

肝細胞癌肺転移に関する免疫組織化学的研究

— 剖検例における転移群と非転移群の比較 —

川中 美和

針生検診断時に、原発性肝細胞癌（以下、HCC）の肺転移性を予測する細胞学的諸因子について検討した。139例のHCC剖検例を対象として、肺転移を伴う群と伴わない群につき、臨床病理学的検討と、同68例を対象として、E-カドヘリン、ラミニン、CD34、P21^{/CIP1/Waf1}、P27^{/KIP1}の各マーカーの免疫染色による比較検討を行い、肺転移に関わる諸因子を検索した。

HCC剖検肝では、臨床病理的事項のうち、脈管侵襲以外に病惱期間、AFP高値、リンパ節転移、核分裂指数（MI）高値、および癌細胞の分化度の低下が、染色マーカーについては、E-カドヘリンの発現の低下が肺転移予測の指標になりうると考えられた。

（平成10年7月8日受理）

Immunohistochemical Study of Lung Metastasis of Hepatocellular Carcinoma — Comparison of Metastatic and Non-Metastatic Groups in Autopsy Cases —

Miwa KAWANAKA

This study was undertaken to detect factors for predicting lung metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) at its diagnosis by the fine-needle aspiration biopsy method. The subjects were 139 autopsy cases who were divided into two groups; with and without lung metastasis. They were clinicopathologically compared to obtain a standard for evaluating the following marker stains. Of the 139 cases, 68 were examined immunohistochemically for the expression of E-cadherin, laminin, CD34, P21^{/CIP1/Waf1} and P27^{/KIP1}.

The results indicated that, in addition to the presence of vascular invasion, the clinicopathological indices including a high AFP titer, lymph node metastasis, a high mitotic index (MI) level, and poor cellular differentiation as well as loss of the E-cadherin marker expression, respectively, could be indicative of potentiality for lung metastasis in HCC autopsy cases. (Accepted on July 8, 1998) *Kawasaki Igakkaiishi* 24(1): 35-45, 1998

Key Words ① E-cadherin ② Laminin ③ CD34
④ P21^{/CIP1/Waf1} ⑤ P27^{/KIP1}

はじめに

原発性肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma ; 以下 HCC) は他の消化器癌と比較して肝外の転移頻度が一般に低いといわれるが、剖検例でみる限り、肺、骨、リンパ節などへの転移が少なくない。しかし、私達の経験上、これらの転移は HCC 原発病巣の大きさや数に必ずしも相関しない。これら HCC の転移能を左右する因子については種々考慮されているが^{1)~5)}、腫瘍細胞自身のもつ生物学的悪性度の違いもその一つと考えられる。そこで、HCC 剖検例を対象として、肺転移を伴う群と伴わない群につき、臨床病理学的検討結果を基準として、E-カドヘリン、ラミニン、CD34、P21^{CIP1/Waf1}、P27^{KIP1}の各マーカーの免疫染色による比較検討から、肺転移に関わる諸因子を検索し、肝生検組織診断への適応の可能性を検討した。

材料および方法

I. 臨床病理学的検討の対象

1961年から1996年までに川崎医科大学附属川崎病院病理部にて剖検された HCC 139 症例を用いた。このうち、肉眼的または顕微鏡的に肺転移が明らかであった症例 (以下、肺転移群) は64例 (46%) で、それぞれの Edmondson グレード分類 (以下、Ed) 別の内訳は、Ed 1 : 0 例、Ed 2 : 38 例、Ed 3 : 20 例、Ed 4 : 6 例であった。また、肺転移を伴わない症例 (以下、非転移群) は75例 (54%) で、それらの内訳は、Ed 1 : 4 例、Ed 2 : 58 例、Ed 3 : 11 例、Ed 4 : 2 例であった。上記両群に対して、年齢、性別、組織型、Ed、核分裂指数 (MI)、最大腫瘍径、AFP 値、病悩期間、リンパ節転移の有無、骨転移の有無、脈管侵襲 (肝静脈、下大静脈、門脈)、肝硬変の有無について比較検討した。

これらの材料は10%ホルマリン固定、パラフィン包埋され、同附属病院病理部で保管されているものを使用した。2群間の比較、検定は

Student's T 検定と chi-square 検定および多変量解析で行った。Ed との比較では Kruskal-Wallis 検定を使用した。

II. 免疫組織化学的検討の対象

上記 I のうち壊死の著明なものを除外して得た68例を用い、うち肺転移群35例の Ed は、Ed 1 : 0 例、Ed 2 : 21 例、Ed 3 : 10 例、Ed 4 : 4 例。非転移群33例の Ed は、Ed 1 : 2 例、Ed 2 : 21 例、Ed 3 : 8 例、Ed 4 : 2 例であった。これらに対して、(1)E-カドヘリン、(2)ラミニン、(3)CD34、(4)P21^{CIP1/Waf1} および(5)P27^{KIP1}の免疫組織化学染色を行い、またそれら結果と Ed および MI との相関を検討した。なお、P53は予備実験において、非特異的な染色結果のみが得られたので割愛した。

