

甲状腺分化癌の再発因子に関する分子生物学的研究 免疫組織学的研究

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/2297/9210

甲状腺分化癌の再発因子に関する分子生物学的研究

—免疫組織学的研究—

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)

永 里 敦

甲状腺分化癌術後にその再発を予知できることは临床上極めて重要であるが、現在正確な予知法があるとは言えない。今回著者は、網膜芽細胞腫 (retinoblastoma, RB) 遺伝子の産物である RB 蛋白質 (RB protein, pRB) および増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の発現率、さらに基底膜構成成分であるラミニン (laminin, LM), フィブロネクチン (fibronectin, FN) の量的異常を免疫組織学的に検討し、再発との関係を明らかにした。甲状腺分化癌59症例を対象とし、術後5年以上再発を認めていない40例 (非再発群) の原発巣と、術後再発を認め再発時に組織所見の得られた19例 (再発群) の原発巣と再発巣について検索を行った。免疫染色強度の測定には、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た。pRB, PCNA の染色強度は、陽性面積比、陽性染色比で表し、LM, FN の染色強度は、間質の平均染色強度を測定した。再発の有無と pRB 染色率の関係では、再発群の、pRB 染色の陽性面積比、陽性染色比はそれぞれ 8.4 ± 8.3 , 16.2 ± 11.9 ($\bar{x} \pm SD$) であり、非再発群のそれ (38.6 ± 29.5 , 47.5 ± 31.6) と比較して有意に低率であった ($p < 0.05$)。臨床病理学的因子と pRB 染色率の関係をみると、再発群では原発巣の腫瘍径が 20mm 以下のものでは陽性面積比が 3.2 ± 2.1 , 20mm より大きいものでは 11.7 ± 7.2 であり、20mm 以下のものでは有意に低値であった ($p < 0.05$)。再発の有無と PCNA 染色率の関係では、再発群の PCNA 染色の陽性面積比、陽性染色比はそれぞれ 38.2 ± 28.4 , 52.2 ± 28.3 であり、非再発群のそれ (25.6 ± 29.0 , 37.1 ± 31.9) と比較して有意に陽性染色比が高率であった ($p < 0.05$)。再発の有無と FN の染色強度の関係では有意差を認めなかったが、LM の染色強度との関係では、非再発群で 0.15 ± 0.06 , 再発群で 0.08 ± 0.03 であり、再発群で有意に低値であった ($p < 0.01$)。再発形式別の検討では、PCNA 染色率においてリンパ節再発群のうち1年以内に再発をきたした症例に限ると、原発腫瘍の PCNA 染色率は 23.4 ± 18.4 , 再発腫瘍は 62.5 ± 27.7 と有意に再発腫瘍で高率であった ($p < 0.05$)。次に全症例について、pRB 染色率 (陽性面積比) が10%未満の pRB 低値群と、10%以上の pRB 高値群に分け、また、PCNA 染色率 (陽性面積比) が20%未満の PCNA 低値群と、20%以上の PCNA 高値群に分けてそれぞれの無再発率を算出した。pRB 高値群では pRB 低値群より有意に無再発率が高く、PCNA 低値群では PCNA 高値群より有意に無再発率が高かった ($p < 0.05$)。以上の結果から、甲状腺分化癌において pRB および PCNA 染色率と LM の発現量は再発の予測因子となりうることを示唆された。

Key words thyroid carcinoma, retinoblastoma protein, proliferating cell nuclear antigen, laminin, fibronectin

甲状腺分化癌は他の癌腫と比較して良好な予後を示すが、その再発率は約10~30%と報告されており^{1)~3)}、診断の遅延や不適切な対処は時に致命的となる。したがって、再発の早期発見を目的とした経過観察が、本疾患の一層の治療成績向上に寄与することに疑いはない。さらに、予め再発の高危険症例を拾い上げることが出来れば、それに対し内照射などの補助療法やより厳密な経過観察を施行することができる。しかし、現在臨床上用いられている病期分類は、再発の危険率とは必ずしも相関を示さず、信頼性の高い再発予知法の開発が急務であるといえる。

近年、種々の悪性腫瘍においてその発生のみならず生物学的悪性度と各種癌関連遺伝子との関係が検討されている。甲状腺腫瘍においても *c-erbB-2*⁴⁾, *ras*⁵⁾, *p53*^{6)~14)} などの異常が報告さ

れている。特に *p53* は、未分化癌では高率にその異常が指摘されているにも関わらず、分化癌では異常は認められていない。甲状腺癌においては、*p53* は未分化癌への移行の際に重要となるが、分化癌の発生、増殖への関与は薄いとされている。一方、*p53* とともに特に注目されている癌抑制遺伝子として網膜芽細胞腫 (retinoblastoma, RB) 遺伝子がある。これらは、ともに後期 G1 期において細胞周期を停止させることが判明している^{15)~17)}。最近、*p53* によって誘導されたサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase, Cdk) 阻害蛋白が、Cdk を不活化することにより RB 遺伝子産物である RB 蛋白質 (RB protein, pRB) のリン酸化を阻害し、G1 停止を引き起こすことが明らかとなった¹⁸⁾。したがって、甲状腺分化癌においては *p53* に異常がみられなくとも、pRB の発現の異常がその増殖お

平成8年1月23日受付, 平成8年2月20日受理

Abbreviations: Cdk, cyclin dependent kinase; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; FN, fibronectin; LM, laminin; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; pRB, retinoblastoma protein; RB, retinoblastoma

よび生物学的悪性度に関与している可能性があると考えられる。

一方、癌の浸潤、転移には、種々の接着因子とその主要リガンドである細胞外マトリックス、特に基底膜構成成分の発現異常が関与している可能性が高い^{19)~24)}。正常組織の悪性化、腫瘍化に伴って間質のフィブロネクチン (fibronectin, FN) が減少すること、ラミニン (laminin, LM), FN よりなる基底膜の断裂、消失がみられることなどが種々の癌腫で観察されている^{25)~28)}。しかしながら、甲状腺癌において、これら基底膜成分の量的異常と再発の有無との関係を明らかにした報告はみられない。

本研究は、甲状腺分化癌の pRB 発現率および増殖能の指標である増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 標識率、さらに基底膜成分の量的異常を免疫組織学的に検討し、再発の予測因子となりうるかを検討した。

対象および方法

I. 対 象

1978年1月から1990年12月までに、金沢大学医学部第1外科手術教室で治療切除術を行った甲状腺分化癌症例のうち、術後5年以上再発を認めていない40例 (非再発群) の原発巣の40検体と、術後再発を認め再発時に組織所見の得られた19例 (再発群) の原発巣19検体および再発巣19検体の、計78検体を対象とした。両群の臨床病理学的因子を比較すると、非再発群の男女比は男性9例、女性31例、年齢は18歳から79歳、平均50歳であり、再発群では男性5例、女性14例で年齢は7歳から68歳、平均44歳であった。腫瘍径、組織型、腺内転移の有無では両群に差はなかったが、t分類²⁹⁾では再発群で有意にt4症例が多く、n分類³⁰⁾では非再発群で有意にn0症例が多かった ($p<0.05$) (表1)。切除材料は、ホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックとして保存されているものを使用した。

II. pRB に対する免疫組織染色法

パラフィン包埋された標本を4 μ mの厚さに薄切し、0.02%ポリリジンでスライドに付着させ、100%キシレンにて5分間、3回の脱パラフィンを行った後、100%、90%、70%のエチルアルコールにて各5分間脱水した。ついで、3%過酸化水素加メタノールにて15分間室温で内因性ペルオキシダーゼを阻害した。リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.2) にて洗浄した後、水道水中で600W、5分間、3回のマイクロウェーブ処理をおこない、その後に再びPBSで洗浄した。次に、10%ウサギ正常血清 (ニチレイ、東京) を用いて10分間ブロッキングを行った後、抗pRBモノクローナル抗体 (マウスIgG, クローン3H9; Medical & Biological Laboratories CO., LTD., 名古屋) をPBSで40倍に希釈し、室温にて60分間反応させた。続いてPBSにて3回洗浄し、ビオチン標識ウサギ抗マウスIgG+IgA+IgM (ニチレイ) を用いて室温にて10分間反応させ、PBSにて洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ) で室温にて10分間反応させた。PBSにて洗浄後、四塩酸3, 3'-ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (ニチレイ) にて顕微鏡で発色状態を確認しながら約10分間反応させ、メチル緑にて核染色を行った。全過程の終了後、脱水、透徹を施行し封入した。

