

学位論文題名

抗 PCNA 抗体を用いた正常子宮内膜、
内膜増殖症および子宮体癌の細胞増殖能の検討

学位論文内容の要旨

I. 緒言

正常の性周期をもつ性成熟婦人の子宮内膜は短期間に規則正しく増殖、分泌、剥脱を繰り返す。一方、子宮内膜の悪性腫瘍は無制御の自律的な増殖を特徴とする。悪性腫瘍を扱う場合、個々の病理組織学的所見を詳細に把握することは重要であるが、その他に腫瘍細胞の細胞増殖能などの生物学的特性を考慮して適切な治療をすることが望まれる。腫瘍細胞の細胞増殖能を調べる方法として、近年モノクローナル抗体作製の技術と増殖期の細胞核内蛋白の分析が進み、それらの核抗原に対する特異的な抗体を用いて免疫組織化学的に細胞の増殖性を解析することが容易になった。PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)は細胞周期のG1後期からS期に合成されるDNA polymerase- δ の補助蛋白で細胞増殖関連物質のひとつである。

本研究ではPCNAに対するモノクローナル抗体(PC10)を用いて正常子宮内膜、子宮内膜増殖症、子宮体癌組織の細胞増殖能を免疫組織化学的に検索し、さらに子宮体癌の予後を反映する病理組織学的因子などとの関連性について検討した。

II. 対象と方法

1. 対象

リンパ節郭清を加えた根治手術を施行した子宮体癌60例(内膜型腺癌52例, 腺棘細胞癌3例, 腺扁平上皮癌5例), 子宮内膜増殖症12例(嚢胞性腺増殖症6例, 腺腫性増殖症6例), 正常の子宮内膜組織44例(性成熟期婦人36例と閉経後の婦人8例)を対象とした。採取された組織を10%ホルマリン固定し, パラフィン包埋後4 μ mの連続切片を作製しH&E染色と免疫組織化学染色を施行した。

2. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色はSAB法で行なった。キシレン, エタノールで脱パラフィンし, 0.6%過酸化水素含メタノールで内因性ペルオキシダーゼを抑制し, 正常ウサギ血清で反応させた。その後一次抗体として抗PCNAマウスモノクローナル抗体(PC10, DAKO)を1%BSA含PBSで希釈して反応させた。二次抗体はビオチン化抗マウス血清を用い, HRP標識ストレプトアビジンで反応させた。発色はAECにて行い, 蒸留水で反応停止後にヘマトキシリンで核染色検鏡した。

3. 研究方法

陽性細胞は核のみが染色され, 最も強くみられた部位を中心に数カ所の視野を選

び、400倍にて観察した。1000個の細胞を数え、そのうちの陽性細胞数の比率を算出しPCNA陽性率とした。正常子宮内膜、内膜増殖症、子宮体癌のPCNA陽性率を求めた。また子宮体癌におけるPCNA陽性率と病理組織学的因子などとの関連性について検討した。統計学的に2群間の比較はWilcoxon検定を用い、生存曲線はKaplan-Meier法で示し、その有意差検定はgeneralized Wilcoxon testを用いた。

III. 結果

1. 正常の子宮内膜組織

増殖期後期のPCNA陽性率 ($26.8 \pm 2.7\%$, mean \pm SE) が最も高く、増殖期前期 ($6.4 \pm 2.9\%$) ($p < 0.001$), 分泌期初・中期 ($12.5 \pm 3.4\%$) ($p < 0.01$), 分泌期後期 ($0.2 \pm 0.1\%$) ($p < 0.001$), 閉経後の正常内膜 ($4.4 \pm 1.4\%$) ($p < 0.001$) よりもそれぞれ有意に高値を示した。

2. 子宮内膜増殖症組織

子宮内膜増殖症の12例はすべて閉経前の症例であった。PCNA陽性率は $15.4 \pm 5.7\%$ で、閉経前の子宮体癌のPCNA陽性率 $17.1 \pm 4.1\%$ および増殖期内膜 $18.9 \pm 3.1\%$ との間には有意差は認められなかった。また嚢胞性腺増殖症と腺腫性増殖症との間にPCNA陽性率の差は観察されなかった。

