

胃癌・大腸癌におけるチミジル酸合成酵素および細胞周期制御因子の発現とその臨床的意義に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9429

胃癌・大腸癌におけるチミジル酸合成酵素および細胞周期制御因子の発現とその臨床的意義に関する研究

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

宇 野 雄 祐

チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) は、デオキシウリジン-5'-リン酸を還元的メチル化反応によってデオキシチミジン-5'-リン酸に代謝する酵素であるとともにフッ化ピリミジン系抗癌剤の標的酵素である。本研究では、胃癌手術摘出標本39例と大腸癌手術摘出標本32例を対象として、抗TS抗体を用いた免疫組織染色法によるTS蛋白定量の信頼性を検討した。すなわち、免疫組織染色法によるTS染色強度を透過光顕微鏡画像解析装置を用いて定量し、その値を従来用いられてきたバインディングアッセイ法によるTS蛋白量と比較した。また、胃癌手術摘出標本80例と大腸癌手術摘出標本50例を対象としてTS染色強度と臨床病理学的因子との関連について検討した。さらに、細胞周期制御因子であるp53, p21野生型p53活性化因子1/サイクリン依存性キナーゼ相互作用蛋白1 (p21 wild type p53 activated fragment 1 / cyclin dependent kinase interacting protein 1, p21^{WAF1/CIP1}), p16サイクリン依存性キナーゼ4a阻害因子 (p16 inhibitor of cyclin dependent kinase 4a, p16^{INK4a}), サイクリンD1, 網膜芽細胞腫蛋白 (retinoblastoma protein, pRB), および増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の発現を免疫組織学的に評価し、TS染色強度との関連について検討した。胃癌組織、大腸癌組織ともにTS染色強度とTS蛋白量との間には有意な正の相関を認めた。胃癌症例、大腸癌症例ともに、臨床病期が進行するほどTS染色強度が低値を示した。また、予後との関連ではTS染色陽性例の予後が陰性例に比べ良好である傾向を認めた。細胞周期制御因子の発現とTS染色強度の関連については、胃癌においてp16^{INK4a}陽性例が陰性例と比較し有意に高い染色強度を示した。大腸癌におけるTS染色強度はp53陽性例、p16^{INK4a}陽性例、PCNA陽性例において各々陰性例に比べ有意に高い染色強度を示した。以上より、抗TS抗体を用いた免疫組織染色法はTS蛋白量の定量法として高い信頼性を有しているものと思われた。また、胃癌・大腸癌ともに、TS蛋白質の発現はpRB-転写因子E2F系以外の調節を受けているものと考えられた。大腸癌においてTS蛋白量とp53の過剰発現は高い相関性を示し、大腸癌ではTS蛋白発現亢進の背景の1つにp53遺伝子の変異が関与しているものと思われた。

Key words gastric cancer, colorectal cancer, thymidylate synthase, 5-fluorouracil, cell cycle regulator

消化管に発生する悪性腫瘍の治療体系において、外科的切除は現在もなおその中心に位置している。しかし、外科的切除の限界を超えて進行した症例に遭遇することも稀でなく、また、治癒切除と判定された手術後に再発をきたす進行癌症例も少なくない。かかる症例には、延命とクオリティオブライフの改善を目的として化学療法が選択されることが多い。とりわけフッ化ピリミジン系抗癌剤である5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) は、進行・再発消化器癌に最も頻繁に用いられてきた薬剤である。近年、5-FUの作用部位と腫瘍細胞による耐性獲得機序が解明され、その抗腫瘍効果をより高める試みが行われている¹⁾²⁾。5-FUの標的酵素であるチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) は、デオキシウリジン-5'-リン酸 (deoxyuridine 5'-monophosphate, dUMP) を還元的メチル化反応によってデオキシチミジン-5'-リン酸 (deoxythymidine 5'-

monophosphate, dTMP) に代謝する酵素である。この反応でメチル基の供与体となるメチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-methylenetetrahydrofolate, METHFA) は、5-FUの活性型であるフッ化デオキシウリジン-5'-リン酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, FdUMP) がTSと結合してこれを不活化する際に必須である。TSは、FdUMPの五位に存在するフッ素をメチル基に置換することができず、METHFAとともに強固な不活性三者結合体 (ternary complex) が形成される。以上が5-FUの主たる作用機序と解釈されているTSの阻害様式であり^{3)~5)}、その阻害効率は細胞質内のTS、FdUMPおよびMETHFAの濃度に規定される。なかでも5-FUによる阻害効率に最も影響するのは腫瘍組織内のチミジル酸合成酵素蛋白 (thymidylate synthase protein, pTS) の量と考えられている^{6)~10)}。したがって、腫瘍内pTS量を化学療法前に知ることができれば、個々の症例

平成11年4月2日受付, 平成11年6月8日受理

Abbreviations: METHFA, 5,10-methylenetetrahydrofolate; cdk, cyclin dependent kinase; CYTOAD, cytoplasm average optical density; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; dTMP, deoxythymidine 5'-monophosphate; dUMP, deoxyuridine 5'-monophosphate; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate; 5-FU, 5-fluorouracil;

における抗癌剤感受性, すなわち化学療法の効果予測することが可能と考えられる。

一方, 近年の癌の分子生物学的研究の進歩により, サイクリンとサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase, cdk) を中心とした細胞周期制御機構の異常が細胞の癌化に深く関与していることが明らかになってきた^{(11)~(14)}。細胞周期におけるG1ブロックは, 網膜芽細胞腫蛋白質 (retinoblastoma protein, pRB) のリン酸化に伴い, pRBから転写因子E2Fが解離することにより解除される^{(15)~(16)}。p53, p21野生型p53活性化因子1/サイクリン依存性キナーゼ相互作用蛋白1 (p21 wild type p53 activated fragment 1 / cyclin dependent kinase interacting protein 1, p21^{WAF1/CIP1}), p16サイクリン依存性キナーゼ4a阻害因子 (p16 inhibitor of cyclin dependent kinase 4a, p16^{INK4a}), サイクリンD1などはpRBのリン酸化を制御する蛋白と考えられている^{(17)~(26)}。したがって, これらの細胞周期制御因子の異常は, TSに代表されるS期特異性蛋白の発現に影響を与えると推測される。

本研究では, 胃癌と大腸癌を対象として腫瘍内TSレベルの測定を定量的免疫組織染色法を用いて行い, その信頼性を従来用いられてきたバインディングアッセイ法との比較によって検討した。さらに, G1制御にかかわる癌関連遺伝子, および増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の発現を免疫組織学的に評価し, 腫瘍内pTSレベルとの関連について評価した。

I. 対象

対象および方法

1989年1月から1992年12月までに金沢大学医学部第一外科学講座, およびその関連施設で術前化学療法を行わずに外科的治療を施行した胃癌80例と大腸癌50例を対象とした。胃癌症例の男女比は11:5, 年齢は33歳~85歳 (平均64.1歳), 大腸癌症例の男女比は14:11, 年齢は43歳~83歳 (平均65.6歳) であった。なお, pTS量の測定には対象症例のうち凍結標本が保存されていた胃癌39例と大腸癌32例を用いた。

II. pTS量の測定

1. 吉田肉腫からのチミジンリン酸化酵素 (thymidine kinase, TK) 溶液の調製

吉田肉腫2gに4倍量のTK用懸濁緩衝液 [0.25M蔗糖, 5mM塩化マグネシウム, 1mMジチオスレイトール, 50mM Tris-HCl (pH 8.0)] を加え破碎し, 105,000g, 60分間遠心分離した。この上清を上述の緩衝液にて1晩透析後, 10,000g, 20分間遠心分離し, 上清をTK溶液とした。

2. 酵素反応による³H-FdUMPの生成と分離

トリチウム標識フルオロデオキシウリジン (³H-5-fluoro-2'-deoxyuridine) (17.9Ci/mmol, 1mCi/ml, NEN, 東京) 500 μ Ciをロータリーエバポレーターにて減圧乾固し, TK用補因子溶液 [0.1M塩化マグネシウムを含む0.5M Tris-HCl (pH 8.0) 溶液, 100mM ATP溶液, 120mM α -グリセロールリン酸溶液の1:1:1混合液] 0.2mlを加え溶解した。これに上記のTK溶液0.8mlを加え37℃で1時間反応させた。その後蒸留水1ml, 20%トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) 0.5mlを加え3000rpm,

10分間遠心分離し上清にTCA除去剤 (17.7%トリ-n-オクチラミンを含む1,1,2-トリクロロトリフルオロエタン溶液) 2~3mlを加え10分間振盪し, 3000rpm, 5分間遠心分離した。この上清をセルロースプレート (Merck, フランクフルト, 独) にスポットし1M酢酸:1M塩化リチウム混液 (1:1) で展開しFdUMP画分をかきとり0.2M蟻酸アンモニウム (pH 5.0) 2mlを加え抽出, 遠心分離し³H-FdUMPを得た。

3. バインディングアッセイ法によるpTS量の測定

pTS量の測定はSpearsら⁽²⁷⁾の方法に準じて行った。すなわち, 腫瘍組織300~500mgを4倍量のTS用懸濁緩衝液 [0.2M Tris-HCl (pH 7.4), 20mM 2-メルカプトエタノール, 15mM CMP, 100mM フッ化ナトリウム] で破碎し, 105,000gで60分間遠心分離後, その上清を酵素溶液とした。この酵素溶液0.1mlに緩衝液A [0.6M 炭酸水素アンモニウム (pH 8.0), 0.2M メルカプトエタノール, 0.1M フッ化ナトリウム, 15mM CMP] 0.1ml, ³H-FdUMP 0.1ml, 補因子溶液B [2mM テトラヒドロ葉酸, 16mM アスコルビン酸塩, 9mM ホルマリン, 15mM CMP, 20mM メルカプトエタノール, 100mM フッ化ナトリウム, 2% 仔牛血清アルブミン, 50mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)] 0.05mlを順次加え攪拌し, 30℃で20分間反応させTS, ³H-FdUMP, METHFAの三重結合体を形成させた。この反応液に10% TCA 0.35mlを加え反応を停止させ遠心分離し, さらに沈殿を5% TCA 2mlで2回懸濁・遠心した。分離した沈殿に蟻酸0.5mlを加え, 全量をバイアルに入れACS-IIシンチレーター (アマシャム・ジャパン, 東京) 10mlを加えシンチレーションカウンター (アロカLSC-1000, アロカ, 東京) にて放射活性を測定し, 組織1gあたりのpTS量を測定した。

