

原発性非小細胞肺癌の PCNA 発現率で評価した 腫瘍増殖能とリンパ節転移の検討

森田 克哉, 林 義信, 家接 健一, 清水 淳三
村上 眞也, 小田 誠, 荒能 義彦, 徳楽 正人
長尾 信, 矢崎 潮, 渡辺 洋宇

要 旨

原発性非小細胞肺癌切除65例に対し, PCNA 発現率で評価した腫瘍増殖能とリンパ節転移との関連について検討を行い, 生物学的悪性度の指標としての有用性について考察した. PCNA 標識率は, 手術材料を用いて flow cytometer により複数部位で測定し, その平均値で評価した. 腺癌36例中13例, 扁平上皮癌29例中5例にリンパ節転移を認め, その頻度は腫瘍径の増大にしたがって増加した. しかし PCNA 標識率とリンパ節転移の頻度は相関を認めず, また腺癌では腫瘍径とも相関を認めなかった. 腫瘍径が同一の場合, PCNA 標識率が高値すなわち doubling time が短い方が発癌から発見までの期間が短かいと考えられ, 腺癌では T1 でかつ PCNA 標識率が高値のものでリンパ節転移を認めなかった. PCNA 標識率は腫瘍の動的状態を反映すると考えられる増殖能を表しており, 癌のある時点での進行度を表す TNM 分類とは独立した因子と考えられた.

索引用語: 非小細胞肺癌, PCNA, 腫瘍増殖能, リンパ節転移
non-small cell lung cancer, PCNA, proliferative potential, lymphnode metastasis

はじめに

非小細胞性肺癌では腫瘍径の増大にしたがってリンパ節転移陽性例の頻度が増す傾向があり, 予後も不良となる¹⁾. しかし一方では従来の TNM 分類から予後を判定するのが困難な例も多数認める. 近年肺癌の予後を生物学的悪性度の面から解明する試みがなされ, 腫瘍増殖能や核 DNA 量などが解析されている. 今回我々は増殖関連因子の1つである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の標識率を flow cytometer を用いて定量的に測定しリンパ節転移との関連について検討を行い, 生物学的悪性

度の指標としての有用性について考察した.

対象と方法

最近1年間に当科で切除された原発性非小細胞肺癌のうち65例を対象とした. 組織型は腺癌36例, 扁平上皮癌29例であった. リンパ節転移は腺癌36例中13例, 扁平上皮癌29例中5例に認めた. これらの新鮮切除標本の複数部位から材料を採取し, 単離浮遊細胞を得た. これに抗 PCNA 抗体 (PC-10, DAKO) を反応させた後, FITC 標識二次抗体 (F313, DAKO) を加え flow cytometer (EPICS PROFILE II, COULTER) で解析した. PCNA 陽性細胞は, 個々の検体ごとに一次抗体である抗 PCNA 抗体を加えていない negative control を対象として用い, 陽性細胞の割合が1%以下となるように cut off line を定め, それより上を PCNA

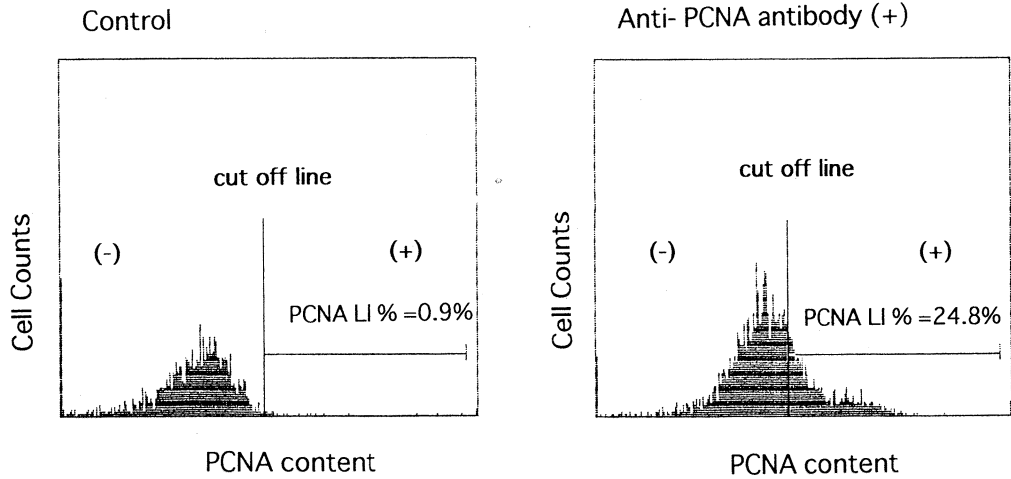


Fig. 1 Flow cytometric quantification of PCNA contents

陽性細胞とみなし、その割合 (%) を算出し PCNA 標識率 (PCNA labeling index, LI%) とした (Fig. 1). PCNA LI% は同一組織内でも heterogeneity を示すため、PCNA LI% の比較には症例ごとに測定したすべてのサンプルの平均値を用いた。