3. 子宮体癌組織

子宮体癌60例中閉経前の症例は17例 (46.3 ± 1.0 歳), 閉経後の症例は43例 (59.4 ± 1.0 歳) であった。閉経前の子宮体癌のPCNA陽性率 ($17.1 \pm 4.1\%$) と増殖期全体の18例の内膜の陽性率 ($18.9 \pm 3.1\%$) との間に有意差はみられなかったが、閉経後の子宮体癌のPCNA陽性率 ($19.9 \pm 2.6\%$) は閉経後の正常内膜の陽性率よりも有意 ($p < 0.005$) に高値を示した。

4. 子宮体癌組織のPCNA陽性率と病理組織学的因子との関係

臨床進行期 (FIGO(1983年)) 別 (I a期(16例): $21.3 \pm 4.1\%$, I b期(25例): $15.9 \pm 2.8\%$, II期(19例): $21.5 \pm 4.7\%$), 付属器転移の有無別 (転移あり(12例): $26.1 \pm 5.4\%$, 転移なし(48例): $18.5 \pm 2.4\%$), 組織分化度別 (G1(25例): $15.9 \pm 2.8\%$, G2(27例): $20.5 \pm 3.4\%$, G3(8例): $27.8 \pm 8.5\%$) では、それぞれ有意の差は認められなかった。しかし子宮頸部浸潤のある群 (19例, $26.6 \pm 4.4\%$) が浸潤のない群 (41例, $15.6 \pm 2.3\%$) ($p < 0.05$) よりも、核異型度の強いgrade 3 (8例, $34.8 \pm 6.2\%$) とgrade 2 (24例, $24.1 \pm 3.8\%$) がgrade 1 (28例, $10.4 \pm 1.6\%$) ($p < 0.001, p < 0.01$) よりも、筋層浸潤1/3を越える群 (44例, $22.9 \pm 2.6\%$) が1/3以下の群 (16例, $8.8 \pm 2.6\%$) ($p < 0.005$) よりも、脈管侵襲群 (31例, $25.1 \pm 3.4\%$) が侵襲の認められない群 (29例, $13.0 \pm 2.3\%$) ($p < 0.01$) よりも、リンパ節転移群 (18例, $31.0 \pm 4.8\%$) が転移陰性群 (42例, $14.0 \pm 1.9\%$) ($p < 0.005$) よりもそれぞれ有意に高値を示した。またリンパ節転移を認めた12例の原発部位では $35.0 \pm 6.0\%$ のPCNA陽性率であり、転移リンパ節では $26.4 \pm 8.7\%$ と原発部位よりも低値を示したが、両群間に有意差は認められなかった。さらに原発部位と転移リンパ節のPCNA陽性率の差異と転帰に関しては、一定の関係は認められなかった。

5. PCNA陽性率と予後との関係

生存曲線の解析 (Kaplan-Meier法) で、PCNA陽性率25%未満の群 (39例) の予後は25%以上の群 (21例) よりも有意 ($p < 0.05$) に良好であった。

IV. 考 察

G1後期からS期の細胞核に検出されるPCNAに対するモノクローナル抗体(PC10)を用いて正常子宮内膜，子宮内膜増殖症，子宮体癌を対象に免疫組織化学的に検索し，以下の結論が得られた。

1. 正常子宮の増殖期後期内膜のPCNA陽性率が最も高く，分泌期初・中期に下降し分泌後期には最低値を示した。また閉経後の内膜で著明な低下を認めた。
2. 子宮内膜増殖症のPCNA陽性率と増殖期内膜，子宮体癌のPCNA陽性率との間に差は認められなかった。
3. 閉経後の子宮体癌のPCNA陽性率は閉経後の正常内膜よりも著明に亢進しているが，閉経前の子宮体癌のPCNA陽性率は性周期をもつ婦人の短期間に増殖する内膜とはほとんど差がないものと考えられた。
4. 子宮体癌において核の異型性の強い腫瘍細胞とPCNA陽性率との関連性がみられ，陽性率の高い例で頸部浸潤，体部筋層への深い浸潤傾向を示し，さらに脈管侵襲，リンパ節転移を起こすことが示唆された。
5. 生存曲線の解析でPCNA陽性率25%未満の群の予後は25%以上の群よりも有意に良好であった。