III. PCNA に対する免疫組織染色法

パラフィン包埋された標本を4 μ mの厚さに薄切し、0.02%

ポリリジンでスライドに付着させ、100%キシレンにて5分間、3回の脱パラフィンを行った後、100%、90%、70%のエチルアルコールにて各5分間脱水した。ついで、3%過酸化水素加メタノールにて15分間、室温で内因性ペルオキシダーゼを阻害した。PBSにて洗浄した後、水道水中で600W、5分間のマイクロウェーブ処理をおこない、10分間放置した後PBSで洗浄した。次に、10%ウサギ正常血清 (ニチレイ) を用いて10分間ブロッキングを行った後、抗PCNAモノクローナル抗体 (マウスIgG, クローンPC10; Dako, Glostrup, Denmark) をPBSにて50倍に希釈し、4℃で一晩反応させた。続いてPBSにて3回洗浄し、ビオチン標識ウサギ抗マウスIgG+IgA+IgM (ニチレイ) を用いて室温にて10分間反応させ、PBSにて洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ) で室温にて10分間反応させた。PBSにて洗浄後、DABにて顕微鏡で発色状態を確認しながら約10分間反応させ、メチル緑にて核染色を行った。全過程の終了後脱水、透徹を施行し封入した。

IV. LM, FN に対する免疫組織染色法

パラフィン包埋された標本を4 μ mの厚さに薄切し、0.02%ポリリジンでスライドに付着させ、100%キシレンにて5分間、3回の脱パラフィンを行った後、100%、90%、70%のエチルアルコールにて各5分間脱水した。ついで、3%過酸化水素加メタノールにて15分間、室温で内因性ペルオキシダーゼを

Table 1. Clinicopathological findings in differentiated thyroid carcinomas

Clinicopathological findings	No. (%) of cases	
	Recurrence (-)	Recurrence (+)
Age (years)		
≤50	23 (57.5)	10 (52.6)
50<	17 (42.5)	9 (47.4)
Sex		
Male	9 (22.5)	5 (26.3)
Female	31 (77.5)	14 (73.7)
Size (mm)		
≤20	23 (57.5)	7 (36.8)
20<	17 (42.5)	12 (63.2)
Pathology		
Papillary ca.	33 (82.5)	17 (89.5)
Follicular ca.	7 (17.5)	2 (10.5)
t factor		
tis	9 (22.5)	2 (10.5)
t1	8 (20.0)	1 (5.3)
t2	9 (22.5)	3 (15.8)
t3	3 (7.5)	3 (15.8)
t4	11 (27.5)	10 (52.6)*
n factor		
n0	23 (57.5)	4 (21.1)*
n1	16 (40.0)	11 (57.9)
n2	1 (2.5)	4 (21.1)
Intraglandular Metastasis		
Negative	25 (62.5)	11 (57.9)
Positive	15 (37.5)	8 (42.1)

Papillary ca., papillary carcinoma; Follicular ca., follicular carcinoma.

* $p<0.05$

障害した。PBS にて洗浄した後、0.1%トリプシン (Dako) を含む PBS 中に37℃、30分間浸漬した後、PBS で洗浄した。次に、LM は10%ウサギ正常血清 (ニチレイ) を用いて、FN は10%ヤギ正常血清を用いて10分間ブロッキングを行った後、抗 LM モノクローナル抗体 (ラット IgG1, クローン 4C12.8; Immunotech, Marseille, France), およびウサギ抗 FN ポリクローナル抗体 (Dako) をそれぞれ50倍、200倍に希釈し、4℃で2時間反応させた後、PBS にて3回洗浄した。二次抗体は、LM にはビオチン標識ウサギ抗ラット IgG (Vector, Burlingame, USA) を200倍に希釈し、FN にはビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (ニチレイ) を用いて室温にて10分間反応させ、PBS にて洗浄し、ペルオキシダーゼ標識streptavidin (ニチレイ) で室温にて10分間反応させた。PBS にて洗浄後、DAB にて顕微鏡で発色状態を確認しながら約10分間反応させ、メチル緑にて核染色を行った。脱水、透徹の後封入した。

V. 免疫染色強度の測定

免疫染色強度の定量的測定には、透過光顕微鏡画像解析装置である、CAS200 イメージ分析装置 (Cell Analysis Systems, Elmhurst, USA) を用いた。エチル緑による核染色は620nmの

波長で測光し、DAB の染色強度 (OD) は500nm の波長で測光した。

1. pRB, PCNA の染色強度の測定

pRB, PCNA の染色強度の測定には、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) と、全核の吸光度の総和に対する DAB で発色した核の吸光度の和の比 (陽性染色比, % positive stain) の測定を行った。なお、両者は各々下記の式を用いて算出した。

$$\text{陽性面積比} = 100 \times \frac{\text{DAB 陽性核面積の和}}{\text{全核面積の和}}$$

$$\text{陽性染色比} = 100 \times \frac{\text{DAB 陽性核の吸光度の和}}{\text{全核の吸光度の和}}$$

測定は、腫瘍辺縁部の任意の視野を選び、15~20視野でおこなった。閾値の決定は陰性標準標本を用いた測定結果をもとにしておこなった。

2. LM, FN の染色強度の測定

LM, FN の染色強度の測定には細胞計測プログラムを用い、間質の平均染色強度を測定した。測定は腫瘍辺縁部の任意の視

Table 2. Image analysis quantitation of pRB by the CAS 200 system for differentiated thyroid carcinomas

Group	No. of cases	% positive area for pRB ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	% positive stain for pRB ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
Recurrence (-)	40	38.6 $\pm$ 29.5	47.5 $\pm$ 31.6
Recurrence (+)	19	8.4 $\pm$ 8.3	16.2 $\pm$ 11.9

pRB, retinoblastoma protein.

*p<0.05

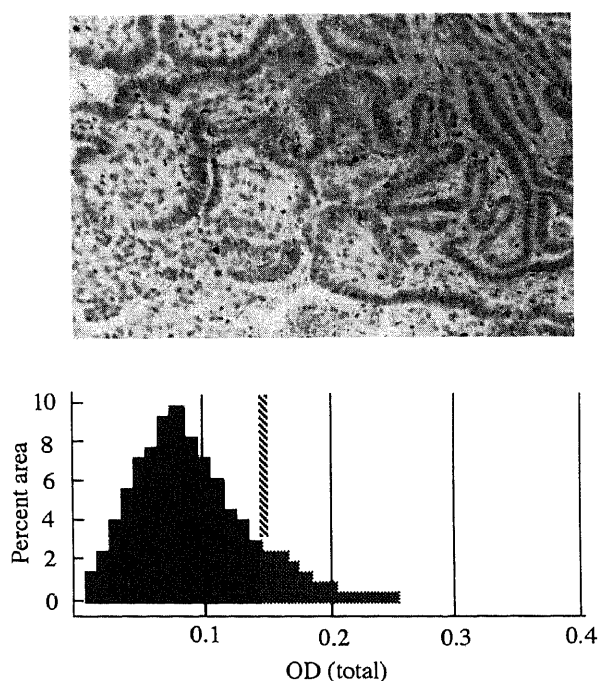


Fig. 1. Immunohistochemical staining of pRB in thyroid papillary carcinoma, and its quantitation with CAS200 image analyzer. ■, negatively staining nuclear area; ▨, positively staining nuclear area; ▤, threshold of OD.

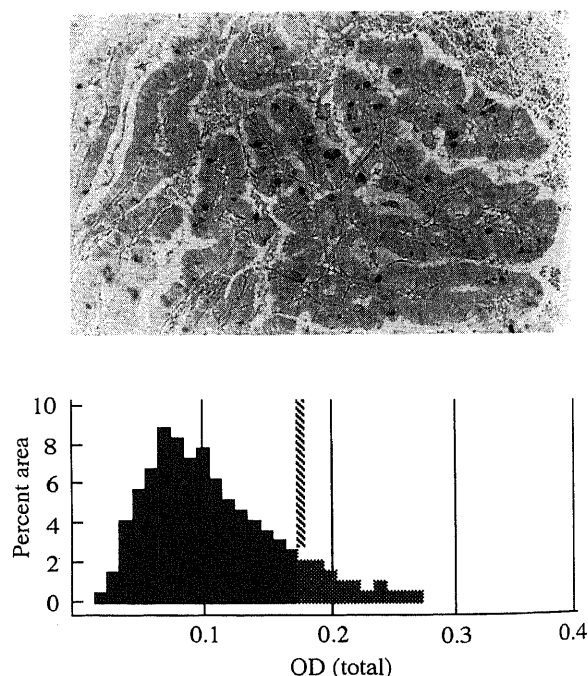


Fig. 2. Immunohistochemical staining of PCNA in thyroid papillary carcinoma, and its quantitation with CAS200 image analyzer. ■, negatively staining nuclear area; ▨, positively staining nuclear area; ▤, threshold of OD.