III. 各種蛋白質の免疫組織染色

1. 各種蛋白質に対する抗体

抗ヒト組み換え型TSポリクローナル抗体は大鵬薬品工業 (株) 第二癌研究所より供与を受けた。また, 抗p53抗体, 抗p21^{WAF1/CIP1}抗体, 抗p16^{INK4a}抗体, 抗サイクリンD1抗体, 抗pRB抗体, 抗PCNA抗体には以下のものを用いた。抗ヒトp53モノクローナル抗体 (マウスIgG2b, クローンDO-7, ダコ・ジャパン, 京都); 抗ヒトp21^{WAF1/CIP1}モノクローナル抗体 (マウスIgG1, クローン2G12, Pharmingen, San Diego, USA); 抗ヒトp16^{INK4a}モノクローナル抗体 (マウスIgG1, クローンG175-405, Pharmingen); 抗サイクリンD1モノクローナル抗体 (マウスIgG2a, クローン5D4, Medical & Biological Laboratories CO., 名古屋); 抗pRBモノクローナル抗体 (マウスIgG2a κ , クローン3H9, Medical & Biological Laboratories CO.); 抗PCNAモノクローナル抗体 (マウスIgG2a κ , クローンPC10, DAKO, Glostrup, Denmark)。

2. TSの免疫組織染色

ホルマリン固定パラフィン包埋された標本を4 μ mの厚さに薄切し, シランコーティングスライド (武藤化学, 東京) に付着させ, 100%キシレン (和光純薬, 大阪) にて10分間, 3回の脱パラフィンを行った後, 99.5%エタノール (和光純薬) 中で20回振盪を3回, 90%エタノール中で20回振盪を1回, 70%エタノール中で20回振盪を1回の脱水を行った。水道水で1分間

Mod, moderately differentiated adenocarcinoma; Muc, mucinous adenocarcinoma; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; pRB, retinoblastoma protein; pTS, thymidylate synthase protein; TCA, trichloroacetic acid; TK, thymidine kinase; TS, thymidylate synthase; Well, well differentiated adenocarcinoma

洗浄後、PBS (pH 7.5) (ダルベッコPBS(-), 日本製薬, 東京) で5分間洗浄した。次いで抗原賦活処理として0.1Mクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で500W, 5分間, 3回のマイクロウェーブ処理を行い、室温になるまで放置した後、PBSで5分間洗浄した。次に室温で20分間0.3%過酸化水素加メタノールに浸し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。PBSで5分間, 3回洗浄し、ウシ血清アルブミン (ダコ・ジャパン) を用いて20分間ブロッキングを行った後、PBSにて1000倍に希釈した抗ヒト組み換え型TSポリクローナル抗体 (549 μ g/ml) と4℃で一晩反応させた。続いてPBSで5分間, 3回洗浄した後、ビオチン標識抗マウス、抗ウサギ・ヤギ抗体 (ダコ・ジャパン) を用いて室温で10分間反応させた。PBSで5分間, 3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ダコ・ジャパン) にて室温で10分間反応させた。PBSで5分間, 3回洗浄した後、四塩酸3,3'-ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (和光純薬) を用いて、4分間室温で発色反応させた。水道水で10分間流水洗浄した後、マイヤー・ヘマトキシリン (武藤化学) にて核染色を行った。全過程終了後、脱水、透徹し、封入した。

3. その他の蛋白質の免疫組織染色

ホルマリン固定パラフィン包埋された標本を4 μ mの厚さに薄切し、シランコーティングスライドに付着させ、100%キシレンにて10分間, 3回の脱パラフィンを行った後、99.5%エタノールで20回振盪を3回, 90%エタノール中で20回振盪を1回, 70%エタノール中で20回振盪を1回の脱水を行った。水道水で1分間洗浄後、PBSで5分間洗浄した。次いで抗原賦活処理として、p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a}, サイクリンD1, pRBの染色は、0.1Mクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で500W, 5分間, 4回, PCNAは5分間, 3回のマイクロウェーブ処理を行った。次に、室温になるまで放置し、PBSで5分間洗浄した。室温で20分間0.3%過酸化水素加メタノールに浸し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。PBSで5分間, 3回洗浄し、ウシ血清アルブミンを用いて20分間ブロッキングを行った後、一次抗体と4℃で一晩反応させた。この際、抗p53抗体、抗p21^{WAF1/CIP1}抗体、抗PCNA抗体は100倍、抗サイクリンD1抗体、抗pRB抗体は200倍、抗p16^{INK4a}抗体では50倍にPBSにて希釈した。続いてPBSで5分間, 3回洗浄した後、ビオチン標識抗マウス、抗ウサギ・ヤギ抗体を用いて室温で20分間反応させた。PBSで5分間, 3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて室温で20分間反応させた。PBSで5分間, 3回洗浄した後、DABを用いて、5分間室温で発色反応させた。水道水で10分間流水洗浄した後、マイヤー・ヘマトキシリンにて核染色を行った。全過程終了後、脱水、透徹し、封入した。

IV. 免疫組織染色の定量化

透過光顕微鏡画像解析装置CAS200イメージ分析装置 (Cell Analysis System, Elmhurst, USA) を用いて免疫組織染色強度を定量的に測定した。マイヤー・ヘマトキシリンによる核染色は620nmの波長で測光し、DABの染色強度は500nmの波長で測光した。

1. TS, p16^{INK4a}の染色強度の測定

TS, p16^{INK4a}の染色強度の測定には細胞計測プログラムを用い、コンピューターモニター上における細胞質の1画素あたりの平均吸光度 (cytoplasm average optical density, CYTOAD) を測定した。染色標本の平均吸光度測定には腫瘍の任意の視野を

選択し、15~20視野で行った。この結果得られたCYTOADを平均し、染色強度とした。また、全症例の染色強度の平均値を求め、平均値以上を陽性例、平均値未満を陰性例とした。

2. p53, p21^{WAF1/CIP1}, サイクリンD1, pRB, PCNAの染色率の測定

p53, p21^{WAF1/CIP1}, サイクリンD1, pRB, PCNAの染色率の測定にはER/PR定量分析法を用い、全核面積に対するDABで発色した核の面積比 (陽性面積比, % positive area) の測定を行った。測定は腫瘍の任意の視野を選択し、15~20視野で行った。この結果得られた陽性面積比を平均し、染色率とした。また、全症例の染色率の平均値を求め、平均値以上を陽性例、平均値未満を陰性例とした。

V. 臨床病理学的因子

胃癌の記載は胃癌取り扱い規約²⁸⁾、大腸癌の記載は大腸癌取り扱い規約²⁹⁾に従った。臨床病理学的因子として性別、組織型、臨床病期、腫瘍の壁深達度、脈管侵襲、リンパ節転移度、肝転移を選択し、各因子についてTSの染色強度を比較検討した。

VI. 統計学的処理

免疫組織染色における染色強度、および染色率は、すべて平均値±標準偏差で示した。平均値の有意差検定には、Mann-WhitneyのU検定を用いた。多群間の有意差検定にはKruskal-Wallis検定を用いた。生存率はKaplan-Meier法にて算出し、その有意差検定はLogrank法にて行った。また、相関の有意性の検定はPearsonの相関係数を求め行った。いずれも危険率が5%未満の場合 ($p < 0.05$) を統計学的に有意差ありと判定した。

成 績

I. 胃癌

1. 免疫組織染色

癌細胞、および正常粘膜の細胞質にTSが染色され、その染色性は比較的均一なものから不均一なものまで様々であった (図1A)。TS染色強度は0.01から0.34、平均 0.18 ± 0.05 であった。p53は、癌細胞の核にのみ染色され、正常粘膜細胞も含めた他の細胞には認められなかった (図1B)。p53染色率は0.2%から74.3%、平均 $21.7 \pm 21.0\%$ であった。p21^{WAF1/CIP1}は癌細胞、および正常粘膜の核において強く染色されたが、細胞質が淡く染色される例もあった (図1C)。p21^{WAF1/CIP1}染色率は0.3%から64.4%、平均 $11.4 \pm 13.1\%$ であった。p16^{INK4a}は癌細胞、および正常粘膜の細胞質に染色され、その染色性は比較的均一であった (図1D)。p16^{INK4a}染色強度は0.10から0.39、平均 0.20 ± 0.06 であった。サイクリンD1は癌細胞、および正常粘膜の核に染色されたが、細胞質が淡く染色される例もあった (図1E)。サイクリンD1染色率は1.4%から66.4%、平均 $12.9 \pm 17.2\%$ であった。pRB, PCNAとも、癌細胞、正常粘膜の核に染色された (図1F・G)。pRBの染色率は0.3%から80.6%、平均 $35.1 \pm 23.5\%$ 、PCNAの染色率は10.4%から98.6%、平均 $44.7 \pm 14.7\%$ であった。

2. TS染色強度とpTS量の相関

TS染色強度とpTS量の関係を見ると、両者の間には有意な正の相関関係が認められた ($r = 0.58$, $p < 0.01$) (図2)。

3. 腫瘍組織と正常組織におけるTS染色強度の比較

胃癌症例80例中23例について腫瘍組織と正常組織のTS染色強度を比較した。腫瘍組織の平均染色強度は0.16、正常組織の平均染色強度は0.15であり、有意差を認めなかった。