III. 抗原性の賦活化および免疫染色法

使用した抗体とその希釈倍率および賦活化法については **Table 1** に示す。

(1) E-カドヘリン

免疫染色は Shi ら^{6),7)}の方法を改良した忠岡⁸⁾の方法を使用した。すなわち、キシレンにより脱パラフィンした後、0.1% Tween を含んだ0.1%クエン酸緩衝液 (pH 6.9) 中でマイクロウェーブ処理を行い、ついで3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼをブロックした (室温)。そして、30分間、0.5%正常ヤギ血清による非特異性抗原抗体反応を行い (室温)、1.0% fetal bovine albumin にて500倍希釈した抗 E-カドヘリン抗体 (HECD-1 : Takara, Kyoto,

Table 1. Antibodies and methods used for the present study

Antibody	Optimal dilution	Source	Antigen retrieval	Staining method
1) E-cadherin	1:500	Takara	microwave	ABC
2) laminin	1:50	Bio-Science	pepsin	Envision
3) CD34	1:50	Nichirei	none	Envision
4) P21 ^{CIP1/Waf1}	1:250	Santa Cruz-Biotec.	microwave	Envision
5) P27 ^{KIP1}	1:250	MBL	microwave	Envision

Japan) と 4℃, 24時間反応させた。その後、トリス緩衝液 (pH 7.6) + 0.01 M 塩化カルシウムで200倍希釈したビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Vectastain ABC Kit, Vector, Inc. Burlingame, USA) と30分反応させた。洗浄後、ABC reagent (Vectastain ABC kit, Vector, Inc. Burlingame, USA) と30分反応させた。最後に40 μ l の30%過酸化水素水と40 mg の3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) を入れたトリス緩衝液 (pH 7.6) で発色させた。核染色はCarazzi's hematoxylinにて行った。

(2) ラミニン

キシレンにより脱パラフィンした後、0.1% ペプシン (Sigma, St. Louis, MO, USA) による酵素消化法にて90分間前処置を行い (37℃), 3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼをブロックした (室温)。ついで、1.0% fetal bovine albumin にて50倍希釈した抗ラミニン抗体 (Bio-Science, Emmenbrucke, Switzerland) と室温で60分間反応させた。その後、Dako Envision 法にてポリマー試薬を30分間反応させた。発色と核染色は抗E-カドヘリン抗体と同様の方法で行った。

(3) CD34

キシレンにより脱パラフィンした後、3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼをブロックし (室温)、さらに1.0% fetal bovine albumin にて50倍希釈した抗CD34抗体 (Nichirei, Tokyo, Japan) と室温で30分間反応させた。その後、Dako Envision 法により同様に30分間反応させた。発色と核染色は抗E-カドヘリン抗体と同様の方法で行った。

(4) P21^{CIP1/Waf1} と (5) P27^{KIP1}

キシレンにより脱パラフィンした後、0.1% クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中でマイクロウェーブ処理を行い、ついで3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼをブロックした (室温)。その後、それぞれ1.0% fetal bovine albumin にて250倍希釈した抗P21抗体 (Santa Cruz Biotech. California, USA) および抗P27抗体 (MBL, Nagoya, Japan) と、それぞれ室温で60分間反応

させた。その後、Dako Envision 法で同様に30分反応させた。発色と核染色は上記同様の方法で行った。

IV. 染色の評価法

(1) E-カドヘリン (Fig. 1)

強拡大 ($\times 400$) で50視野につき、HCC 部と周囲非癌部の染色陽性細胞数をカウントし、癌部陽性細胞数/非癌部陽性細胞数比を検討した。

(2) ラミニン (Fig. 2) と (3) CD34 (Fig. 3)

ラミニンとCD34においては弱拡大 ($\times 40$) で、30~50視野につき、陽性に染色された癌部面積/癌全体面積比を検討した。

(4) P21^{CIP1/Waf1} (Fig. 4) と (5) P27^{KIP1} (Fig. 5)

強拡大 ($\times 400$), 50視野につき、癌部陽性細胞数/癌部全細胞数比が10%以上のものを陽性として検討した。

(5) MI (Fig. 6)

強拡大 ($\times 400$) で50視野あたりの核分裂細胞数で検討を行った。

結 果

I. HCC 肺転移群と非転移群における臨床病理学的比較

検討結果を Table 2 に示す。肺転移群は非転移群に比べ、病悩期間は短く、AFP は有意に高値で、Ed による腫瘍細胞の分化度は中~低分化型が多かった。MI については、肺転移群 3.5 ± 1.8 に対し、非転移群 1.3 ± 1.2 と転移群で有意の高値を示した。また、リンパ節転移の有無、肝静脈と下大静脈侵襲においても両群間に有意に差を認めた。しかし、患者の年齢と性別、最大腫瘍径、組織型、骨転移の有無、門脈侵襲および肝硬変の有無については、両群間に差を認めなかった。

II. HCC 肺転移群と非転移群におけるマーカー免疫組織化学的染色による比較

E-カドヘリン、ラミニン、CD34、P21^{CIP1/Waf1} および P27^{KIP1} の各染色結果の両群間における比較を Table 3 に示した。E-カドヘリン染色においては、肺転移群 $15.6 \pm 18.1\%$ に対し、非