得られた値は平均値 ± 標準偏差で表し、統計学的解析には Mann-Whitney's U test を用いた。

結 果

1. 腫瘍径とリンパ節転移 (Table 1)

腺癌では、腫瘍径増大にしたがってリンパ節転移の頻度が増大する傾向を認めた。扁平上皮癌では有意差をもって腫瘍径とリンパ節転移陽性例の頻度が正の相関を示した (P < 0.05)。

2. PCNA LI% とリンパ節転移 (Table 2)

腺癌36例中リンパ節転移陽性13例の PCNA LI% は $28.0 \pm 17.7\%$ 、リンパ節転移陰性23例の PCNA LI% は $25.0 \pm 12.8\%$ で有意差を認めなかった。扁平上皮癌29例中リンパ節転移陽性5例の PCNA LI% は $37.0 \pm 16.8\%$ で、リンパ節転移陰性24例の $24.3 \pm 12.3\%$ より高い傾向を認めた。

Table 1 Tumor size and frequency of lymphnode metastasis.

Adenoca.

Tumor size (mm)	n 0	n 1, 2	Total
0-30	16 (69.6%)	7 (30.4)	23
31-50	7 (63.6)	4 (36.4)	11
51-	-	2 (100)	2
Total	23 (63.9)	13 (36.1)	36

SCC

Tumor size (mm)	n 0	n 1, 2	Total
0-30	9 (90%)	1 (10)	10
31-50	11 (91.7)	1 (8.3)	12
51-	4 (57.1)	3 (42.9)	7
Total	24 (82.8)	5 (17.2)	29

Table 2 PCNA LI% and frequency of lymphnode metastasis.

Adenoca.			
PCNA LI%	n 0	n 1, 2	Total
Average	25.0±12.8	28.0±17.7	
0-20	8 (61.5%)	5 (38.5)	13
21-40	9 (56.3)	7 (43.8)	16
41-	6 (85.7)	1 (14.3)	7
Total	23 (63.9)	13 (36.1)	36

SCC			
PCNA LI%	n 0	n 1, 2	Total
Average	24.3±12.3	37.0±16.8	
0-20	11 (91.7%)	1 (8.3)	12
21-41	10 (90.9)	1 (9.1)	11
41-	3 (50)	3 (50)	6
Total	24 (82.8)	5 (17.2)	29

3. 腫瘍径と PCNA LI% (Fig. 2)

腺癌では腫瘍径と PCNA LI%との相関は認めなかったが、扁平上皮癌では腫瘍径と PCNA LI%は正の相関を認めた ($r^2=0.278$, $P < 0.05$).

4. 腫瘍径, PCNA LI%とリンパ節転移の頻度 (Table 3).

腺癌では腫瘍径30 mm 以下で PCNA LI% 41%以上と高値を示した5例すべてに、リンパ節転移は認めなかった. 一方腺癌, 扁平上皮癌ともに腫瘍径30 mm 以下で PCNA LI%20%以下と低値を示した症例中にも、リンパ節転移陽性例を認めた. Fig. 3 は胸部X線上10年の経過を観察できた slow-growing な発育を示す腺癌で PCNA LI%も低値を示したが、pT1N1 (#11)

Table 3 Frequency of lymphnode metastasis in relation to tumor size and PCNA LI%.

