香川県立保健医療大学リポジトリ

大腸癌におけるKi－67の発現と臨床病理学的因子およびPPAR－αの局在との関連についての検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森西, 起也, 徳原, 康哲, 平川, 栄一郎, Morinishi, Tatsuya, Tokuhara, Yasunori, Hirakawa, Eiichiro メールアドレス: 所属:
URL	https://kagawa-puhs.repo.nii.ac.jp/records/233

大腸癌におけるＫｉ－67の発現と臨床病理学的因子およびPPAR－αの局在との関連についての検討

森西 起也[1)*]，徳原 康哲[2)]，平川 栄一郎[1)]

[1)]香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科
[2)]愛媛県立医療技術大学保健医療学部臨床検査学科

Expression of Ki-67 and Localization of PPAR-α in Colorectal Cancer

Tatsuya Morinishi[1)*], Yasunori Tokuhara[2)], Eiichiro Hirakawa[1)]

[1)] Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural University of Health Sciences
[2)] Department of Medical Technology, Ehime Prefectural University of Health Sciences

要旨

Ki－67は，細胞周期のＧ１期からM期にある細胞中で発現される核蛋白質であり，細胞増殖マーカーとして使用されており，その発現は正常組織よりも悪性腫瘍の細胞で高くなる．また，Peroxisome proliferator-activated receptors（PPARs）は，核内ホルモン受容体として1990年にIssemannやＧreenらによって同定され，ヒトを含む様々な種においてその発現が確認された．細胞質に存在するPPARsは活性化されることで核内へと移行しターゲット遺伝子の転写を調整する．そして，血管新生の阻害，腫瘍細胞の増殖抑制等の作用が報告されている．PPARsはPPAR-α，PPAR-β/δ，PPAR-γ の３種類のサブファミリーからなり，組織における発現様式はそれぞれ異なっている．今回われわれは，大腸癌におけるKi－67の発現と臨床病理学的因子およびPPAR-αの局在との関連について検討した．大腸癌におけるKi－67のLabeling index（LI）と臨床病理学的因子との相関では，進行度において有意差を認め，LIは進行度Ⅱと比較してⅢbで有意な増加を認めた（$p<0.05$）．次に，PPAR-αの局在とKi－67のLIを比較した結果，PPAR－αが細胞質に局在している症例は，細胞質に局在していない症例と比較してLIの有意な増加を認めた（$p<0.05$）．以上の結果からＫｉ－67は，進行した悪性度が高い大腸癌の予後因子として応用できる可能性を示した．

Abstract

Ki-67 is a nuclear protein that is expressed by cells in the G 1 to M phase of the cell cycle, is used as a cell proliferation marker, and is more strongly expressed in malignant tumor cells than in normal tissues. Peroxisome proliferator-activated receptors（PPARs）were identified as nuclear hormone receptors by Issemann and Green in 1990, and their expression has been confirmed in various species including humans. PPARs in the cytoplasm function as inhibitors of angiogenesis and suppressors of tumor cell proliferation following their activation and translocation into the nucleus and regulate the transcription of target genes. PPARs are composed of three subfamilies, PPAR-α, PPAR-β/δ, and PPAR-γ, and their expression patterns in tissues differ from each other. In the present study, we examined the relationships among the expression of Ki-67 and clinicopathological factors, and localization of PPAR-α, in colorectal cancer. An examination of the relationship between the labeling index（LI）of Ki-67 in colorectal cancer and clinicopathological factors revealed that the LI of stage Ⅱ was 53.7 ± 19.8%, while that of stage Ⅲb was 84.2 ± 9.60, the difference being statistically significant（$p<0.05$）. The expression of Ki-67 and localization of PPAR-α showed no significant difference in the LI of Ki-67 expressed in the nucleus, whereas a significant difference was observed for cytoplasmic expression（$p<0.05$）. These results suggest that Ki-67 may have potential as a prognostic factor for advanced colon cancer with high malignancy.

