

## 細胞増殖マーカーの免疫組織細胞化学

東大和病院 病理細胞診断科

木村文一，河村淳平，傳田珠美，桑尾定仁

### はじめに

細胞増殖は、細胞周期の進行とその制御によって行なわれている。細胞周期はG1期（Gap1：DNA合成準備期）→S期（Synthesis：DNA合成期）→G2期（Gap2：分裂準備期）→M期（Mitosis：分裂期）に分かれており、自動車のブレーキにたとえられるp21<sup>waf1</sup>やp27<sup>kip1</sup>、アクセルにたとえられるcyclin、またCDKsなどの調節因子によって制御されている（図1）。なかでもcyclin Dやcyclin Eなどは増殖マーカーとして、さまざまな上皮性腫瘍（癌）や非上皮性腫瘍でその発現が確認されている。細胞周期制御因子のcyclinやCDKとは別に、いわゆる細胞増殖マーカーと称される細胞増殖関連タンパクがあり、Ki-67、PCNAおよびtopoisomeraseが代表的である。これら核内タンパク質に対して免疫染色を行うことで、腫瘍の増殖程度を知ることができ、腫瘍の生物学的悪性度について予測可能となってきた。近年、種々の癌で発現が認められ、より腫瘍の増殖程度や予後判定について有用と報告されたDNA複製制御因子であるminichromosome maintenance protein（以下、MCM）が注目されてきている。

そこでMCMのisoformの一つであるMCM7、Ki-67およびtopoisomerase II $\alpha$ （以下、topo II $\alpha$ ）について、発現の違いや、その有用性について紹介していく。なお、反応の検出系（免疫染色）はヒストファイン シンプルステインMAX-PO（MULTI）（ニチレイバイオサイエンス社）を使用した。