Adenoca.			
Tumor size (mm)	PCNA LI (%)		
	0-20	21-40	41-
0-30	3/8 (37.5%)	3/10 (30.0)	0/5
31-50	2/5 (40.0)	2/5 (40.0)	0/1
51-	-	1/1	1/1

SCC			
Tumor size (mm)	PCNA LI (%)		
	0-20	21-40	41-
0-30	1/6 (16.7%)	0/4	-
31-50	0/5	0/5	0/2
51-	0/1	1/2 (50.0)	2/4 (50.0)

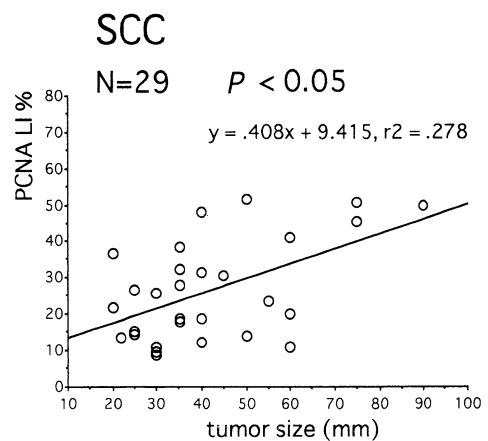
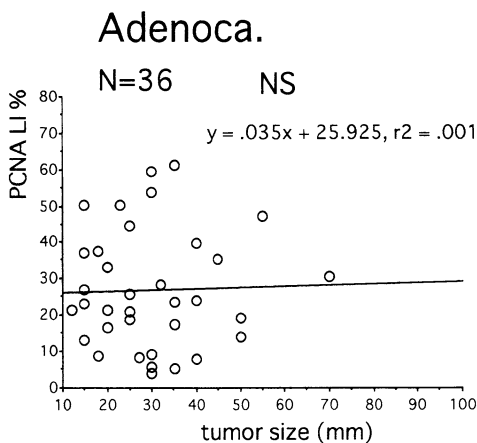


Fig. 2 Correlation between PCNA LI% and tumor size

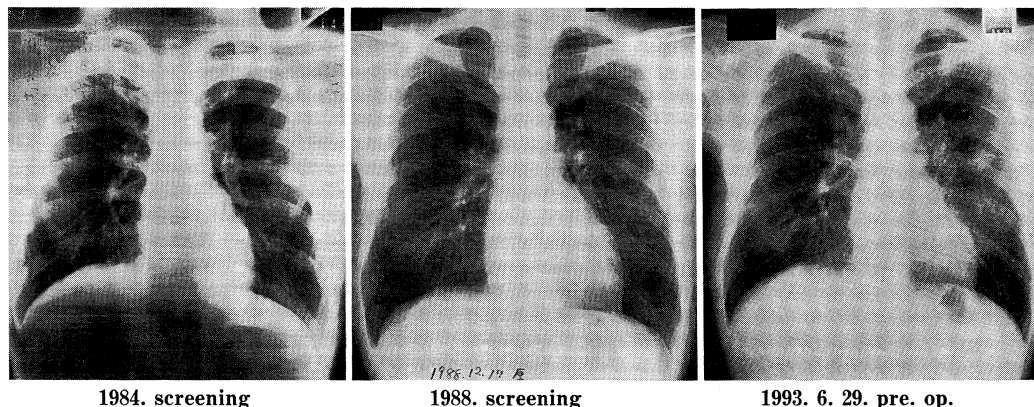


Fig. 3 This patient has been followed for ten years with no significant change in size of lesion. Pathological diagnosis was adenocarcinoma (T1 N1 M0), but the PCNA LI% was low.

Mo stage II と診断された。

考 察

肺癌は各種臓器癌の中でもっとも多様性の高い癌腫の一つと考えられ、その発生母地や組織型、分化度により様々な形態を示すことが指摘されている^{2,3)}。そのため、肺癌の進行度を一時点で断面的にみている TNM 分類のみでは十分といえず、腫瘍の動的状態を反映すると考えられる増殖能や転移能が注目されるようになってきた⁴⁾。

PCNA は G₁後期から S 期にかけて出現する増殖細胞に特異的な核蛋白で、腫瘍増殖能の一指標として注目されている。また抗 PCNA 抗体はパラフィン包埋された標本でも染色可能であるため、臨床病理学的因子や予後との相関について retrospective な研究がなされ、予後因子としての有用性が報告されている^{5,6)}。しかし、PCNA は同一組織内でも heterogeneity が存在し^{7,8)}、また染色の判定法も報告者によって一定していない。今回の研究では、flow cytometer を用いて複数部位から採取した材料の標識率を客観的に測定し、その平均値を用いることにより、個々の症例の PCNA 標識率を評価した。

