

腎癌の肉腫様転換における増殖能とp53遺伝子変異

小田 秀 明

①

腎癌の肉腫様転換における増殖能とp53遺伝子変異

小田 秀明

はじめに

腎癌（腎細胞癌）は腎に原発する悪性腫瘍でヒトの癌の中でも代表的腫瘍であるが、その発生、遺伝子変異、発癌に関わる環境因子など未解決の部分の多い腫瘍である。1974年から1988年の15年間の剖検報¹を集計すると総剖検数512, 619例中、腎悪性腫瘍症例は5, 512例（1.075%）で5年毎に時期を区切ってみると軽度ながら増加の傾向が認められる（表1）。組織学的には腎悪性腫瘍中91.2%が腎細胞癌で明細胞型が66.4%を占めている（表2）。腎細胞癌に限ってみると剖検時の患者年齢は64歳で男性に多く（男：女=2.84：1）、症例数は全腎悪性腫瘍と同様に僅かではあるが増加している。全剖検数に対する割合は1974年からの5年間で0.85%であったものが1984年からの5年間では1.16%になっている。腎細胞癌の症例で臓器別転移の頻度をみると肺が最も高く、38.5%の症例で肺転移が確認され、次いで、肝、骨、副腎、腎の順になっている。腎癌で骨転移のおこることはよく知られているが頻度的には第3位にあたる。また、リンパ節転移は大動脈周囲リンパ節が最も高く18.2%を占め、次いで、肺、気管周囲リンパ節の順になる（表3）。腎細胞癌剖検症例を地域別にみると図1のようになる。これは、1974年から1988年の地区別総剖検数をその地区の人口10万人当りに換算したもので、関東地区（438剖検数/人口10万）と北陸地区（359）で高い。一方、四国（183）、山陰（204）、九州（207）では低い傾向にあることが分かる。この数値は剖検数を基にしたものであり、もちろん、地区別の病院数や剖検率などのファクターを考慮しなければならないが、地区別で対人口の腎癌剖検数が異なることは興味深い。この傾向は別の疫学的検索結果²（都道府県別標準化死亡比）でもほぼ同様の結果が得られているが、その理由についてははっきりとした結論はでていない。疫学上腎癌のリスクファクターと考えられている喫煙、コーヒーや牛乳の消費量、鉄や炭化水素を扱う職業など³⁻⁵と腎癌症例の地域別差異との関連の有無は今後の疫学的課題であろう。

このような臨床病理学的背景を持つ腎癌であるが、その発癌に関わる遺伝子異常および癌化の過程における遺伝子変異は不明の点が多い。癌化の過程は *in vitro*の発癌実験や動物を用いた実験発癌の知見から大きくイニシエーション、ブ

ロモーション、コンバージョン、プログレッションの4段階に分けることができる。最近の分子生物学の進歩により、各段階に対応した遺伝子変異が次第に明らかになりつつある。ヒトにおける癌化の過程を解析する場合には各段階に対応する組織学的に差異のある腫瘍の存在が必要である。この代表的腫瘍が大腸癌であろう。大腸には正常粘膜、過形成病変、種々の異型度を示す腺腫、早期癌、進行癌が認められ、各々に対応した癌遺伝子、癌抑制遺伝子を含む複数の遺伝子変化が検出されている^{6,7}。しかし、大腸癌で見いだされるような癌化の過程に対応した遺伝子変化がヒト癌の全てに共通して認められるわけではない。発癌に関与する遺伝子は臓器毎に異なり、いわば臓器特異性を有していると考えられている。腎癌においては最近の細胞遺伝学および分子生物学的解析により染色体3p領域の欠失がその発生に重要であることが分かってきた⁸⁻¹⁰。この領域には現在少なくとも三つの腎癌に関わる遺伝子が存在すると考えられている^{11,12}。最近、この内の一つであるvon Hippel-Lindau病に関連する遺伝子が単離された¹³。腎癌のステージでみると染色体3p領域の欠失は早期のものにも、また、ステージの進んだものにも認められることから3p領域に存在する癌抑制遺伝子の不活化は腎癌のイニシエーションに関連する遺伝子変化であると考えられている⁸⁻¹²。一方、腎癌のプログレッションに関わるメカニズムについてはほとんど分かっていない。

癌におけるプログレッションには、しばしば組織学的に腫瘍細胞の脱分化を伴うことが知られている¹⁴。癌化の過程におけるプログレッションを考えると、より分化度が低く増殖能の高い腫瘍細胞集団が出現し、その腫瘍内で発育し、結果としてheterogenousな形態をとることになる¹⁵。単一腫瘍内で腫瘍細胞が異なる形態をとることをtumor heterogeneityという言葉で言い表されている^{15,16}。したがって、単一腫瘍内でheterogenousな細胞分化を示す腫瘍における遺伝子変化を検索することは腫瘍のプログレッションに関わる遺伝子変異の研究としてふさわしいものとする。

腎癌の場合も脱分化を伴いつつ癌化の過程において進展していく。興味深いことに、腎癌は希ではあるが肉腫様に変化することが知られている¹⁷⁻²⁰。腎腫瘍で通常の腎癌部分と肉腫様部分を単一腫瘍内に有する腫瘍は肉腫様腎癌と呼ばれ、腎癌の中でも極めて悪性度が高いことで注目されている^{19,20}。肉腫様腎癌は組織学的には通常の腎癌部分が明確に認められ、これと接して肉腫に類似した組織像

を呈する部分が存在し両者の間に移行像が認められる腫瘍である¹⁹⁻²⁰。肉腫様腎癌の肉腫様部分は組織学的に通常の腎癌からのトランスフォーメーションと考えられるが、このことは免疫組織学的にケラチンやepithelial membrane antigenが肉腫様部分に認められることや^{19, 22}、電子顕微鏡的に肉腫様の形態を示す細胞にも基底膜構造や細胞間接着装置²³が存在することからも裏付けられている。

本研究では肉腫様腎癌に注目し、腎癌のプログレッションについて検索した。肉腫様腎癌は上記のように腎癌のプログレッションを検索するには良いモデルとなり得る腫瘍であるが、比較的希な腫瘍であることや組織学的に十分な検索を要する腫瘍であるためパラフィンブロックを利用する必要がある。最近の組織化学や分子生物学の進歩によりパラフィン包埋材料を用いた細胞増殖能の解析に簡便な方法が考案され、さらに、パラフィンブロックから抽出したDNAをpolymerase chain reaction (PCR)で増幅させることにより遺伝子変異の解析が可能となった。本研究では増殖能の解析にパラフィン切片を用い銀染色で検出することができる核小体形成領域 (AgNOR) と抗PCNA (proliferating cell nuclear antigen)免疫組織化学を用いた。また、遺伝子変異の解析の対象としてヒト悪性腫瘍で最も高率に変異が認められ^{24, 25}大腸癌^{6, 7}や脳腫瘍²⁶などでそのプログレッションに関与していると考えられているp53遺伝子と少数ではあるがステージの進んだ腎癌において変異があったとの報告があるHara s 遺伝子^{27, 28}に注目しその変異を検索した。すなわち、肉腫様腎癌が通常の腎癌に比べきわめて悪性の生物学的態度を示すことはその増殖能の高さによるか否かをAgNOR数およびPCNA-LI (PCNA-Labeling index)を指標に調べた。次に、肉腫様腎癌において同一腫瘍内の形態的に異なる部位すなわち肉腫様部位と通常の腎癌部位において同様の指標を用いて増殖能の違いを明らかにした。これらの研究により肉腫様腎癌は単一腫瘍内で直接プログレッションを検索できる良いモデルであることを確認し、さらに、同一腫瘍内で増殖能の違いをもたらす遺伝子変異をp53遺伝子およびHara s 遺伝子について検索した。