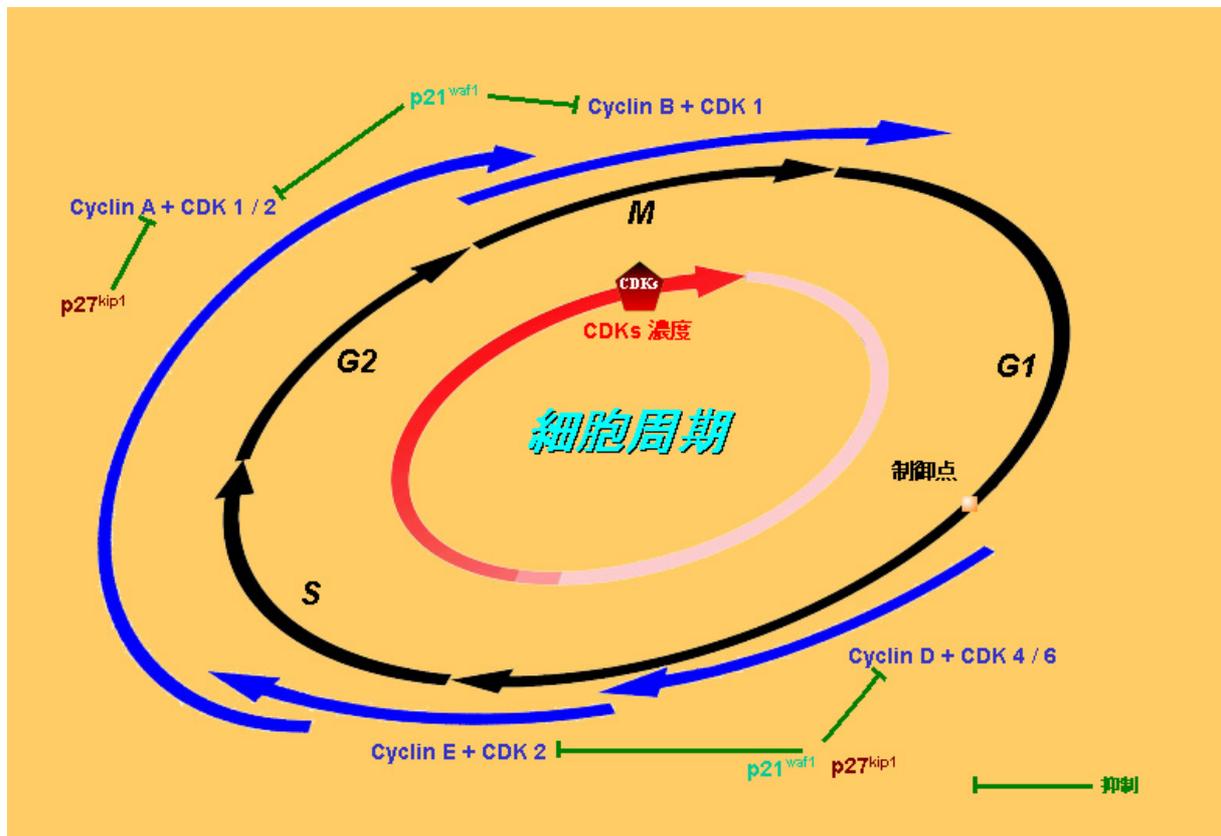


図1. 細胞周期と制御因子

- ・細胞周期（cell cycle）はG1期（Gap 1）→S期（Synthesis）→G2期（Gap2）→M期（Mitosis）へ進行する。細胞周期のアクセル役を務めるcyclinとブレーキ役を務めるp21<sup>waf1</sup>およびp27<sup>kip1</sup>を示した。
- ・細胞周期の進行と共にCDKs濃度は上昇する。

## 細胞増殖マーカー

### 1) Ki-67

Ki-67 は増殖の程度を表わす MIB-1 index (MIB-1 とは抗 Ki-67 抗体の clone の 1 つ) として良く知られ、一般的に用いられている細胞増殖マーカーである。Ki-67 は白血病患者の自己抗体として見出され、増殖性細胞の核小体および核分裂期の染色体上に発現する機能不明の分子で、リンパ腫培養株の核分画を抗原として開発された。Ki-67 は機能面で不明な点も多く細胞周期のすべての phase で発現しており、G1 期後期から発現量に変化が現れ、S 期で発現量の増加がおり、M 期で最大となるといわれている。そのため、Ki-67 の発現が見られた細胞は、細胞周期に入っていることを表わしているにすぎない。しかし、Ki-67 は乳癌、胃癌、大腸癌、子宮癌など多くの腫瘍において、分化度、血管侵襲およびリンパ節転移といった腫瘍の悪性度や予後とよく関連することが知られており、細胞増殖マーカーとして非常に有用である。

### 2) PCNA

PCNA は G1 期後期から S 期初期における細胞で同定され、分子量 3.3 万 kDa のポリペプチドよりなる等電点 4.8 の非ヒストン酸性核タンパク質で、全身性エリテマトーデス (SLE) に特異的な抗核抗体の対応抗原として報告された。後に Bravo らによって細胞周期に特異的なタンパク質として報告されたサイクリンと同一物質であることが明らかにされた。PCNA は DNA 複製の際に DNA ポリメラーゼ  $\delta$  (デルタ) がリーディング鎖を合成するのを補助する働きをもつ。PCNA は種特異性の低いタンパク質で、固定条件に大きく左右され再現性に乏しい。免疫染色の条件により、S 期のみしか染色されない場合や、S 期以外でも染色される場合もあることがわかっている。また、一部の細胞では増殖していない時期 (Go 期) でも発現している (増殖を終えて細胞内に残る PCNA 分子が同定される) ことも報告され、現在では Ki-67 や topo II  $\alpha$  ほど用いられなくなった。

### 3) Topoisomerase

Topoisomerase は DNA 複製に関与し、細胞周期の S 期後期から G2/M 期に限定して発現する核内酵素で、I、II  $\alpha$ 、II  $\beta$ 、III  $\alpha$  および III  $\beta$  の 5 種の isoform が知られている。その中でも乳癌、非小細胞性肺癌など多くの癌でその発現が確認されている topo II  $\alpha$  は、17q21-q22 の遺伝子上 (erbB2 の近傍) に位置し、DNA の複製の際に DNA 鎖の両方を切断、再結合することで DNA の形態を変化させ、DNA の複製の円滑化に貢献している。そして、複製してできた娘 DNA どうしを解離する働きをもつ。抗癌剤のアドリアマイシンやエトポシドは topoisomerase の阻害剤であり、特に乳癌では topo II  $\alpha$  が抗癌剤の効果判定のマーカーとなることが期待されている。

