

学位論文題名

ki-67 Labeling Indices in Non-Small Cell Lung Cancer:
Comparison between Image Cytometry and Flow Cytometry

(肺非小細胞癌における ki-67 陽性率：イメージサイトメトリーと
フローサイトメトリーの比較)

学位論文内容の要旨

Ki-67抗体は、細胞周期におけるG1、S、G2/M期に存在し、G0期には存在しない核抗原に対する抗体である。そのため悪性腫瘍などの組織標本におけるKi-67抗体陽性細胞の比率は増殖期にある細胞の割合を示し、増殖能の指標となり得る。これまでにKi-67陽性率は mitotic index、bromodeoxyuridineの標識率、S期の割合 (SPF) など従来の増殖能の指標と相関があることが報告されていて、しかもそれらの方法よりも簡便な方法で検出可能である。一方、p53遺伝子の機能のひとつはG1-S期への移行を抑制して細胞回転を調節することであるが、p53遺伝子変異は肺癌を含む多くの悪性腫瘍の発生、増殖に関係している事が知られている。そして一部の悪性腫瘍ではKi-67陽性率と相関があることが報告されている。

我々は肺非小細胞癌の増殖能とその臨床病理学的指標との関係を調べるため、手術摘出標本で肺非小細胞癌組織におけるKi-67陽性率を測定した。Ki-67の測定方法として多数の細胞を短時間で解析できるフローサイトメトリー (FCM) と、組織の構築を壊さずに評価が可能であるイメージサイトメトリー (ICM) の方法が報告されているが、我々は同一検体で両方法でKi-67陽性率を測定して、今回の測定方法のうちどちらにより利点があるかについても検討した。さらにFCMを行った際、良好なDNAヒストグラムの得られた検体について、DNA-analysis softwareを用いてSPFを算出し、Ki-67陽性率との関係を比較した。

また肺癌組織におけるp53遺伝子変異の有無をp53タンパク質の免疫組織化学法で検討した

材料と方法：材料としては27例の手術摘出肺非小細胞癌組織 (腺癌20例、扁平上皮癌5例、大細胞癌2例) を用いた。Ki-67陽性率測定法であるが、ICM法においては凍結保存した手術摘出肺癌組織を薄切後、1次抗体としてKi-67抗体を用いた免疫組織化学法で染色し、画像分析システム (CAS 100) で陽性率を算出した。FCM法においては、手術摘出肺癌組織の細胞単離を行い、蛍光色素で標識したKi-67抗体と反応させpropidium iodideにて

DNA染色を行った。同時に検体の一部は細胞単離後、蛍光色素で標識した正常マウスIgGと反応させ、negative controlとして用いた。測定したDNA量におけるaneuploidの細胞集団を腫瘍細胞とみなし、その集団についてKi-67陽性率を測定した。以上はFACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, Oxnard, CA) を用いて解析した。Ki-67陽性率を求めるための陽性、陰性の境界を決定するため、対数増殖期にある肺癌培養細胞株、PC-10のKi-67/DNA量を測定し、得られたグラフにおいて陽性側にS、G2/M期が含まれるようにcutoff labelを設定した。これはnegative controlの95%の細胞が除かれるlabelと一致した。このcutoff labelを用いることによって手術摘出肺癌組織での検索においてもS、G2/M期を分離できた。故に今回の肺癌組織での検討もnegative controlの95%の細胞が除かれるlabelをKi-67陽性のcutoff labelとして用いた。

変異p53遺伝子産物はタンパク質の半減期が正常型に比べて延長するため細胞核内に大量に蓄積する。そのため、p53遺伝子産物に対するモノクローナル抗体PAb1801を1次抗体とした免疫組織化学染色を行って、腫瘍組織で10%以上の細胞核が染色されたものを変異p53遺伝子産物陽性とした。統計処理はMann-Whitney U-test、Kruskal-Wallis test、Spearman rank-order coefficient法を用いた。

結果：肺癌組織のKi-67陽性率はFCMにて3~56%、ICMにて2~56%であり、両者は正の相関を示した ($r=0.77$, $p<0.05$)。今回のFCMによる方法では、aneuploidの集団を癌細胞として認識しKi-67陽性率を求めているため、diploidの腫瘍では正常細胞との分離ができずKi-67陽性率を測定できなかった。しかしICMによる方法では、形態により腫瘍細胞を認識できるので、diploidの腫瘍でも測定可能であった。ICMによるKi-67陽性率と、FCMによるDNA histogramより求めたSPFには正の相関を認めた ($r=0.91$, $p<0.01$)。Ki-67陽性率と臨床病理学的指標との比較では高分化群が陽性率9.0%で中分化・低分化群 (24.4%) より有意に低かった ($p<0.05$)。T因子、N因子との関係ではT1:7.5%、T2-4:20.3%、N0:17.4%、N1-3:16.9%であり、T1群がT2-4群に比して低い傾向があったが有意差は認めなかった。組織型との関係においても腺癌16.5%、扁平上皮癌19.0%、大細胞癌36.0%で有意差は認めなかった。変異p53遺伝子産物発現との関係でも、p53タンパク質陽性群24.6%、同陰性群19.4%と相関を認めなかった。

