 天野定雄, 柴田昌彦, 安東克征ほか: 大腸癌組織における HSP-70, HLA-DR の発現の TIL の検討。Biother 11: 336 340, 1997

- 11) Nadeau K, Nadler SG, Saulnier M et al : Quantitation of the interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin and analogs with hsc70 and hsp90. *Biochemistry* 33 : 2561-2567, 1994
- 12) 高橋由美子, 浦出雅裕 : 抗癌剤耐性と HSP . 組織培養工学 23 : 127-132, 1997
- 13) 和田好正, 平田公一, 八木橋厚仁 : HSP 結合蛋白 . *Surg Fronti* 2 : 77-80, 1995
- 14) Lazaris C, Theodoropoulos E, Davaris S et al : Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules Tissue Expression. *Dis Colon Rectum* 38 : 739-745, 1995.
- 15) Ciocca R, Clark M, Tandon K et al : Heat Shock hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer : Prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85 : 570-574, 1993

Immunohistochemical Study of HSC73, RB and Ki-67 Expression
in Esophageal Squamous Cell Carcinomas

Kenichi Sakurai, Satoshi Hata, Sadao Amano and Masahiro Fukuzawa
1st Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

We examined the immunohistochemical expressions of HSC73 RB protein and Ki-67 in samples of esophageal squamous cell carcinoma from 64-cases, and these expressions were studied along with clinicopathologic factors and the survival rate. The expressions of the HSC73 and RB were recognized in 47.9% and 70.4% respectively, while the average of Ki-67 positive ratio was 53.3%. The expressions of HSC73 were more prominent in well differentiated or moderately differentiated carcinomas in comparison with those in poorly differentiated cancers. Survival rate was significantly worse in the patients with HSC73 negative tumors than in those with HSC73 positive tumors. The expression of RB did not relate to histologic classification, growth pattern, and lymphatic invasion. The RB positive and HSC73 negative groups revealed the lower Ki-67-PI than RB positive and HSC73 positive groups. We guessed that cell cycle regulators were stabilized with HSC73 in squamous cell carcinoma of the esophagus.

Reprint requests : Kenichi Sakurai First Department of Surgery, Nihon University School of Medicine
30-1 Oyaguchi, Itabashi, Tokyo, 173-8610 JAPAN