### 4) MCM (Minichromosome maintenance protein)

MCM は、細胞周期の G1 期初期から S 期にかけて DNA の複製に関与する分子量約 100kDa のタンパク質として知られ、子宮頸部癌や胃癌など種々の癌で MCM の過剰発現が報告されている。MCM による DNA 複製機構は以下のように進行する。まず細胞周期の M 期から G1 期にかけて、DNA 複製基点に複製開始点認識複合体 origin recognition complex (以下、ORC) が結合することから始まる。そして ORC に依存して Cdc 6 と Cdt 1 が結合し、前複製複合体 pre-replicative complex (以下、pre RC) を形成する。その後、Cdc 6 と Cdt 1 が MCM を誘導し、MCM がクロマチンにロードされ DNA の複製が開始される (図 2)。MCM は MCM 2、3、4 (= Cdc 21)、5 (= Cdc 46)、6 (= Mis 5) および 7 (= Cdc 47) の isoform がある。Ki-67 はその有用性が高い割に、作用機序が明確になっていないところも多いが、MCM は前述したように、その作用機序がかなり解明されており、MCM の発現が確認されれば DNA の複製が起こっていることが証明できる。

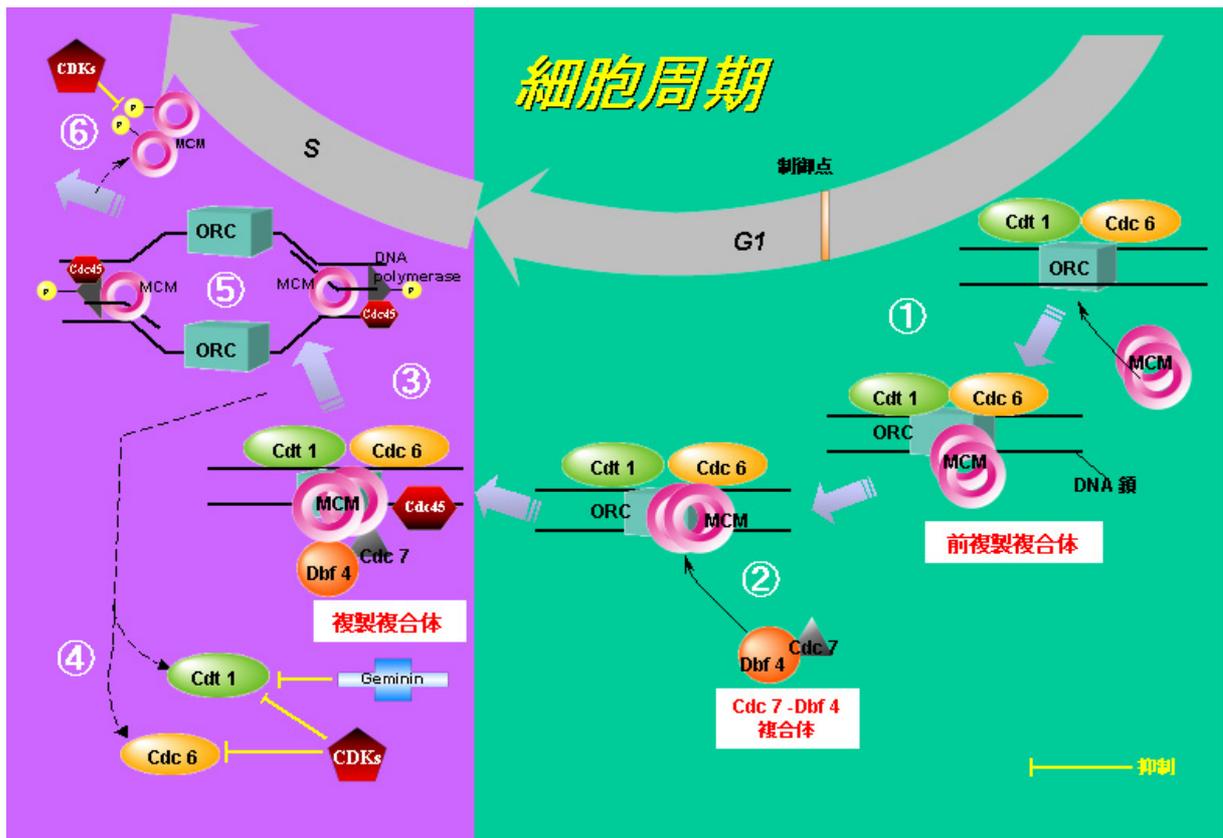


図 2. 細胞周期における MCM の発現機序

- ① ORC は DNA 鎖の複製開始点を認識して結合。ORC に依存して Cdc 6 と Cdt 1 が結合する。Cdc 6 と Cdt 1 が MCM を誘導し、複製起点に結合。Pre-RC を形成し、複製の許可 (ライセンス化) が与えられる。
- ② Cdc 7-Dbf 4 複合体が Pre-RC に結合し、RC を形成する。