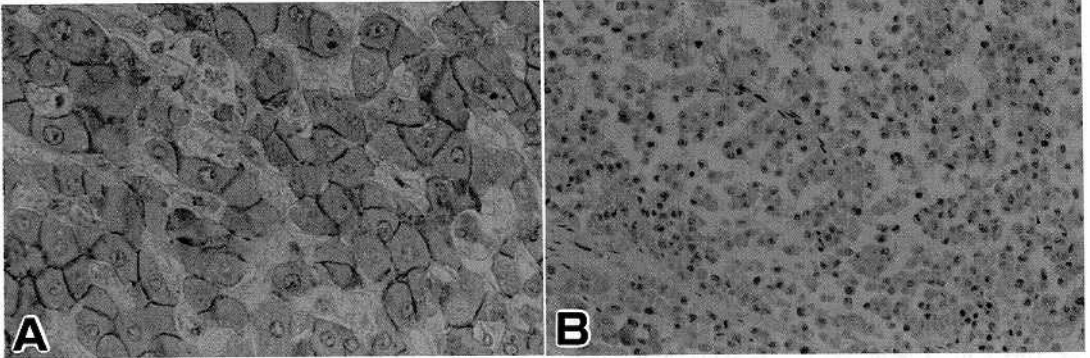


Fig. 1. E-cadherin immunostains on hepatocellular carcinoma (HCC).

- (A) A moderately differentiated HCC of Edmondson grade II showing an increase of the staining intensity along cell-membranes. (ABC, $\times 400$)
- (B) A poorly differentiated HCC of Edmondson grade IV showing absence of the staining along cell-membranes. (ABC, $\times 200$)

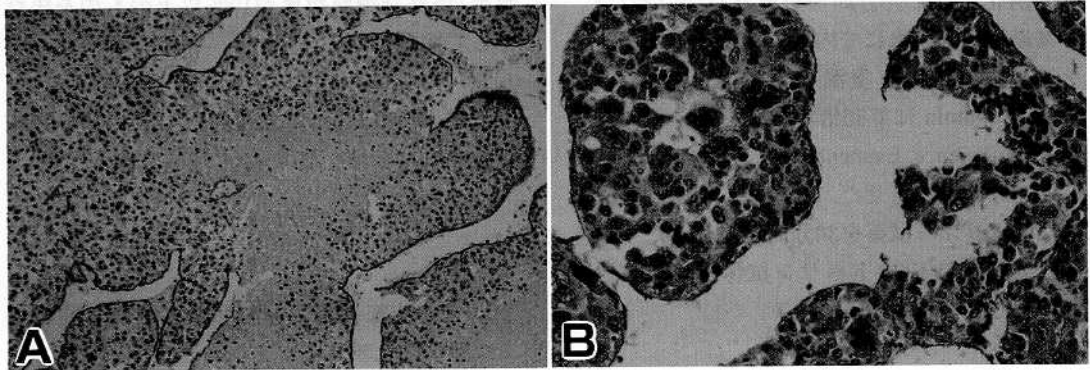


Fig. 2. Laminin immunostains on HCC.

- A moderately differentiated HCC of Edmondson grade II (A) and of Edmondson grade III (B), showing distinct linear stains around the nests. (Envision, A $\times 100$, B $\times 200$)

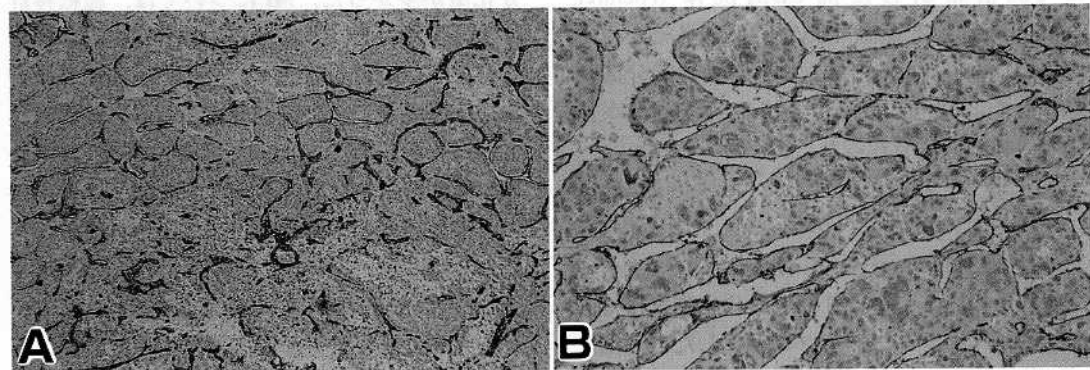


Fig. 3. CD34 immunostains on HCC.