野を選び、15～20視野でおこなった。閾値の決定は陽性標準標本を用いた測定結果をもとにしておこなった。

VI. 臨床病理学的因子

臨床病理学的因子として年齢、性別、腫瘍径、組織型、t分類、n分類、腺内転移を選択し、年齢は50歳以下と50歳をこえるもの、腫瘍径は20mm以下と20mmをこえるもの、組織型は乳頭癌と濾胞癌、t分類はtis～t3とt4、n分類はn0とn1～n2、腺内転移は陽性と陰性にそれぞれを分類して検討を行った。

VII. 統計学的処理

測定値はすべて $\bar{x} \pm SD$ 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。また、再発群の原発巣と再発巣における各測定値の平均値の差の検定には、Wilcoxon の符号付順位和検定を用いた。離散量に対しては χ^2 検定および Fisher の直接確率計算法を用いた。無再発率の算出は Kaplan-Meier 法を用い、その有意差検定には一般化 Wilcoxon 検定を用いた。いずれも、危険率 (p 値) が 5% 未満を有意差ありとした。

成 績

I. 再発の有無と各抗原の染色性の検討

1. 再発の有無と pRB 染色率

甲状腺乳頭癌の pRB 免疫染色像および CAS200 によって得られたヒストグラムを示した (図1)。再発の有無と pRB 染色率の関係では、再発群の、pRB 染色の陽性面積比、陽性染色比はそれぞれ 8.4 ± 8.3 、 16.2 ± 11.9 であり、非再発群のそれ (38.6 ± 29.5 、 47.5 ± 31.6) と比較して有意に低率であった

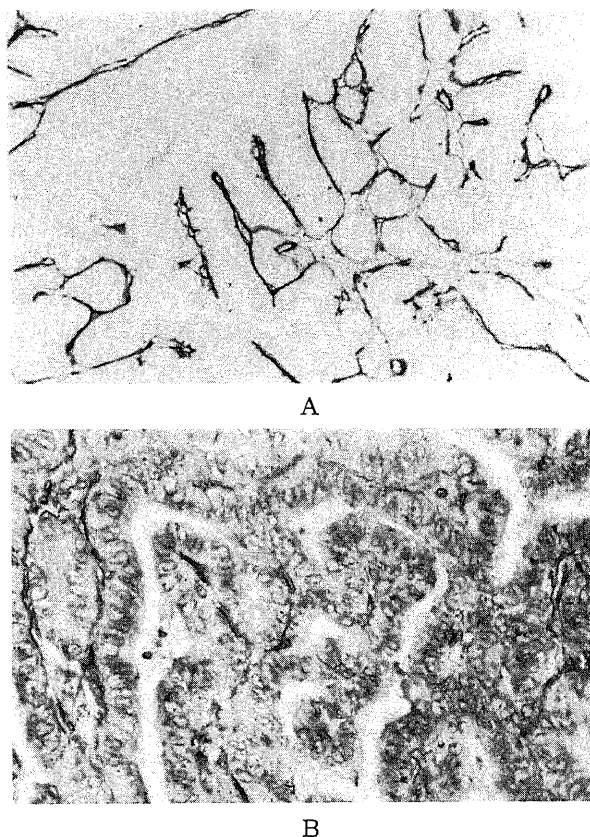


Fig. 3. Immunohistochemical stainings of thyroid papillary carcinoma sections using anti-laminin monoclonal antibody (A), and using anti-fibronectin polyclonal antibody (B).

Table 3. Correlation between clinicopathological factors and staining of pRB in differentiated thyroid carcinomas

Clinicopathological findings	% positive area for pRB ($\bar{x} \pm SD$)		% positive stain for pRB ($\bar{x} \pm SD$)	
	Recurrence(-)	Recurrence(+)	Recurrence(-)	Recurrence(+)
Age (years)				
≤50	49.3 ± 33.9	8.0 ± 6.2	57.5 ± 37.0	15.9 ± 10.8
50<	23.4 ± 12.0	7.2 ± 8.1	33.2 ± 14.2	16.5 ± 13.5
Sex				
Male	46.0 ± 34.2	9.3 ± 6.8	54.5 ± 37.3	17.5 ± 11.6
Female	34.6 ± 27.6	6.6 ± 7.3	43.7 ± 29.3	15.6 ± 12.6
Size (mm)				
≤20	32.2 ± 28.9	3.2 ± 2.1]*	41.0 ± 31.5	9.7 ± 5.4]*
20<	50.3 ± 29.5	11.7 ± 7.2]	59.4 ± 30.8	23.0 ± 11.8]
Pathology				
Papillary ca.	38.2 ± 30.8	7.2 ± 7.1	46.4 ± 33.2	16.0 ± 12.5
Follicular ca.	40.0 ± 29.2	10.1 ± 8.4	51.0 ± 29.9	17.2 ± 9.9
t factor				
tis～t3	43.0 ± 29.5	7.4 ± 8.2	52.2 ± 32.0	12.6 ± 8.7
t4	28.2 ± 30.2	9.5 ± 8.3	36.1 ± 30.8	20.3 ± 13.9
n factor				
n0	34.2 ± 21.8	6.9 ± 8.1	44.5 ± 22.7	12.0 ± 11.4
n1～n2	42.6 ± 36.0	7.7 ± 7.1	50.1 ± 39.1	17.2 ± 12.3
Intralacunar metastasis				
Negative	37.2 ± 29.5	7.7 ± 7.7	45.9 ± 31.6	15.4 ± 14.1
Positive	43.3 ± 33.8	7.4 ± 6.9	52.4 ± 35.8	16.9 ± 10.6

Papillary ca., papillary carcinoma; follicular ca., follicular carcinoma; pRB, retinoblastoma protein.

*p<0.05.

($p<0.05$) (表 2).

2. 臨床病理学的因子と pRB 染色率

各群内で臨床病理学的因子と pRB 染色率の関係をみると、非再発群においては年齢、性別、腫瘍径、組織型、t 分類、n 分類、腺内転移の有無ではいずれも有意差を認めなかった。再発群においては年齢、性別、組織型、t 分類、n 分類、腺内転移の有無では差を認めなかったが、腫瘍径において原発巣が 20mm 以下のものでは陽性面積比が 3.2 ± 2.1 , 20mm より大きいものでは 11.7 ± 7.2 であり、20mm 以下のものでは有意に低値であった ($p<0.05$) (表 3)。また、陽性染色比でも同様の有意差を認めた。

3. 再発の有無と PCNA 染色率

甲状腺乳頭癌の PCNA 免疫染色像および CAS200 によって得られたヒストグラムを示した (図 2)。再発の有無と PCNA 染色率の関係では、再発群の PCNA 染色の陽性面積比、陽性染色比はそれぞれ 38.2 ± 28.4 , 52.2 ± 28.3 であり、非再発群で

はそれぞれ 26.6 ± 29.0 , 37.1 ± 31.9 であった。再発群では非再発群に比較して有意に陽性染色比が高率であった ($p<0.05$) (表 4)。

4. 臨床病理学的因子と PCNA 染色率

各群内で臨床病理学的因子と PCNA 染色率の関係をみると、非再発群においては年齢、性別、腫瘍径、組織型、n 分類、腺内転移の有無では差を認めなかったが、t 分類において t4 症例の陽性面積比、陽性染色比はそれぞれ 7.0 ± 11.5 , 12.8 ± 14.7 であり、tis~t3 症例の 33.7 ± 30.3 , 45.9 ± 32.0 と比較して有意に低値であった ($p<0.01$) (表 5)。

再発群においては年齢、腫瘍径、組織型、t 分類、n 分類、腺内転移の有無では差を認めなかったが、性別では男性の陽性面積比、陽性染色比がそれぞれ 11.1 ± 8.5 , 24.0 ± 8.7 であるのに対して、女性では 47.9 ± 26.6 , 62.3 ± 26.0 と有意に低値であった ($p<0.01$) (表 5)。

5. 再発の有無と LM, FN の染色強度

甲状腺乳頭癌の LM 免疫染色像 (図 3A) および FN 免疫染色像 (図 3B) を示した。再発の有無と LM の染色強度の関係では、非再発群で 0.15 ± 0.06 , 再発群で 0.08 ± 0.03 であり、再発群で有意に低値であった ($p<0.01$) (表 6)。なお、再発の有無と FN の染色強度の関係では非再発群、再発群の間に有意差は認めなかった。

6. 臨床病理学的因子と LM, FN の染色強度

両群で臨床病理学的因子と LM の染色強度との関係を比較すると、年齢、性別、腫瘍径、組織型、n 分類、腺内転移の有無などでは差を認めなかったが、t 分類では両群ともに、t4 症例は tis~t3 症例に比較して有意に高値であった ($p<0.05$) (表

Table 4. Image analysis quantitation of PCNA by the CAS 200 system for differentiated thyroid carcinomas

Group	No. of cases	% positive area for PCNA ($\bar{x}\pm SD$)	% positive stain for PCNA ($\bar{x}\pm SD$)
Recurrence(-)	40	26.6 ± 29.0	37.1 ± 31.9
Recurrence(+)	19	38.2 ± 28.4	52.2 ± 28.3

PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

* $p<0.05$.