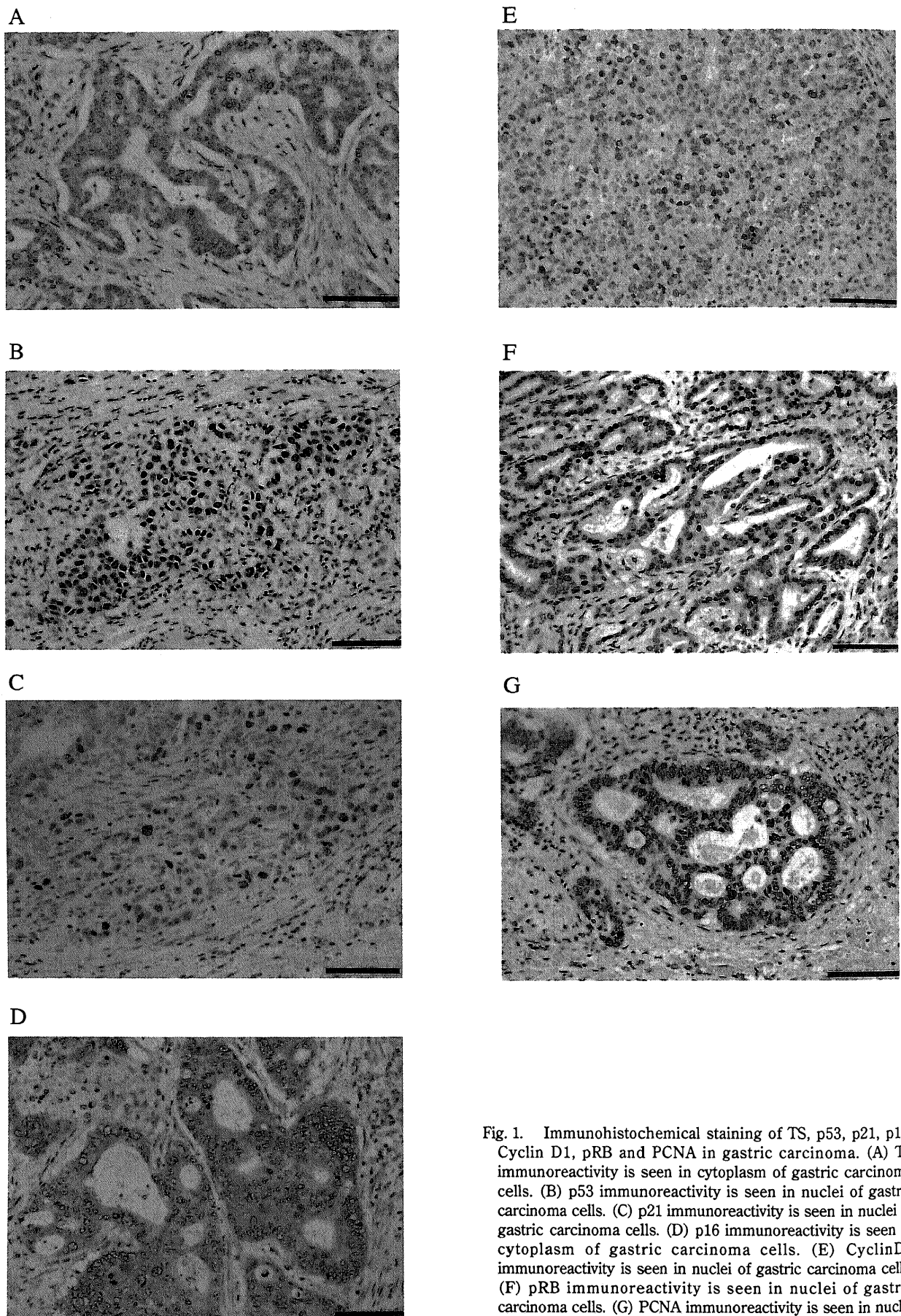


Fig. 1. Immunohistochemical staining of TS, p53, p21, p16, Cyclin D1, pRB and PCNA in gastric carcinoma. (A) TS immunoreactivity is seen in cytoplasm of gastric carcinoma cells. (B) p53 immunoreactivity is seen in nuclei of gastric carcinoma cells. (C) p21 immunoreactivity is seen in nuclei of gastric carcinoma cells. (D) p16 immunoreactivity is seen in cytoplasm of gastric carcinoma cells. (E) Cyclin D1 immunoreactivity is seen in nuclei of gastric carcinoma cells. (F) pRB immunoreactivity is seen in nuclei of gastric carcinoma cells. (G) PCNA immunoreactivity is seen in nuclei of gastric carcinoma cells. Bar indicates 100 μ m.

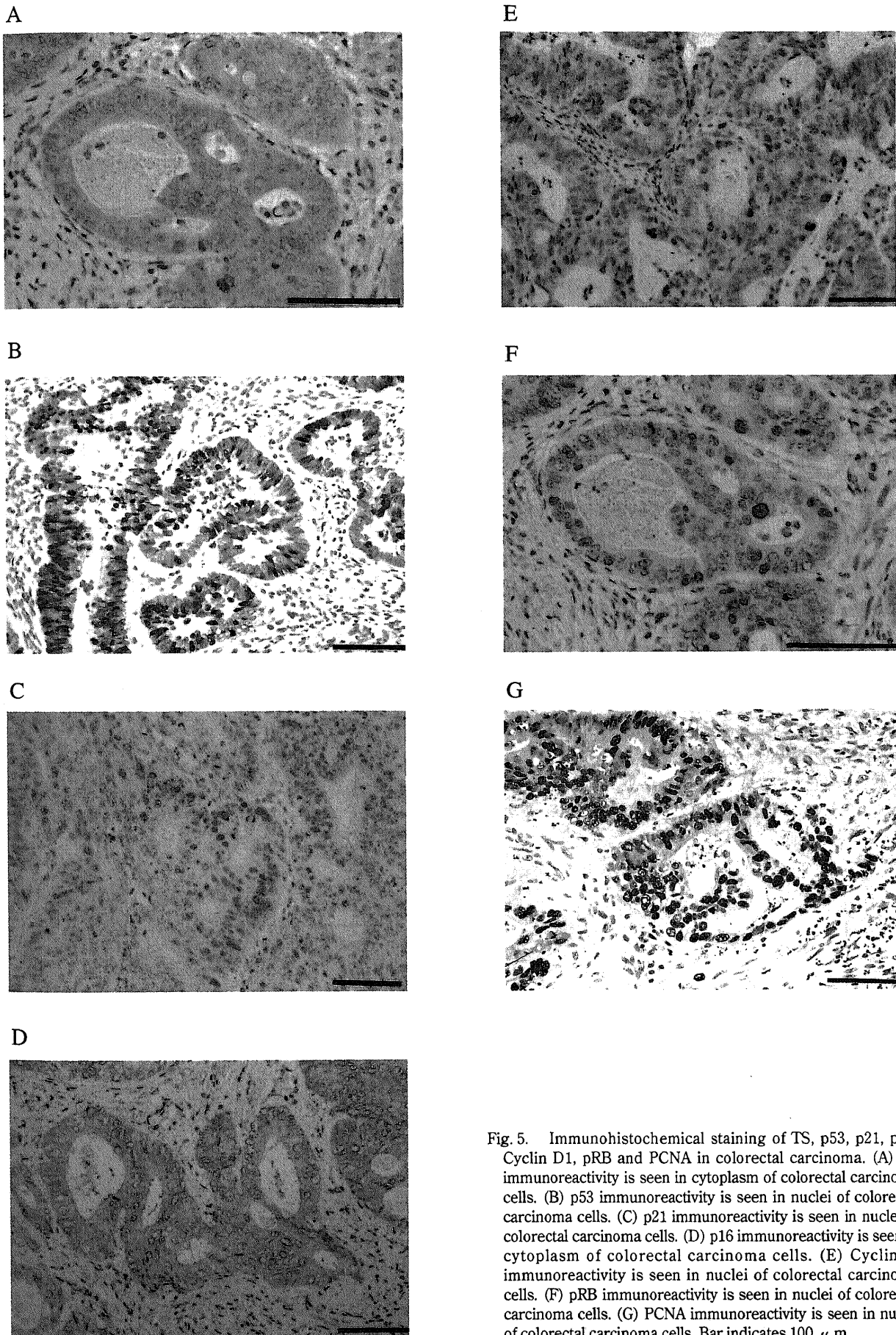


Fig. 5. Immunohistochemical staining of TS, p53, p21, p16, Cyclin D1, pRB and PCNA in colorectal carcinoma. (A) TS immunoreactivity is seen in cytoplasm of colorectal carcinoma cells. (B) p53 immunoreactivity is seen in nuclei of colorectal carcinoma cells. (C) p21 immunoreactivity is seen in nuclei of colorectal carcinoma cells. (D) p16 immunoreactivity is seen in cytoplasm of colorectal carcinoma cells. (E) Cyclin D1 immunoreactivity is seen in nuclei of colorectal carcinoma cells. (F) pRB immunoreactivity is seen in nuclei of colorectal carcinoma cells. (G) PCNA immunoreactivity is seen in nuclei of colorectal carcinoma cells. Bar indicates 100 μ m.