Key Words：大腸癌（colorectal cancer），ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR-α），リンパ節転移（lymph node metastasis）

*連絡先：〒761－0123 香川県高松市牟礼町原281－1　香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科　森西 起也
*Correspondence to：Tatsuya Morinishi, Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan
E-mail：morinishi@chs.pref.kagawa.jp

はじめに

癌は，日本における全ての死因の中で最も割合が高い疾患で，癌の部位別死亡率を比較すると大腸癌は男性で第３位，女性では第１位を占めている[1)2)]．大腸癌は，経済発展と並行して，罹患者は上昇しており，世界で年間600,000人以上が死亡している[3)4)]．

Ki－67は，細胞周期のＧ１期からM期にある細胞中で発現される核蛋白質であり，細胞増殖マーカーとして使用されている．また，その発現は正常組織よりも悪性腫瘍の細胞で高くなり，乳癌や甲状腺癌におけるKi－67の高発現は，腫瘍サイズの増大，リンパ節転移の増加と関与していることが報告されている[5)6)]．

Peroxisome proliferator-activated receptors（PPARs）は，核内ホルモン受容体として1990年にIssemannやGreenらによって同定され，ヒトを含む様々な種においてその発現が確認された．また，細胞質に存在するPPARsは活性化されることで核内へと移行しターゲット遺伝子の転写を調整している．PPARsはPPAR-α，PPAR-β/δ，PPAR-γ の３種類のサブファミリーからなり，組織における発現様式はそれぞれ異なっている[7)]．PPAR-αについては，その活性化によりアテローム動脈硬化症や心筋症，虚血－再灌流障害の予防，血管新生の阻害，腫瘍細胞の増殖抑制等が報告されている[8)]．

Ki－67とPPARsとの関連については，肝細胞癌において，PPAR-γ の活性化がアポトーシス誘導および細胞周期を停止し，Ki－67の発現減少に関与していることや，PPAR-αノックアウトマウスの肝臓において，アポトーシスの抑制およびKi－67の発現増加が観察された[9)10)]．しかし，大腸癌における，PPAR-αの発現とKi－67との関連についての報告はみられなかった．そこで今回，大腸癌におけるKi－67の発現と臨床病理学的因子およびPPAR-αの局在との関連について検討した．

方　法

１）対象

平成24年４月から平成26年３月までにＡ大学医学部附属病院病理診断科病理部で大腸癌と診断され外科的に切除された症例63例を用いた．臨床病理学的因子は大腸癌取扱い規約（第８版）[11)]に従い組織学的分化度，リンパ管侵襲，静脈侵襲，リンパ節転移，深達度，遠隔転移の項目により分類した（表１－１）．組織学的分化度は乳頭腺癌，管状腺癌の高分化型と中分化型を分化型腺癌，そして低分化型腺癌と，粘液癌に分類した．リンパ管侵襲はly０を陰性(－)，ly1，ly2，ly３を陽性(＋)とし，静脈侵襲はv０を陰性(－)，v1，v2，v３を陽性(＋)とした．また，進行度（Stage)は同規約に従い，リンパ節転移，深達度，遠隔転移の３つの要素により分類した(表１－２)．

表1-1　症例の分類

組織型	リンパ節転移
1. 乳頭腺癌 2. 管状線癌 ①高分化型 ②中分化型 ③低分化型 3. 粘液癌	N0:リンパ節転移を認めない N1:腸管傍リンパ節と中間リンパ節の転移総数が３個以下 N2:腸管傍リンパ節と中間リンパ節の転移総数が４個以上 N3:主リンパ節または側方リンパ節に転移を認める
リンパ管侵襲	深達度
ly0:侵襲を認めない ly1:侵襲が軽度である ly2:侵襲が中等度である ly3:侵襲が高度である	Tis:癌が粘膜内にとどまり、粘膜下層に及んでいない T１:癌が粘膜下層までにとどまり、固有筋層に及んでいない T２:癌が固有筋層まで浸潤し、これを超えない T３:癌が固有筋層を超えて、漿膜下層にとどまる T4a:癌が漿膜表面に露出している T4b:癌が直接他臓器に浸潤している
静脈侵襲	遠隔転移
v0:侵襲を認めない v1:侵襲が軽度である v2:侵襲が中等度である v3:侵襲が高度である	M0:遠隔転移を認めない M1:遠隔転移を認める