Table 5. Correlation between clinicopathological factors and staining of PCNA in differentiated thyroid carcinomas

Clinicopathological findings	% positive area for PCNA ($\bar{x}\pm SD$)		% positive stain for PCNA ($\bar{x}\pm SD$)	
	Recurrence(-)	Recurrence(+)	Recurrence(-)	Recurrence(+)
Age (year)				
≤50	28.1 ± 30.0	32.4 ± 28.9	39.9 ± 32.1	47.0 ± 29.3
50<	24.7 ± 28.7	44.6 ± 27.9	33.4 ± 32.4	58.0 ± 27.7
Sex				
Male	17.1 ± 23.6	11.1 ± 8.5	24.9 ± 27.6	24.0 ± 8.7
Female	29.5 ± 30.3	47.9 ± 26.6	40.8 ± 32.7	62.3 ± 26.0
Size (mm)				
≤20	26.3 ± 29.5	53.0 ± 29.3	36.8 ± 32.4	64.8 ± 26.0
20<	26.9 ± 29.5	29.6 ± 25.0	37.4 ± 32.4	44.9 ± 28.1
Pathology				
papillary ca.	25.8 ± 30.3	41.5 ± 28.2	35.1 ± 32.9	55.8 ± 27.8
Follicular ca.	30.5 ± 23.6	10.2 ± 4.8	46.9 ± 26.7	22.0 ± 7.6
t factor				
tis~t3	33.7 ± 30.3	41.5 ± 31.4	45.9 ± 32.0	53.2 ± 29.6
t4	7.0 ± 11.5	35.2 ± 24.5	12.8 ± 14.7	51.3 ± 27.0
n factor				
n0	30.8 ± 30.2	37.8 ± 36.7	42.6 ± 33.6	49.0 ± 34.8
n1~n2	21.1 ± 27.7	38.3 ± 27.3	29.8 ± 29.0	53.1 ± 27.7
Intraglandular metastasis				
Negative	18.7 ± 23.9	42.2 ± 30.9	29.1 ± 28.2	54.1 ± 33.0
Positive	40.3 ± 32.9	30.2 ± 26.9	50.8 ± 34.5	52.9 ± 23.9

PCNA, proliferating cell nuclear antigen; papillary ca., papillary carcinoma; follicular ca., follicular carcinoma.

** $p<0.01$.

7).

臨床病理学的因子と FN の染色強度との関係では、非再発群において50才以下では 0.10 ± 0.02 と50歳以上の 0.12 ± 0.02 と比較して有意に低値であった ($p < 0.05$). また、男性は 0.09 ± 0.02 と女性の 0.11 ± 0.02 と比較して有意に低値であった ($p < 0.05$). 腫瘍径, 組織型, t 分類, n 分類, 腺内転移の有無では差がな

Table 6. Image analysis quantitation of laminin and fibronectin by the CAS 200 system for differentiated thyroid carcinoma

Group	No. of cases	Average OD for LM ($\bar{x} \pm SD$)	Average OD for FN ($\bar{x} \pm SD$)
Recurrence (-)	40	0.15 ± 0.06	0.11 ± 0.02
Recurrence (+)	19	0.08 ± 0.03	0.11 ± 0.03

LM, laminin; FN, fibronectin.

** $p < 0.01$

Table 7. Correlation between clinicopathological factors and staining of laminin and fibronectin in differentiated thyroid carcinomas

Clinicopathological findings	Average OD for LM staining ($\bar{x} \pm SD$)		Average OD for FN staining ($\bar{x} \pm SD$)	
	Recurrence (-)	Recurrence (+)	Recurrence (-)	Recurrence (+)
Age (years)				
≤50	0.15 ± 0.04	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.02
50 <	0.15 ± 0.07	0.09 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02
Sex				
Male	0.15 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02
Female	0.15 ± 0.06	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02
Size				
≤20	0.15 ± 0.06	0.07 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02
20 <	0.15 ± 0.05	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02
Pathology				
Papillary ca.	0.16 ± 0.06	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02
Follicular ca.	0.12 ± 0.02	0.04 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
t factor				
tis~t3	0.13 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01
t4	0.20 ± 0.07	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.02
n factor				
n0	0.15 ± 0.07	0.06 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01
n1~n2	0.14 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02
Intraglandular metastasis				
Negative	0.14 ± 0.06	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02
Positive	0.16 ± 0.06	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02

LM, laminin; FN, fibronectin; papillary ca., papillary carcinoma; follicular ca., follicular carcinoma.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 8. Correlation between recurrent site and staining of retinoblastoma protein

Recurrent site	No. of cases	% Positive area for pRB ($\bar{x} \pm SD$)		% positive stain for pRB ($\bar{x} \pm SD$)	
		Primary	Recurrent	Primary	Recurrent
Lymph node	10	10.2 ± 9.2	7.5 ± 5.5	18.7 ± 12.8	20.5 ± 12.5
Residual thyroid	5	7.3 ± 6.0	15.2 ± 8.2	15.9 ± 6.7	27.8 ± 9.5

pRB, retinoblastoma protein; primary, primary tumor; recurrent, recurrent tumor.

* $p < 0.05$.

かった。なお、再発群では各因子間で差がなかった。

II. 再発形式による検討

再発群19例の再発部位は、リンパ節のみが10例、残存甲状腺のみが5例、リンパ節+残存甲状腺が2例、リンパ節+隣接臓器が1例、リンパ節+遠隔転移が1例であった。再発形式別の特徴を明確にするために、1系統のみの再発であるリンパ節再発群 (リンパ節群) と残存甲状腺再発群 (残存甲状腺群) において、それぞれ原発腫瘍と再発腫瘍について検討を行った。

1. 再発形式別の再発までの期間

リンパ節群と残存甲状腺群について、初回手術から再発までの期間を比較した。リンパ節群の再発までの期間は平均 1086.2 ± 1721.3 日であり、残存甲状腺群では平均 2519 ± 2113.4 日であった。有意差は認められないものの、残存甲状腺群はリンパ節群と比較して再発までが長期間である傾向が認められた。

2. 再発形式別の pRB 染色率

原発腫瘍の pRB 染色率では、リンパ節群、残存甲状腺群の間で差はなかったが、再発腫瘍ではリンパ節群の陽性面積比は

7.5±5.5と残存甲状腺群の15.2±8.2と比較して有意に低率であった ($p<0.05$) (表8)。また、リンパ節群と残存甲状腺群の両群で、原発腫瘍と再発腫瘍との間には pRB 染色率に差はみられなかった。

3. 再発形式別の PCNA 染色率

PCNA 染色率では、リンパ節群と残存甲状腺群の間、また、原発腫瘍と再発腫瘍の間に有意差は認められなかったが、再発腫瘍ではリンパ節群の PCNA 染色率は54.5±28.6と残存甲状腺群の36.5±26.2より高い傾向にあった。リンパ節群の原発腫瘍の PCNA 染色率は28.1±26.5、再発腫瘍は54.5±28.6と有意差はみられないものの再発腫瘍で高率となる傾向であった (表9)。また、リンパ節群のうち1年以内に再発をきたした症例に限ると、原発腫瘍の PCNA 染色率は23.4±18.4、再発腫瘍は62.5±27.7と有意に再発腫瘍で高率であった ($p<0.05$)。

4. 再発形式別の LM, FN の染色強度

LM 染色強度では、リンパ節群と残存甲状腺群の間、また、原発腫瘍と再発腫瘍の間に有意差は認められなかった。FN 染色強度では、残存甲状腺群において原発腫瘍が0.11±0.02であったが、再発腫瘍では0.13±0.02と再発腫瘍で有意に高値であった ($p<0.05$) (表10)。

Ⅲ. 無再発率の検討

1. pRB 染色率と無再発率

非再発群40例と、再発群19例をあわせた59例について、pRB 染色率 (陽性面積比) が10%未満の pRB 低値群と、10%以上の pRB 高値群に分けてそれぞれの無再発率を算出した。pRB 高値群では3年無再発率79.0%、5年無再発率79.0%、10年無再発率65.8%であったのに対し、pRB 低値群では3年無再発率50.0%、5年無再発率42.9%、10年無再発率28.6%と pRB 低

Table 9. Correlation between recurrent site and staining of PCNA

Recurrent site	No. of cases	% Positive area for PCNA ($\bar{x} \pm SD$)		% positive stain for PCNA ($\bar{x} \pm SD$)	
		Primary	Recurrent	Primary	Recurrent
Lymph node	10	28.1±26.5	54.5±28.6	41.9±28.2	66.1±26.5
Residual thyroid	5	57.5±35.9	36.5±26.2	68.1±33.3	50.4±28.0

PCNA, proliferating cell nuclear antigen; primary, primary tumor; recurrent, recurrent tumor.

