

腎細胞癌における Thymidine Phosphorylase (TdRPase)

および核 DNA 量の臨床病理学的検討

富田 雅之 大石 幸彦

東京慈恵会医科大学泌尿器科学講座 (指導: 大石幸彦教授)

(受付 平成 15 年 12 月 15 日)

CLINICOPATHOLOGIC ANALYSIS OF EXPRESSION OF THYMIDINE PHOSPHORYLASE AND DNA CONTENT IN RENAL CELL CARCINOMA

Masayuki TOMITA and Yukihiro OOISHI

Department of Urology, The Jikei University School of Medicine

Thymidine phosphorylase (TdRPase) is an enzyme that phosphorylates thymidine; human TdRPase has an amino-acid sequence identical to that of platelet-derived endothelial cell growth factor, which is involved in vascularization. Furthermore, TdRPase enzyme activity is significantly elevated in carcinomas of the stomach, colon, rectum, and breast. Clinically, TdRPase has been investigated as a potential index for proliferation and metastasis of carcinoma cells. We studied the relations between clinicopathologic factors (pathologic grade and stage and survival rate) and anti-TdRPase antibody staining in resected tumor specimens from 58 patients with renal cell carcinoma. Furthermore, the quantity of nuclear DNA was analyzed with flow cytometry to determine whether the ploidy pattern (diploid or aneuploid) was correlated with anti-TdRPase antibody staining. No correlations were found between anti-TdRPase antibody staining and pathologic grade or stage. However, prognosis was poorer in cases with an anti-TdRPase staining rate of 80% or greater.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004; 119: 159-63)

Key words: renal cell carcinoma, DNA ploidy, thymidine phosphorylase

I. 緒 言

Thymidine phosphorylase (TdRPase) は DNA 合成過程での thymidine の再利用に関与する酵素であり、また最近では血小板由来内皮細胞増殖因子 (platelet derived endothelial cell growth factor; PD-ECGF) とアミノ酸配列がまったく同一であることも明らかとなった¹⁾。また本酵素は血管新生作用の面からも注目されており、DNA 合成の活発な組織に高く、そのため胃癌²⁾、大腸癌³⁾、乳癌⁴⁾ などでは癌細胞の増殖、浸潤、転移の指標となる可能性が検討されている。

今回我々は腎細胞癌に対し、抗 TdRPase 抗体

を用いた免疫組織化学染色を行い、予後と関連する臨床的諸因子との関係について検討した。同時に、様々な悪性腫瘍において、その生物学的特性を反映するとされている核 DNA 量⁵⁾⁶⁾ についても、flow cytometry を用いて併せて解析をすすめた。

II. 実験対象症例および方法

1. 対象症例の臨床病理学的特徴

1987 年 1 月から 1997 年 12 月末までに、東京慈恵会医科大学附属青戸病院で手術施行された腎細胞癌患者 58 名を検討対象とした。平均観察期間は 38.6 カ月 (0.5~122 カ月)。9 例が癌死しており、1

例は他因死であった。患者背景は Table 1 に要約して示した。腎摘時採取した腫瘍組織より作成したホルマリン包埋ブロックを検討材料として用いた。

2. 免疫組織化学染色手順

1) 抗体

1次抗体には抗ヒト TdRPase モノクローナル抗体 654-1(日本ロッシェ)を用いた。この抗体は、ヒト大腸癌 HCT116 xenograft より精製したヒト TdRPase を抗原として得られたものである。2次抗体はニチレイ社製ヒストファイン SAB-PO (M) キットを用いた(ビチオン標識抗マウス IgG+IgA+IgM 抗体を 10 μ g/ml 含有している)。

2) 試薬

ブロッキング試薬 I は 3% 過酸化水素加メタノールを、ブロッキング試薬 II は SAB-PO (M) キットの 10% ウサギ正常血清をそれぞれ用いた。酵素試薬は同キットのペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン 100 μ g/ml 含有のものを用いた。発色試薬 (DAB) は同キットの 3,3 ジアミノベンチジン \cdot 4HCL, トリス塩緩衝液, 0.6% 過酸化水素水を混和したものを用いた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の組成は (PH-7.4, 137NaCl, 3KCl, 15Na₂HPO₄ \cdot PH₂O, 2KH₂PO₄) (mM) であった。

3) 染色法

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを、ミクロトームを用いて 4 μ m に薄切し、スライドに付着させた。95% 以上のキシレンで 10 分間、2 回脱パラフィン後、エタノールで親水化(95%, 70%, 50% 各 5 分ずつ)し、水洗した。マイクロウエーブにて 95°C, 14 分間加熱処理を行い、抗原性を増強した。室温で自然冷却した後、ブロッキング試薬 I に 30 分間、ブロッキング試薬 II に 20 分間反応させ非特異的抗原をブロックした。PBS で洗浄後、1次抗体である抗 TdRPase モノクローナル抗体で 37°C, 1 時間反応させた。PBS で洗浄し、2次抗体を室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄、20 分間酵素試薬で標識をし、洗浄後 DAB にて発色させ、ヘマトキシリンで対比染色した後、封入鏡検した。