A. 肉腫様腎癌と通常の腎癌における増殖能の比較検討

1. 対象

1970年から1989年の間に東京大学医学部附属病院にて切除された原発性腎腫瘍は計198例である。この全ての症例の全スライドを再検討し12例の肉腫様腎癌を本研究の対象とした。また増殖能の比較の上で通常の腎癌32例を抽出した。この32例は代表的な組織学的異型度を示す部分に組織学的に変性、壊死や出血が少なく増殖能の評価に耐え得るという条件を満たす症例の中から症例を選んだ。この内訳はGrade（以下Gと表す）1の腎癌12例、G2腎癌12例、G3腎癌8例である。12例の肉腫様腎癌症例の臨床病理データは表4に示す通りである。全ての患者は男性で、32才から77才、平均年齢56.3才であった。8例は右腎に発生し、4例は左腎に生じた。肉腫様腎癌の腫瘍径は5.0cmから14.0cmにわたり平均8.9cmであった。また、G1腎癌の患者は男性9、女性3で平均年齢57.2才（36才から73才）、G2腎癌患者は男性8、女性4で平均年齢55.6才（24才から70才）、G3腎癌患者は男性6、女性2で平均年齢56.4才（43才から69才）であった。腎癌は組織学的にheterogenousな腫瘍であるため、増殖能の比較を行う際には通常の腎癌ではG1からG3それぞれ代表的な部位について、また、肉腫様腎癌では肉腫様部位について増殖能を検討した。

本研究では肉腫様腎癌として単一腫瘍内に通常の腎癌成分と肉腫様成分が同時に認められ、両者が接して存在し、両者の間に移行像が認められる腫瘍に限定した（図2）。ここで用いる肉腫様腎癌はAFIP、third series²⁹で定義されているsarcomatoid renal cell carcinomaあるいは腎癌取扱い規約、第1版³⁰での肉腫型（sarcomatoid type）と同一の組織形態を示すものであり、腎癌取扱い規約、第2版³¹では充実型、多形細胞型に相当する。上皮成分のない肉腫や腎芽腫は本研究では用いていない。また、G1-G3の組織学的異型度分類は腎癌取扱い規約、第2版に依った。

2. PCNA免疫組織化学およびPCNA Labeling Index (PCNA LI)

PCNA (proliferating cell nuclear antigen)は10%ホルマリン固定、バ

ラフィン包埋ブロックを用いてavidin-biotin-peroxidase complex法³²にて免疫組織化学的に検出した。一次抗体には抗ヒトPCNAマウスモノクローナル抗体(PC10, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK)を200倍希釈で用いた。すなわち脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼのブロックを0.3%過酸化水素水で15分間行った。次に正常ヤギ血清にて20分間反応後、上記一次抗体を4℃にて一晩反応させた。続いてビオチン標識二次抗体を室温にて20分間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識アビジン溶液にて20分反応させた。発色はDAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)と過酸化水素水で行い、核染はヘマトキシリンで軽く染色した。なお、各反応間にはPBS(pH 7.4)にて十分に洗浄した。PCNA-LI(PCNA陽性細胞数の割合、%)は少なくとも300個(300個から1000個、高倍率で3から9視野)の腫瘍細胞核を数え陽性細胞数の割合を算定した。陽性コントロールとして正常組織で増殖細胞を含んでいるリンパ節および胃粘膜を用い、一次抗体の代わりとして正常ブタ血清を用いたものを陰性コントロールとした。

3. AgNOR染色と算定法

AgNORは1段階の銀染色法を用いた³³。すなわち、3ミクロン厚のパラフィン切片をキシレンにて脱パラフィンした後エタノールを通し脱イオン水に浸した。ゼラチンを1%蟻酸に溶解し最終2%とした。この溶液を50%硝酸銀水溶液に1:2(volume ratio)の割合で混合し直ちに脱イオン水に浸した切片上に注ぎ暗室、室温にて25分間反応させた。次に、切片を水洗しエタノールにて脱水した後キシレンを通してマウントした。切片は対物100倍の油浸レンズを用い顕微鏡下で観察した。AgNORは核内の暗褐色から黒色のドットとして認められ、これを200個の腫瘍細胞核について数え1核当りの平均AgNORを算定した。AgNOR数が多いことで知られている子宮頸部の扁平上皮癌および胃癌を陽性コントロールとし、また、対象切片内に認められるリンパ球、血管内皮細胞をinternalコントロールとして用いた。

4. 統計的解析

各々のグループの平均AgNOR値およびPCNA-LIの差の検定にはWilcoxon rank-sum testを用いた。また、AgNOR数とPCNA-LIとの相関はPearsonの相関係数とone-way analysis of varianceを用い解析した。

B. 肉腫様腎癌の同一腫瘍内で異なる形態部位（肉腫様部位と通常の腎癌部位）
における増殖能の比較検討

1. 対象

Aで用いた12症例の肉腫様腎癌の肉腫様部位と通常の腎癌部位各々について
検索した。

2. 方法

方法はA-2, 3, 4と同一である。

C. p53遺伝子およびH a - r a s遺伝子変異の検討

1. 対象

Aで用いた12例の肉腫様腎癌に1990年以降に経験した2例の肉腫様腎癌
症例を加えて、計14例の肉腫様腎癌を対象とした。新たに加えた症例は68才、
男性、腫瘍は右腎に存在し径9cm、pT3a（症例13）と59才、男性、右
腎に原発する15x13x15cm大の腫瘍でpT3a（症例14）の2例であ
る。肉腫様腎癌とはAで述べた診断基準を満たすものとした。また、通常の腎癌
部位については取扱い規約に準じてG1, 2, 3およびClear cell type (Cl),
Granular cell type (Gr), Mixed cell type (M)の分類を行った。