- ③ Cyclin E-CDK 2 が Cdc 45 をリン酸化し、RC への結合を促進する。
- ④ 複製開始後、Cdc 6 と Cdt 1 は RC より解離し、Cdc 6 は CDK 2 によりリン酸化・分解され、また Cdt 1 は CDK および Geminin により活性阻害され、再結合・再複製が抑制される。
- ⑤ 複製開始領域へ、DNA ポリメラーゼを含む複製タンパク群が集合し、複製が開始される。複製が開始されると共に MCM は複製フォークと共に移動する。
- ⑥ その後、複製領域から MCM は遊離し、CDK 2 によりリン酸化され核外へ排除される。

**略号説明**

- ORC: Origin recognition complex、複製開始点認識複合体
- Cdc 6: Cell division cycle 6
- Cdt 1: Cdc 10 dependent transcript 1
- Pre-RC: Pre-replication complex、前複製複合体
- CDK: Cyclin dependent kinase、サイクリン依存性キナーゼ

## 正常大腸上皮および大腸癌における増殖因子の発現

### 1) 正常大腸陰窩上皮での発現

正常の陰窩上皮では、腺の下層に増殖帯が存在する。増殖帯は MCM 7、Ki-67 および topo II  $\alpha$  で陽性所見を示し、陰窩上層では発現は認められない (図 3)。増殖帯の拡大像では、MCM 7 は増殖帯のほとんどの細胞で発現が見られるが、Ki-67 では約半数の細胞で発現が見られず、topo II  $\alpha$  では 10% くらいの細胞にしか発現が認められない (図 4)。

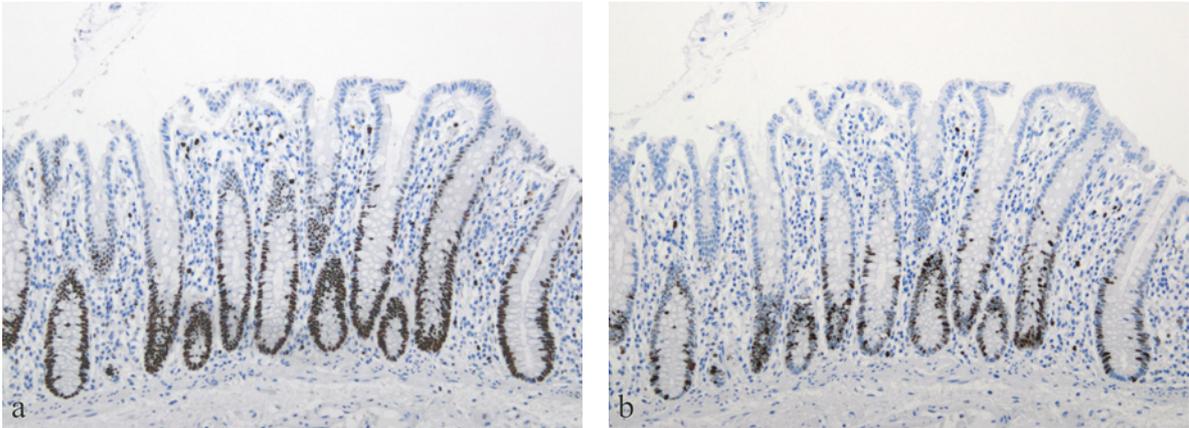
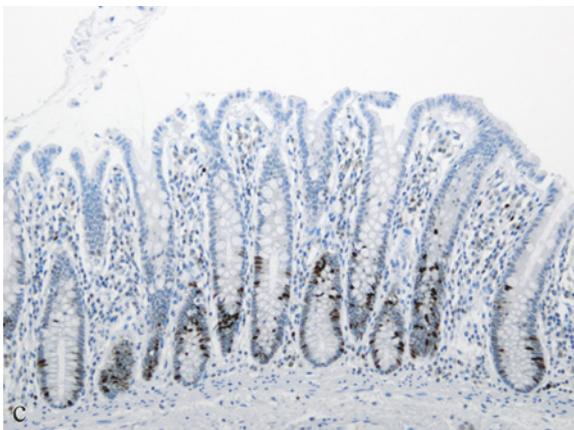