以上から，PCNAの免疫組織染色所見は子宮内膜腺細胞の細胞増殖能を十分に反映し，子宮体癌においてはPCNA陽性率の高い症例は増殖活性が高く，PCNA陽性率と悪性度とが関連していることが示唆された。従って，本法は子宮体癌の予後を推定するうえで，さらには手術治療後の追加治療を選択するために臨床的にきわめて有用であることがはじめて確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征 一 郎
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 本 間 研 一

学 位 論 文 題 名

抗 PCNA 抗体を用いた正常子宮内膜、 内膜増殖症および子宮体癌の細胞増殖能の検討

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) は細胞周期の G1 後期から S 期に合成される DNA polymerase- δ の補助蛋白で細胞増殖関連物質のひとつである。本研究では PCNA に対するモノクローナル抗体 (PC10) を用いて、正常子宮内膜、子宮内膜増殖症、子宮体癌組織の細胞増殖能を免疫組織化学的に検索し、さらに子宮体癌の予後を反映する病理組織学的因子などとの関連性について検討した。

リンパ節郭清を加えた根治手術を施行した子宮体癌 60 例 (内膜型腺癌 52 例, 腺棘細胞癌 3 例, 腺扁平上皮癌 5 例), 子宮内膜増殖症 12 例 (嚢胞性腺増殖症 6 例, 腺腫性増殖症 6 例), 正常の子宮内膜組織 44 例 (性成熟期婦人 36 例と閉経後の婦人 8 例) を本研究の対象とした。採取された組織を 10%ホルマリン固定し, パラフィン包埋後 4 μm の連続切片を作製し H & E 染色と免疫組織化学染色を施行した。

免疫組織化学染色は SAB 法で行なった。キシレン, エタノールで脱パラフィンし, 0.6% 過酸化水素含メタノールで内因性ペルオキシダーゼを抑制し, 正常ウサギ血清で反応させた。その後一次抗体として抗 PCNA マウスモノクローナル抗体 (PC10, DAKO) を 1% BSA 含 PBS で希釈して反応させた。二次抗体はビオチン化抗マウス血清を用い, HRP 標識ストレプトアビジンで反応させた。発色は AEC にて行い, 蒸留水で反応停止後にヘマトキシリンで核染し検鏡した。

陽性細胞は核のみが染色され, 最も強くみられた部位を中心に数カ所の視野を選び, 400 倍にて観察した。1000 個の細胞を数え, そのうちの陽性細胞数の比率を算出し PCNA 陽性率とした。正常子宮内膜, 内膜増殖症, 子宮体癌の PCNA 陽性率を求めた。また子宮体癌における PCNA 陽性率と病理組織学的因子などとの関連性について検討した。統計学的に 2 間の比較は Wilcoxon 検定を用い, 生存曲線は Kaplan-Meier 法で示し, その有意差検定は generalized Wilcoxon test を用いた。

研究成績は以下の如くである。

- 1) 正常の子宮内膜組織において, 増殖期後期の PCNA 陽性率 ($26.8 \pm 2.7\%$, mean \pm SE) が最も高く, 増殖期前期 ($6.4 \pm 2.9\%$) ($p < 0.001$), 分泌期初・中期 ($12.5 \pm 3.4\%$) ($p < 0.01$), 分泌期後期 ($0.2 \pm 0.1\%$) ($p < 0.001$), 閉経後の正常内膜 ($4.4 \pm 1.4\%$) ($p < 0.001$) よりもそれぞれ有意に高値を示した。
- 2) 閉経前の子宮内膜増殖症組織において, PCNA 陽性率は $15.4 \pm 5.7\%$ で, 閉経前の子宮体癌の PCNA 陽性率 $17.1 \pm 4.1\%$ および増殖期内膜 $18.9 \pm 3.1\%$ との間には有意差は認められなかった。また嚢胞性腺増殖症と腺腫性増殖症との間に PCNA 陽性率の差は観察されなかった。
- 3) 子宮体癌 60 例中閉経前の症例は 17 例 (46.3 ± 1.0 歳), 閉経後の症例は 43 例 (59.4 ± 1.0 歳)