4. 臨床病理学的因子との相関

表1に各臨床病理学的因子別のTS染色強度を示した。性別、組織型による差は認めなかった。臨床病期では、Ia期0.21, Ib期0.18, II期0.18, IIIa期0.18, IIIb期0.17, IVa期0.15, IVb期0.16と病期の進行に伴って、TS染色強度が低下する傾向を認め、Ia期とIb, IIIb, IVa, IVb期との間に有意差が認められた。腫瘍の壁深達度では、si癌を除くと壁深達度が進むに伴いTS染色強度が低値となる傾向を認め、m癌とss, se癌との間、およびsm, mp, ss癌とse癌との間に有意差を認めた。尿管侵襲では、リンパ管侵襲あるいは静脈侵襲陽性例のTS染色強度が、おのこの陰性例と比較して低値であったが有意差は認めなかった。リンパ節転移では、転移度が高度になるにつれてTS染色強度が低値となり、n0とn3, n0とn4の間に有意差がみられた。肝転移では、転移陽性例の方がTS染色強度が陰性例と比較して低値であったが有意差は認めなかった。

胃癌80例のうち、非治癒切除、術死、予後不明例を除いた65例についてpTSの発現と生存率の関係を検討した。なお、全症例のTS染色強度の平均値は0.18であったため、0.18以上の症例を陽性、0.18未満の症例を陰性とした。65例全例について検討すると、術後5年生存率はTS陽性例(31例)で78.2%, 陰性例(34例)では56.3%であり、陽性例は陰性例に比べ有意に予後良好であった($p < 0.05$) (図3)。また、65例のうち進行癌49例について検討すると、術後5年生存率はTS陽性例(20例)で66.4%, 陰性例(29例)で45.2%であり、有意差はないもののTS陽性例は陰性例に比べ予後良好である傾向を認めた(図4)。

3. 細胞周期制御因子との関連

ついで、pTS発現と細胞周期制御因子の発現との関連を検討した。すなわち、p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a}, サイクリンD1, pRB, およびPCNAの染色強度とTS染色強度を比較検討した。なお、p53, p21^{WAF1/CIP1}, サイクリンD1, pRB, PCNAにおける全症例の染色率の平均値は各々21.7%, 11.4%, 12.9%, 35.1%, 44.7%であり、それぞれの平均値以上を陽性、平均値

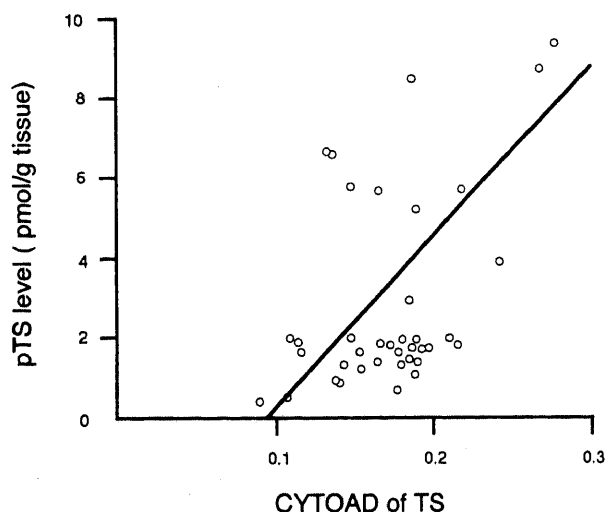


Fig. 2. Relationship between pTS level and cytoplasm average optical density (CYTOAD) of TS in gastric carcinomas. The liner regression line formed from the data points is shown in TS protein level versus CYTOAD of TS ($r = 0.58$, $p < 0.01$).

未満を陰性とした。また、p16^{INK4a}における全症例の染色強度の平均値は0.20であり、0.20以上を陽性、0.20未満を陰性とした。その結果、p53, p21^{WAF1/CIP1}, サイクリンD1, pRB, およびPCNAについては、陰性例と陽性例の間にTS染色強度の差を認めなかった。一方p16^{INK4a}では、p16^{INK4a}陽性例は陰性例と比較し有意に高いTS染色強度を示した($p < 0.01$) (表2)。

II. 大腸癌

1. 免疫組織染色

各免疫組織染色像は胃癌におけるものと同様であった。各染色像を図5に示した。TS染色強度は0.10から0.27, 平均 0.17 ± 0.04 であった。p53染色率は0.3%から80.9%, 平均 $35.4 \pm 26.5\%$ であった。p21^{WAF1/CIP1}染色率は0.4%から42.7%, 平均 $9.1 \pm 10.7\%$ であった。p16^{INK4a}染色強度は0.09から0.34, 平均

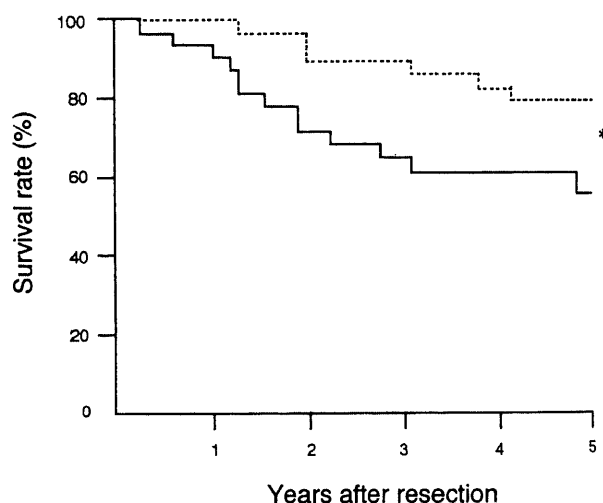


Fig. 3. Survival curves of patients with gastric carcinoma after curative resection. ---, TS positive cases ($n=31$); —, TS negative cases ($n=34$). * $p < 0.05$ by Logrank test.

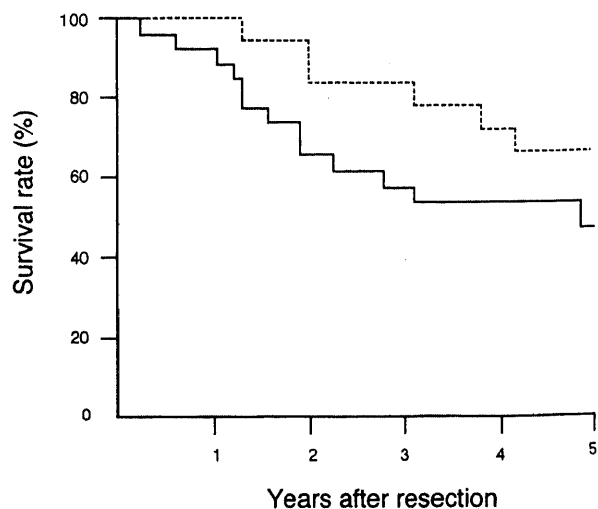


Fig. 4. Survival curves of patients with advanced gastric carcinoma after curative resection. ---, TS positive cases ($n=20$); —, TS negative cases ($n=29$).

0.20±0.05であった。サイクリンD1染色率は0.3%から72.3%，平均12.6±16.9%であった。pRBの染色率は0.8%から84.8%，平均42.1±24.0%，PCNAの染色率は17.7%から88.8%，平均45.6±16.5%であった。

2. TS染色強度とpTS量の相関

TS染色強度とpTS量の関係を見ると、胃癌の場合と同様に両者の間には有意な正の相関関係が認められた ($r = 0.55$, $p < 0.01$) (図6)。

3. 腫瘍組織と正常組織におけるTS染色強度の比較

大腸癌症例50例中17例について腫瘍組織と正常組織のTS染色強度を比較した。腫瘍組織の平均染色強度は0.17，正常組織の平均染色強度は0.15であり、胃癌の場合と同様に有意差を認めなかった。

4. 臨床病理学的因子との相関

表3に各臨床病理学的因子別のTS染色強度を示した。性別、組織型による差は認めなかった。臨床病期では、病期が進行するに伴いTS染色強度が低下する傾向がみられたが、有意差はなかった。腫瘍の壁深達度では、壁深達度が進むに従いTS染色強度が低下する傾向を認めたが、有意差はなかった。また、脈管侵襲の有無、リンパ節転移の程度、肝転移の有無についてもTS染色強度に有意な差を認めなかった。

大腸癌50例のうち、非治癒切除、術死、予後不明例を除いた39例についてTSの発現と生存率の関係を検討した。なお、全症例のTS染色強度の平均値は0.17であったため、0.17以上の症例を陽性、0.17未満の症例を陰性とした。39例全例について検討すると、術後5年生存率はTS陽性例(21例)で83.1%，

Table 1. Relationship between the CYTOAD of TS and clinicopathological factors in 80 gastric carcinoma cases

Facter	Classification	Number of cases	CYTOAD of TS ($\bar{x} \pm SD$)
Sex	Male	55	0.18±0.05
	Female	25	0.18±0.05
Histological classification ^{a)}	Pap	8	0.17±0.04
	Well	10	0.21±0.06
	Mod	21	0.17±0.04
	Por	33	0.17±0.04
	Muc	3	0.16±0.01
	Sig	5	0.19±0.04
Clinical stage	I a	15	0.21±0.06
	I b	18	0.18±0.04
	II	10	0.18±0.04
	III a	10	0.18±0.04
	III b	8	0.17±0.05
	IV a	8	0.15±0.03
	IV b	11	0.16±0.04
Depth of invasion ^{b)}	m	8	0.22±0.07
	sm	8	0.19±0.04
	mp	13	0.18±0.03
	ss	34	0.17±0.04
	se	13	0.14±0.05
	si	4	0.19±0.03
Lymphatic invasion	Negative	31	0.19±0.05
	Positive	49	0.17±0.04
Venous invasion	Negative	61	0.18±0.05
	Positive	19	0.16±0.04
Lymph node involvement	n0	32	0.19±0.05
	n1	18	0.18±0.04
	n2	12	0.17±0.03
	n3	12	0.15±0.04
	n4	6	0.14±0.02
Liver metastasis	Negative	74	0.18±0.05
	Positive	6	0.16±0.04

CYTOAD, cytoplasm average optical density; TS, thymidylate synthase.

Clinicopathological factors including clinical stage and lymph node involvement were evaluated according to the general rules for the gastric cancer study by the Japanese research society for gastric cancer.

a) Pap, papillary adenocarcinoma; Well, well differentiated adenocarcinoma; Mod, moderately differentiated adenocarcinoma; Por, poorly differentiated adenocarcinoma; Muc, mucinous adenocarcinoma; Sig, signet-ring cell carcinoma.