核染色性の評価: TdRPase の発現は染色性で評価した。強拡大視野(200 倍)にて 1 視野中の細

胞数に対する染色された細胞数の比率を計算し 0~20% を(-), 20~50% を(+), 50~80% を(#), 80~100% を(##) の 4 段階に分類し評価した。

3. 核 DNA 量の分析手順

1) 標本

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを 60 μ m に薄切し、1 腫瘍につき 2~4 個の検体(平均 3 個)を作成し、染色法で述べた方法に準じて脱パラフィン、親水化を行った。1% ペプシンに 37°C, 120 分間反応させ核懸濁液を調節した。Vindelov の方法⁷⁾に準じて RNase で処理後、Propidium Iodide にて細胞核の DNA 染色を行った。

4. 核 DNA 量の解析

FACScan (Becton Dickinson, USA) を使用した。測定条件は核の流速を毎秒 150 個前後になるように設定し、20,000 個の核の DNA 量をヒストグラムとして表示した。細胞周期の解析はコンピュータ解析ソフト (Cell FIT Cell Cycle Analysis) を用いて行った。

5. DNA ploidy の判定

判定は九嶋麻らの報告⁸⁾に準じて行った。すなわち、DNA index が 0.8~1.2 で G2/M 期細胞の割合が 10% 未満のものを DNA diploid とし、他は DNA aneuploid とした。同一腫瘍の検索で、1ヵ所でも aneuploid を認めた症例は aneuploid 症例と判断した。

6. 統計学的解析法

有意差検定は χ^2 検定で行い、累積生存曲線の作成には Kaplan-Meier 法を用い、その検定は Log-rank 法に従い、危険率 5% 以下を有意と判断した。

なお、stage および grade 分類は腎癌取扱い規約第 3 版⁹⁾に準じた。

III. 結 果

1. TdRPase の染色性と grade の関連 (Table 2)

TdRPase の染色性は、(-) が 15 例(25.9%), (+) が 22 例 (37.9%), (#) が 18 例(31.0%) (#) が 3 例(5.2%) であった。Table 2 に染色性と組織学的異型度 (grade) との関連を示す。grade I では (-) が 37.1% と最も多く、grade II では (+) が 48.2% を占めていた。grade III では (#) が 50% を占めており、grade の上昇に伴い

Table 1. Patient and tumor profile in 58 cases

Characteristics	No.	(%)
Sex		
Male	49	84.5
Female	9	15.5
Age (years)		
Average	59	
Range	38~84	
Tumor size		
~4 cm	15	25.9
4~7 cm	31	53.4
7~ cm	12	20.7
Cell type		
clear cell	32	55.2
granular	13	22.4
mixed	12	20.7
spindle	1	1.7
Pathological grade		
I	25	43.1
II	28	48.3
III	5	8.6
pT stage		
pT1	37	63.8
pT2	3	5.2
pT3	16	27.6
pT4	2	3.4

Table 2. Relationship between the expression of TdRPase and Grade

grade	anti-TdRPase antibody staining (%)			
	(-)	(+)	(#)	(#)
I (n=27)	10 (37.1)	9 (33.3)	7 (25.9)	1 (3.7)
II (n=27)	4 (14.8)	13 (48.2)	9 (33.3)	1 (3.7)
III (n=4)	1 (25.0)	0 (0)	2 (50.0)	1 (25.0)
total	15	22	18	3

TdRPase の染色度が強くなる傾向を認めた。しかし、いずれも統計学的有意差は認められなかった。

2. TdRPase の染色性と pT-stage の関連 (Table 3)

pT-stage を 7 cm 以下 (pT1) の群と、それ以上 (pT2 以上) の群に分け、それぞれの TdRPase

Table 3. Relationship between the expression of TdRPase and pT-Stage

pT-Stage	anti-TdRPase antibody staining (%)			
	(-)	(+)	(#)	(#)
pT1 (n=37)	8 (21.7)	14 (37.8)	14 (37.8)	1 (2.7)
pT2~ (n=21)	7 (33.3)	8 (38.1)	4 (19.1)	2 (9.5)
total	15	22	18	3

Table 4. Relationship between the expression of TdRPase and DNA ploidy

ploidy	anti-TdRPase antibody staining (%)			
	(-)	(+)	(#)	(#)
diploid (n=19)	5 (26.3)	8 (42.1)	6 (31.6)	0 (0)
aneuploid (n=39)	10 (25.6)	14 (35.9)	12 (30.8)	3 (7.7)
total	15	22	18	3