）であったが、閉経前の子宮体癌のPCNA陽性率(17.1±4.1%)と増殖期全体の18例の陽性率(18.9±3.1%)との間に有意差はみられなかった。しかし、閉経後の子宮体癌のPCNA陽性率(19.9±2.6%)は閉経後の正常内膜の陽性率よりも有意(p<0.005)に高値を示した。

4) 子宮体癌組織のPCNA陽性率と病理組織学的因子との関係、すなわち、臨床進行期(FIGO(1983年))別(Ia期(16例):21.3±4.1%, Ib期(26例):15.9±2.8%, II期(19例):21.5±4.7%), 付属器転移の有無別(転移あり812例):26.1±5.4%, 転移なし(48例):18.5±2.4%), 組織分化度別(G1(25例):15.9±2.8%, G2(27例):20.5±3.4%, G3(8例):27.8±8.5%)の検討では、それぞれ有意の差は認められなかった。しかし子宮頸部浸潤のある群(19例, 26.6±4.4%)が浸潤のない群(41例, 15.6±2.3%) (p<0.05)よりも、核異型度の強いgrade 3(8例, 34.8±6.2%)とgrade 2(24例, 24.1±3.8%)がgrade 1(28例, 10.4±1.6%) (p<0.001, p<0.01)よりも、筋層浸潤1/3を超える群(44例, 22.9±2.6%)が1/3以下の群(16例, 8.8±2.6%) (p<0.005)よりも、脈管侵襲群(31例, 25.1±3.4%)が侵襲の認められない群(29(29例), 13.0±2.3%) (p<0.01)よりも、リンパ節転移群(18例, 31.0±4.8%)が転移陰性群(42例, 14.0±1.9%) (p<0.005)よりもそれぞれ有意に高値を示した。またリンパ節転移を認めた12±例の原発部位では35.0±6.0%のPCNA陽性率であり、転移リンパ節では26.4±8.7%と原発部位よりも低値を示したが、両群間に有意差は認められなかった。さらに原発部位と転移リンパ節のPCNA陽性率の差異と転滞に関しては、一定の関係は認められなかった。

5) PCNA陽性率と予後との関係すなわち生存曲線の解析(Kaplan-Meier法)で、PCNA陽性率25%未満の群(39例)の予後は25%以上の群(21例)よりも有意(p<0.05)に良好であった。

以上の研究成績から、PCNAの免疫組織染色所見は子宮内膜腺細胞の細胞増殖能を十分に反映し、子宮体癌においてはPCNA陽性率の高い症例は増殖活性が高く、PCNA陽性率と悪性度とが関連していることが示唆された。従って、PCNAは子宮体癌の予後を推定するうえで、さらには手術治療後の追加治療を選択するために臨床的にきわめて有用であることがはじめて確認された。

口頭発表に際し、細川教授から正常の子宮内膜と子宮体癌組織とを比較した意義、PCNA陽性率の臨床応用について、PCNA陽性・陰性症例の浸潤率、転移率について、また正常内膜組織でPCNA陽性を示した間質細胞の種類について、葛巻教授からは酵素抗体法の染色のintensityについて、in situ hybridizationによるmRNAレベルあるいは細胞周期での検討について、またPCNAの影響化でのDNA polymerase- δ のミスマッチリベアについて、本間教授からはPCNA陽性率の意味すなわち細胞周期の短縮あるいは蛋白発現量の増加のどちらに関連するのかなどについて質問があった。さらに小野江教授からは転移とPCNA陽性率との関係、PCNA以外の転移関連マーカーなどについての質問があった。これらの質問に対して、申請者は概ね適切に解答しえた。

発表後、副査の葛巻教授、本間教授には口頭試問による審査を個別にうけ合格と判定された。

以上、本研究は子宮体癌におけるPCNAの臨床上の意義を病理組織学的因子ならびに予後との関連からはじめて明らかにしえた研究であり、今後の子宮体癌の治療に役立つものと判断された。よって、博士(医学)の授与に値するものと判定された。