表1-2　進行度分類

進行度　（Stage）

	M０			M１
	N０	N１	N２/N３	AnyN
Tis	0			
T１	Ⅰ	Ⅲa	Ⅲb	Ⅳ
T２				
T３	Ⅱ			
T４a				
T４b				

２）免疫組織化学染色

患者から採取された大腸癌組織のパラフィン包埋ブロックを４㎛の厚さに薄切し標本を作成し，脱パラフィン後，クエン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）を用いて，オートクレーブにより120℃，15分間熱処理をおこなった．その後，３％過酸化水素水を10分反応させることで内因性ペルオキシダーゼを失活させ，0.1％スキムミルクを10分反応させた．使用する１次抗体はPBSで希釈した抗Ki－67抗体（mouse monoclonal，１：200，Dako, Glostrup, Denmark），抗PPAR-α抗体（rabbit polyclonal，１：200, abcam, Cambridge, United Kingdom）を用い，抗体滴下後２時間反応させ，２次抗体としてMAX-PO（MULTI)(anti-mouse polyclonal and anti-rabbit polyclonal，ニチレイ,東京）を反応させた．発色は3.3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)（ニチレイ,東京）を用い，対比染色としてマイヤーのヘマトキシリンによる核染をおこなった．

Ki－67の評価はLabeling index（LI）により，細胞を数視野，100カウント以上計測しその陽性率を求めた．PPAR-αの評価は，核と細胞質の陽性率で判定をおこない，０％をスコア０，陽性率１～25％をスコア１＋，陽性率26～50％をスコア２＋，陽性率51～75％をスコア３

＋，陽性率76％以上をスコア４＋とし，スコア０と１＋を陰性(-)，スコア２＋，３＋，４＋を陽性(+)と判定した[12]．

３）統計学的解析

統計処理は，免疫組織化学染色による判定と病理組織学的因子との相関についてはMann-Whitney U検定およびKruskal-Wallis検定を用い，$p<0.05$を統計学的有意と判定した．

４）倫理的配慮

本研究は香川県立保健医療大学倫理審査委員会の承認（承認番号　No. 158）を得ておこなった．

結　果

１）臨床病理学的特徴

Ａ大学医学部附属病院病理診断科病理部から提供された大腸癌症例の臨床病理学的特徴は，平均年齢が68. 3歳（39歳～95歳）であり男性36名，女性27名の計63名であった．そのうち，分化型腺癌は54例，低分化型２例，粘液癌は７例であり，リンパ管侵襲陰性例は18例，陽性例は45例，静脈侵襲陰性例は17例，陽性例は46例であった．リンパ節転移に関しては，陰性例43例，陽性例は20例であり，深達度については，Tisは２例，Ｔ１は８例，Ｔ２は３例，Ｔ３は31例，Ｔ４は19例であった．進行度（Stage）分類は，Stage０は２例，StageⅠは10例，StageⅡは31例，StageⅢaは16例，StageⅢbは４例であった（表２）．

表２　臨床病理学的特徴

項目		n
年齢(歳)	平均	68. 3
	範囲	39～95
性別	男性	36
	女性	27
組織学的分化度	分化型	54
	低分化型	2
	粘液癌	7
リンパ管侵襲	－	18
	＋	45
静脈侵襲	－	17
	＋	46
リンパ節転移	－	43
	＋	20
深達度	Tis	2
	Ｔ1	8
	Ｔ2	3
	Ｔ3	31
	Ｔ4	19
進行度(Stage)	0	2
	Ⅰ	10
	Ⅱ	31
	Ⅲa	16
	Ⅲb	4
	Ⅳ	0

２）Ｋｉ－67のLIと臨床病理学的因子との相関

大腸癌症例63例に対して，免疫組織化学染色をおこない，Ｋｉ－67のLIと臨床病理学的因子との相関を検討した．結果，リンパ節転移陰性症例のLIは58. 5±20. 6％，陽性症例のLIは69. 4±24. 6％となり有意差は認められなかったが，陽性症例ではLIが高くなる傾向を認めた（$p=0.052$）．また，進行度については有意差を認め，進行度の項目ごとに検定をおこなったところ，LIは進行度Ⅱと比べⅢbで有意に増加していた（$p<0.05$）（表３）．