Table 10. Correlation between recurrent site and staining of laminin and fibronectin

Recurrent site	No. of cases	Average OD for LM ($\bar{x} \pm SD$)		Average OD for FN ($\bar{x} \pm SD$)	
		Primary	Recurrent	Primary	Recurrent
Lymph node	10	0.08±0.03	0.09±0.03	0.11±0.02	0.09±0.02
Residual thyroid	5	0.07±0.01	0.09±0.03	0.11±0.02	0.13±0.02

OD, optical density; LM, laminin; FN, fibronectin; primary, primary tumor; recurrent, recurrent tumor.

* $p<0.05$.



Fig. 4. Disease-free survival curves of patients with differentiated thyroid carcinoma which were divided into two groups with low % positive area for pRB staining (<10%) and high % positive area for pRB staining ($\geq 10\%$) groups. —, low % positive area for pRB staining group; ---, high % positive area for pRB staining group. * $p<0.05$, by generalized Wilcoxon test.

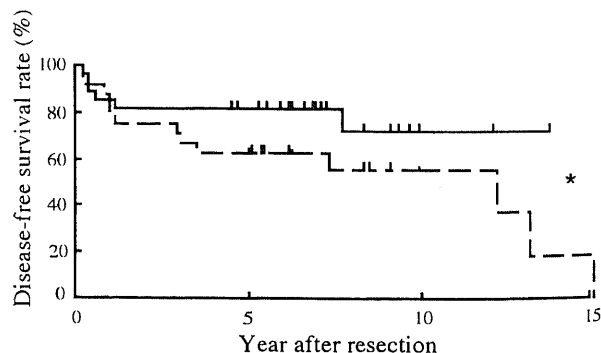


Fig. 5. Disease-free survival curves of patients with differentiated thyroid carcinoma which were divided into two groups with low % positive area for PCNA staining (<40%) and high % positive area for PCNA staining ($\geq 40\%$) groups. —, low % positive area for PCNA staining group; ---, high % positive area for PCNA staining group. * $p<0.05$, by generalized Wilcoxon test.

Table 11. PCNA staining rate in all primary tumors divided into low pRB staining and high pRB staining group

Group	No. of cases	% positive area for PCNA ($\bar{x} \pm SD$)	% positive stain for PCNA ($\bar{x} \pm SD$)
Low pRB	26	29.5 $\pm$ 24.6	43.6 $\pm$ 25.8
High pRB	33	14.1 $\pm$ 18.8	24.1 $\pm$ 23.3

pRB, retinoblastoma protein; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; low pRB, low pRB staining group whose % positive area for pRB is $\leq 10\%$; high pRB, high pRB staining group whose % positive area for pRB is $>10\%$.
* $p < 0.05$.

値群で有意に再発率が高かった ($p < 0.05$) (図4).

2. PCNA 染色率と無再発率

非再発群40例と、再発群19例をあわせた59例について、PCNA 染色率 (陽性面積比) が20%未満の PCNA 低値群と、20%以上の PCNA 高値群に分けてそれぞれの無再発率を算出した。PCNA 低値群では3年無再発率81.5%, 5年無再発率81.5%, 10年無再発率72.4%であったのに対し、PCNA 高値群では3年無再発率66.7%, 5年無再発率62.5%, 10年無再発率55.6%と PCNA 高値群で有意に再発率が高かった ($p < 0.05$).

IV. PCNA 染色率と pRB 染色率の相関

非再発群40例と、再発群19例をあわせた59例について、pRB 染色率 (陽性面積比) が10%未満の pRB 低値群と、10%以上の pRB 高値群に分けて、それぞれの PCNA 染色率を求めた。

pRB 低値群における PCNA 染色率は陽性面積比が29.5 $\pm$ 24.6, 陽性染色比が43.6 $\pm$ 25.8であり、pRB 高値群のそれ (14.1 $\pm$ 18.8, 24.1 $\pm$ 23.3) に比較して有意に高率であった ($p < 0.05$) (表11).

考 察

最近、遺伝子異常、とりわけ細胞増殖能に関与する遺伝子異常が正常細胞の癌化と深い関わりを持つことが証明され、発癌機構の解明にむけて多くの研究がなされつつある。発癌に関連する遺伝子異常は二つに大別される。一つは、休止期の細胞を増殖期に移行させたり、増殖因子様の活性を有する蛋白をコードする遺伝子の異常で、*ras* や *c-erbB-2* の異常発現がこれにあたる。他の一つは、細胞周期を制御する蛋白をコードする遺伝子の異常で、*p53*, サイクリン, pRB の発現異常がこれに含まれる。胃癌や大腸癌、乳癌などに比較して、甲状腺腫瘍についてはかかる遺伝子の異常を検討した研究は少なく、*c-myc*, *c-fos*, *c-erbB-2*, *ret*, *ras*, *p53* などの異常に関する報告が散見されるのみである³³⁵⁻⁴¹⁾。それらによると *p53* 遺伝子の異常は、未分化癌においては認められるものの乳頭癌、濾胞癌では異常を認めず、甲状腺分化癌の発生には *p53* の関与は薄いと報告されている。

RB 遺伝子は、網膜芽細胞腫の発生に関与する癌抑制遺伝子として単離された。その後骨肉腫、繊維肉腫、肺癌、乳癌、膀胱癌、腎癌、睾丸腫瘍、卵巣腫瘍、白血病、肝癌などでも異常が報告されている⁴²⁻⁵⁴⁾。RB 遺伝子の産物である pRB は、核に局在する分子量 110~115kD の蛋白質である。pRB は、非磷酸化状態で転写因子 E2F と複合体を形成し、その機能を抑制し

ていと解釈される。細胞周期の G1 期から S 期に移行するには、pRB が磷酸化を受けて E2F が解離し、後者がその転写活性化能を発揮する必要がある。したがって、pRB はいわゆる G1 ブロックの主たる役割を果たす蛋白質と考えられる。*p53*, *p21*, *p16* などの生理活性は、結局 pRB の磷酸化の調節に集約される。甲状腺癌における pRB の発現を検討した報告は少なく⁵⁵⁾、特に再発との関係を検討したものはみられない。本研究では、*p53* との関与が薄いとされる甲状腺分化癌において、*p53* より下位レベルで細胞増殖抑制に関わっていると思われる pRB の発現を免疫組織学的に検討し、細胞増殖能、臨床背景因子、再発との関連について検討を行った。また細胞増殖能は、PCNA に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行って評価した。

今回これら免疫組織化学染色の評価には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使用した。従来、光学顕微鏡を用いた免疫染色の評価では、染色の陽性・陰性の判定、染色の強弱の判定は測定者の主観や経験に依存することが指摘されており、事実、測定者間で測定値にばらつきがあり、客観的な比較検討を困難にしていた。これに反し、画像解析装置を用いる方法は免疫染色強度の測定を客観的かつ定量的に行うことが可能となる。

前述の如く、pRB の発現が減少している場合には細胞増殖抑制機構が破綻しているため、細胞増殖能が亢進していることが予測される。本研究結果で、全症例における pRB 発現と PCNA 染色率の関係をみると、pRB の発現が低下している症例では PCNA 染色率が有意に高率であり、pRB の発現と細胞増殖能との間には負の相関関係があるものと考えられた。また、再発例の原発巣では pRB の発現量が少なく PCNA 染色率が高値であることから、非再発例と比較して腫瘍細胞は増殖能が亢進した状態にあることが示唆された。特に、20mm 以下の比較的腫瘍径の小さい症例で再発をきたした場合は、pRB の発現率が低く、PCNA 染色率が高値であり高い増殖能を有するものと思われた。また、pRB 染色率、PCNA 染色率と無再発率の検討では、pRB 低値群、PCNA 高値群ではいずれも有意に再発の可能性が高かった。すなわち、甲状腺分化癌においては腫瘍径の大小に関わらず、癌抑制遺伝子である RB 遺伝子の異常が腫瘍増殖能に深く関与しているものと考えられる。pRB の発現量が低値の腫瘍や PCNA 染色率が高値を示す腫瘍は、再発をきたす可能性が高いと考えられ、両者は再発の予測因子として有用であると思われた。また、一般に浸潤傾向が強いと思われる t4 症例であっても再発をきたさない症例は PCNA が低値であり、また一般に予後良好といわれている女性であっても再発例では PCNA が高値であった。したがって、病期や臨床背景因子と予後との解離は、腫瘍増殖能の差に基づくものであることが推測された。

