

学位論文題名

Pyrimidine nucleoside phosphorylase activity and biological characteristics of breast cancer

(乳癌組織内 PyNPase 活性と乳癌の生物学的特性)

学位論文内容の要旨

I 緒 言

癌の生物学的特性の解明は単に予後因子との関連のみではなく、診断治療上重要な意義を持っている。

乳癌の術後成績を予測する予後因子としては、腫瘍断面最大径と組織学的リンパ節転移の有無が最も重要なものとされている。しかし、これらの因子は腫瘍の進行度を示すが、腫瘍自体の生物学的性格を反映するものではないので、これらの因子のみにより予後を推定するには無理がある。Pyrimidine nucleoside phosphorylase(PyNPase)は5'-deoxy-5-fluorouridine(5'-DFUR)を5-fluorouracil(5-FU)に変換する酵素であり、腫瘍組織内では正常組織中よりもその活性が高いことが知られている。また最近PyNPaseが癌の遠隔転移と関係するPlatelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF)と同一のものであることが判明した。しかし、悪性腫瘍組織内PyNPase活性が腫瘍の生物学的性格や予後といかなる関係にあるかは明らかでない。

本研究では、乳癌の生物学的特性を表わすとされている諸因子との関係を検討し、PyNPaseの予後因子としての特徴を検索した。

II 材料および方法

対象は、Stage IIの乳癌138例であり、年齢は28~75才、 55.2 ± 10.0 才(平均 \pm SD)であった。外科手術により乳房切除後速やかに腫瘍組織を採取し、 -20°C で凍結保存した。乳癌組織内PyNPase活性、estrogen receptor(ER)、progesterone receptor(PgR)、epidermal growth factor receptor(EGFR)、DNA ploidy pattern, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)、c-erbB-2 gene amplificationについて随時以下の方法で測定した。また一部は新鮮材料として用いた。

1. PyNPase活性の測定：検体を処理して得たPyNPaseの粗酵素と一定量の5'-DFURを反応させて生成された5FU量をHPLCにて測定し、PyNPase活性とした。
2. ERの測定：Dextran Coated Charcoal(DCC)法により行った。ER値が5fmol/mg protein以上を示す検体をER陽性とした。
3. PgRの測定：PgRモノクローナル抗体によるEIAキットを用いた。PgR値が10fmol/mg protein以上を示す検体をPgR陽性とした。
4. EGFRの測定：(125)Iを用いたcompetitive binding assayにより行った。EGFR値が5fmol/mg protein以上を示す検体をEGFR陽性とした。

5. DNA ploidy patternの測定：DNAヒストグラムはFlowcytometry (Becton Dickinson社) を用いて測定し、その解析は単一のG0/G1ピークを有するものをdiploidとし、これからずれたもの、一つ以上のG0/G1ピークを有するものをaneuploidとした。
6. PCNA陽性細胞の解析：FITC標識抗PCNA抗体を使用し、FCMにより分析した。陽性細胞率が10%以上をPCNA陽性乳癌とした。
7. c-erb B-2遺伝子増幅の測定：スロットプロットハイブリダイゼーション法により行った。増幅のあるものをc-erb B-2遺伝子増幅陽性乳癌とした。
測定値はMEAN±SDで示した。有意差検定にはMann-Whitney U test を用いた。

Ⅲ 結 果

1. 138症例の乳癌組織内のPyNPase活性は4.2~626.0 μ gFU/mg Protein/hrで、平均は207.3±122.4 μ gFU/mg Protein/hrであった。
2. 腫瘍断面最大径とPyNPase活性の間に有意な関係はなかった。
3. 充実腺管癌が他の組織型よりも有意に高いPyNPase活性を示した(p<0.01)。
4. リンパ節転移度とPyNPase活性の間に有意な関係を認めなかった。
5. ER, Pgrとともに陰性例が陽性例よりも有意に高いPyNPase活性を示した(p<0.05)。
6. EGFR、DNA ploidy pattern、PCNAとPyNPase活性との間に有意な関係はなかった。
7. c-erbB-2遺伝子増幅例は、非増幅例よりも有意に高いPyNPase活性を示した(p<0.05)。