表３　Ｋｉ－67のLIと臨床病理学的因子との相関

項目		n	Ki-67のLI(%)	p
年齢	68歳未満	34	64. 3±21. 7	0. 41
	68歳以上	29	59. 3±23. 3	
性別	男性	36	60. 7±21. 3	0. 51
	女性	27	63. 7±23. 9	
組織型	分化型	54	62. 7±22. 8	0. 36
	低分化型	2	70. 7±13. 2	
	粘液癌	7	53. 8±20. 5	
リンパ管侵襲	陰性	18	62. 3±17. 9	0. 55
	陽性	45	61. 9±24. 2	
静脈侵襲	陰性	17	63. 7±16. 9	0. 54
	陽性	46	61. 3±24. 3	
リンパ節転移	陰性	43	58. 5±20. 6	0. 052
	陽性	20	69. 4±24. 6	
深達度	Tis	2	63. 7±29. 6	0. 40
	Ｔ1	8	75. 7±13. 5	
	Ｔ2	3	70. 3±12. 0	
	Ｔ3	31	62. 7±22. 3	
	Ｔ4	19	53. 5±22. 6	
進行度	0	2	63. 7±29. 6	0. 022
	Ⅰ	10	72. 6±12. 8	
	Ⅱ	31	53. 7±19. 8	
	Ⅲa	16	65. 7±25. 8	
	Ⅲb	4	84. 2±9. 60	

３）Ki－67のLIとPPAR-αの局在との相関

Ｋｉ－67のLIとPPAR-αの局在との相関を比較した結果，PPAR-αの核における発現の有無とＫｉ－67のLIとの間には有意差は認められなかった（図１）．しかし，PPAR-αが細胞質に発現している症例では，細胞質に発現していない症例と比較してＫｉ－67のLIの有意な増加を認めた（$p<0.05$）（図２）．

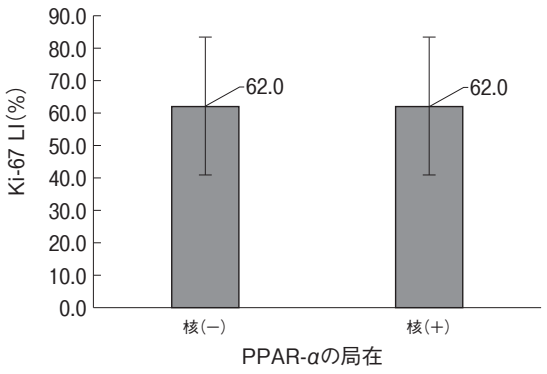

図１　核に局在するPPAR－αとＫｉ－67のLIとの相関

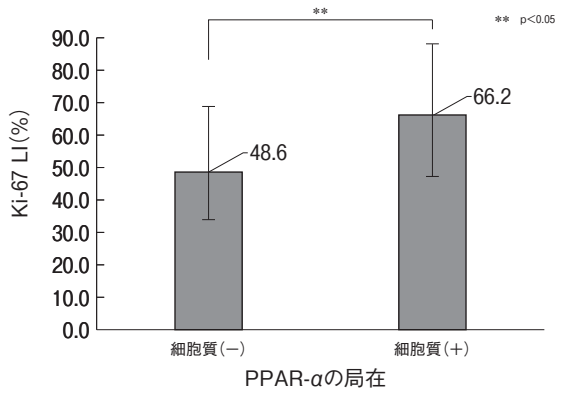

図2　細胞質に局在するPPAR−αとKi−67のLIとの相関

考　察

大腸癌におけるKi−67のLIと臨床病理学的因子との関連について検討した結果，進行度について有意差を認め，進行度の項目ごとに検定をおこなったところ，LIは進行度Ⅱと比べⅢbで有意な増加を認めた．進行度のⅡとⅢbとの違いはリンパ節転移の有無であり，そのことがLIの増加と関係していると考えられる．一方，リンパ節転移の有無とLIとの相関においては有意差を認めなかったが，リンパ節転移陽性例ではKi−67のLIが高くなる傾向を認めた(p＝0. 052)．リンパ管侵襲や静脈侵襲の有無とKi−67の発現との間には，有意差を認めなかったことから，Ki−67の発現は増殖を示す細胞周期と関連しており，脈管侵襲能力の程度とは関係なく，癌細胞の増殖能が高い為リンパ節転移陽性のLIが高くなったと考えられる．