非小細胞癌でも重要な予後規定因子であるリンパ節転移は、腫瘍径の増大と共にその頻度が

増大したが、PCNA 標識率とは相関を認めなかった。腫瘍径の大きいものはその時点で癌が進行しているものが多いと考えられ、リンパ節転移の頻度も多いと考えられる。しかし、PCNA 標識率は腫瘍の動的状態を示す増殖能を表しており、腫瘍径やリンパ節転移の有無など、癌のある時点の進行度とは独立した因子であることが示唆された。今回の研究でも腺癌では腫瘍径と PCNA 標識率との間に相関を認めなかった。一方扁平上皮癌では腫瘍径と PCNA 標識率とに正の相関を認めたが、これは扁平上皮癌の生物学的な特性なのか、または症例のサンプリング法（たとえば末梢型か肺門型かで癌の発癌から発見までの期間が異なると考えられる）のためなのかについては今回の検討では不明であった。

胃癌継代培養株⁹⁾や白血病細胞¹⁰⁾などを用いた研究では PCNA 標識率と、tumor doubling time とは負の相関を示すことが報告されている。このことから PCNA 標識率と腫瘍径によって、発癌から診断までの期間が逆算できると考えられる。腺癌では腫瘍径が小さくかつ PCNA 標識率が高値のもの、すなわち発癌から診断までの期間が短いと考えられるものではリンパ節転移を認めなかった。また腺癌、扁平上皮癌ともに腫瘍径が小さくても、PCNA 標識率が低値のものでリンパ節転移陽性例を認めたが、

これらは発癌から診断までの期間が長いと考えられた。以上の結果は、発癌から診断までの期間とリンパ節転移との関連を示唆するものとして興味深い。

TNM 病期が同一であっても、PCNA 標識率が高値のものは潜在的な浸潤能、転移能は高いと考えられ⁴⁾、今後再発形式や、術後健在期間さらに予後との関係について検討したい。

文 献

- 1) 渡辺洋字, 林 義信, 高島一郎, 他: リンパ節転移の拡がりからみた, 広範囲郭清の必要性. 胸部外科 **47**: 4-9, 1994.
- 2) 児玉哲郎: 病理学的にみた肺癌の多様性と予後. 癌と化学療法 **12**: 45-53, 1985.
- 3) 君塚五郎, 林 豊: 肺癌の病理組織学的検討. 肺癌 **19**: 167-176, 1985.
- 4) 井上博元, 小川純一, 正津 晃: 肺癌における p 53発現と細胞増殖能, 予後との関係. 肺癌 **34**: 153-159, 1994.
- 5) 藤井昌史, 元井 信, 佐伯英行, 他: 非小細胞肺癌切除例における proliferating cell nuclear antigen の免疫組織化学的検討. 癌の臨床 **38**: 1190-1194, 1992.
- 6) 折橋典大: 肺扁平上皮癌に対する抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色の臨床的検討—手術標本および経気管支生検標本での染色パターン. 肺癌 **33**: 897-905, 1993.
- 7) Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol **162**: 285-294, 1990.
- 8) Carey FA, Fabbroni G, Lamb D: Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy. Histopathology **20**: 499-503, 1992.
- 9) 高橋 豊, 渡辺秀人, 藤岡 央, 他: ノードマウス移植ヒト胃癌株における PCNA 染色率と発育速度との相関. 日外会誌 **93**: 1511, 1992.
- 10) Giglio A, Brien N, Ford R, et al: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in chronic lymphoid leukemia. Blood **79**: 2717-2720, 1992.

Flow cytometric quantification of PCNA content in relation to lymphnode metastasis of non-small cell lung cancer

*Katsuya Morita, Yoshinobu Hayashi, Kenichi Ietsugu, Junzo Shimizu
Shinya Murakami, Makoto Oda, Yoshihiko Arano, Masato Tokuraku
Shin Nagao, Ushio Yazaki, Yoh Watanabe*

The First Department of Surgery, Kanazawa University School of Medicine

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression was studied in relation to the frequency of lymphnode metastasis in 65 resected non-small cell lung cancers. PCNA labeling index (LI) % was assayed objectively with flow cytometry. Lymphnode metastasis was found in 13 of 36 adenocarcinomas and in 5 of 29 squamous cell carcinomas. The frequency of lymphnode metastasis correlated positively with tumor size but not with PCNA LI%. In adenocarcinomas, there was no correlation between tumor size and PCNA LI%, but there was no lymphnode metastasis when the tumor was less than 30 mm in diameter and the PCNA LI % was high. It was concluded that PCNA LI% did not correlate with other prognostic factors but showed proliferating potential.