- A moderately differentiated HCC of Edmondson grade II (A) and of Edmondson grade III (B), showing strong staining along the luminal surface of sinusoid-like vessels surrounding the nests. (Envision, A $\times 40$, B $\times 100$)

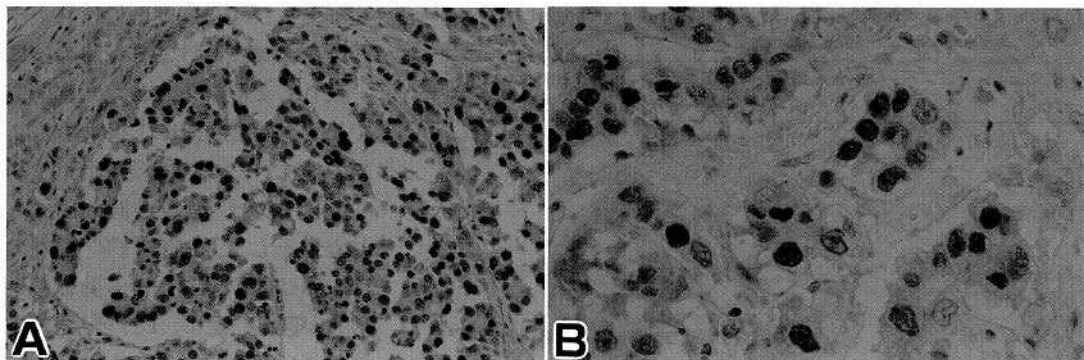


Fig. 4. P21^{CIP1/Waf1} immunostains on HCC.

A moderately differentiated HCC of Edmondson grade II (A) and of Edmondson grade III (B), showing positive nuclear staining as revealed dark brown. (Envision, A $\times 200$, Envision, B $\times 400$)

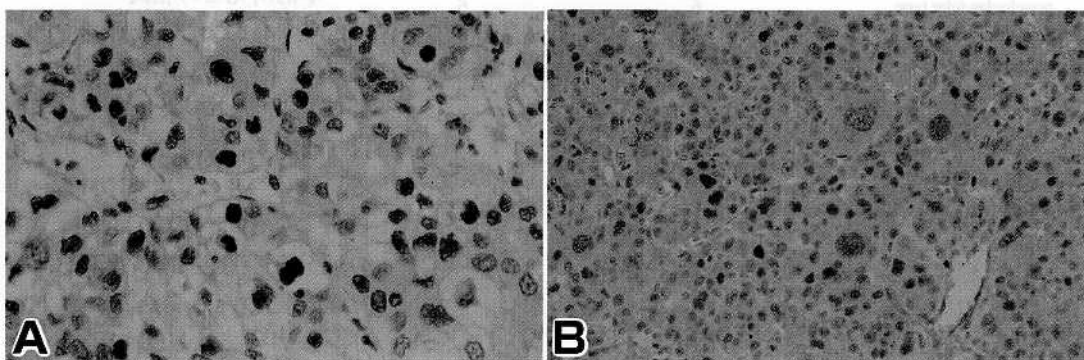


Fig. 5. P27^{KIP1} immunostains on HCC of Edmondson grade II (A) and of Edmondson grade III (B), showing positive nuclear staining as revealed dark brown. (Envision, A $\times 400$, B $\times 200$)

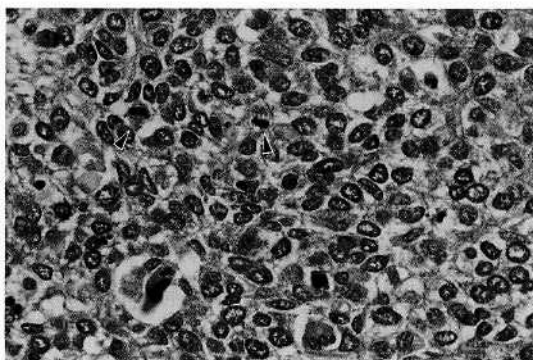


Fig. 6. HCC of Edmondson grade III showing some mitotic figures (arrow heads). (H.E., $\times 400$)

転移群 $35.5 \pm 35.1\%$ と有意に肺転移群で E-カドヘリン発現の低下を認めた。しかし、ラミニン、CD34、P21^{CIP1/Waf1} および P27^{KIP1} 染色にお

いては、両群間で有意差を認めなかった。

E-カドヘリンは、HCC 病巣周囲の慢性肝炎や肝硬変の肝細胞には細胞同士が接する細胞膜に均一に連続性に認められ、HCC においては一部に凝集したかのように強く発現したものや、減弱、消失したものも見られた。本症例のなかには、同一症例の HCC 原発巣と肺転移巣において、E-カドヘリンの発現が一致しない症例がみられた。今回染色を行った HCC 35 例中 28 症例 (80%) で肝原発巣と肺転移巣のカドヘリン発現が一致したが、肝原発巣のみ発現し、肺転移巣では発現が低下しているものが 3 症例、逆に肝原発巣でカドヘリンが発現が低下しているにもかかわらず、肺転移巣ではその発現が維持されていた症例が 4 症例あった。