考案と結論：以上より、Ki-67陽性率は、肺非小細胞癌組織において増殖能の指標として用いることが可能であり、分化度と統計学的に有意な相関があった。測定はFCM、ICMどちらでも可能であったが、ICMではdiploidの腫瘍においても測定可能であるため、より好ましい方法であると考えられた。本研究では検討していないが、腫瘍の増殖能は化学療法および放射線療法の感受性と相関があるという報告もあり、Ki-67陽性率は肺非小細胞癌において臨床的に有用な指標になり得ることが示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 眞澄男
副 査 教 授 犬 山 征 夫
副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

ki-67 Labeling Indices in Non-Small Cell Lung Cancer: Comparison between Image Cytometry and Flow Cytometry

(肺非小細胞癌における ki-67 陽性率：イメージサイトメトリーと
フローサイトメトリーの比較)

Ki-67抗体は、細胞周期におけるG1、S、G2/M期に存在し、G0期には存在しない核抗原に対する抗体である。そのため悪性腫瘍などの組織標本におけるKi-67抗体陽性細胞の比率は増殖期にある細胞の割合を示し得る。本研究では手術摘出標本で肺非小細胞癌組織におけるKi-67陽性率を測定し、その臨床病理学的指標との関係、および悪性腫瘍の発生、増殖に関係しているとされるp53タンパク質発現異常との関係を調べた。また、同一検体でフローサイトメトリー (FCM) と、イメージサイトメトリー (ICM) の両方法でKi-67陽性率を測定し、どちらにより利点があるかについて比較した。さらにFCMにて S期細胞比率 (SPF) を算出し、Ki-67陽性率との関係を検討した。材料は27例の手術摘出肺非小細胞癌組織で、Ki-67陽性率測定法は、ICM法においては凍結保存した手術摘出肺癌組織を薄切後1次抗体としてKi-67抗体 (陰性コントロールでは正常マウスIgG) を用いた免疫組織化学法で染色し、画像分析システム (CAS 100) で陽性率を測定した。FCM法においては、手術摘出肺癌組織の細胞単離を行い、蛍光色素で標識したKi-67抗体 (陰性コントロールでは蛍光色素で標識した正常マウスIgG) と反応させ、propidium iodideにてDNA染色を行いFACSscan flow cytometerを用いて陽性率を測定した。Ki-67陽性率のcutoff labelの設定は対数増殖期にある肺癌培養細胞株、PC-10を用いて決定した。このcutoff labelを用いた手術摘出肺癌組織での検索においても S、G2/M期が分離可能であった。p53タンパク質はモノクローナル抗体PAb1801を1次抗体とした免疫組織化学染色を行って、腫瘍組織で10%以上の細胞核が染色されたものを陽性とした。統計処理は、Mann-Whitney U-test、Kruskal-Wallis test、Spearman rank-order coefficient法を用いた。肺癌組織のKi-67陽性率はFCMにて3~56%、ICMにて2~56%であり、両者は正の相関を示した ($r=0.77$ 、 $p<0.05$)。今回のFCMによる方法では、aneuploidの集団を癌細胞として認識しKi-67陽性率を求めているため、diploidの腫瘍では正常細胞との分離ができずKi-67陽性率を測定できなかった。しかしICMによる方法では、形態により腫瘍細胞を認識できるので、diploid

の腫瘍でも測定可能であった。ICMによるKi-67陽性率と、SPFには正の相関を認めた ($r=0.91$ 、 $p<0.01$)。Ki-67陽性率と臨床病理学的指標との比較では、高分化群の陽性率9.0%は中分化・低分化群の陽性率24.4%より有意に低かった ($p<0.05$)。T因子との関係ではT1群がT2-4群に比して低い傾向があったが有意差は認めなかった。N因子、組織型、p53タンパク質発現異常とは有意差を認めなかった。以上より、Ki-67陽性率は、肺非小細胞癌組織において増殖細胞の比率を表していた。測定はFCM、ICMどちらでも可能であったが、ICMではdiploidの腫瘍においても測定可能であるため、より好ましい方法であると考えられた。

審査に当たっては、副査犬山教授より、1. 肺小細胞癌におけるKi-67陽性率との比較について、2. MIB-1とKi-67陽性率との比較について、3. 臨床応用の実際について、4. Ki-67陽性率と化学療法の感受性との関係について質問があった。また、副査川上教授より、1. サンプル数について、2. 肺以外の腫瘍におけるKi-67陽性率と病期、p53などとの関係について質問があった。さらに主査細川より、1. Ki-67陽性率が小さい腫瘍の臨床的特徴について、2. PCNA、BrdUなどgrowth fractionをあらわすKi-67以外の指標との比較について質問を行った。また菅野教授より、1. FCMとICMによるKi-67陽性率が大きく異なった1例の理由について、2. FCMにおける細胞単離の方法について、3. 手術後の治療方針の決定への応用について質問があった。申請者はこれらの質問に対しておおむね適切な回答を行った。

さらに検体数をふやし、予後、化学療法・放射線療法などに対する感受性などとの比較することにより、Ki-67陽性率の臨床的役割をさらに解明することができると期待される。

審査員一同は、本研究を、Ki-67陽性率が肺非小細胞癌のgrowth fractionを求める上で有用な方法であり、臨床に応用するための基礎的研究として高く評価し、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。