図 3. 正常大腸陰窩上皮における増殖因子の発現

(a) 抗 MCM 7 マウスモノクローナル抗体 (DCS-141) による増殖帯の発現。陰窩上皮上層部には発現が認められない。

(b) 抗 Ki-67 マウスモノクローナル抗体 (Invitrogen 社、ニチレイバイオサイエンス code No ; 08-1156) による増殖帯の発現。MCM 7 とほぼ同様に増殖帯に発現を認める。



(c) 抗 Topo II  $\alpha$  マウスモノクローナル抗体 (SWt3D1) による増殖帯の発現。陰窩上皮の下層に発現を認めるが、MCM 7 や Ki-67 と比べて発現は少ない。

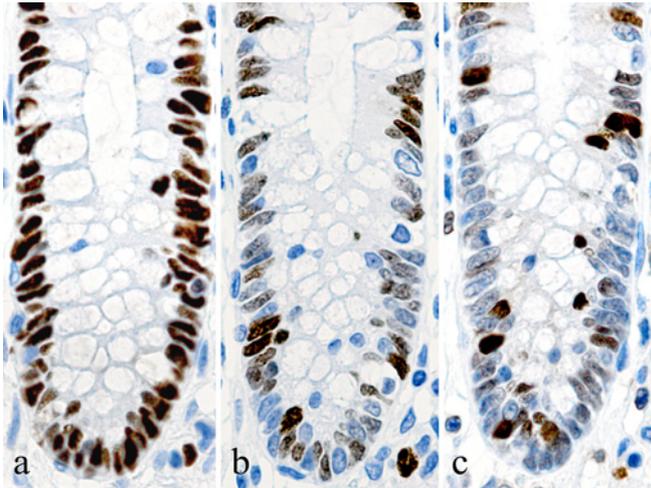


図 4. 正常大腸陰窩上皮における増殖因子の発現 (増殖帯拡大像)

- (a) MCM 7; 増殖帯の多くの細胞に MCM 7 の発現が認められる。
- (b) Ki-67; MCM 7 に比べて発現する細胞が少ない。
- (c) Topo II  $\alpha$ ; MCM 7、Ki-67 と比べて topo II  $\alpha$  の発現は少ない。

## 2) 癌症例における発現

大腸の高分化型腺癌症例である。ほぼ全層にわたって、悪性細胞に増殖因子の発現が認められる (図 5)。各増殖因子を比べると、MCM 7 で発現が高く、ついで Ki-67、topo II  $\alpha$  の順である。拡大像では発現の差が明瞭に見分けられる (図 6)。細胞標本では組織標本とほぼ同様の発現を示した (図 7)。一方、低分化型腺癌症例では陽性細胞は散在性に分布している (図 8)。

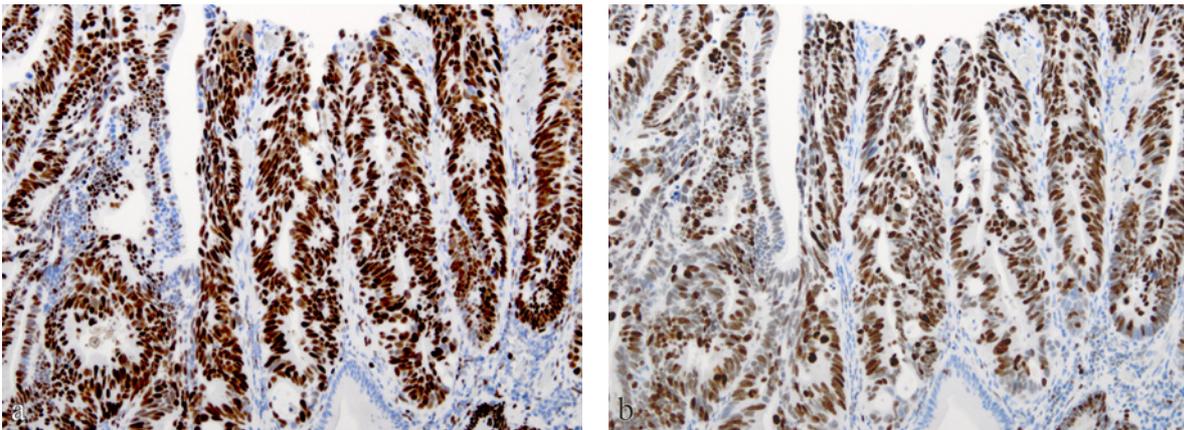
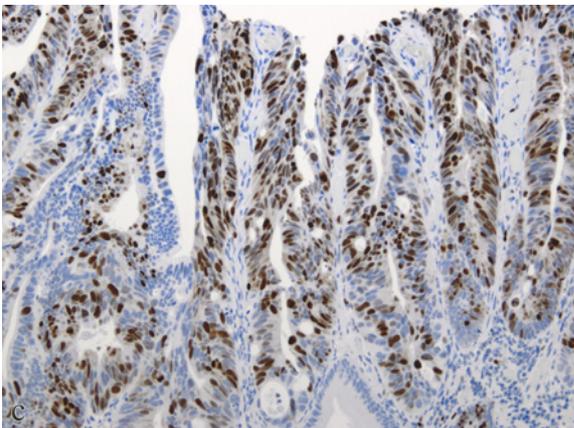