ラミニン発現においては HCC 病巣周囲の肝

Table 2. Clinicopathological findings between two groups of HCC patients with and without lung metastasis

	metastatic group (n = 64) 46%	non-metastatic group (n = 75) 54%
Age (year)	61.5 ± 10.8	64.6 ± 9.2
Sex M/F	44(46.8%)/20(44.4%)	50(53.2%)/25(55.6%)
Liver cirrosis (+)	58	71
(-)	6	4
Duration from dis. onset (mo.) ^a	12.5 ± 15.2*	16.5 ± 14.3*
AFP (ng/ml) ^b	62300 ± 19159**	11375 ± 5344**
Max. dia. of tumor (cm)	8.7 ± 4.6	7.0 ± 6.5
Histological pattern		
trabecular type	45	61
compact type	12	8
pseudoglandular type	6	6
sarcomatoid type	1	0
Edmondson grading		
1	0	4
2	38	58
3	20	11
4	6	2
Mitotic Index	3.5 ± 1.8	1.3 ± 1.2**
Lymph node meta.		
(+)	27	9
(-)	37	66
Bone meta.		
(+)	9	3
(-)	55	72
Hepatic V, IVC-invasion		
(+)	34	8
(-)	30	67
Portal V-invasion		
(+)	29	52
(-)	35	23

a 1984~1996 metastatic group; n = 25, non-metastatic group; n = 47

b 1984~1996 metastatic group; n = 24, non-metastatic group; n = 40

**P < 0.01 *P < 0.05

小葉内には染色されず、門脈域の血管および胆管、細胆管の基底膜のみが染色された。これに対して、HCC 病巣においては、ラミニンは胞巣周囲をとり囲む類洞様血管壁に沿って稀ならず陽性を示した。また、CD34はHCC 病巣周囲では血管壁に、HCC 病巣内においては、類洞様血管内皮細胞に染色された。ラミニンとCD34はともに、HCC 原発巣と肺転移巣におけるの発現に大きな差は見られなかった。

また P21^{CIPI/Waf1} と P27^{KIP1} においては、HCC

病巣および病巣周囲の慢性肝炎や肝硬変病巣における肝細胞の核に一致してよく染色された。本研究では、検索したHCC 病巣の約7割でP21^{CIPI/Waf1} の発現の低下、約5割でP27^{KIP1} 発現の低下が見られた。そして、P21^{CIPI/Waf1} 発現の消失率は肝原発巣よりも肺転移巣の方が低く、逆に、P27^{KIP1} 発現の消失率は肺転移巣の方が肝原発巣よりも低かった。

III. Ed と MI および免疫組織化学的所見との相関

Ed と MI および E-カドヘリン、ラミニン、CD34、P21^{CIPI/Waf1} および P27^{KIP1} の各染色結果の相関は Table 4 に示したとおりである。Ed と MI はよく相関した。ラミニンおよび CD34 では、Ed の低分化型な症例で低下し、有意差を認めた。また、E-カドヘリンにおいては、Ed の低分化型な症例で染色性の低下を認めたが、有意差は認めなかった。Ed と P21^{CIPI/Waf1} および P27^{KIP1} との相関は有意でなかった。

考 察

癌の発生と進展過程には癌遺伝子、癌抑制遺伝子、細胞周期調節因子を含むさまざまな遺伝子異常の蓄積が必要と云われている^{9)~11)}。また、癌の転移が成立するためには、一般に以下のステップが必要とされている。すなわち、①原発巣からの遊離(癌細胞胞巣の基底膜破壊、癌細胞間接着能の低下による)、②血管、リンパ管内侵入、③血管、リンパ管内移動、④血管、リンパ管内皮細胞への生着および血管外脱出、⑤標的臓器内へ浸潤、増殖である¹²⁾。

今日、HCC 診断の確定のためには fine-

Table 3. Comparison between two groups of HCC with and without lung metastasis by means of the expression of E-cadherin, laminin CD34, P21^{ClP1/Waf1} and P27^{KIP1}

Marker detected	metastatic group (n = 35) (%)	non-metastatic group (n = 33) (%)	total (n = 68) (%)
E-cadherin	15.6 ± 18.1**	35.5 ± 35.1**	
laminin	65.9 ± 26.4	65.0 ± 29.2	
CD34	73.9 ± 28.9	72.9 ± 28.7	
Primary (liver)			
P21 ^{ClP1/Waf1}			
+	12 (34.3%)	8 (24.4%)	20 (29.4%)
-	23 (65.7%)	25 (75.8%)	48 (70.6%)
Metastatic (lung)			
P21 ^{ClP1/Waf1}			
+	15 (42.8%)		
-	20 (57.2%)		
Primary (liver)			
P27 ^{KIP1}			
+	20 (57.1%)	13 (39.4%)	33 (48.5%)
-	15 (42.9%)	20 (60.6%)	35 (51.5%)
Metastatic (lung)			
P27 ^{KIP1}			
+	12 (34.3%)		
-	23 (63.7%)		

**P<0.01

Table 4. Correlation between expression of mitotic index, E-cadherin, laminin, CD34, P21^{ClP1/Waf1}, P27^{KIP1} and Edmondson grading (Ed) in HCC