2. DNA抽出

上記症例のホルマリン固定パラフィンブロック各々数個から肉腫様部分、通
常の腎細胞癌部分、非癌部について計42個のDNAサンプルを得た³²。すなわ
ち、パラフィンブロックから連続的に切片を切り、初めと終わりに4ミクロンの
切片を、中数枚を15ミクロンの切片を作成しスライドガラスに付け伸展した。
このうち、初めと終わりの4ミクロンの切片は組織像の確認のためヘマトキシリ
ン・エオジンにて染色し、残りの15ミクロンの切片数枚をDNA抽出に用いた。
切片各々からディスボーズブルナイフを用い顕微鏡下で肉腫様部分、腎細胞癌部
分、非癌部各々から組織を取りこれを1.5 mlのエッペンドルフチューブに入れ
1 mlのキシレンを加えた。このようにして3回キシレンを換えて脱パラフィンを行
った後エタノールを3回通してペレットを乾燥させた。これにリシスバッファ
(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, proteinase K 最終 0.5 mg/ml)を加え55℃にて

6時間反応させた。フェノール・クロロホルム抽出後エタノールにてgenomic DNAを沈澱させた。上記の過程ではcontaminationが生じぬように注意して行った。

3. PCRによる増幅

0.5 ugのgenomic DNAを計50 ulの1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin (w/v)), 0.2 mM each dNTP, 1 uM each primerおよび 2.5 units Taq polymeraseを含む溶液に溶解した。この溶液を5分間92℃でdenatureした後55℃1分、72℃2分、92℃1分のcycleを40回行った。PCR primerはp53遺伝子の場合エクソン5から8を含むように以下のごとくイントロン内に設定し、H a - r a s 遺伝子の場合エクソン1のコードン12, 13およびエクソン2コードン61が含まれるようにイントロンおよびエクソン内に設定した。

< p 5 3 遺伝子の primer >

exon 5 5'TGTTCACTTGTGCCCTGACT3', 5'CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG3'

exon 6 5'TGGTTGCCAGGGTCCCCAG3', 5'TTAACCCCTCCTCCCAGAGA3'

exon 7 5'TAGGTTGGCTCTCTGACTGT3', 5'TGCAGGGTGGCAAGTGGCTC3'

exon 8 5'CCTATCCTGAGTAGTGGTAA3', 5'AGGCATAACTGCACCCTTGG3'

< H a - r a s 遺伝子の primer >

exon 1 5'CAGGAGACCCTGTAGGAGGA3', 5'AGGCTCACCTCTATAGTGGG3'

exon 2 5'AGAGGCTGGCTGTGAACT3', 5'CATGTAAGTGGTCCCGCATGG3'

全ての増幅反応についてtemplate DNAに代えてdeionized waterを加えたものを陰性コントロールとして用いた。

4. クローニングとDNA塩基配列の決定

増幅したPCR産物を低融点アガロースを用い電気泳動にて精製した。次に、精製したPCR産物をpBluscript II SK(-) (Stratagene, La Jolla, CA, USA)のEcoRV siteにサブクローニングした。シークエンスは少なくとも50のrecombinant coloniesを混合培養したものから得られたDNAの両方のstrandsについて、T7 sequencing kit (Pharmacia)を用いサンガー法にて行い塩基配列を決定した。シークエンスプライマーはPCRプライマーと同一のものを用いた。塩基配列に変異のあった場合はPCRから塩基配列決定までを再度行い得られた結果の確認を行った。さらに、“結果”に述べるごとくホットスポットとして変異の認

められた p53 遺伝子コドン 278 および 244 に変異のあった症例では腫瘍の
パラフィンブロックから新たに DNA を抽出して PCR、サブクローニング、シ
ークエンスを繰り返し行い contamination による false-positive な結果を除外した。

5. 制限酵素による分析

False-positive な結果を除外しサブクローニングによるアーチファクトを否定
するために、ホットスポットとして変異の認められたエクソン 7、8 については
PCR 産物を直接制限酵素で消化した。14 例全例の肉腫様部分から得られた D
NA を上記のごとく PCR し、PCR 産物をエクソン 7 については Nsp I を用い
エクソン 8 については Eco RI 1 でそれぞれ消化し、これらを 4% NuSieve aga
rose gel (FMC Bioproducts, Rockland, Me., USA) にて電気泳動しエチジウムプロ
マイドにて染色した。Nsp I は正常のエクソン 7 の 136 base pairs (bp) の P
CR 産物を 98 bp と 38 bp に切断する。コドン 244 の GGC から TGC へ
の変異は新たな制限酵素部位を作るため変異のある PCR 産物は 80 bp, 38
bp, 18 bp のサブフラグメントに切断される。また、正常エクソン 8 には Ec
o RI 1 site が二ヶ所あり、Eco RI 1 はエクソン 8 の PCR 産物 (203 bp) を
71 bp, 69 bp, 63 bp 切断する。コドン 278 の CCT から CTT へ
の変異は二ヶ所の制限酵素部位の一方を失うため、変異 PCR 産物は Eco RI 1 によ
って 132 bp と 71 bp のサブフラグメントに切断される。

6. p53 タンパクの免疫組織化学的解析

p53 タンパクは 10% ホルマリン固定パラフィン包埋を用い avidin-biotin-
peroxidase complex 法にて検出した。各症例毎に数個のブロックを免疫染色に用
いた。一次抗体としてヒト p53 タンパクに対するマウスモノクローナル抗体
(DO-7, Novocastra Lab., Newcastle upon Tyne, UK) とウサギポリクローナル抗
体 (CM-1, Novocastra Lab.) を各々 1:50 および 1:1000 の希釈で用いた。
以下の免疫組織化学法は A-2 と同様である。陽性コントロールとして陽性が確
認されている肺癌および大腸癌を、また、陰性コントロールとして一次抗体の代
わりに正常ブタ血清を用いたものを染色毎に同様の手技で反応させた。

結 果

A. 肉腫様腎癌と通常の腎癌における増殖能の比較検討

PCNAに対する免疫組織化学では、陽性コントロールとして用いたリンパ節のgerminal centerの核および胃粘膜のfoveolar epitheliumのneck zoneの細胞核は陽性に反応した。陰性コントロールは染色されなかった。研究対象とした腎癌では腫瘍細胞核が様々な陽性率を示した(図3)。PCNA-LIは、G1腎癌では2.1から9.2(mean±standard deviation, 4.8±2.7)、G2腎癌では12.0から31.4(19.8±5.6)、G3腎癌では25.8から45.4(37.8±6.6)であり、肉腫様腎癌では27.5から64.7(45.5±13.3)であった。PCNA-LIの平均値の差はG1またはG2腎癌と肉腫様腎癌との間で統計学的に有意であった($p < 0.005$)。肉腫様腎癌のPCNA-LIはG3腎癌よりも高い傾向にあるが、その平均値の差は統計学的には有意の差はなかった(図4)。

AgNOR染色での反応産物は核内に暗褐色ないし黒色のドットまたは小球物質として認められた(図5)。腎癌におけるAgNOR値は、G1腎癌では1.20から2.10(mean±standard deviation, 1.5±0.2)、G2腎癌では2.13から3.10(2.6±0.3)、G3腎癌では3.78から6.88(5.7±1.1)であるのに対し、肉腫様腎癌では4.25から11.68(7.8±2.0)であった(図6)。AgNORの平均値は肉腫様腎癌で最も高く、G1からG3および肉腫様腎癌における平均AgNOR値の差は各グループ間で統計学的に有意であった($p < 0.01$)。