の染色性を検討した。遠隔転移例は pT1 群に 3 例、pT2 以上の群に 7 例含まれている。TdRPase の染色性と pT-stage の間に、一定の傾向は見られなかったが、(＃)の 3 例のうち 2 例が pT2 以上であった。

3. TdRPase の染色性と核 DNA ploidy の関連 (Table 4)

TdRPase の染色性は diploid 群、aneuploid 群ともに (+) がやや多い傾向であった。また (＃) の染色性を示した 3 例はすべて aneuploid であった。しかし、TdRPase の染色性と核 DNA ploidy の間には、一定の傾向は見られなかった。

4. TdRPase の染色性と予後の結果 (Fig. 1)

(＃)の染色性を示した 3 症例の生存率はその他の染色性を示した症例に比較して有意に予後不良であった。しかし、その他の染色性を示した症例群間の生存率には、有意差を認めなかった。

IV. 考 察

最近では proliferating cell nuclear antigen (PCNA), bromodeoxyuridine (BrdU), Ki-67 など DNA 合成に関与する活性物質を解析することで、腫瘍の有する生物学的特性との関連について

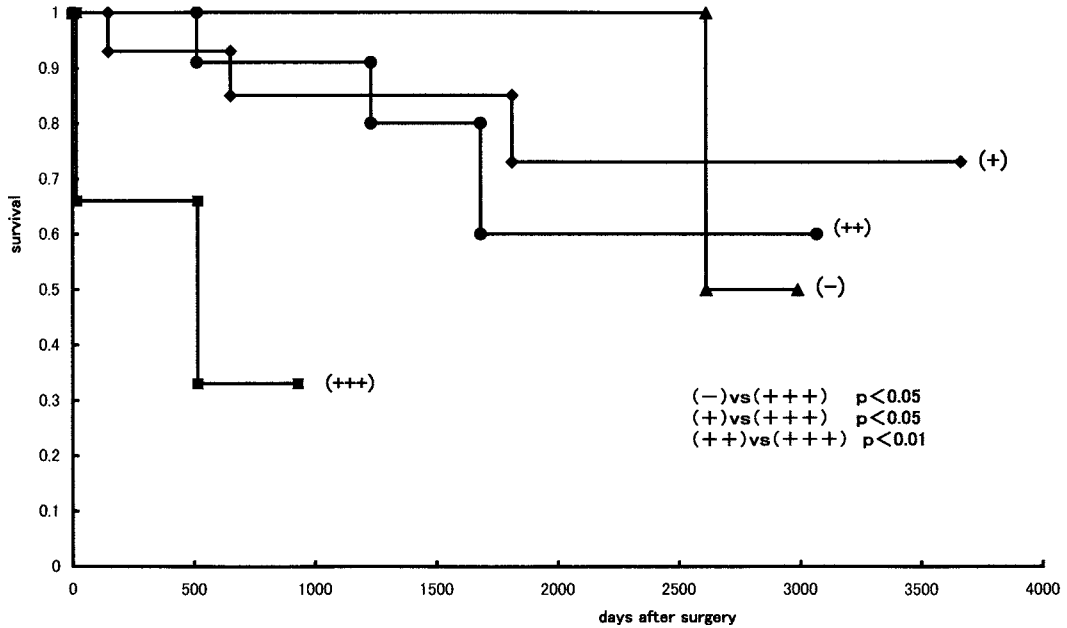


Fig. 1. The survival curve after surgery

多くの検討結果が報告されている¹⁰⁾⁻¹²⁾。一方、TdRPaseは、DNA合成の過程においてThymidineを加里ン酸分解しThymineに変換し、細胞内の過剰なThymidineの蓄積を防ぐ役割を果たしている。そのため、TdRPaseの活性はDNA合成の活発な組織で高く、胃癌²⁾、大腸癌³⁾、乳癌⁴⁾などの腫瘍組織は陽性を示す。ELISA法を用いた定量測定の結果、腫瘍組織が正常組織に比較して有意に高いTdRPase酵素活性が認められている。しかし、免疫組織染色を用いた検討はまだまだ少なく、とくに腎細胞癌については一定の見解を得ていない。そこで今回手術切除した腎細胞癌に対し、抗TdRPase抗体を用いた免疫組織化学染色を施し、その染色性の強度と組織学的grade、pT-stage、DNA ploidy patternとの関連性について検討した。

腎細胞癌において、組織学的grade、pT-stageは重要な予後決定因子と考えられており、実際に今回の症例群では、有意差は認めなかったがHigh grade、High stageの症例がLow grade、Low stageの症例に比べて予後不良の傾向であった。組織学的gradeとTdRPaseの染色強度について検討した結果、組織学的gradeの上昇に伴い、TdRPaseの染色強度も増大する傾向が認