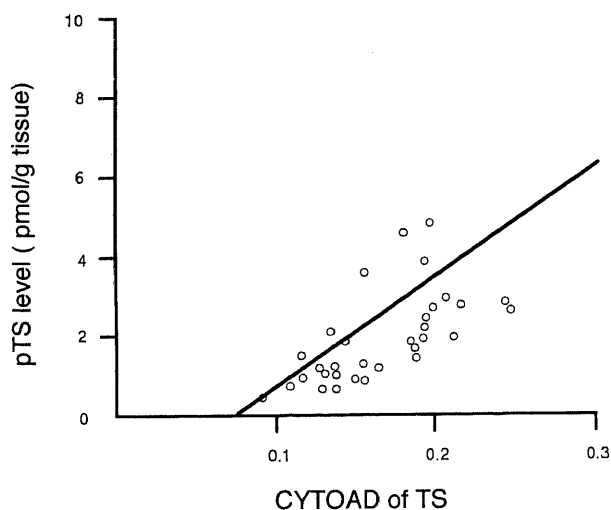
b) m, intramucosal carcinoma; sm, submucosal carcinoma; mp, carcinoma invading into the muscularis propria; ss, subserosal carcinoma; se, serosal carcinoma; si, carcinoma infiltrating the other organ.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test.

Table 2. Relationship between the CYTOAD of TS and expression of p53, p21, p16, cyclin D1, pRB, and PCNA in 80 gastric carcinoma cases

Factor		Number of cases	CYTOAD of TS ($\bar{x} \pm SD$)
p53	Negative	53	0.17 ± 0.04
	Positive	27	0.18 ± 0.05
p21	Negative	52	0.17 ± 0.04
	Positive	28	0.19 ± 0.05
p16	Negative	45	0.16 ± 0.04
	Positive	35	0.19 ± 0.05]*
Cyclin D1	Negative	58	0.17 ± 0.05
	Positive	22	0.18 ± 0.04
pRB	Negative	37	0.17 ± 0.06
	Positive	43	0.18 ± 0.05
PCNA	Negative	42	0.18 ± 0.04
	Positive	38	0.18 ± 0.05

PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

* $p < 0.05$ by Chi-square testFig. 6. Relationship between pTS level and CYTOAD of TS in colorectal carcinomas. The liner regression line formed from the data points is shown in TS protein level versus CYTOAD of TS ($r = 0.58$, $p < 0.01$).

陰性例 (18例) で61.8%であり、有意差はないものの陽性例は陰性例に比べ予後が良好である傾向を認めた ($p = 0.06$) (図7). また、39例のうち進行癌37例について検討すると、術後5年生存率はTS陽性例 (20例) で82.0%, 陰性群 (17例) で58.0%であり、有意差はないものの陽性例は陰性例に比べ予後良好である傾向を認めた (図8).

3. 細胞周期制御因子との関連

ついで、pTS発現と細胞周期制御因子の発現との関連を検討した。すなわち、p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a}, サイクリンD1, pRB, およびPCNAの染色強度とTS染色強度を比較検討した。なお、p53, p21^{WAF1/CIP1}, サイクリンD1, pRB, PCNAにおけ

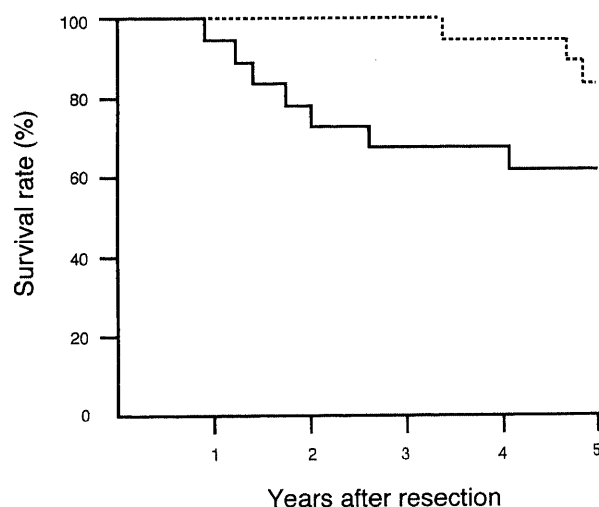
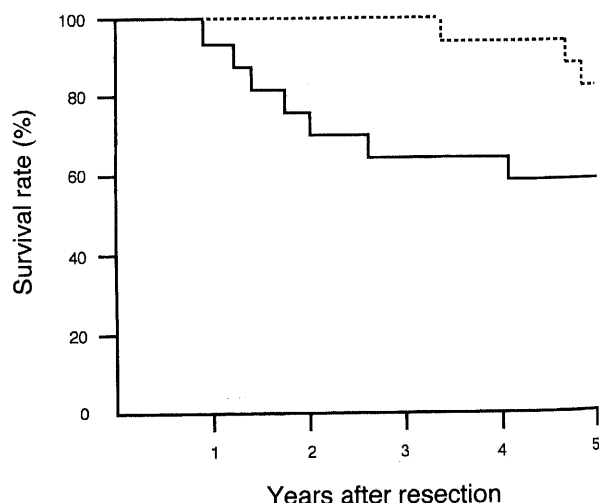
Fig. 7. Survival curves of patients with colorectal carcinoma after curative resection. ---, TS positive cases ($n=21$); —, TS negative cases ($n=18$).Fig. 8. Survival curves of patients with advanced colorectal carcinoma after curative resection. ---, TS positive cases ($n=20$); —, TS negative cases ($n=17$).

Table 3. Relationship between the CYTOAD of TS and clinicopathological factors in 50 colorectal carcinoma cases

Factor	Classification	Number of cases	CYTOAD of TS ($\bar{x} \pm SD$)
Sex	Male	28	0.18 $\pm$ 0.05
	Female	22	0.17 $\pm$ 0.04
Histological classification ^{a)}	Well	26	0.17 $\pm$ 0.04
	Mod	19	0.17 $\pm$ 0.05
	Por	2	0.26 $\pm$ 0.11
	Muc	3	0.15 $\pm$ 0.02
Clinical stage	I	5	0.19 $\pm$ 0.05
	II	21	0.17 $\pm$ 0.04
	III a	11	0.18 $\pm$ 0.06
	III b	5	0.17 $\pm$ 0.06
	IV	8	0.17 $\pm$ 0.05
Depth of invasion ^{b)}	sm	2	0.18 $\pm$ 0.04
	mp	5	0.19 $\pm$ 0.06
	ss	37	0.18 $\pm$ 0.05
	se	4	0.14 $\pm$ 0.02
	si	2	0.14 $\pm$ 0.05
Lymphatic invasion	Negative	33	0.17 $\pm$ 0.04
	Positive	17	0.19 $\pm$ 0.06
Venous invasion	Negative	40	0.18 $\pm$ 0.04
	Positive	10	0.16 $\pm$ 0.07
Lymph node involvement	n0	28	0.17 $\pm$ 0.04
	n1	12	0.18 $\pm$ 0.06
	n2	5	0.15 $\pm$ 0.04
	n3	3	0.19 $\pm$ 0.05
	n4	2	0.21 $\pm$ 0.09
Liver metastasis	Negative	48	0.17 $\pm$ 0.05
	Positive	2	0.18 $\pm$ 0.01

Clinicopathological factors including clinical stage, depth of invasion, and lymph node involvement were evaluated according to the general rules for clinical and pathological studies on cancer of the colon, rectum and anus by the Japanese research society for cancer of the colon and rectum.

a) b) See Table 1 for abbreviations.

Table 4. Relationship between the CYTOAD of TS and expression of p53, p21, p16, cyclin D1, pRB, and PCNA in 50 colorectal carcinoma cases

Factor		Number of cases	CYTOAD of TS ($\bar{x} \pm SD$)
p53	Negative	23	0.16 $\pm$ 0.03
	Positive	27	0.19 $\pm$ 0.05]*
p21	Negative	34	0.18 $\pm$ 0.06
	Positive	16	0.18 $\pm$ 0.04
p16	Negative	27	0.17 $\pm$ 0.05
	Positive	23	0.19 $\pm$ 0.04]*
Cyclin D1	Negative	37	0.17 $\pm$ 0.05
	Positive	13	0.19 $\pm$ 0.04
pRB	Negative	23	0.18 $\pm$ 0.05
	Positive	27	0.17 $\pm$ 0.04
PCNA	Negative	26	0.16 $\pm$ 0.04
	Positive	24	0.19 $\pm$ 0.04]*

*p<0.05 by Chi-square test

る全症例の染色率の平均値は各々35.4%, 9.1%, 12.6%, 42.1%, 45.6%であり, それぞれの平均値以上を陽性, 平均値未満を陰性とした。また, p16^{INK4a}における全症例の染色強度の平均値は0.20であり, 0.20以上を陽性, 0.20未満を陰性とした。p21^{WAF1/CIP1}, サイクリンD1, およびpRBについては, 陰性例と陽性例の間にTS染色強度の差を認めなかったが, p53, p16^{INK4a}, PCNAではおのおの陽性例が陰性例に比べ有意に高いTS染色強度を示した (p53, $p < 0.05$; p16^{INK4a}, $p < 0.05$; PCNA, $p < 0.01$) (表4)。

考 察

TSは分子量65,000~70,000の蛋白質で, 細胞質内では同性二量体として存在する³⁰⁾。その立体構造はすでに明らかにされており, FdUMPおよびMETHFAは複数の水素結合によってTSの活性中心近辺と結びつく³¹⁾。FdUMPはTSによる還元メチル化を受けないため, これら三者の間に形成された水素結合は解除されず, TS本来の基質であるdUMPの結合が妨げられることになる。したがって, FdUMP, すなわち5-FUによるTSの競合的阻害効率は, TS, FdUMP, METHFA三者相互の量的関係に依存すると解釈される。腫瘍細胞質内のpTS量に比してFdUMPおよびMETHFAの双方が量的優位にあれば, TSの阻害はほぼ完全に達成される。一方, FdUMPとMETHFAのどちらか一者でも不足しているとTS阻害による細胞死を惹起することはできない。TSの不完全阻害下では, TSmRNAからpTSへの翻訳が持続し, TSの遊離基質結合部位に変化を認めないことが報告されている³²⁾。