研究対象とした各症例毎にPCNA-LIと腫瘍細胞1核当りのAgNOR数を比較すると、それらは相関係数0.845を持って直線関係にあることが分かった($p < 0.01$, 図7)。

B. 肉腫様腎癌の同一腫瘍内で異なる形態部位(肉腫様部位と通常の腎癌部位)における増殖能の比較検討

対象とした肉腫様腎癌12例の通常の腎癌部位は表5で示すようにG1からG3まで各種の組織学的異型度を有する。図8に示すように通常の腎癌が肉腫様にトランスフォームすることと一致して増殖能に差がみられるかを検討した。何れの症例も、AgNOR数、PCNA-LIを指標にした増殖能は肉腫様部位の

方が高かった($p < 0.01$, 図9)。

C. p53遺伝子およびHarras遺伝子変異の検討

p53遺伝子変異: 表5に示すように肉腫様腎癌14例中11例においてp53遺伝子のエクソン5、7、8に遺伝子変異を認めた。全ての変異はアミノ酸変異を伴うミスセンスミューテーションであった。11例の変異を認めた症例の内、症例8を除く10例で単一腫瘍内でgenetic heterogeneityが認められた。肉腫様部位では、11例中6例でコドン244(エクソン7)の第一塩基がGからTへの点突然変異を示し、グリシンからシステインへのアミノ酸変異を来す(図10)。また、11例中8例にコドン278(エクソン8)の第二塩基の点突然変異が見られた。これはCからTへの塩基変化で、これによりアミノ酸はプロリンからロイシンへの変異を来していた(図11)。他の変異は、症例10でコドン157、症例14でコドン248の各々ミスセンスミューテーションであった。5症例で肉腫様部位にダブルミスセンスミューテーションが認められた。この内4例(症例2、6、11、13)ではコドン278と244に、症例14はコドン278と248の2カ所に点突然変異を生じていた。一方、通常の腎癌部位では2症例にのみ変異を認めたにすぎなかった。症例6と8の通常の腎癌部位にはコドン278と244に各々点突然変異が見られた。上記および表6に示すように10症例でp53遺伝子に関して単一腫瘍内でgenetic heterogeneityを認めた。9症例(症例1、2、3、5、7、10、11、13、14)でp53遺伝子は通常のG1からG3の腎癌部位では野生型であったのに対して肉腫様部位では単一ないし二重の点突然変異を認めた。症例8ではコドン244に通常の腎癌部位と肉腫様部位で同一の変異が生じていた。腎の非癌部から取ったサンプルにはp53遺伝子のエクソン5から8には変異は無かった。症例4、9、12には調べた範囲のp53遺伝子には変異が無かった。PCR産物を直接、制限酵素で消化した結果は表5のシーケンスの結果と同一であった。6例(症例2、3、6、8、11、13)の肉腫様部位からのPCR産物はNsp Iにより98、80、38、18bpのサブフラグメントに切断された。図12aで示すように正常の制限酵素パターンと変異型の制限酵素パターンが認められる。またEco RIで消化したエクソン8のPCR産物は8例(症例1、2、5、6、7、11、13、

14) の肉腫様部位で132bpのサブフラグメントを認めた(図12b)。

p53タンパクの過剰発現： ヒトp53タンパクに対する二種類の抗体(DO-7、CM-1)を用いて免疫組織化学的にp53タンパクの発現を調べた。二種類の抗体はCM-1がややバックグラウンドが強いもののほぼ同様な結果であった。図13および表7に示すようにp53遺伝子に変異のあった13箇所の部位(肉腫様部位11箇所、通常の腎癌部位2箇所)の内12箇所の部位で腫瘍細胞の核に陽性所見を得た。症例7の肉腫様部位ではp53遺伝子には変異が見られたものの免疫組織学化学的には陽性所見は得られなかった。陽性コントロールとして用いた肺癌および大腸癌症例では腫瘍細胞核が陽性に染色された。陰性コントロールは染色されなかった。

Ha-ras遺伝子変異： Ha-ras遺伝子には、表8に示すように、コドン12, 13, 61を含むエクソン1, 2における遺伝子変異は肉腫様部位、通常の腎癌部位、非癌部何れにも認められなかった。

考 察

肉腫様腎癌は腎癌の中でも臨床的に極めて悪性度の高い腫瘍として注目されているが^{18, 19, 21}、これまで増殖能の解析や遺伝子解析はなされていなかった。これは肉腫様腎癌の頻度が腎腫瘍中数%と比較的希なため新鮮な材料が得にくく、また、組織学的検査によって腎癌部分と肉腫様部分との移行像がはじめて明らかにされるためと考えられる¹⁸⁻²⁰。したがって、このユニークな腫瘍の解析にはホルマリン固定パラフィン包埋材料を利用した方法論に頼らざるを得なかった。最近になってホルマリン固定パラフィン包埋組織の増殖能の解析に信頼性のあるAgNOR法とPCNAに対する免疫染色という二つの方法が導入された。またパラフィンブロックからDNAを抽出しPCRにて増幅することによって遺伝子解析も可能となってきた。本研究ではこれらの方法を用いパラフィン包埋材料を対象として増殖能および遺伝子変異の解析を行った。

核小体形成領域 (nucleolar organizer region, NOR) はリボソームRNAをコードする染色体セグメントで、ループ状のDNAであることが知られている。リボソームRNAはリボソーム形成に関与し、したがって、タンパク合成能と相関しNOR数は細胞の活動性を反映すると考えられている^{33, 35}。染色体上のNORを銀染色で選択的に染める方法は1975年にHowell, Goodpastureらによって提唱され主として細胞遺伝学の領域で染色体異常の評価に用いられてきた^{36, 37}。その後、この方法がパラフィン包埋組織に応用されるようになり³¹、銀染色で検出される核内のNOR数とその組織の増殖能を反映している事を示唆するデータが多数発表された。非ホジキンリンパ腫ではDNAフローサイトメトリーで検出されたS期の細胞数とAgNOR (銀染色によるNOR) 数がよく相関することが報告された³⁸。また、他のグループは乳腺腫瘍でモノクローナル抗体であるKi-67を用いた免疫染色による腫瘍の増殖能と腫瘍細胞1核当りのAgNOR数が正の相関があることを示している。さらに、脳腫瘍や実験的に誘発されたラットの肝腫瘍でプロモデオキシウリジンの核内取り込みとAgNOR数が相関するという報告もある^{40, 41}。