次に，PPAR-αの局在とKi−67の発現について検討した結果，PPAR-αの核における発現の有無とKi−67のLIの間には有意差は認めなかった．しかし，PPAR-αの細胞質局在の有無とLIについて同様に比較したところ，PPAR-αが細胞質で発現している症例では，発現していない症例と比較してKi−67のLIが有意に増加していた．Yang Yらによれば，PPAR-γ の活性化がKi−67の発現を減少させたと報告がある[9]．また，Zhang Nらは，PPAR-αのノックアウトマウスではKi−67の発現が増加したと報告している[10]．PPAR-αは非活性化の状態では細胞質に局在しており，PPAR-αが活性化されると核へ移動し，アポトーシスを誘導する．従って，今回の結果はPPAR-αの非活性化がKi−67の増加に関与したと考えられる．しかし，核に発現している活性化したPPAR-αとKi−67との間に有意差は認められなかった．その理由として，1）今回の症例では，PPAR-αが核に発現している症例数が少なかったこと，2）PPAR-αが核に発現しているが細胞質にも発現している症例が多かったこと，3）PPAR-γとPPAR-αでは発現態度が異なること等の3つの可能性が考えられる．以上より，Ki−67による免疫組織化学染色は進行した大腸癌の予後を判断する上で有用である可能性があり，またPPAR-αの活性化はKi−67を指標とする細胞増殖能に関与している可能性を示すことができた．今後，培養細胞を用いた実験や細胞死とのシグナル伝達経路について更なる検討をおこなう予定である．

文　献

1）厚生労働省　平成27年（2015）人口動態統計の年間推計
2）Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, et al. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008 ：a study of 25 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan （MCIJ） project. Jpn J CLIn Oncol 44(4)：388－96, 2014.
3）Crosara Teixeira M, Braghiroli MI, Sabbaga J, Hoff PM. Primary prevention of colorectal cancer： myth or reality? World J Gastroenterol 7 ；20(41)：15060 －9, 2014.
4）Ahmad R, Alam M, Hasegawa M, Uchida Y, et al. Targeting MUC1-C inhibits the AKT-S6K1-elF4A pathway regulating TIGAR translation in colorectal cancer. Mol Cancer 2 ；16(1)：33, 2017 Feb.
5）Pan Y, Yuan Y, LIu G, Wei Y. P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. PLoS One 24；12(2)：e0172324, 2017.
6）Pan DH, Wen DY, Luo YH, Chen G, et al. The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer： a meta-analysis with 6 , 051 cases. Onco Targets Ther 3；10：3261－3276, 2017.
7）Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 18；347(6294)：645－50, 1990.
8）Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARalpha：energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. Nucl Recept Signal 16；8：e002, 2010.
9）Yang Y, Zhao LH, Huang B, Wang RY, et al. Pioglitazone, a PPARγ agonist, inhibits growth and invasion of human hepatocellular carcinoma via blockade of the rage signaling. Mol Carcinog 54(12)：1584 －95, 2015.
10）Zhang N, Chu ES, Zhang J, LI X, et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha inhibits hepatocarcinogenesis through mediating NF-κB signaling pathway. Oncotarget 30； 5 (18)：8330－40, 2014.
11）大腸癌研究会．大腸癌取り扱い規約 第8版．金原

出版，東京，2013.
12）Lin MS, Huang JX, Chen WC, Zhang BF, et al. Expression of PPARγ and PTEN in human colorectal cancer : An immunohistochemical study using tissue microarray methodology. Oncol Lett2(6) : 1219－1224, 2011.

受付日　2017年 9 月22日
受理日　2017年12月17日