癌の浸潤、転移のメカニズムに関する研究の中で、多くの腫瘍においてインテグリンをはじめとする細胞接着因子とその主要リガンドである細胞外マトリックスの機能や発現の異常が報告されている¹⁹⁾⁻²³⁾。LM, FNなどの基底膜構成成分をはじめとする細胞外マトリックスは、細胞接着活性を有する多様な分子を含み、細胞の機能調節に関与する半面、細胞が通過できないほどの網目構造を持ち、細胞を隔てるバリアーとして作用している。癌細胞が浸潤、転移を生じる場合、原発巣からの遊離や、脈管内へ侵入、遊離する際にこれがバリアーに接し破壊する

段階を経ることになる。癌細胞は、細胞外マトリックスレセプターである細胞接着因子を介してマトリックスと結合し、その刺激によってマトリックス分解酵素の産生が誘導され、細胞外マトリックスが分解されると考えられている。事実、多くの癌腫において基底膜構成成分の量的減少が報告されている^{25)~33)}。甲状腺疾患に関する細胞外マトリックスや細胞接着因子の異常も報告されている^{31)36)~49)}。甲状腺癌においては乳頭癌、未分化癌において基底膜の断裂、消失が指摘されている。しかしながら、前述の如くこれらの報告の多くは免疫組織染色による染色度により判定されており、報告者の主観や経験に左右されるため、客観的な評価を困難にしていた。本研究のごとく、甲状腺分化癌の細胞外マトリックス構成成分の免疫染色を、細胞解析装置を用いて定量化した検討はいまだみられない。

再発の有無との関係では、FN 量は再発例と非再発例の間に差を認めなかったが、LM 量は再発例で有意に低値を示し、LM の減少が再発しやすい環境を作り出している可能性が示唆された。また、臨床病理学的因子との関係では、t4 症例において LM 量が高値を呈した。すなわち、浸潤傾向の強い腫瘍では LM が増加していることから、浸潤過程に LM が関与していることが示唆された。このことは、癌細胞のマトリックス分解酵素、とくに、N型コラゲナーゼの産生は、癌細胞と LM との接着によって誘導されるという説と矛盾しない。

再発形式についてみると、リンパ節再発例と残存甲状腺再発例では、それぞれの原発腫瘍の RB 蛋白発現率、PCNA 染色率には差がみられなかった。リンパ節に再発した腫瘍は残存甲状腺に再発した腫瘍より pRB の発現が低率であり、PCNA 染色率は高い傾向にあった。また、リンパ節再発例では原発腫瘍より再発腫瘍で PCNA 染色率が高い傾向にあり、特に1年以内の再発例で有意に高率であった。したがって、短期間にリンパ節へ転移する癌細胞は、原発巣を構成する成分の中でとりわけ増殖能が高い部分であったか、あるいは転移後に増殖能が増加したと考えられる。

原発巣あるいは再発巣の LM 染色強度と再発形式との関係では、リンパ節再発と残存甲状腺再発との間に差は認められなかった。一方、FN 染色強度は、原発巣については再発形式による差は認めなかったが、残存甲状腺に再発した腫瘍では、原発腫瘍よりも FN 量が増加していた。一般に、残存甲状腺再発は初回手術時にすでに潜在的腺内転移が存在し、これが増大することにより成立すると考えられる。また、腺内転移は甲状腺組織に特有の豊富なリンパ管網を介して癌細胞が転移して成立するとの報告がある⁷⁰⁾。この説が正しければ腺内転移とリンパ節転移は同様の機序によって成立するのであって、それを裏付けるように腺内転移陽性例でリンパ節転移率が高いとする報告もみられる⁷⁰⁾。しかしながら、今回の検討で残存甲状腺再発腫瘍はリンパ節再発腫瘍よりも増殖能は低く、発育も緩徐であることが判明した。事実、リンパ節再発群の再発までの期間は平均1086.2日、残存甲状腺再発群では平均2519日であった。残存甲状腺再発腫瘍で FN が増加していた理由として、比較的緩徐な発育を呈する残存甲状腺再発腫瘍に対し、生体防御機構として細胞外マトリックスの増加が惹起されたことによるものか、あるいは残存甲状腺再発腫瘍では FN に対する分解酵素の分泌が減少していたことによるものかであろうが、今回の検討では結論を導くことはできなかった。

本研究では、すべてパラフィン包埋された癌組織を用いて免

疫組織学的検討をおこなった。本手法では、目的とする抗原の染色時における抗原性の保持など問題となる点はあるが、甲状腺分化癌は発育が緩徐で再発までの期間が比較的長期であるため、過去の症例について RB 蛋白発現および腫瘍増殖能、基底膜構成成分と再発との関係を現時点で解析できた点で有用であったと考えられる。また、免疫組織染色の判定にイメージ分析装置を用い、客観的、定量的評価をおこなった点は特記されるべきと考える。甲状腺分化癌の再発には、病理組織学的因子、臨床背景因子および分子生物学的因子などが複雑に関与していると考えられるが、本研究で検討した、RB 蛋白発現率および PCNA 標識率は再発の予測因子となりうると思われた。

結 論

甲状腺分化癌非再発例40例、再発例19例を対象に免疫組織学的に pRB 発現と PCNA 染色率および LM, FN 発現量を測定し、以下の結論を得た。

1. pRB 染色率は、再発例で有意に低値であった。
 2. PCNA 染色率は、再発例で有意に高値であった。
 3. 20mm 以下の腫瘍径で再発をきたしているものは pRB 染色率が有意に低値であり、PCNA 染色率も高値であった。
 4. t4 症例で再発していない症例は、PCNA 染色率が有意に低値であった。
 5. LM の発現量は、再発例で有意に低値であった。
 6. リンパ節再発例で1年以内に再発した症例では、再発腫瘍の PCNA 染色率は原発腫瘍に比べて有意に高率であった。
 7. 無再発率との関係では、pRB 低値群および PCNA 高値群で有意に再発の危険性が高かった。
- 以上の結果から、甲状腺分化癌において pRB および PCNA 染色率と LM の発現量は再発の予測因子となりうることが示唆された。

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宇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中央検査部野々村昭孝助教授に心から感謝いたします。さら、本研究の遂行に際し御協力を頂きました第一外科一般消化器グループの諸先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第30回中部外科学会総会 (1994, 名古屋)、第33回癌治療学会総会 (1995, 札幌) において発表した。

文 献

- 1) Krausz, Y., Uziely, B., Karger, H., Isacson, R., Catane, R. & Glaser, B.: Recurrence-associated mortality in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J. Surg. Oncol.*, 52, 164-168 (1993).
- 2) Akslen, L. A., Myking, A. O., Salvesen, H. & Varhaug, J. E.: Prognostic importance of various clinicopathological features in papillary thyroid carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 1, 44-51 (1992).
- 3) Hay, I. D., Grant, C. S., van-Heerden, J. A., Goellner, J. R., Ebersold, J. R. & Bergstralh, E. J.: Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 535 cases observed in a 50-year period. *Surgery*, 112, 1139-1146 (1992).
- 4) 前川 仁: 甲状腺癌における c-erbB-2/neu 遺伝子産物と c-erbB-1 遺伝子産物 (EGFR) の発現. *日外会誌*, 92, 221

(1991).

5) 前川 仁: 甲状腺癌における C-erbB-1, C-erbB-2/neu 遺伝子産物の発現抗体希釈による陽性率の変化. 日癌会50回総会記事, 131 (1991).

6) Wynford-Thomas, D.: Molecular basis of epithelial tumorigenesis: the thyroid model. *Crit. Rev. Oncog.*, **4**, 1-23 (1993).

7) Gedde, D. T.d., Spurkland, A., Eriksen, J. A. Thorsby, E. & Gaudernack, G.: Memory T cells of a patient with follicular thyroid carcinoma recognize peptides derived from mutated p21 ras (Gln→Leu61). *Int. Immunol.*, **4**, 1331-1337 (1992).