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)はDNAポリメラーゼデルタの補助タンパクである⁴²。このタンパクは初めSLE (systemic lupus erythema-

tosus)患者の血清中の自己抗体と反応する核抗原として同定されたが^{43, 44}、その後増殖細胞のS期の核に強い集積性があることが判明した^{45, 46}。また、PCNAは通常ホルマリン固定パラフィン包埋組織においてもその抗原性が保たれることが明かとなり^{47, 48}、パラフィン包埋材料における増殖細胞の免疫組織学的マーカーとしての可能性が示された。実際、PCNA-LI (labeling index)はDNAフローサイトメトリーによる増殖期細胞数やKi-67陽性率とよく相関することが示されている^{47, 49}。

本研究において、一段階のAgNOR染色とPCNA免疫組織化学を用い肉腫様腎癌および通常の腎癌の増殖能を分析した結果、一核当りの平均AgNOR数は組織学的異型度が増すに従って増え肉腫様腎癌で最も高い値をとった。AgNOR数の平均値は通常の腎癌における3段階のGrade間ばかりではなく肉腫様腎癌と通常の腎癌の間でも統計学的に有意であった。PCNA免疫組織化学によって評価したPCNA-LIは組織学的異型度の順に増加し、G3腎癌と肉腫様腎癌との間で有意の差はなかったものの各Grade間では統計学的に有意であった。また、腎癌においてAgNOR数とPCNA-LI互によく相関することが分かった。以上より、AgNORとPCNA免疫染色を用いた増殖能の高さは通常の腎癌の組織学的異型度と一致し、肉腫様腎癌の増殖能は腎癌の中で最も高いことが明かとなった。

最近、DelahuntらはNOR数と腎癌の予後および病期との関連を調べNOR数は予後に関連し病期とは関連しないことを示した⁵⁰。DelahuntらはNOR数と組織学的異型度との関係については言及していないが、本研究で示された核異型度とNOR数との相関はDelahuntらの報告と矛盾しないと考える。腎癌における核異型度は悪性の指標であり患者の予後と相関することが示されているからである^{51, 52}。

これまで各種の方法を用いて腎癌の増殖能を検討した論文がみられる。二つのグループからはフローサイトメトリーによるDNA含量を調べた報告がある^{53, 54}。これによると、組織学的異型度が高い腎癌は異型度の低い腎癌に比べaneuploidyの比率が高い。S期細胞の割合で評価した腫瘍の増殖率は正常腎組織やdiploidパターンをとる腫瘍よりaneuploidパターンをとる腫瘍で高いことが知られている。また、各種核異型度の腎癌におけるKi-67とc-myc遺伝子産

物に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的解析ではこれらの発現と組織学的異型度が相関することが示されている⁵⁵。これらの報告は本研究の結果と合致するが、これまで肉腫様腎癌に焦点を当てた研究はなかった。本研究により肉腫様腎癌の悪性度の高さはその増殖能の高さによることが示唆された。すなわち、肉腫様腎癌は腎癌におけるプログレッションの一つの表現型であると考えられる。

一般的に腎癌の中で肉腫様腎癌が増殖能の点できわめて高いことを示したが、次に、単一腫瘍内では肉腫様腎癌において部位による増殖能の違いがあるのかを同様の方法で解析した。その結果、単一腫瘍内で部位により増殖能が異なり肉腫様部位の方が通常の腎癌部位に比べて統計学的に有意の差を持って増殖能が高い事が判明した。このことは、組織学的にheterogenousな肉腫様腎癌において増殖能の点からもheterogeneityを明らかにした事であると考ええる。これまで、腎癌では単一腫瘍内での増殖能の違いを調べた報告は少ない。Ljungbergらは腎癌におけるheterogeneityを単一腫瘍の数カ所のDNA含量を調べ報告しているが⁵³、組織学像とDNA含量との対比は明確ではなく、また、肉腫様腎癌については言及していない。本研究で肉腫様腎癌に注目しその増殖能を解析したことにより、肉腫様腎癌が単一腫瘍内でのプログレッションを直接見ることのできる良いモデルであることが明かとなった。

次に、肉腫様腎癌では単一腫瘍内でプログレッションを見ることができれば通常の腎癌の表現型から肉腫様にトランスフォームすることに関わる遺伝子変異は腎癌におけるプログレッションに深く関与している遺伝子変異であると考え、単一腫瘍内の通常の腎癌部位および肉腫様部位からそれぞれ別個にDNAを抽出してp53遺伝子とH-ras遺伝子の変異を調べた。対象とした14症例中11例の肉腫様部位にp53遺伝子の点突然変異が見いだされた。通常の腎癌部位にはわずかに2例のみがp53遺伝子変異を示したに過ぎなかった。しかも通常の腎癌部位にp53遺伝子変異のあった症例の内1例(症例6)は通常の腎癌部位にはコドン278のみの点突然変異であったのに対し、肉腫様腎癌部位ではコドン278に加えコドン244の変異も認められた。したがって、p53遺伝子変異は通常の腎癌部位と肉腫様腎癌部位で14症例中10例にheterogeneityがあることが明かとなった。このことは、p53遺伝子変異が通常の腎癌から肉腫

様にトランスフォームする際に重要な働きをしていることを示唆している。

さらに肉腫様部位ではコドン278の第二塩基の変異(CCTからCTTへの変異)が8例に、また、コドン244の第一塩基の変異(GGCからTGCへの変異)が6例に認められ二つのコドンの特定の塩基に限局した変異、いわゆるホットスポットが存在していた。このようにある特定のコドンの中の特定の塩基に限局して変異が見られる場合false-positiveな要素を否定しなければならない。確かにPCRを用いて増幅した産物をプラスミドにサブクローニングして塩基配列を決定する方法には、抽出したDNAおよびPCRの際のcontamination、PCRにおけるTaq polymeraseのmisincorporation、PCR産物をサブクローニングする際に生ずるアーチファクト等が生ずる可能性がある。本研究ではこれらのfalse positiveな結果を除外し得られたデータを確認するために、PCRの際には常に陰性コントロールが陰性であることを確認して次の操作に移っており、シーケンスには少なくとも50個のrecombinant colonyをmix cultureしたもから得られたDNAを用いている。変異の見られた症例ではPCRからシーケンスまでの操作を繰り返して結果を確認し、また、ホットスポットとして変異が集中してみられたコドン278と244に変異のある症例ではDNA抽出からシーケンスまでを再度行って結果の確認をした。同時に検索した非癌部の腎組織にはp53遺伝子変異がないことも上記の結果がcontaminationやartifactでないことを示している。さらに、ホットスポットとして変異の認められた肉腫様部位のエクソン7、エクソン8についてはPCR産物を直接制限酵素で消化し制限酵素部位の変化で変異を解析し、シーケンスの結果と一致する事を確認した。