図 5. 大腸の高分化型腺癌における増殖因子の発現

- (a) MCM 7; 悪性細胞全層に MCM 7 の発現を認める。
- (b) Ki-67; 悪性細胞全層に Ki-67 の発現を認める。



- (c) Topo II  $\alpha$ ; 悪性細胞全層に発現を認めるが、発現細胞はまばらに認められる。

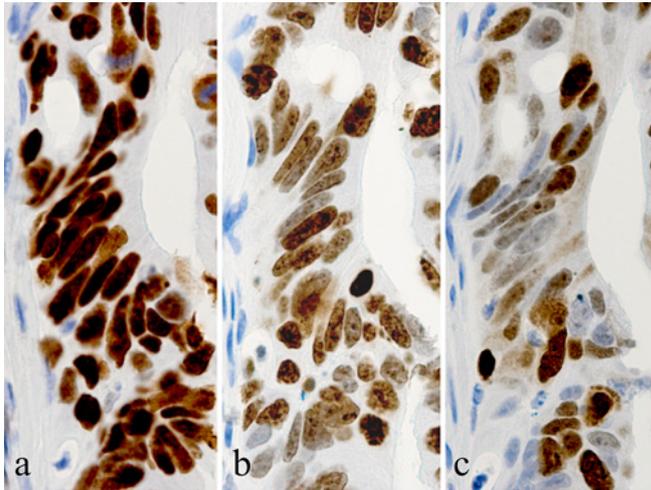


図 6. 大腸の高分化型腺癌における増殖因子の発現 (拡大像)

- (a) MCM 7 ; ほとんどの細胞に発現が見られる。
- (b) Ki-67 ; MCM 7 と比べると発現細胞がやや少ない。
- (c) Topo II  $\alpha$  ; MCM 7、Ki-67 と比べ発現細胞は減少している。

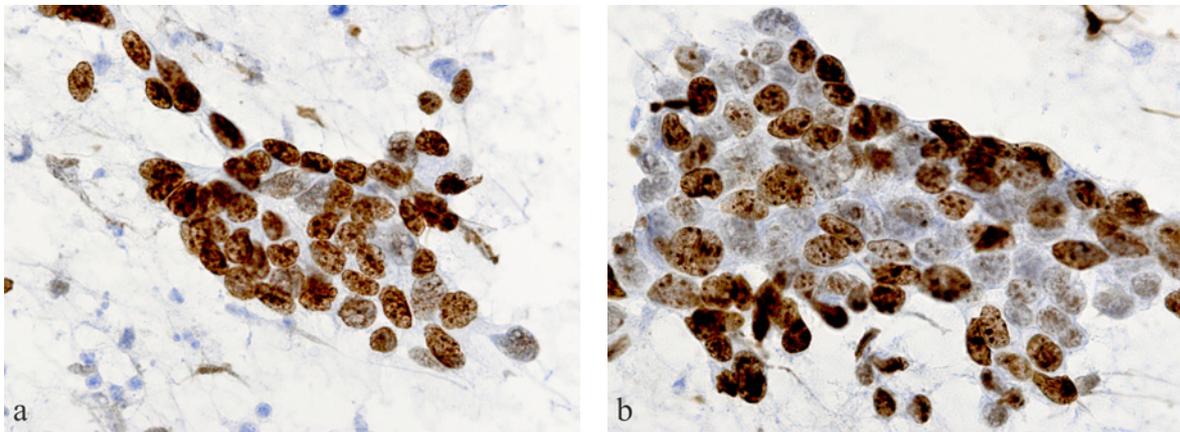
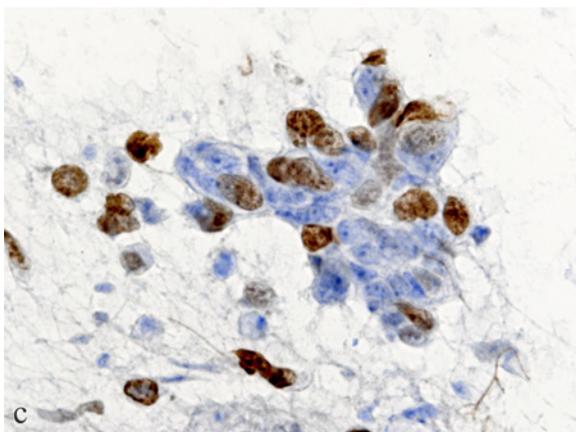