近年, 欧米では5-FUとフォリン酸カルシウムの併用療法が大腸癌に対する標準的な化学療法となっている³³⁾³⁴⁾。フォリン酸投与に引き続く腫瘍細胞内還元型葉酸濃度の上昇が, 5-FUの抗腫瘍効果を著しく増強するものと考えられている。また, シスプラチンも細胞膜における中性アミノ酸の能動輸送阻害に端を発する一連の代謝を修飾することにより, 還元型葉酸濃度を上昇させて5-FUの抗腫瘍効果を増強することが明らかにされた^{35)~37)}。癌の化学療法に新境地を開いた生化学的調節(biochemical modulation)の概念に立脚したこれら一連の化学療法は, 進行・再発大腸癌などの治療成績を確実に向上させている³⁸⁾。しかし, その一方で5-FUとその調節因子を併用した化学療法が無効である腫瘍も相当数存在する。かかる調節因子の併用下にみられる5-FU抵抗性は, 主として腫瘍組織におけるpTS量の高値に由来するものと思われる³⁹⁾。トポイソメラーゼI阻害物質などの新規抗癌剤が臨床に用い始められた現在⁴⁰⁾⁴¹⁾, pTS量高値の腫瘍には作用機序の異なる薬剤を選択すべきである。したがって, 腫瘍組織におけるpTSの発現を評価することは癌化学療法の戦略構築上極めて大きな意義をもつことになる。

従来, 腫瘍内のpTS量の測定にはバインディングアッセイ法が用いられてきた⁴²⁾。しかし, この方法によるpTS量の測定にはいくつかの問題点がある。第1に, この方法では300mg以上の組織量を必要とする³²⁾⁴³⁾。このような大量の検体は, 進行癌手術摘出標本からしか得ることができない。したがって, 術前化学療法予定症例や切除不可能な進行癌症例に対する生検組織, あるいは腫瘍組織量の少ない早期癌ではpTS量を測定することは不可能である。第2に, この方法では検体内に含まれる間質細胞や炎症細胞も測定の対象となるため, 純粋に腫瘍細胞

だけのpTS量が得られない。第3に, 測定には新鮮標本を必要とするため, ホルマリン固定標本を用いた多数例を対象とするレトロスペクティブな研究は不可能である。これらの問題点を解決するために, Jastreboffら⁴⁴⁾やJohnstonら⁴⁵⁾⁴⁶⁾により抗TS抗体が作成され, パラフィン包埋ブロックを用いた免疫組織染色により臨床例の検討が行われた⁴⁷⁾。しかし, 免疫組織染色においては, その評価が定性的かつ判定者の主観に依存する点に問題があった。そこで本研究においては, 免疫組織染色強度を透過光顕微鏡画像解析装置であるCAS200イメージ分析装置を用いて定量的かつ客観的に判定した。胃癌症例では, すべての腫瘍組織でTSが染色され, CAS200によって定量化した染色強度とバインディングアッセイ法より得られたpTS量との間には有意な相関関係がみられた。また, 大腸癌症例を用いた検討でも同様であり, TSのポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色法がpTSの定量法として高い信頼性を有しているものと思われる。今後, 本研究で用いた方法によって測定した腫瘍内pTS量と5-FUを用いた化学療法の効果との関係や, 化学療法中の腫瘍内pTS発現量の変化などを検討する必要がある。

TSは, 前述した如く, dTMPを生成するポリミジンの新たな合成系律速酵素である。したがって, 高い増殖能を有する腫瘍組織ではpTSの発現量が高いと予想される。Johnstonら⁴⁷⁾は, TSに対するモノクローナル抗体を用いて直腸癌症例の免疫組織染色を行った結果, 腫瘍内pTSレベルと腫瘍の悪性度は相関し, pTS発現の程度は直腸癌の予後因子になり得ると結論している。ところが, 本研究では逆の結果が得られた。胃癌では, 臨床病期が進行するほどTS染色強度, すなわち腫瘍内pTS量が有意な低値を示した。臨床病期を構成する因子についても同様であり, 壁深達度が深くなるほど, リンパ節転移度が高くなるほどに腫瘍内pTS量が有意に低値を示した。また, 肝転移の有無については転移陽性例の方が陰性例よりも低値をとる傾向がみられ, 脈管侵襲に関しても同様であった。大腸癌では有意差は認めないものの, 臨床病期が進行するに従いpTS量が低値となる傾向を認めた。腫瘍の壁深達度, リンパ節転移, 肝転移, 脈管侵襲などの個々の因子とpTS量の間には有意の相関関係はみられなかった。腫瘍組織内pTS量と予後との関連をみると, 胃癌では, TS陽性例の予後が陰性例に比べ良好であり, 大腸癌では, TS陽性例の予後が陰性例と比較して良好である傾向を認めた。すなわち, 胃癌・大腸癌においては腫瘍内pTS発現量と腫瘍の生物学的悪性度は逆相関を示す可能性が示唆された。この結果はJohnstonら⁴⁷⁾の報告と分離した成績であるが, 腫瘍組織におけるpTS発現量とその悪性度の関係について定説はなく, また, 種族の違いや異なった食習慣などが成績の違いに関与している可能性がある。また, TSは, 癌細胞に特異的な蛋白ではなく, 正常細胞でも発現がみられる。本研究では, 胃癌・大腸癌の腫瘍組織内のpTS量と正常組織内のpTS量に有意な差はなかった。

一方, 近年の分子生物学的研究の進歩により, 細胞周期制御機構の破綻が細胞癌化の重要な原因の一つであることが明らかにされた^{11)~14)}。さらに, 腫瘍細胞にみられる細胞周期制御因子の異常の有無が腫瘍の生物学的悪性度を規定する因子となることが報告されている^{48)~53)}。TSはS期特異性蛋白の一つであるため, 細胞周期制御機構の破綻はpTSの発現に影響を及ぼす可能性が高い。そこで本研究では, pTS発現と細胞周期制御因子発現の関連について免疫組織学的に検討を加えた。

cdkは細胞周期制御機構の中心的役割を担っている。G1サイクリンは、cdkの活性化を介して標的蛋白質のリン酸化を誘導する。これにより、細胞はG1期を進行しS期へと移行する。高等動物の場合、サイクリンDとサイクリンEがG1サイクリンに相当し、サイクリンDはcdk4とcdk6、サイクリンEはcdk2と複合体を形成し各々を活性化する。サイクリンD/cdk4/cdk6複合体は、pRBのリン酸化酵素として作用する^{24)~26)}。網膜芽細胞腫の原因遺伝子としてクローニングされた癌抑制遺伝子の産物であるpRBは⁵⁴⁾⁵⁵⁾、そのリン酸化に伴って転写因子E2Fと解離し、細胞周期はS期に入る¹⁵⁾¹⁶⁾。pRBより解離したE2Fは、サイクリンEの発現を誘導する。サイクリンEはcdk2と複合体を形成し、pRBのリン酸化をより完全なものとし、S期特異性蛋白質の翻訳が継続することになる。かかるG1ブロック解除機構のなかで、サイクリン/cdk複合体はさまざまなcdkインヒビターによって活性が制御されている⁵⁶⁾。高等動物におけるcdkインヒビターは、p21ファミリーとp16ファミリーの2つに分類される。p21ファミリーはサイクリン/cdk複合体に対し特異性が低く、幅広い種類のサイクリン/cdk複合体と結合してそのキナーゼ活性を阻害する⁵⁵⁾⁵⁷⁾。一方、p16ファミリーはcdkに対する特異性が高く、cdk4あるいはcdk6とのみ結合し、その活性を阻害する²⁶⁾⁵⁸⁾。紫外線やX線などにより核内染色体のDNAが損傷された場合、細胞周期のG1期またはG2期で細胞の増殖が一時休止する。この間に、損傷されたDNAは修復されるが、特にG1期における休止には癌抑制遺伝子産物であるp53蛋白質が必須である。p53蛋白質は、その半減期が約20分と短いので正常細胞内の発現量は低い。しかし、種々の刺激でDNAが損傷を受けると細胞内p53の濃度が急速に上昇し、下流遺伝子であるp21^{WAF1/CIP1}などの転写活性化を介してcdkの阻害が成立する。その結果、細胞周期上でG1期からS期への移行が妨げられ、p53の癌抑制遺伝子としての機能が発揮されると考えられている^{17)~23)}。

これまで癌抑制遺伝子、サイクリン/cdk複合体やcdkインヒビターの異常が種々の腫瘍で発見されてきた。p53遺伝子異常は、あらゆる種類のヒト癌においてみられ、その頻度は約50%に達し⁵⁹⁾、胃癌⁴⁸⁾、乳癌⁴⁹⁾、肺癌⁵⁰⁾などにおいてもその発現例は予後不良とされている。また乳癌⁶⁰⁾、食道癌⁶¹⁾でサイクリンD1遺伝子の増幅とそれに伴う蛋白過剰発現が報告されており、試験管内でもサイクリンD1遺伝子の導入により細胞が悪性転化することが確認されている¹¹⁾¹²⁾。さらに、脳腫瘍においてはcdk4遺伝子の増幅例が報告されている⁶²⁾。一方、p16^{INK4a}の発現の異常は、ホモ接合性欠失だけでなく^{63)~65)}、点変異、小領域の欠失、遺伝子のメチル化による転写抑制など、様々な機構によって起こること、異常の頻度やタイプに臓器、組織特異性があることが解明されている^{66)~68)}。これに対して、同じcdkインヒビターであるp21^{WAF1/CIP1}に関しては、発癌への直接的な関与は明らかになっていない。p21^{WAF1/CIP1}ノックアウトマウスには大きな異常は認められず、癌の発生頻度も高くない⁶⁹⁾。癌における遺伝子の異常もほとんど報告されておらず、癌発症と遺伝子の異常の相関は低いと考えられている。しかし、p21^{WAF1/CIP1}はp53によってその発現が誘導され、DNAの損傷修復に関与するため、発癌に関与する可能性を完全には否定できない。また、pRBに関しては、食道癌⁶¹⁾⁷⁰⁾や大腸癌^{71)~74)}を含む様々な癌腫でその欠失、変異が報告されている。