腎癌におけるp53遺伝子変異およびp53遺伝子の存在する染色体17p領域を調べた報告は少ない。腎癌では細胞遺伝学的に染色体3p領域に高頻度で欠失を初めとする異常が認められているが、17pの異常は明かではなかった。最近、遺伝子多型を利用したLOH(loss of heterozygosity)の検索で17pのLOHの頻度はMoritaら¹¹は21%(24例中5例)、Prestiraら⁵⁶は16%(31例中5例)、Anglardら⁵⁷は6%(22例中2例)であったと報告している。論文の中でPrestiraやAnglardらは、17pのLOHは他の領域である11pや13qなどのLOHと共に腎癌の高異型度やステージの進んだ症例で多い傾向にあり、これらが腎癌の悪性進展に関与しているのではないかと推論しているが

LOHの認められた症例も少なく明確な結論には達していなかった。また、p53遺伝子変異そのものを検索した論文はさらに少なく最近までSuzukiらの一遍の論文のみであった⁵⁰。彼らは23例の散発性腎癌をPCR-SSCP法およびシーケンスで調べ、stage 1、G2の腎癌1例にのみ点突然変異を認めたと報告し、p53遺伝子変異は腎癌においては重要ではないと結論している。ところが最近Reiterら⁵⁹は腎癌の細胞株を用い48% (29細胞株中14細胞株) に17pのLOHを認め、33% (33細胞株中11細胞株) にPCR-SSCP法およびシーケンスにてp53遺伝子変異があったと報告している。Reiterらは彼らが見いだした高率な17pのLOHおよびp53遺伝子変異とこれまでの低率な報告を比較し、この理由として彼らが対象としたものがステージの進んだ患者から得られた細胞株であること、細胞株であるために正常細胞の混入がほとんど無いこと、原発の腫瘍は遺伝子変異の上からみてheterogeneousな腫瘍でp53遺伝子変異を持つ細胞が少なく通常のシーケンスでは変異を同定できないことを挙げている。Reiterらの報告は腎癌におけるp53遺伝子変異の重要性を初めて明らかにした論文であるがその対象が全て細胞株であり原発性腎癌そのものについては解析していない。細胞株を利用した研究は確かに正常細胞の混入が少なく、DNAやRNA抽出も比較的容易であるが、細胞が株化する際に遺伝子変異が新たに生ずる可能性や極めて少数の変異を持つ細胞だけが選択的に細胞株となる可能性を否定できず腫瘍そのものに起こっている遺伝子変異を反映しないこともしばしば観察される。したがって、原発性腎癌でのp53遺伝子変異がどの段階で生ずるのか、その報告が待たれていた。

肉腫様部位に一致したp53遺伝子の高い変異頻度は、本研究で示した増殖能の検討結果と併せて考えるとp53遺伝子変異が腎癌のプログレッションと深い関わりがあると考えられる。しかし、p53遺伝子変異が腫瘍のプログレッションに重要な役割を果たしていると考えられている他の臓器の腫瘍、たとえば、大腸癌⁶⁻⁷、脳腫瘍²⁶、肝癌⁶⁰などでは本研究でみられた程の変異の集積、すなわち、ホットスポットは報告されていない。本研究でみられたホットスポットであるコドン278、244はこれまでのp53遺伝子変異を記載した論文の中に認められるが⁶¹、何れも散発性で明かな集積性は報告されていない。本研究におけるホットスポットの持つ意味には少なくとも二つの可能性があると考えられる。まず、

環境因子と発癌の関係が挙げられる。p53 遺伝子のホットスポットの領域とその変異を来す塩基の種類は悪性腫瘍のタイプ毎に異なっている。例えば、喫煙に関連した肺癌や食道癌の場合にはGからTへのトランスポージョン型の変異が多く認められる^{61, 62}。また、最近話題となっている中国や南アフリカにおけるB型肝炎ウィルス感染と食物へのアフラトキシンB1汚染地域には高率に肝癌が発生し、この肝癌にはp53 遺伝子のコドン249におけるGからTへのトランスポージョンが極めて高い頻度で認められる^{63, 64}。これらの報告は環境中のなんらかの発癌因子と癌細胞に生ずるDNA上の塩基変異に密接な関係があることを示唆している。腎癌においては未だ発癌に関わる環境因子は明確には同定されていないが本研究での高率な変異の特定のコドンへの集積は腎癌が肉腫様に変化する際に、あるいは、腎癌のプログレッションの際になんらかの環境因子が作用している可能性を示唆している。次に、ホットスポットが認められた可能性として本研究で対象として用いた肉腫様腎癌の組織学的特殊性が挙げられる。プログレッションを評価する場合、ステージの早期の腫瘍と進行した腫瘍とで比較検討する方法があるが、本研究ではより直接的にプログレッションの過程における遺伝子変異をみるために単一腫瘍内で組織学的に異なり、増殖能にも違いの見られる部位毎の変異を調べた。この腫瘍の研究は未だ報告がほとんど無く他の研究報告との比較は難しいが、甲状腺未分化癌におけるp53 遺伝子変異を調べた報告⁶⁵によると、未分化癌では高率に変異がみられ、しかも、半数の症例(6例中3例)でコドン248の変異が報告されている。一方通常の分化を示す癌には全く変異がなかったという。この論文は単一腫瘍内での評価はしていないが、ある特殊な組織型には比較的限局した遺伝子変異がある可能性を示唆している。

本研究において非癌部の腎組織にはp53 遺伝子変異がみられなかったことから、観察された変異は全て体細胞変異であると考えられる。変異の総計は18個でこのうち6変異はシーケンス反応上単一の変異バンドのみ認められたが、他の12変異については変異型と共に野生型のバンドも認められた。変異型のバンドのみの症例では対立遺伝子の一方のみ変異を来し他方は欠失していると考えられる。野生型と変異型両方のバンドがみられた症例では野生型のバンドは正常細胞、例えば、リンパ球や間質細胞、が混入した可能性があるが、野生型の対立遺伝子が残存し、一方の遺伝子のみの変異でも腎癌の肉腫様変化あるいはプログレ

ッションには充分であるのかもしれない。p53 遺伝子は癌抑制遺伝子であるが、変異を来した p53 遺伝子は発癌において二つの側面を持つと考えられている。すなわち、癌抑制能の消失^{66, 67}と癌遺伝子類似の性格の獲得^{68, 69}である。変異 p53 遺伝子のトランスフォーム能は変異の生じた領域や変異の種類によって異なると考えられている⁷⁰ので本研究で見いだされた変異 p53 タンパクの生物学的機能については今後調べる必要があると考える。また本研究において肉腫様部位に一致してダブルミスセンスミューテーションが高率に認められた(5 症例)。これまで p53 遺伝子のダブルミューテーションは腫瘍および細胞株においていくつかの報告がある^{25, 71}。しかしその意義についてははっきりとした結論が得られていない。もし p53 遺伝子変異の集積が腫瘍細胞のクローナルな拡大と関連するのであれば、シングルミューテーションを持つ腫瘍細胞にもう一つの変異が加わることによって progressive potential が増加すると考えられる。本研究でみられた結果はこの仮説を支持するものであると考える。