図 7. 大腸の高分化腺癌 (腫瘍捺印細胞標本) における増殖因子の発現

- (a) MCM 7 ; 腫瘍細胞集塊の多くに MCM 7 の発現を認める。
- (b) Ki-67 ; 腫瘍細胞集塊に Ki-67 が発現しているが、発現が見られない細胞も出現している。



- (c) Topo II  $\alpha$  ; MCM 7、Ki-67 と比べて topo II  $\alpha$  発現細胞は少ない。

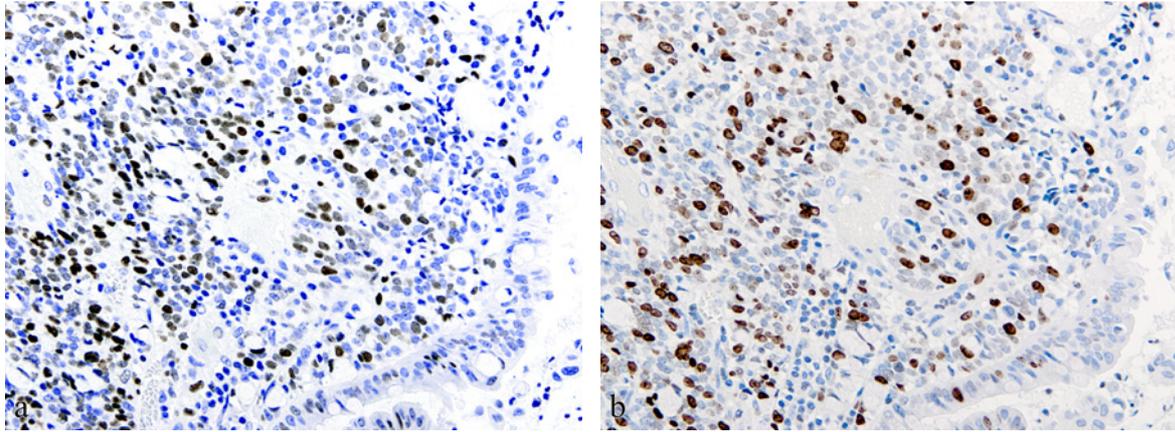
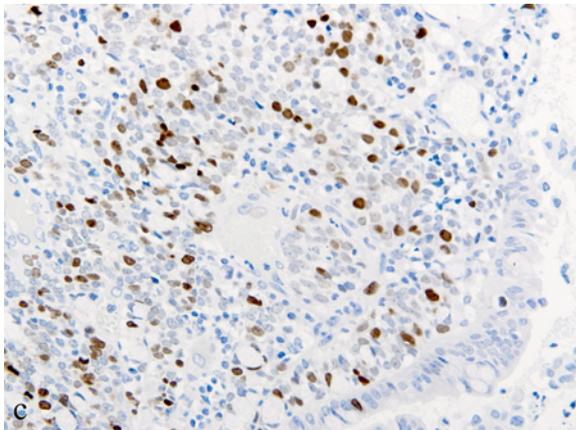