	Ed1 (n = 2)	Ed2 (n = 42)	Ed3 (n = 18)	Ed4 (n = 6)	total
MI	0**	1.9 ± 1.4**	3.0 ± 1.7**	4.9 ± 2.7**	
E-cadherin (%)	15.0 ± 7.1	28.5 ± 32.7	22.1 ± 24.4	7.2 ± 12.8	
laminin (%)	37.5 ± 17.7**	68.8 ± 23.9**	68.0 ± 30.7**	33.3 ± 20.4**	
CD34 (%)	50.0 ± 35.4**	78.8 ± 25.7**	66.7 ± 26.1**	41.7 ± 29.2**	
Primary (liver)					
P21 ^{ClP1/Waf1}					
+	0 (0%)	8 (19%)	10 (55.6%)	2 (33.3%)	20 (29.4%)
-	2 (100%)	34 (81%)	8 (44.4%)	4 (66.7%)	48 (70.6%)
Primary (liver)					
P27 ^{KIP1}					
+	1 (50%)	17 (40.5%)	13 (72.2%)	2 (33.3%)	33 (48.5%)
-	1 (50%)	25 (59.5%)	5 (27.8%)	4 (66.7%)	35 (51.5%)

**P<0.01

needle biopsy による組織学的検査が用いられる。したがって、日常的な肝生検組織検査に、これら上記の転移過程のいずれかを評価できるような染色マーカー検索を併用することにより、HCC の転移性を予測できれば HCC 診療上貢献するところが大きいと考え、本研究を行なった。

I. HCC 肺転移群と非転移群における臨床病理学的比較

これらは本研究では、HCC 肺転移性予測のためのマーカー染色を評価する基準を得る目的で行われたが、両群間において病恟期間、AFP 値、Ed による腫瘍細胞の分化度、MI、リンパ節転移、肝静脈と下大静脈侵襲について、それぞれ有意差を認めた。Sawabe ら¹³⁾は HCC 剖検98症例において、62%で肺転移を認め、肺転移に関連する因子として、Ed 分類、肝静脈、門脈侵襲、最大腫瘍径を挙げ、肝硬変の有無は関連しないと報告している。これらのうち、Ed 分類、肝静脈侵襲、肝硬変に関しては本研究と一致したが、腫瘍最大径に関しては一致しなかった。以上から、HCC 肺転移の予測のために肝生検時に利用可能な臨床病理学的項目としては、AFP 値、Ed による腫瘍細胞の分化度、肝静脈と下大静脈侵襲および MI がその候補として挙げられ、このうち Ed と MI は肝生検診断時に肺転移予測の指標として適用可能と考えた。

II. HCC 肺転移群と非転移群におけるマーカー免疫組織化学的染色による比較

1. E-カドヘリン

細胞間接着分子カドヘリンはカルシウム依存性の膜貫通性糖タンパク(分子量約 120 KD)で、E 型(上皮由来)、P 型(胎盤由来)、N 型(神経由来)などのサブタイプが存在し、そのうち正常上皮における細胞間接着には、E-カドヘリンが強く関与している^{10)~12),14)}。つまり、E-カドヘリンの発現の低下により細胞相互の接着性が喪失し、癌細胞が離脱しやすくなり、癌の転移、

浸潤を促す。さらに、E-カドヘリン機能を消失するような遺伝子変化、染色体16q21.1の異常も見いだされている^{15), 16)}。

本研究において、周囲非癌部とHCC部の陽性細胞比で比べると、肺転移群において有意にE-カドヘリン発現が低下しており、E-カドヘリンは肝生検組織診断時に肺転移の可能性を予測する上で、利用できるマーカーの一つと考えられた。しかし、十分なE-カドヘリンの発現が保持されている症例でも遠隔転移を起したという報告がある^{11), 17)}。これは、E-カドヘリンはその制御タンパクであるカテニン α 、 β 、 γ とcomplexを形成してはじめて接着性を有するためと云われる^{4), 10), 11), 14)}。今回検討したHCC症例では従来の報告どおり^{4), 18)}、Edの低分化型の症例で、E-カドヘリンが消失する傾向があったが、Ed全体としてはE-カドヘリンとの明らかな相関はなかった。今後カテニンの検討も併せて行う必要があると考える。

また、同一症例のHCC原発巣と肺転移巣において、E-カドヘリンの発現が一致しない症例の理由として、肝内に多中心性に発生したHCCの場合、各腫瘍のクローンが必ずしも同一でないことが知られており¹⁹⁾、同一症例でも原発巣内のHCC細胞のE-カドヘリン発現が単一でないことが考えられ、したがって、原発巣と転移巣でそれが一致しない場合もあり得ると推定した。

2. ラミニン

基底膜を中心とする細胞外基質も癌化細胞の拡大、遊離を抑制する上で重要な役割を果たす。基底膜の主要構成成分の一つであるラミニンは分子量約900KDの糖タンパクからなり¹⁴⁾、その機能は多彩で細胞接着以外に細胞の形態形成、運動、分化、増殖、生体防御に関与すると云われる¹⁴⁾。従来より、癌の進展は基底膜の破壊から始まるとされ、癌細胞が産生する基底膜成分の分解酵素も発見されている²⁰⁾。しかし、近年、免疫組織化学的研究により、特に大腸癌でラミニンを発現する癌が肝転移を起しやすという報告があり²¹⁾、一方でそれを否定する報告²²⁾

もあるまた、HCCにおいてもラミニン結合性インテグリンの表出を介して、転移、増殖に関与することが示唆されている⁵⁾。

HCC肺転移との相関を検討すると、癌巣周囲のラミニン染色性は癌巣全体に占める面積比で比較した場合、肺転移性と有意の相関が認められなかった。しかし、Edによる細胞分化度との関係については、低分化型のHCCでラミニン染色が低下しており、これは従来の報告と一致していた^{23), 24)}。