p53 免疫組織化学の結果は p53 タンパクが症例 7 を除き p53 遺伝子にミスセンスミューテーションのみられた部位と一致して陽性所見を示し、p53 タンパクの過剰発現が確認された。正常組織においては p53 タンパクは半減期が短いために発現のレベルは極めて低く通常の免疫組織化学では陽性所見は得られない。しかし、p53 遺伝子、特に進化上高度に保存された領域に変異が生ずることによって p53 タンパクは安定化し半減期が延びるため免疫組織化学的に同定することができるようになる^{72, 73}。その後の研究により、p53 タンパクの安定化に最も強く関わる遺伝子変異はアミノ酸変異を伴うミスセンスミューテーションの場合であり、当然のことながら、欠失やナンセンスミューテーションによりストップコドンが生じ不完全なタンパクが作られる場合は遺伝子に変異があっても免疫染色では陽性所見が得られないことが明かとなっている^{73, 74}。本研究で認められた遺伝子変異は何れもミスセンスミューテーションであり免疫組織化学的に過剰発現が認められたこととよく相関する。また陽性所見は何れの症例も腫瘍細胞の核に認められた。Mollら⁷³は免疫組織化学的 p53 タンパクの局在と p53 遺伝子の変異パターンを乳癌で詳細に調べ、細胞質に局限した陽性像を呈し遺伝子は野生型を示す症例のあることを示し、これが変異を生ぜずに p53 タンパクを不活性化するメカニズムの一つであることを示唆している。本研究では Mo

11らの言う細胞質に限局したパターンはみられなかった。ミスセンスシューテーションが有りながら免疫組織化学的に陽性所見が認められなかった症例7については組織の固定、保存がまず問題となるが、この組織は増殖能の検討にも用いPCRNA免疫染色では良好な結果を得ているので単に固定保存だけではないファクターを考えなければならない。p53遺伝子変異はエクソン5から8の領域のみを調べているため、症例7においてはこれ以外の領域での欠失あるいは調べていないエクソンでのナンセンスシューテーションが生じ不完全なタンパクとなっている可能性がある。

本研究で変異検索の対象としたもう一つの遺伝子にH-ras遺伝子があるが、コドン12、13、61を含むエクソン1、2を調べたが通常の腎癌部位、肉腫様部位いずれにも変異は認められなかった。H-ras遺伝子の変異については、Nanusら²⁷はPCRを用いたドットプロット法により腎細胞癌47例oncocytoma3例を対象にH-ras, K-ras, N-ras遺伝子の変異を解析し、転移を有する腎細胞癌1例のみにH-ras遺伝子の変異を検出したと報告し、病期の進んだ症例でras遺伝子の変異があるのではないかと推論している。また、Nagataら²⁸は同様の方法で16例の腎癌を対象として解析したがras遺伝子の変異は認められていない。以上のデータと本研究結果を併せて考えると腎癌においては点突然変異によるrasタンパクの活性化の頻度は低いと考えられる。

腎癌で認められる肉腫様転換と同様の形態変化は稀ではあるが他のいくつかの臓器における癌でも観察され、膀胱⁷⁵、肝臓⁷⁶、肺⁷⁷などでみられるとの報告がある。特に、喉頭、食道、肺などのsquamous cell carcinomaでは比較的多く同様の形態変化が観察され、これらはspindle cell carcinomaと呼ばれている⁷⁸。これらの肉腫様転換に、本論文で示したようなp53遺伝子の変異が関与しているか否かはいへん興味の持たれるところであるが、肉腫様転換に注目して遺伝子変異を検索した研究は本論文以外には発表されていない。しかし、腎癌以外の癌でも肉腫様転換を呈するものは悪性度が高く、患者の予後も悪い事が報告されており⁷⁵⁻⁷⁸、増殖、進展に関与する遺伝子に変異が生じている可能性はあると考える。今後の研究に待ちたい。

おわりに

本研究において肉腫様腎癌に注目して増殖能の解析を行い肉腫様腎癌が通常の腎癌に比べ増殖能が高いことを示した。また、肉腫様腎癌の単一腫瘍内での部位別増殖能を検討し通常の腎癌が肉腫様にトランスフォームすることに一致して増殖能が高まっていることを明らかにした。さらに、肉腫様変化に関与する遺伝子変異の検索をp53遺伝子、H a - r a s 遺伝子について行い、p53遺伝子に二つのホットスポットを含む高率なミスセンスミューテーションを検出し、また、免疫組織化学的にp53遺伝子変異を示す部位とほぼ一致してp53タンパクの過剰発現を認めた。以上、本研究により肉腫様腎癌が腎癌の悪性転換を検索する良いモデルであり、腎癌の悪性転換にp53遺伝子変異が重要な役割を担っていることが明かとなった。今後腎癌における肉腫様の形態変化とp53遺伝子変異との関係のより直接的な解析、たとえば、肉腫様の形態をとる腎癌細胞株に野生型p53を導入する実験等を行うと共にホットスポットとして認められたコドン278, 244変異p53蛋白の生物学的機能の解析も行いたい。

文 献

1. 日本病理学会：日本病理剖検輯報、第17輯-31輯、1974-1988.
2. 大野良之、久保奈佳子、黒石哲生. 腎腫瘍の疫学像と関連要因. 病理と臨床 1990; 8: 720-725.
3. McLaughlin JK, Mandel JS, Blot WJ, Schuman LM, Mehl ES, Fraumeni JF Jr. A population-based case-control study of renal cell carcinoma. J Natl Cancer Inst 1984; 72: 275-284.
4. Jacobsen BJ, Bjelke E, Kvale G, Heuch I. Coffee drinking, mortality, and cancer incidence: results from a Norwegian prospective study. J Natl Cancer Inst 1986; 76: 823-831.
5. McCredie M, Ford JM, Stewart JH. Risk factors for cancer of the renal parenchyma. Int J Cancer 1988; 42: 13-16.
6. Fearon ER, Vogelstein BA. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-767.
7. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup M, Paraskeva C, Markowitz S, Wilson JKV, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. Cancer Res 1990; 50: 7717-7722.
8. Zbar B, Bruch H, Talmadge C, Linehan M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. Nature 1987; 327: 721-727.
9. Seizinger BR, Ruoleau GA, Ozelius LJ. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. Nature 1988; 332: 268-269.
10. Bergerheim U, Nordenskjold M, Collins VP. Deletion mapping in human renal cell carcinoma. Cancer Res 1989; 49: 1390-1396.
11. Morita R, Ishikawa J, Tsutsumi M, Hikiji K, Tsukada Y, Kamidono S, Maeda S, Nakamura Y. Allelotype of renal cell carcinoma. Cancer Res 1991; 51: 820-823.