められた。一方、pT-stageとTdRPaseの染色強度との関連は、pT1症例とpT2以上の症例で一定の関連は認められなかった。この結果は今園ら¹³⁾の、TdRPaseの発現は組織学的gradeに相関関係を認めるものの、他の臨床病理学的因子とは有意な相関を認めないとの報告と一致している。またTdRPaseの発現と臨床病期についての関連については、川田ら¹⁴⁾がpT-stageではなくRobson分類を用いて検討しており、Robson III以上の症例がRobson II以下の症例に比べて有意にTdRPaseの発現率が高いと報告している。

一方、予後とTdRPaseの染色性との検討において、TdRPaseの染色性が(≡)の群はそれ以下の群に比較して、有意に生存率不良であった。Imazonoら¹⁵⁾もTdRPase高発現が独立した予後因子であると報告しており、本酵素の染色強度は腎癌において予後決定因子として有用である可能性が示唆された。

TdRPaseの染色強度と核DNA量に関しては、有意な関連は認められなかった。この結果については、TdRPaseの染色性は腫瘍最深部を鏡検しているが、今回は症例数の関係でDNA ploidyのpatternをdiploid群とaneuploid群の2群に大別しており、clonal heterogeneityの検討も必要で

あると考えられた。しかし、染色性(Ⅲ)の群はすべてDNA aneuploid群であったという興味深い結果も認められ、今後のより正確な算定方法の検討など課題を残した。

V. 結 語

腎細胞癌において、抗TdRPase抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、TdRPaseの発現が80%以上と高い群は予後不良でかつすべてDNA aneuploid群であり、抗TdRPase抗体の染色性が重要な予後因子となり得ると考えられた。

文 献

- 1) Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguchi M, Akiyama S, Fukuji K, et al. Angiogenic factor. *Nature* 1992; 356: 668.
- 2) Takebayashi Y, Miyadera K, Akiyama S, Hokita S, Yamada K, Akiba S, et al. Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 288-95.
- 3) 亀山雅男, 中森正二, 今岡真義. 大腸癌の原発巣におけるPyNPase活性の臨床病理学的意義. 第32回日本癌治療学会総会抄録集, 1994; 1204.
- 4) Toi M, Hoshina S, Taniguchi T, Yamamoto Y, Ishitsuka H, Tominaga T, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 64: 79-82.
- 5) 永森 聡, 坂下茂夫, 小柳知彦, 井上和秋. Flow cytometryによる腎癌パラフィン包埋組織の核DNA量解析. *日泌会誌* 1988; 79: 1355-63.
- 6) 豊田健一, 永森 聡, 柏木 明, 野々村克也, 小柳知彦. Flow cytometryによる膀胱癌の核DNA量解析: 膀胱癌におけるDNA heterogeneityの検討. *日泌会誌* 1995; 86: 1353-9.
- 7) Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometry DNA analysis. *Cytometry* 1983; 3: 323-7.
- 8) 九嶋麻優美, 小西 平, 岡田裕作, 友部唯夫, 九嶋亮治, 服部隆則. 顕微蛍光測光法とflow cytometryによる腎細胞癌の核DNA量のheterogeneityの検討. *日泌会誌* 1994; 85: 473-80.
- 9) 日本泌尿器科学会 ほか 編. 腎癌取り扱い規約, 第3版, 東京: 金原出版; 1999.
- 10) Morell QL, Clar BF, Fenollosa EB, Perez BM, Martinez LA, Llombart BA. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a prognostic factor in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18: 677-82.
- 11) 関 晴夫, 永森 聡, 小柳知彦. 腎細胞癌におけるproliferating cell nuclear antigen (PCNA)の発現. *日泌会誌* 1995; 86: 1475-82.
- 12) 関 晴夫, 出村孝義, 永森 聡, 野々村克也, 小柳知彦. Ki-67を用いた腎細胞癌における増殖分画の検討. *日泌会誌* 1994; 85: 649-54.
- 13) 今園義治, 有馬純一郎, 久保博幸, 西山賢龍, 中川昌之, 秋山伸一. 腎癌および膀胱癌における血管新生因子Thymidine phosphorylaseの発現とその臨床的意義. *西日泌会誌* 2001; 63: 205-14.
- 14) 川田 望, 平方 仁, 児玉雅仁, 藤村 敬, 山本忠男, 滝本至得. 腎細胞癌におけるThymidine phosphorylaseの免疫組織学的検討. *日癌治療会誌* 1996; 31: 799.
- 15) Imazono Y, Takebayashi Y, Nishiyama K, Akiba S, Miyadera K, Yamada Y. Correlation between thymidine phosphorylase expression and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2570-8.