8) Dobashi, Y., Sugimura, H., Sakamoto, A., Mernyei, M., Mori, M., Oyama, T. & Machinami, R.: Stepwise participation of p53 gene mutation during dedifferentiation of human thyroid carcinomas. *Diagn. Mol. Pathol.*, **3**, 9-14 (1994).

9) Futreal, P. A., Soderkvist, P., Marks, J. R., Iglehart, J. D., Cochran, C., Barrett, J. C. & Wiseman, R. W.: Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms. *Cancer Res.*, **52**, 2624-2627 (1992).

10) Knyazev, P. G., Imyanitov, E. N., Chernitca, O. I., Nikiforova, I. F. & Hanson, K. P.: Amplification of ERBB-2 (HER-2/NEU) oncogene in different neoplasms of patients from USSR. *Oncology*, **49**, 162-165 (1992).

11) Nakamura, T., Yana, I., Kobayashi, T., Shin, E., Karakawa, K., Fujita, S., Miya, A., Mori, T., Nishisho, I. & Takai, S.: p53 gene mutations associated with anaplastic transformation of human thyroid carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1293-1298 (1992).

12) Wright, P. A., Lemoine, N. R., Goretzki, P. E., Wyllie, F. S., Bond, J., Hughes, C., Roher, H. D., Williams, E. D. & Wynford-Thomas, D.: Mutation of the p53 gene in a differentiated human thyroid carcinoma cell line, but not in primary thyroid tumours. *Oncogene*, **6**, 1693-1697 (1991).

13) Yoshimoto, K., Iwahana, H., Fukuda, A., Sano, T., Saito, S. & Itakura, M.: Role of p53 mutations in endocrine tumorigenesis: mutation detection by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Cancer Res.*, **52**, 5061-5064 (1992).

14) Zou, M., Shi, Y. & Farid, N. R.: p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**, 1054-1058 (1993).

15) Karantza, V., Maroo, A., Fay, D. & Sedivy, J. M.: Overproduction of Rb protein after the G1/S boundary causes G2 arrest. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 6640-6652 (1993).

16) Stokke, T., Erikstein, B. K., Smedshammer, L., Boye, E. & Steen, H. B.: The retinoblastoma gene product is bound in the nucleus in early G1 phase. *Exp. Cell. Res.*, **204**, 147-155 (1993).

17) Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D.,

Vogelstein, B. & Craig, R. W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, **51**, 6304-6311 (1991).

18) Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. & Sherr, C. J.: Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes. Dev.*, **7**, 331-342 (1993).

19) Kumagai, S., Kojima, S., Imai, K., Nakagawa, K., Yamamoto, E., Kawahara, E. & Nakanishi, I.: Immunohistologic distribution of basement membrane in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, **16**, 51-57 (1994).

20) Paulus, W. & Tonn, J. C.: Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. *J. Neurosurg.*, **80**, 515-519 (1994).

21) Sobel, M. E.: Differential expression of the 67 kDa laminin receptor in cancer. *Semin. Cancer Biol.*, **4**, 311-317 (1993).

22) Rosendahl, A., Neumann, K., Chaloupka, B., Rothmund, M. & Weinel, R. J.: Expression and distribution of VLA receptors in the pancreas: an immunohistochemical study. *Pancreas*, **8**, 711-718 (1993).

23) Azzam, H. S., Arand, G., Lippman, M. E. & Thompson, E. W.: Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J. Natl. Cancer Inst.*, **85**, 1758-1764 (1993).

24) Bosman, F. T.: Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem. J.*, **25**, 469-477 (1993).

25) Jaskiewicz, K., Chasen, M. R. & Robson, S. C.: Differential expression of extracellular matrix proteins and integrins in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Anticancer Res.*, **13**, 2229-2237 (1993).

26) Gordon, J. N., Shu, W. P., Schluskel, R. N., Droller, M. J. & Liu, B. C.: Altered extracellular matrices influence cellular processes and nuclear matrix organizations of overlying human bladder urothelial cells. *Cancer Res.*, **53**, 4971-4977 (1993).

27) Incardona, F., Calvo, F., Fauvel-Lafeve, F., Legrand, Y. & Legrand, C.: Involvement of thrombospondin in the adherence of human breast-adenocarcinoma cells: a possible role in the metastatic process. *Int. J. Cancer*, **55**, 471-477 (1993).

28) von-Lampe, B., Stallmach, A. & Riecken, E. O.: Altered glycosylation of integrin adhesion molecules in colorectal cancer cells and decreased adhesion to the extracellular matrix. *Gut*, **34**, 829-836 (1993).

29) Weinel, R. J., Rosendahl, A., Neumann, K., Chaloupka, B., Erb, D., Rothmund, M. & Santoso, S.: Expression and function of VLA-alpha 2, -alpha 3, -alpha 5 and -alpha 6-integrin receptors in pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, **52**, 827-833 (1992).

30) Yamada, S., Ichida, T., Matsuda, Y., Miyazaki, Y., Hatano, T., Hata, K., Asakura, H., Hirota, N., Geerts,

- A. & Wisse, E.: Tenascin expression in human chronic liver disease and in hepatocellular carcinoma. *Liver*, 12, 10-16 (1992).
- 31) Demeure, M.J., Damsky, C. H., Elfman, F., Goretzki, P. E., Wong, M. G. & Clark, O. H.: Invasion by cultured human follicular thyroid cancer correlates with increased beta 1 integrins and production of proteases. *World J. Surg.*, 16, 770-776 (1992).
- 32) Stallmach, A., Rosewicz, S., Kaiser, A., Matthes, H., Schuppan, D. & Riecken, E. O.: Laminin binding in membranes of a rat pancreatic acinar cell line are targets for glucocorticoids. *Gastroenterology*, 102, 237-247 (1992).
- 33) Schmitt, M., Janicke, F., Moniwa, N., Chucholowski, N., Pache, L. & Graeff, H.: Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler*, 373, 611-622 (1992).
- 34) 甲状腺外科検討会編: 外科・病理, 甲状腺癌取扱い規約, 第4版, 4-25頁, 金原出版, 東京, 1991.
- 35) Prabakaran, D., Kim, P., Kim, K. R. & Arvan, P.: Polarized secretion of thrombospondin is opposite to thyroglobulin in thyroid epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 268, 9041-9048 (1993).
- 36) Di-Renzo, M. F., Olivero, M., Ferro, S., Prat, M., Bongarzone, I., Pilotti, S., Belfiore, A., Costantino, A., Vigneri, R. & Pierotti, M. A.: Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene*, 7, 2549-2553 (1992).
- 37) Paulin, C., Fabien, N., Fusco, A., Pages, M. P., Patricot, M. C., Bornet, H. & Dubois, P. M.: Description of cell line established from human thyroid papillary cancer and secreting human chorionic gonadotropin hormone. *Acad. Sci. Iii.*, 315, 493-498 (1992).
- 38) Schulz, N., Propst, F., Rosenberg, M. M., Linnoila, R. I., Paules, R. S., Schulte, D. & Vande-Woude, G. F.: Patterns of neoplasia in c-mos transgenic mice and their relevance to multiple endocrine neoplasia. *Henry Ford Hosp. Med. J.*, 40, 307-311 (1992).
- 39) Gedde, D. T. d., Spurkland, A., Eriksen, J. A., Thorsby, E. & Gaudernack, G.: Memory T cells of a patient with follicular thyroid carcinoma recognize peptides derived from mutated p21 ras (Gln→Leu61). *Int. Immunol.*, 4, 1331-1337 (1992).
- 40) Williams, E. D.: Cell proliferation and thyroid neoplasia. *Toxicol. Lett.*, 64, 375-379 (1992).
- 41) Auguste, L. J., Masood, S., Westerband, A., Belluco, C., Valderamma, E. & Attie, J.: Oncogene expression in follicular neoplasms of the thyroid. *Am. J. Surg.*, 164, 592-593 (1992).
- 42) Borg, A., Zhang, Q. X., Alm, P., Olsson, H. & Sellberg, G.: The retinoblastoma gene in breast cancer: allele loss is not correlated with loss of gene protein expression. *Cancer Res.*, 52, 2991-2994 (1992).
- 43) Comerford, S. A., McCance, D. J., Dougan, G. & Tite, J. P.: Identification of T- and B-cell epitopes of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.*, 65, 4681-4690 (1991).
- 44) Defeo-Jones, D., Vuocolo, G. A., Haskell, K. M., Hanobik, M. G., Kiefer, D. M., McAvoy, E. M., Ivey-Hoyle, M., Brandsma, J. L., Oliff, A. & Jones, R. E.: Papillomavirus E7 protein binding to the retinoblastoma protein is not required for viral induction of warts. *J. Virol.*, 67, 716-725 (1993).
- 45) DiPaolo, J. A., Popescu, N. C., Alvarez, L. & Woodworth, C. D.: Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by recombinant human papillomavirus DNA. *Crit. Rev. Oncog.*, 4, 337-360 (1993).
- 46) Gope, R. & Gope, M. L.: Abundance and state of phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in human colon cancer. *Mol. Cell Biochem.*, 110, 123-133 (1992).
- 47) Heck, D. V., Yee, C. L., Howley, P. M. & Munger, K.: Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89, 4442-4446 (1992).
- 48) Howley, P. M., Munger, K., Romanczuk, H., Scheffner, M. & Huibregtse, J. M.: Cellular targets of the oncoproteins encoded by the cancer associated human papillomaviruses. *Princess Takamatsu Symp.*, 22, 239-248 (1991).
- 49) Howley, P. M.: Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.*, 51, 5019-5022 (1991).
- 50) Huang, P. S., Patrick, D. R., Edwards, G., Goodhart, P. J., Huber, H. E., Miles, L., Garsky, V. M., Oliff, A. & Heimbrook, D. C.: Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol. Cell Biol.*, 13, 953-960 (1993).
- 51) Ibaraki, T., Satake, M., Kurai, N., Ichijo, M. & Ito, Y.: Transacting activities of the E7 genes of several types of human papillomavirus. *Virus Genes.*, 7, 187-196 (1993).
- 52) Knudson, Jr., A.: Genetics of tumors of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 119, 735-737 (1993).
- 53) Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C. & Howley, P. M.: The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88, 5523-5527 (1991).
- 54) Scurry, J. & Wells, M.: Viruses in anogenital cancer. *Epithelial. Cell. Biol.*, 1, 138-145 (1992).
- 55) Figge, J., Bakst, G., Weisheit, D., Solis, O. & Ross, J. S.: Image analysis quantitation of immunoreactive retinoblastoma protein in human thyroid neoplasms with a streptavidin-biotin-peroxidase staining technique. *Am. J. Pathol.*, 139, 1213-1219 (1991).
- 56) Katoh, R., Muramatsu, A., Kawaoi, A., Komiyama, A., Suzuki, K., Hemmi, A. & Katayama, S.: Alteration of the basement membrane in human thyroid diseases: an