図 8. 大腸の低分化腺癌における増殖因子の発現

(a) MCM 7 ; 腫瘍細胞に MCM 7 の発現を認める。図右下の正常腺管では、MCM 7 の発現はほとんど認められない。

(b) Ki-67 ; MCM 7 と比べ発現はやや少ない。



(c) Topo II  $\alpha$  ; MCM 7 や Ki-67 と比べ、topo II  $\alpha$  の発現は少ない。

## 終わりに

癌症例では、正常上皮より増殖因子の発現が増加している。増殖因子の発現が高いほど、増殖能が盛んなことを示し、悪性度も高くなると考えられている。正常の陰窩上皮増殖帯での増殖因子の発現の状態と同様、癌症例でもその発現状態や分布が異なる。先に記載したように **Ki-67** では細胞周期のすべての **phase** で発現しているが、**G1** 期後期から発現量が増加し始め、**S** 期で発現量の増加がおり、**M** 期で最大となる。**topo II $\alpha$**  では **S** 期後期から **G2/M** 期に限定して発現し、**MCM 7** では **G1** 期初期から **S** 期にかけて発現する (図 9) ため、発現程度の違いが現れる。

腫瘍の正確な増殖程度を知るためには、**MCM 7**、**Ki-67** および **topo II $\alpha$** 、の **cell cycle** での発現時期の違いを良く理解し、それぞれ特徴を活かして使用することが肝要と思われる。

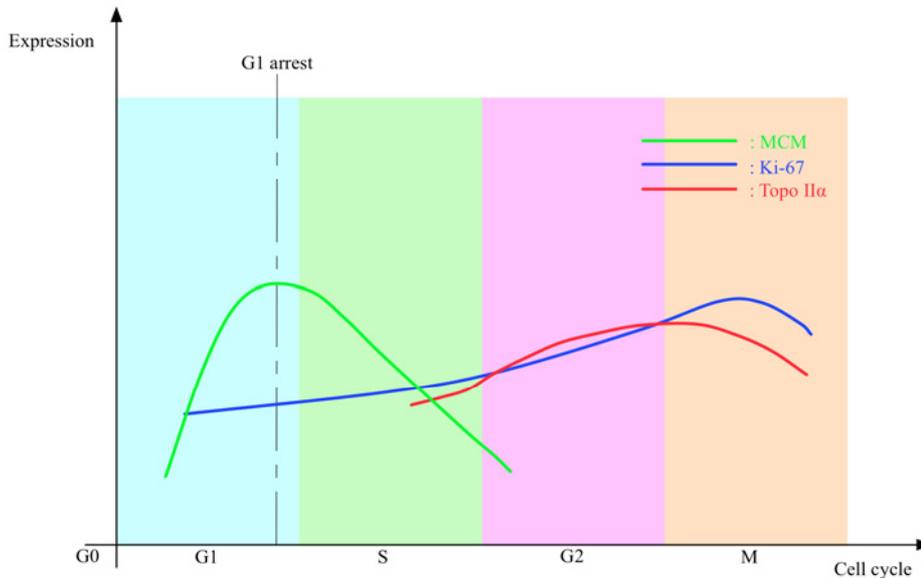


図 9. 細胞周期における細胞増殖マーカー発現時期

MCM 7、Ki-67 および topo II $\alpha$  は細胞周期でそれぞれ発現時期が異なる。

## 参考文献

- ・土橋 洋 ほか. 細胞周期とその制御 —厳密性と多様性—. 病理と臨床 1999 ; 17 ; 782-788.
- ・中山敬一 編. 細胞周期がわかる 東京:羊土社, 2001 : 12-35.
- ・Nemoto et al. Correlation of enhanced cell turnover with prognosis of gastrointestinal stromal tumors of the stomach: Relevance of cellularity and p27<sup>kip1</sup>. Pathol Int 2006;56:724-731.
- ・森井栄一. 細胞増殖・細胞死の検出. 病理と臨床 臨時増刊号 2004 ; 22 : 364-370.
- ・名倉 宏 編. 渡辺・中根 酵素抗体法 改訂 4 版. 東京 : 学際企画, 2002 ; 177-179.
- ・Brown DC et al, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology. 1990;17:489-503.
- ・Wigley DB et al. Structure and mechanism of DNA Topoisomerases. Wigley Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1995 24:185-208.
- ・Forsburg SL et al. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. Microbiol Mol Biol Rev. 2004;68:109- 131.