Ⅳ 考 察

乳癌組織内PyNPase活性についてのこれまでの報告例は、種々の病期のものを一緒にしたものであり、測定値に大きな幅があったが、本研究では対象を病期Ⅱのみに統一した。したがって病期の差によるバイアスが除かれた値が測定された。

腫瘍断面最大径、組織学的リンパ節転移度は腫瘍の進展度を直接示す指標であるが、本研究の結果ではPyNPase活性値との間に関係がなく、PyNPase活性はこれらの腫瘍の進展度を示す因子とは独立したものであると考えられた。

充実腺管癌でPyNPase活性が高いことの意義は不明である。悪性度が高く、増殖性の強い乳癌はERを欠く傾向が強く、ER陰性乳癌はER陽性乳癌に比べ、予後不良である。本研究では、ER陰性例が陽性例よりもPyNPase活性が高く、PyNPase活性が癌の悪性度を反映していることが示唆された。PgrはERに比べると悪性度との相関は少ないとされるが、陰性例が陽性例よりも高いPyNPase活性を示した。

EGFRが悪性度の高い乳癌でその増殖に何らかの役割を果たしている可能性が示されているが、EGFR値とPyNPase活性値の関連は明かではなく、両者は独立した因子と考えられた。

DNA aneuploidyはdiploidyよりも悪性度が高いとされるが、両者のPyNPase活性に差を認めなかった。

細胞増殖能の指標であるPCNA陽性細胞数とPyNPase活性の関連はなく、両者は互いに独立した因子と考えられた。

c-erbB-2遺伝子の増幅は乳癌の10~30%に認められ、増幅群の予後は不良であり、とくにリンパ節転移陽性例で予後の差が顕著であった。多変量解析ではc-erbB-2遺伝子の増幅は腫瘍径やリンパ節転移の程度とは独立した因子とされている。本研究により、乳癌組織内PyNPase活性はc-erbB-2遺伝子増幅群に高く、両者の間に有意な関係が見られた。この結果は、乳癌組織内PyNPase活性が腫瘍径やリンパ節転移度とは独立した因子であることを支持するものと考えられる。

Ⅴ 結 語

ヒト乳癌stage 138症例の組織を用いて乳癌組織内PyNPase活性を測定し、検討した結果、以下の結論が得られた。

1. 腫瘍径やリンパ節転移度とは独立した因子である。
2. ER、PgR、c-erbB-2遺伝子増幅の有無と有意な関係を有する。
3. 乳癌の生物学的特性をを表す新しい因子と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 眞澄男
副 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 内 野 純 一

学 位 論 文 題 名

Pyrimidine nucleoside phosphorylase activity and biological characteristics of breast cancer

(乳癌組織内 PyNPase 活性と乳癌の生物学的特性)

乳癌の術後成績を予測する予後因子としては、腫瘍断面最大径と組織学的リンパ節転移の有無が最も重要なものとされている。しかし、これらの因子は癌の進行度を示すが、癌細胞自体の生物学的性格を反映するものではない。また、乳癌細胞の悪性度を示す予後因子として、estrogen receptor(ER)、progesterone receptor(PgR)、epidermal growth factor receptor(EGFR)、DNA ploidy pattern、proliferating cell nuclear antigen(PCNA)、c-erbB-2 gene amplificationなどが報告されているが、これらも乳癌の生物学的特性を表わす因子としては十分でない。一方、Pyrimidine nucleoside phosphorylase(PyNPase)は5'-deoxy-5-fluorouridine(5'-DFUR)を5-fluorouracil(5-FU)に変換する酵素であり、腫瘍組織内では正常組織中よりもその活性が高いことが知られている。また、最近PyNPaseが癌の遠隔転移と関係する血管新生能を有するPlatelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF)と同一のものであることが判明した。しかし、悪性腫瘍組織内PyNPase活性が腫瘍の生物学的性格や予後といかなる関係にあるかは明らかでない。