本研究では腫瘍内の細胞周期制御因子とpTS量の関係について

免疫組織学的に検討を行った。その結果、胃癌ではp53、p21^{WAF1/CIP1}、サイクリンD1、pRB、PCNAの陰性例と陽性例との間で腫瘍内pTS量に差はなかった。p53、p21^{WAF1/CIP1}などの細胞周期制御因子の発現程度やその異常のみならず、S期を中心とする細胞分画に特徴的に染色されるPCNAの染色性とpTSの発現との間にも相関がみられなかったことは興味深い。一方、p16^{INK4a}陽性例は陰性例と比較して有意に高いpTS量を示した。p16^{INK4a}はG1ブロック機構の解除を抑制する因子であり、p16^{INK4a}陽性例ではpTS量が低いと予測されたが、逆の結果が得られた。胃癌では、p53、p21^{WAF1/CIP1}、pRBの発現程度がpTSの発現に影響を及ぼさず、p16^{INK4a}高発現例で有意に高いpTS発現がみられたことから、TS発現に対するpRB-E2F系の関与が希薄であることが示唆された。

大腸癌においては、p53陰性例よりも陽性例の方が、また、PCNA陰性例よりも陽性例の方が高い腫瘍内pTS量を示した。野生型p53遺伝子から誘導されるp53蛋白の半減期が20~30分であるのに対し、変異型p53遺伝子から誘導されるp53蛋白の半減期は6~7時間と長く⁷⁵⁾、免疫組織染色で同定されるp53蛋白はそのほとんどが変異型である。野生型p53は、TS遺伝子の転写抑制作用を有すると報告されており⁷⁶⁾、本研究の結果はそれを支持するものであった。また、p53の下流遺伝子であるp21^{WAF1/CIP1}やpRBの発現程度とpTS発現量との間には関連がみられないことより、変異型p53発現例に認められたpTS発現亢進はpRB-E2F系を介した現象ではないと解釈された。さらに大腸癌でもp16^{INK4a}高発現例が有意に高いpTS発現を示しており、胃癌と同様pTS発現に対してpRB-E2F系の関与が希薄であることが示唆された。pTS自身がTSmRNAの翻訳を調節するとの報告があり、pTS発現調節機構は複雑かつ特異であると推測される⁷⁷⁾。

種々の異なる作用機序を有する新規抗癌剤が臨床に応用されつつある⁴⁰⁾⁴¹⁾⁷⁸⁾。しかし、それらと全く異なる作用機序を有し、かつ腫瘍細胞内環境を修飾することによって薬剤耐性にも対処が可能な5-FUは、癌の化学療法の分野において今後も重要な地位を保つものと思われる。本研究で行った抗TSポリクローナル抗体による免疫組織染色とその染色性の定量化は、微量検体によるpTSの定量を可能にするものと思われた。また、pTS発現量とp21^{WAF1/CIP1}、p16^{INK4a}、pRBの発現程度、およびp53過剰発現との関係より、pTS発現はpRB-E2F系以外の調節を受けているものと考えられた。今後、pTS発現調節機構をより明らかにすることが必要であると思われる。

結 論

胃癌80例、大腸癌50例を対象に、p53、p21^{WAF1/CIP1}、p16^{INK4a}、サイクリンD1、pRB、PCNA、pTS発現を定量的免疫組織染色法を用いて測定した。また、このうち胃癌39例、大腸癌32例を対象にpTS量を測定し、以下の結論を得た。

1. 胃癌、大腸癌ともに、バインディングアッセイ法により測定されたpTS量と定量的免疫組織染色法によるTS染色強度は正の相関関係にあり、抗TSポリクローナル抗体を用いた定量的免疫組織染色法が信頼性を有するものであることが示された。

2. 胃癌では、臨床病期が進行するほどTS染色強度が有意な低値を示した。臨床病期を構成する因子についても同様であり、壁深達度が深くなるほど、リンパ節転移度が高くなるにつれて

TS染色強度が有意に低下した。

3. 大腸癌では有意差は認めないものの、臨床病期が進行するに従いTS染色強度が低下する傾向を認めた。腫瘍の壁深達度、リンパ節転移の因子とTS染色強度の間には有意の相関関係はみられなかった。

4. 胃癌では、TS陽性例の予後が陰性例に比べ良好であり、大腸癌では、TS陽性例の予後が陰性例と比較して良好である傾向を認めた。

5. 胃癌・大腸癌ともに、p16^{INK4a}陽性例では陰性例よりも高いTS染色強度を呈しており、pTS発現はpRB-E2F系以外の調節を受けているものと考えられた。

6. 大腸癌においてpTS量とp53の過剰発現は高い相関性を示し、大腸癌ではpTS発現亢進の背景の1つにp53遺伝子の変異が関与しているものと思われた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋字教授に深甚なる謝意を捧げます。またCAS200の使用に際し、御指導頂きました医学部付属病院病理部野々村昭孝助教授に心から感謝いたします。終始、直接実験の御指導を賜りました大村健二講師に心から感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり御協力頂きました金沢大学医学部第1外科教室員の皆様に感謝いたします。本論文の要旨の一部は第49回日本消化器外科学会総会(1997, 福岡)、第96回日本外科学会総会(1997, 京都)において発表した。

文 献

- 1) 白坂哲彦, 島本雄司, 大下英之, 木村彰男, 福島正和. 5-FU系抗癌剤とシスプラチンの併用による抗腫瘍効果増強とその作用機序 - 5-FUのBiochemical Modulationの立場から -. 癌と化学療法 18: 403-409, 1991
- 2) 塚越 茂. Biochemical Modulation - その歴史的背景 -. 癌と化学療法 19: 941-945, 1992
- 3) Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* 13: 471-481, 1974
- 4) Danberg PV, Lockshin A. Thymidylate synthetase-substrate complex formation. *Mol Cell Biochem* 43: 49-57, 1982
- 5) Maehara Y, Kusumoto T, Kusumoto H, Anai H, Sakaguchi Y, Kido Y, Okamura T, Korenaga D, Sugimachi K. 5-Fluorouracil and UFT-sensitive gastric carcinoma has a high level of thymidylate synthase. *Cancer* 63: 1693-1696, 1989
- 6) Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frosing R, Bernstein L, Hays AA. Mechanism of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. *Cancer Res* 48: 5894-5900, 1988
- 7) Washtien WL. Thymidylate synthetase levels as a factor in 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate cytotoxicity in gastrointestinal tumor cells. *Mol Pharmacol* 21: 723-728, 1982
- 8) Rossana C, Rao LG, Johnson LF. Thymidylate synthetase overproduction in 5-fluorodeoxyuridine-resistant mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2: 1118-1125, 1982
- 9) Priest DG, Ledford BE, Doig MT. Increased thymidylate synthetase in 5-fluorodeoxyuridine resistant cultured hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 29: 1549-1553, 1980
- 10) Berger SH, Hakala MT. Relationship of dUMP and free FdUMP pools to inhibition of thymidylate synthase by 5-fluorouracil. *Mol Pharmacol* 25: 303-309, 1984
- 11) Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante AS, Doi S, Santella RM, Weinstein IB. Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene* 8: 3447-3457, 1993
- 12) Hinds PH, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. Function of human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 709-713, 1994
- 13) Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996
- 14) Hunter T, Pines J. Cyclins and Cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79: 573-582, 1994
- 15) Dynlacht BD, Flores O, Lees JA, Harlow ED. Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev* 8: 1772-1786, 1994
- 16) Takahashi IS, Kitagawa M, Saijo M, Higashi H, Ogino H, Matsumoto H, Taya Y, Nishimura S, Okumura A. The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene* 10: 1691-1698, 1995
- 17) Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311, 1991
- 18) Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW, Ullrich SJ. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6166-6170, 1990
- 19) El-deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Persons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825, 1993
- 20) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816, 1993
- 21) Xiong Y, Gregory JH, Hui Z, David C, Ryuji K, David B. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704, 1993
- 22) Gu Y, Christoph WT, David OM. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366: 707-710, 1993
- 23) Noda A, Ning Y, Venable SF, Smith OMP, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211: 90-98, 1994
- 24) Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. Human D-type cyclin. *Cell* 65: 691-699, 1991
- 25) Matsusime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK-J3}/CDK4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71: 323-334, 1992
- 26) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707, 1993
- 27) Spears CP, Shahinian AH, Moran RG, Heidelberger C, Corbett TH. In vivo kinetics of thymidylate synthetase inhibition