3. CD34

血液中に侵入した癌細胞が転移臓器の血管壁に捕捉されるためには、癌細胞と同部血管内皮細胞との細胞間接着が必要である¹⁰⁾。CD34は接着因子L-セレクチンのリガンドとして働き、ヒト造血幹細胞や血管内皮細胞に存在する。このL-セレクチンはローリング作用によって、血管内皮細胞に対する癌細胞の接着能を亢進させるといわれている¹⁴⁾。CD34はHCCにおいては、類洞様血管内皮細胞に比較的よく染色されることが知られ²⁴⁾、本研究でもそれが確認された。しかし、HCCの肺転移性との関係は明らかでなかった。EdによるHCCの細胞分化度との関係においては、ラミニンと同様に低分化型でその染色率が低下しており、これも従来の報告と一致していた²⁴⁾。

4. P21^{CIP1/Waf1} と P27^{KIP1}

発癌に関連する遺伝子異常は癌遺伝子と癌抑制遺伝子に大別されるが、本研究で検討したP21^{CIP1/Waf1} と P27^{KIP1} は共に癌抑制遺伝子で、細胞周期G1サイクリン/Cdkの他に、サイクリンA/Cdk2の活性を阻害し、発生、分化に伴う細胞増殖の抑制にかかわるといわれる^{10), 11), 25)}。種々の原因でDNAが損傷を受けると、癌抑制遺伝子P53を通してP21^{CIP1/Waf1}が誘導され、細胞をG1期に一時的に停止してDNAを修復する。このため、P53に変異のある細胞はP21^{CIP1/Waf1}が誘導されず、DNAを修復することもない。しかし、細胞老化や細胞分化におけるP21^{CIP1/Waf1}の誘導はP53に依存していないともいわれており^{10), 11), 25)}、P53以外の因

子による誘導の重要性が示唆される。また、肝癌、乳癌、大腸癌、胃癌においては、P53とP21^{CIP1/Waf1}には相関がないという報告もある^{26)~29)}。

P27^{KIP1}の発現の減少はG1サイクリン/Cdkを早期に活性化して、細胞増殖をもたらし、発癌に関与する可能性が示唆されている^{10), 25)}。大腸癌や乳癌においては、P27^{KIP1}発現の低下が悪性度と相関するという報告^{30), 31)}もあり、発癌自体よりも進展や悪性化の亢進に関連するものとも考えられる。一般的に、P21^{CIP1/Waf1}とP27^{KIP1}の発現低下と予後および細胞分化度とは関連があるといわれるが^{10), 25), 26), 29), 30)}、転移性との関連については明らかでない。

本研究では、HCC病巣においてP21^{CIP1/Waf1}とP27^{KIP1}で発現の低下が見られたが、肺転移性との相関では、両マーカー発現の有無と転移性に有意の関連を認めなかった。しかし、興味あることはP21^{CIP1/Waf1}およびP27^{KIP1}発現の消失率が肝臓原発巣と肺転移巣で一致していないことである。これもE-カドヘリンの場合と同様に相互に異なるクローンを持つHCC病巣が肝内に多中心的な発育をきたすことに関連するかもしれない。また、従来の報告とは違い²⁶⁾、

この両マーカーの染色性と細胞分化度の相関は明らかでなかった。これはEd 1およびEd 4の症例数が少ないためとも考えられ、さらに症例数を増やして検討する必要性があると思われる。

以上、HCC剖検例における本研究では、針生検診断時に肺転移性の予測を可能にする、マーカー免疫染色を含む細胞学的な指標として利用できるものは、核分裂指数(MI)高値、癌細胞分化度の低下とE-カドヘリン発現の減少と考えられた。これら三者について、多重ロジスティック回帰でみた転移予測が50%以上可能なものを+、50%未満を-とし、2×2分割表にて正診率を求めたところ、83.8%と高値であった。今後、HCCの生検診断において、これら指標の有用性を実際に検討したい。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った伊藤慈秀教授に深甚なる謝意を表します。また、ご指導、ご助言いただいた同病理科森谷卓也先生、川崎医科大学附属病院検査診断学市原清志助教授に深謝いたします。技術的援助をいただいた高谷照行氏、上平正子氏ほか川崎病院病理部の皆様に心より感謝いたします。

なお、本論文の一部は第2回日本肝臓学会大会(平成10年10月、金沢)において発表した。

文 献

- 1) Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y: Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer* 74: 482-491, 1997
- 2) Torimura T, Ueno T, Kin M, Inuzuka S, Sugawara H, Tamaki S, Tsuji R, Sujaku K, Sata M, Tanikawa K: Coordinated expression of integrin $\alpha 6 \beta 1$ and laminin in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 28: 1131-1138, 1997
- 3) Matsumura M, Niwa Y, Kato N, Komatsu Y, Shiina S, Kawabe T, Kawase T, Toyoshima H, Ihori M, Shiratori Y, Omata M: Detection of α -fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: A possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 20: 1418-1425, 1994
- 4) 岩本信一, 石黒信吾, 佐々木洋, 今岡真義, 塩崎 均, 岩永 剛: 肝細胞癌の病理学的悪性度と cadherin. *病理と臨床* 12: 791-796, 1994
- 5) 鳥村拓司, 上野隆登, 金 基哲, 谷川久一, 矢野博久, 神代正道: 肝細胞癌のラミニンへの接着における各種インテグリンの関与. *Cyto-protection & biology* 13: 103-106, 1995
- 6) Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffinembedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748, 1991
- 7) Shi SR, Cote C, Kalra KL, Taylor CR, Tandon AK: A technique for retrieving antigens in formalin-fixed, routinely