そこで、申請者は新しい乳癌細胞の予後因子としてのPyNPaseの可能性を明らかにすることを目的に次の研究を行った。すなわち、乳癌組織内PyNPase活性と既に報告されているER、PgR、EGFR、PCNAなどの発現、DNA ploidy pattern、c-erbB-2 gene amplificationなどの乳癌の生物学的特性を表わす諸因子との関係を検討した。

検討は、138例のStage IIの乳癌患者を対象として行われた。患者の年齢は28～75才(平均55.2±10.0才)であった。外科手術により乳房切除後速やかに腫瘍組織を採取し、-20℃で凍結保存し、また一部の症例では新鮮材料を用い、随時以下の方法により各因子を検索した。

1. PyNPase活性の測定：検体を処理して得た粗酵素分画を一定量のPyNPaseの基質である5'-DFURと反応させて生成された5-FU量をHPLCにて測定し、PyNPase活性とした。
2. ERの測定：Dextran Coated Charcoal(DCC)法により行った。ER値が5 fmol/mg protein以上を示す検体をER陽性とした。
3. PgRの測定：PgRモノクローナル抗体によるEIAキットを用いた。PgR値が

- 10fmol/mg protein以上を示す検体をPgR陽性とした。
- EGFRの測定： ^{125}I を用いたcompetitive binding assayにより行った。EGFR値が5fmol/mg protein以上を示す検体をEGFR陽性とした。
 - DNA ploidy patternの測定：DNAヒストグラムはFlowcytometry (Becton Dickinson社)を用いて測定し、その解析は単一のG0/G1ピークを有するものをdiploidとし、これからずれたもの、一つ以上のG0/G1ピークを有するものをaneuploidとした。
 - PCNA陽性細胞の解析：FITC標識抗PCNA抗体を使用し、FCMにより分析した。陽性細胞率が10%以上をPCNA陽性症例とした。
 - c-erb B-2遺伝子増幅の測定：スロットプロットハイブリダイゼーション法により行った。増幅のあるものをc-erb B-2遺伝子増幅陽性症例とした。測定値はMEAN \pm SDで示した。有意差検定にはMann-Whitney U testを用いた。

検索の結果は次のように要約される。

- 138症例の乳癌組織内のPyNPase活性は4.2~626.0 $\mu\text{gFU}/\text{mg Protein}/\text{hr}$ で、平均は207.3 \pm 122.4 $\mu\text{gFU}/\text{mg Protein}/\text{hr}$ であった。
- 腫瘍断面最大径とPyNPase活性の間に有意な関係はなかった。
- 充実腺管癌が他の組織型よりも有意に高いPyNPase活性を示した($p<0.01$)。
- リンパ節転移度とPyNPase活性の間に有意な差を認めなかった。
- ER、PgRともに陰性例が陽性例より有意に高いPyNPase活性を示した($p<0.05$)。
- EGFR、DNA ploidy pattern、PCNAとPyNPase活性との間に有意な差はなかった。
- c-erbB-2遺伝子増幅例では、非増幅例よりも有意に高いPyNPase活性を示した($p<0.05$)。

本研究は138例のstage II乳癌を対象とし癌組織内PyNPase活性を測定したものであり、申請者は得られた実験結果から、

- 乳癌組織内PyNPase活性は腫瘍径やリンパ節転移度とは独立した因子である。
- 乳癌組織内PyNPase活性はER、PgR、c-erbB-2遺伝子増幅の有無と有意な相関を示す。
- 乳癌組織内PyNPase活性は乳癌細胞の生物学的特性を表す新しい因子である。などの新しい知見を示した。検索された各症例の経過観察による予後とPyNPase活性との照合など今後の検討を要する事項もあるが、乳癌の診療に有意義な研究と思われる。

審査にあたって、癌研細胞制御部門の浜田講師より組織の新生血管、細胞外へのPyNPase分泌の可能性などについて、加藤教授よりc-erbB-2遺伝子との関連、リンパ節内PyNPase活性、組織型による活性の差異、ERとの関連、予後因子としての価値について、小柳教授より、臨床的応用について、細川教授よりPyNPaseのinhibitorの臨床応用に関して質疑があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、研究歴期間にける研鑽なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。