immunohistochemical study of type IV collagen, laminin and heparan sulphate proteoglycan. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, **423**, 417-424 (1993).

57) **Boylan, J. F., Lohnes, D., Taneja, R., Chambon, P. & Gudas, L. J.**: Loss of retinoic acid receptor gamma function in F9 cells by gene disruption results in aberrant Hoxa-1 expression and differentiation upon retinoic acid treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**, 9601-9605 (1993).

58) **Russo, A. F., Lanigan, T. M. & Sullivan, B. E.**: Neuronal properties of a thyroid C-cell line: partial repression by dexamethasone and retinoic acid. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 207-218 (1992).

59) **Nishiyama, I. & Fujii, T.**: Laminin-induced process outgrowth from isolated fetal rat C-cells. *Exp. Cell. Res.*, **198**, 214-220 (1992).

60) **De-Luca, L. M.**: Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb. J.*, **5**, 2924-2933 (1991).

61) **Rottman, J. N., Widom, R. L., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. & Karathanasis, S. K.**: A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3814-3820 (1991).

62) **Chauhan, S. S., Goldstein, L. J. & Gottesman, M. M.**: Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res.*, **51**, 1478-1481 (1991).

63) **Garbi, C., Colletta, G., Cirafici, A. M., Marchisio, P. C. & Nitsch, L.**: Transforming growth factor-beta induces cytoskeleton and extracellular matrix modifications in FRTL-5 thyroid epithelial cells. *Eur. J. Cell. Biol.*, **53**, 281-289 (1990).

64) **Garza, R., Puymirat, J. & Dussault, J. H.**: Influence

of soluble environmental factors on the development of fetal brain acetylcholinesterase-positive neurons cultured in a chemically defined medium: comparison with the effects of L-triiodothyronine (L-T3). *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **56**, 160-168 (1990).

65) **Komaki, G., Tamai, H., Mukuta, T., Kobayashi, N., Mori, K., Nakagawa, T. & Kumagai, L. F.**: Alterations in endothelium-associated proteins and serum thyroid hormone concentrations in anorexia nervosa. *Br. J. Nutr.*, **68**, 67-75 (1992).

66) **Banovac, K. & De-Forteza, R.**: The effect of mast cell chymase on extracellular matrix: studies in autoimmune thyroiditis and in cultured thyroid cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **99**, 141-149 (1992).

67) **Foldes, J., Tarjan, G., Banos, C., Nemeth, J., Varga, F. & Buki, B.**: Biologic markers in blood reflecting thyroid hormone effect at peripheral tissue level in patients receiving levothyroxine replacement for hypothyroidism. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **99**, 129-133 (1992).

68) **Arnaout, M. A., Awidi, A. S., el-Najdawi, A. M., Khateeb, M. S. & Ajlouni, K. M.**: Arginine-vasopressin and endothelium-associated proteins in thyroid disease. *Acta Endocrinol. Copenh.*, **126**, 399-403 (1992).

69) **Lee, J., Murata, Y., Seo, H., Menjo, M., Torii, S. & Matsui, N.**: The effect of thyroid hormone on fibronectin messenger ribonucleic acid levels in primary cultured rat hepatocytes. *Endocrinology*, **130**, 2733-2738 (1992).

70) **Katoh, R., Sasaki, J., Kurihara, H., Suzuki, K., Iida, Y. & Kawaoi, A.**: Multiple thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 105 consecutive patients. *Cancer*, **70**, 1585-1590 (1992).

An Immunohistochemical Study of Factors Involved in Recurrence in Patients with Differentiated Thyroid Carcinomas Atsushi Nagasato, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 105, 350—362 (1996)

Key words thyroid carcinoma, retinoblastoma protein, proliferating cell nuclear antigen, laminin, fibronectin

Abstract

Prediction of the recurrence of differentiated thyroid carcinoma is extremely important. Using immunohistochemical techniques, the present study was performed to examine the correlation between recurrence of differentiated thyroid carcinoma and degree of staining for retinoblastoma protein (pRB), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), laminin and fibronectin. Fifty-nine specimens of differentiated thyroid carcinomas were investigated. They consisted of primary lesions in 40 cases with no recurrence in more than 5 years after operation (non-recurrence group), and primary and recurrent lesions in 19 cases with pathological findings provided at recurrence (recurrence group). The degree of staining for pRB and PCNA were quantified with a CAS200 image analyzer. The % positive area and % positive stain parameters were calculated as the staining degree. Staining intensities of laminin and fibronectin were determined by measuring the average optical densities at the interstitium. Staining rates (% positive area, % positive stain) of pRB in the recurrence group were 8.4 ± 8.3 , 16.2 ± 11.9 ($\bar{x} \pm SD$) being significantly lower than in the non-recurrence group (38.6 ± 29.5 , 47.5 ± 31.6) ($p < 0.05$). In the recurrence group, the % positive area in primary lesions which was less than 20 mm in diameter (3.2 ± 2.1) was significantly lower than that in primary lesions larger than 20 mm (11.7 ± 7.2) ($p < 0.05$). The PCNA staining rates in the recurrence group (38.2 ± 28.4 , 52.2 ± 28.3) were significantly higher than those in the non-recurrence group (25.6 ± 29.0 , 37.1 ± 31.9) ($p < 0.05$). The staining intensity of laminin in the recurrence group (0.08 ± 0.03) was significantly lower than that in the non-recurrence group (0.15 ± 0.06) ($p < 0.01$). In examination of recurrence forms, in cases with the lymph-node recurrence and with recurrence within less than 1 year post operative, the % positive area of PCNA staining in the recurrent tumors (62.5 ± 27.7) was significantly higher than that in the primary tumors (23.4 ± 18.4) ($p < 0.05$). The disease-free survival rate was calculated for the cases divided into low pRB staining rate ($< 10\%$) (low pRB) and high pRB staining rate groups ($\geq 10\%$) (high pRB), or divided into low PCNA staining rate ($< 40\%$) (low PCNA) and high PCNA staining rate groups ($\geq 40\%$) (high PCNA). The high pRB group and low PCNA group had significantly higher disease-free survival rates than the low pRB group and high PCNA group ($p < 0.05$). pRB and PCNA staining rate, along with the staining intensity of laminin are considered to be prediction factors of recurrence in differentiated thyroid carcinomas.