- acid-decalcified, celloidin-embedded human temporal bone sections for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 40 : 787-792, 1992
- 8) Tadaoka Y : Antigen retrieval of E-cadherin with citrate buffer and Tween from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by microwave oven heating. *Kawasaki Med J* 22 : 197-204, 1996
 - 9) Vogelstein B, Kinzler KW : The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9 : 138-141, 1993
 - 10) 山本 雅, 土田信夫, 中村祐輔, 藤永 恵 : がんと遺伝子 42. 東京, 共立出版, 1997, pp 1562-1575, pp 1669-1673
 - 11) 横田 淳, 秋山 徹 : 癌抑制遺伝子の最前線. 東京, 羊土社, 1995, pp 26-52
 - 12) 塩崎 均, 宮田幹也, 岡 博史, 森 武貞 : 癌転移とカドヘリン. *実験医学* 10 : 1452-1456, 1992
 - 13) Sawabe M, Nakamura T, Kanno J, Kasuga T : Analysis of morphological factors of hepatocellular carcinoma in 98 autopsy cases with respect to pulmonary metastasis. *Acta Pathol Jpn* 37 : 1389-1404, 1987
 - 14) 宮坂昌之, 矢原一郎 : 細胞接着. 東京, 羊土社, 1996, pp 130-135, pp 138-139, pp 146-151, pp 178-179
 - 15) Mansouri A, Spurr N, Goodfellow PN, Kemler R : Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin. *Differentiation* 38 : 67-71, 1988
 - 16) Natt E, Magenis RE, Zimmer J, Mansouri A, Scherer G : Regional assignment of the human loci for uvomorulin and chymotrypsinogen B with the help of two overlapping deletions on the long arm of chromosome 16. *Cytogenet Cell Genet* 50 : 131-135, 1989
 - 17) Shimoyama Y, Hirohashi S : Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 51 : 2185-2192, 1991
 - 18) 忠岡好之 : 原発性肝細胞癌における E-cadherin の発現の意義. *川崎医学会誌* 22 : 279-285, 1996
 - 19) Sheu JC, Huang GT, Chou HC, Lee PH, Wang JT, Lee HS, Chen DS : Multiple hepatocellular carcinomas at the early stage have different clonality. *Gastroenterology* 105 : 1471-1476, 1993
 - 20) Liotta LA : Tumor invasion and metastasis-Role of the extracellular matrix : Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 46 : 1-7, 1986
 - 21) 久保隆一, 喜多岡雅典, 待寺則和, 大塚浩史, 進藤勝久, 安富正幸 : 肝転移における大腸癌基底膜の役割. *外科治療* 71 : 172-175, 1994
 - 22) 吉田和弘 : 大腸癌原発巣におけるラミニン発現の臨床病理学的意義. *川崎医学会誌* 22 : 129-134, 1996
 - 23) Yoshida K, Tadaoka Y, Manabe T : Expression of laminin in hepatocellular carcinoma : An adjunct for its histological diagnosis. *Jpn J Clin Oncol* 26 : 70-76, 1996
 - 24) Ciu S, Hano H, Sakata A, Harada T, Liu T, Takai S, Ushigoma S : Enhanced CD34 expression of sinusoid-like vascular endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int* 46 : 751-756, 1996
 - 25) 田也洋一 : 癌と細胞周期. *実験医学*. 東京, 羊土社, 1995, pp 1588-1593, pp 1612-1628, pp 1656-1659
 - 26) 張 宇浩, 藤元治朗, 山本秀尚, 植木孝浩, 岡本英三 : 肝細胞癌における癌抑制遺伝子 P21^{waf1} の発現, 臨床的背景に関する検討. *肝臓* 38 : 118, 156, 1997
 - 27) Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, Semba S, Kudo Y, Simamoto F, Tahara E : Expression of p21^{waf1/cip1} in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p53 protein expression. *Pathol Int* 47 : 470-477, 1997
 - 28) Giannikaki E, Kouvidou CH, Tzardi M, Koutsoubi K, Gregoriou M, Zois E, Kakolyris S, Mavroudi C, Delides G, Georgoulia V, Kanavaros P : p53 protein expression in breast carcinomas. Comparative study with the wild type p53-induced proteins mdm 2 and p21^{waf1}. *Anticancer Res* 17 : 2123-2128, 1997
 - 29) Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M, Kaibara N, Ito H : Expression of p21(waf1 / cip1 / sd11), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 79 : 2067-2072, 1997
 - 30) Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Protzner IM, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM : Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27 protein : Prognostic

implications in primary breast cancer. *Nature Med* 3 : 227 - 230, 1997

- 31) Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M : Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med* 3 : 231 - 234, 1997