- in 5-fluorouracil-sensitive and-resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 42: 450-456, 1982
- 28) 胃癌取り扱い規約 (胃癌研究会編). 改訂第12版, 2-89頁, 金原出版, 東京, 1993
- 29) 大腸癌取り扱い規約 (大腸癌研究会編). 改訂第5版, 1-57頁, 金原出版, 東京, 1994
- 30) William RM, Kathy MP, Eric BF, Janet S F-M, Gladys FM, Larry H, Frank M, Robert MS. Structure, multiple site binding, and segmental accommodation in thymidylate synthase on binding dUMP and anti-folate. *Biochemistry* 29: 6964-6967, 1990
- 31) Matthews DA, Appelt K, Oatley SJ, Xoung NH. Crystal structure of *Escherichia coli* thymidylate synthase containing bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and 10-propargyl-5,8-dideazafolate. *J Mol Biol* 214: 923-936, 1990
- 32) 川上和之. ヒト大腸組織内チミジル酸合成酵素活性および葉酸プールの測定とユーエフティ投与によるその変動. 十全医会誌 101: 975-986, 1992
- 33) Doroshow JH, Multhauf P, Leong L, Margolin K, Litchfield T, Akman S, Carr B, Bertrand M, Goldberg D, Blayney D, Odujinrin O, Delap R, Shuster J, Newman E. Prospective randomized comparison of fluorouracil versus fluorouracil and high-dose continuous infusion leucovorin calcium for the treatment of advanced measurable colorectal cancer in patients previously unexposed to chemotherapy. *J Clin Oncol* 8: 491-501, 1990
- 34) Laufman LR, Brenckman Jr WD, Stydnicki KA, Morgan ED, Collier M, Knick VB, Duch DS, Mullin R, Ferone R. Clinical experience with leucovorin and 5-fluorouracil. *Cancer* 63: 1031-1035, 1989
- 35) Shirasaka T, Shimamoto Y, Ohshimo H, Saito H, Fukushima M. Metabolic basis of the synergistic antitumor activities of 5-fluorouracil and cisplatin in rodent tumor models in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 167-172, 1993
- 36) Scanlon KJ, Safirstein RL, Thies H, Gross RB, Waxman S, Guttenplan JB. Inhibition of amino acid transport by cis-diamminedichloroplatinum (II) derivatives in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res* 43: 4211-4215, 1983
- 37) Scanlon KJ, Newman EM, Lu Y, Priest DG. Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8923-8925, 1986
- 38) Kemeny N, Lokichi JJ, Anderson N, Ahlgren D. Recent advances in the treatment of advanced colorectal cancer. *Cancer* 71: 9-18, 1993
- 39) Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55: 1407-1412, 1995
- 40) ニツ木浩一, 涌井 昭, 中尾 功, 坂田 優, 神部真理子, 島田安博, 吉野正効, 田口鐵男, 小川暢也. 再発・進行胃癌に対する塩酸イリノテカン (CPT-11) の後期第II相試験. 癌と化学療法 21: 1033-1038, 1994
- 41) Shimada Y, Yoshino M, Wakui A. Phase II study of CPT-11, a new camptothecin derivative in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 11: 909-913, 1993
- 42) Santi DV, McHenry CS, Perriard ER. A filter assay for thymidylate synthetase using 5-fluoro-2'-deoxyuridylate as an active site titrant. *Biochemistry* 13: 467-470, 1974
- 43) 道伝研司. 消化管癌化学療法における生化学的修飾の研究 - とくに三者結合体形成と還元型葉酸代謝を中心に -. 十全医会誌 103: 721-730, 1994
- 44) Jastreboff MM, Todd MB, Malech HL, Bertino JR. Isolation and functional effect of monoclonal antibodies binding to thymidylate synthase. *Biochemistry* 24: 587-592, 1985
- 45) Johnston PG, Liang CM, Henry S, Chabner BA, Allegra CJ. Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res* 51: 6668-6676, 1991
- 46) Johnston PG, Drake JC, Trepel DJ, Allegra CJ. Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 4306-4312, 1992
- 47) Johnston PG, Fisher ER, Rocktte HE, Fisher BF, Wolmark N, Drake JC, Chabner BA, Allegra CJ. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 12: 2640-2647, 1994
- 48) Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 50: 859-862, 1992
- 49) Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, Tamaki K, Tamakura S, Fukutomi T, Mukai K, Hirohashi S. Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 82: 835-840, 1991
- 50) 家接健一. 原発性非小細胞肺癌におけるp53蛋白発現および腫瘍増殖能に関する研究. 十全医会誌 102: 492-505, 1993
- 51) 大竹由美子. 原発性非小細胞癌におけるBcl-2蛋白およびp53蛋白発現の予後因子としての意義について. 十全医会誌 106: 96-104, 1997
- 52) Yasui W, Kudo Y, Semba S, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 88: 625-629, 1997
- 53) Omura K, Nagasato A, Kanehira E, Kinsen H, Amaya S, Kimura K, Kajita T, Nozaki Y, Mizukami Y, Nonomura A, Watanabe Y. Retinoblastoma and proliferating-cell nuclear antigen expression as predictors of recurrence in well differentiated primary thyroid carcinoma. *J Clin Oncol* 15: 3458-3463, 1997
- 54) Ewen ME. The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Rev* 13: 45-66, 1994
- 55) Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330, 1995
- 56) Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitions of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9: 1149-1163, 1995
- 57) Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1821-1828, 1994
- 58) Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe

- CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by *p18*, a *p16^{INK4/MTS1}*- and *p14^{INK4B/MTS2}*-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8: 2939-2952, 1994
- 59) Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein BM, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878, 1994
- 60) Gillett C, Vera F, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 54: 1812-1817, 1994
- 61) Jiang W, Zhang YJ, Kahn SM, Hollstein MC, Santella RM, Lu SH, Harris CC, Montesano R, Weinstein B. Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9026-9030, 1993
- 62) Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* 54: 4299-4303, 1994
- 63) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-756, 1994
- 64) Kamb A, Gruis NA, Jane WF, Liu Q, Haarshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS, Johnsson BE. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994
- 65) Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, Harris CC. Mutation and altered expression of *p16INK4* in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11045-11049, 1994
- 66) Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 11: 136-140, 1995
- 67) Hirama T, Koeffler P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86: 841-854, 1995
- 68) Shapiro GI, Rollins BJ. *p16INK4a* as a human tumor suppressor. *Biochem Biophys Acta* 1242: 165-169, 1996
- 69) Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking *p21CIP1/WAF1* undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82: 675-684, 1995
- 70) Robert FB, Ying H, Patrical LB, Brian JR, Wendy HR, Rodger CH, Carnell N, James HR, Jim Y, Tim M, Stephen JM. Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. *Cancer Res* 51: 5766-5769, 1991
- 71) Lothe RA, Fossli T, Danielsen HE, Stenwig AE, Nesland JM, Gallie B, Borresen AL. Molecular genetic studies of tumor suppressor gene regions on chromosomes 13 and 17 in colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 84: 1100-1108, 1992
- 72) Meling GI, Lothe RA, Borresen AL, Hauge S, Graue C, Clausen OPF, Rognum TO. Genetic alterations within the retinoblastoma locus in colorectal carcinomas. Relation to DNA ploidy pattern studied by flow cytometric analysis. *Br J Cancer* 64: 475-480, 1991
- 73) Fukuda K, Monden T, Yamamoto H, Ohue M, Fukunaga M, Tomita N, Shimano T, Mori T. Immunohistochemical study of retinoblastoma gene expression in colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 4: 117-121, 1994
- 74) Yamamoto H, Monden T, Ikeda K, Izawa H, Fukuda K, Fukunaga M, Tomita N, Shimano T, Shiozaki H, Monden M. Coexpression of *cdk2/cdc2* and retinoblastoma gene products in colorectal cancer. *Br J Cancer* 71: 1231-1236, 1995
- 75) Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991
- 76) Lee Y, Chen Y, Chang L-S, Johnson LF. Inhibition of mouse thymidylate synthase promoter activity by the wild-type p53 tumor suppressor protein. *Exp Cell Res* 234: 270-276, 1997
- 77) Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, Zinn S, Allegra CJ. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8977-8981, 1991
- 78) 田口鐵男. 消化器癌に対する RP56976 (Docetaxel) 前期第 II 相試験. *癌と化学療法* 21: 2431-2437, 1994

Expression of Thymidylate Synthase and the Cell Cycle Regulator in Gastric and Colorectal Carcinoma

Yusuke Uno, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., 108, 381 — 395 (1999)

Key words gastric cancer, colorectal cancer, thymidylate synthase, 5-fluorouracil, cell cycle regulator

Abstract

Thymidylate synthase (TS) catalyzes the reductive methylation of deoxyuridine 5'-monophosphate to deoxythymidine 5'-monophosphate, and is also a target enzyme of fluoropyrimidine drugs. In this study, immunohistochemistry with an antibody against human TS was used to quantify TS protein in 39 gastric and 32 colorectal carcinoma tissue samples. A cell analysis system was used, and the production of TS protein was expressed as the cytoplasm average optical density (CYTOAD). The TS protein CYTOAD was then correlated with the TS level as measured by a binding assay. Using 80 gastric and 50 colorectal carcinoma tissues samples, the relationship between the TS CYTOAD and clinicopathological factors was examined. In addition, to examine the relationship between the TS CYTOAD and expression of the cell cycle regulators, immunohistochemical stainings of p53 protein, p21 wild type p53 activated fragment 1 / cyclin dependent kinase interacting protein 1 (p21^{WAF1/CIP1}) protein, p16 inhibitor of cyclin dependent kinase 4a (p16^{INK4a}) protein, cyclinD1, retinoblastoma protein (pRB) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were performed. A significant and positive correlation between the TS CYTOAD and the TS protein level measured by the binding assay was shown in the gastric carcinoma tissues, and also in the colorectal carcinoma tissues. In both gastric and colorectal carcinoma patients, the TS CYTOAD showed negative correlation with the grade of clinical stage. The TS protein positive group showed a better survival rate than the negative group. In the gastric carcinoma patients, the TS CYTOAD in the p16^{INK4a} positive group was significantly higher than that in the p16^{INK4a} negative group. In colorectal carcinoma patients, the TS CYTOAD in the group positive to p53, p16^{INK4a}, and PCNA was significantly higher than that of the respective negative group. These findings suggest that quantitative immunohistochemical staining of TS is a useful method for evaluation of the production of TS protein. In addition, expression of TS protein might not be regulated by only pRB-E2F in gastric and colorectal carcinoma tissues. Furthermore, the fact that the TS protein level correlates positively and significantly with p53 protein expression in colorectal carcinoma tissues suggests that overexpression of TS protein in colorectal carcinoma tissues may be due to a mutation of the p53 gene.