12. Yamakawa K, Morita R, Takahashi E. A detailed deletion mapping of the short arm of chromosome 3 in sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 4707-4711.
13. Latiff F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh F-M, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Schmidt L, Zhou F, Li H, Wei MH, Chen F, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Weng Y, Duan D-SR, Dean M, Glavac D, Richards FM, Crossey PA, Ferguson-Smith MA, Paslier DL, Chumakov I, Cohen D, Chinault C, Maher ER, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; 260: 1317-1320.
14. Norwell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986; 46: 2203-2207.
15. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 1984; 44: 2259-2265.
16. Nicolson GL. Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res* 1987; 47: 1473-1487.
17. Farrow GM, Harrison EG, Utz DC. Sarcomas and sarcomatoid and mixed malignant tumors of the kidney in adults: Part III. *Cancer* 1968; 22: 556-563.
18. Tomera KV, Farrow GM, Lieber MM. Sarcomatoid renal carcinoma. *J Urol* 1983; 130: 657-659.
19. Ro JY, Ayala AG, Sella A, Samuels ML, Swanson DA. Sarcomatoid renal cell carcinoma: clinicopathologic: a study of 42 cases. *Cancer* 1987; 59: 516-526.
20. Bennington JL, Beckwith JB. Tumors of the kidney, renal pelvis, and ureter. In: Armed Forces Institute of Pathology. Atlas of tumor pathology, 2nd series. 12th fascicle. Washington DC: 1975; 229-231.
21. Sella A, Logothetis CJ, Ro JY, Swanson DA, Samuels ML. Sarcomatoid renal cell carcinoma: a treatable entity. *Cancer* 1987; 60:1313-1318.
22. Medeiros LJ, Michie SA, Johnson DE, Warnke RA, Weiss LM. An immuno-

- peroxidase study of renal cell carcinomas: correlation with nuclear grade, cell type, and histologic pattern. *Hum Pathol* 1988; 19: 980-987.
23. Deitchman B, Sidhu GS. Ultrastructural study of a sarcomatoid variant of renal cell carcinoma. *Cancer* 1980; 46: 1152-1157.
 24. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bringner SH, Collins F, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-708.
 25. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
 26. Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res* 1992; 52: 674-679.
 27. Nanus DM, Mentle IR, Motzer RJ, Bander NH, Albino AP. Infrequent ras oncogene point mutations in renal cell carcinoma. *J Urol* 1990; 143: 175-178.
 28. Nagata Y, Abe M, Kobayashi K, Saiki S, Kotake T, Yoshikawa K, Ueda R, Nakayama E, Shiku H. Point mutations of c-ras genes in human bladder cancer and kidney cancer. *Jpn J Cancer Res* 1990; 80: 22-27.
 29. Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM. Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures. In: *Armed Forces Institute of Pathology. Atlas of tumor pathology, 3rd series. 11th fascicle.* Washington DC: 1993; 113-120.
 30. 日本泌尿器科学会、日本病理学会、日本医学放射線学会編。腎癌取扱い規約。1983年、第1版。金原出版。
 31. 日本泌尿器科学会、日本病理学会、日本医学放射線学会編。腎癌取扱い規約。1992年、第2版。金原出版。
 32. Hsu SM, Raine L, Ranger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and

- unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 557-580.
33. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himer G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18: 5-14.
34. Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142: 710-716.
35. Crocker J. Nucleolar organizer regions. In: Underwood JCE, editor. *Pathology of the nucleus*. Berlin: Springer-Verlag, 1991:91-149.
36. Howell WM, Denton TE, Diamond JR. Differential staining of the satellite regions of acrocentric chromosomes. *Experientia* 1975; 31: 513-516.
37. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975; 53: 37-50.
38. Crocker J, Macartney JC, Smith PJ. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 1988; 154: 151-156.
39. Raymond WA, Leong AS-Y. Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. *Hum Pathol* 1989; 20: 741-746.
40. Orita T, Kajiwara K, Nishizaki T, Ikeda N, Kamiryo T, Aoki H. Nucleolar organizer regions in meningioma. *Neurosurgery* 1990; 26: 43-46.
41. Tanaka T, Takeuchi T, Nishikawa A, Takaki T, Mori H. Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenyl-acetamide in rats: comparison with bromodeoxyuridine immunohisto-

- chemistry. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 1047-1051.
42. Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* 1987; 326: 515-517.
 43. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-2234.
 44. Takahashi Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation. *J Exp Med* 1981; 154: 1899-1909.
 45. Celis JE, Celis A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferative cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3262-3266.
 46. Landberg G, Roos G. Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res* 1991; 51: 4570-4574.
 47. Gracia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues: comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 1989; 134: 733-739.
 48. Robbins BA, de la Vaga D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 841-845.
 49. Hall PA, Crocker J, Watts A, Stansfeld AG. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1988; 12: 373-381.
 50. Delahunt B, Ribas J, Nancy JN, Bethwaite PB. Nucleolar organizer regions and prognosis in renal cell carcinoma. *J Pathol* 1991; 163: 31-37.
 51. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morpholo-

- gic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6:655-663.
52. Medeiros LJ, Gelb AB, Weiss LM. Renal cell carcinoma. Prognostic significance of morphologic parameters in 121 cases. *Cancer* 1988; 61: 1639-1651.
53. Ljungberg B, Stenling R, Roos G. DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity. *Cancer* 1985; 56: 503-508.
54. Oosterwijk E, Warnaar SO, Zwartendijk J, van der Velede EA, Fleuren GJ, Cornelisse CJ. Relationship between DNA ploidy, antigen expression and survival in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1988; 42: 703-708.
55. Kinouchi T, Saiki S, Naoe T, Uenaka A, Kotake T, Shiku H, et al. Correlation of c-myc expression with nuclear pleomorphism in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1989; 49: 3627-3630.
56. Presti JC Jr, Rao PH, Chen Q, Reuter VE, Li FP, Fair WR, Jhanwar SC. Histological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res* 1991; 51: 1544-1552.
57. Anglard P, Tory K, Brauch H, Weiss GH, Latiff F, Merino MJ, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM. Molecular analysis of genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 1071-1077.
58. Suzuki Y, Tamura G, Satodate R, Fujioka T. Infrequent mutation of p53 gene in human renal cell carcinoma detected by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 233-235.
59. Reiter RE, Anglard P, Liu S, Gnarr JR, Linehan WM. Chromosome 17p deletions and p53 mutations in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 3092-3097.
60. Tanaka S, Toh Y, Adachi E, Matsumata T, Mori R, Sugumachi K. Tumor progression in hepatocellular carcinoma may be mediated by p53 muta-

- tion. *Cancer Res* 1993; 53: 2884-2887.
61. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 1994; 57: 1-9.
 62. Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R. p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: association between mutations and smoking. *Cancer Res* 1992; 52: 734-736.
 63. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; 350: 427-428.
 64. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; 350: 429-431.
 65. Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, Dohi K, Nakamura N, Akiyama M. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 1992; 52: 1369-1371.
 66. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57: 1083-1093.
 67. Hinds P, Finlay C, Levine AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with ras oncogene and transformation. *J Virol* 1989; 63: 739-746.
 68. Parada LR, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between genes encoding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 1984; 312: 649-651.
 69. Milner J, Mendcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild-type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991; 65: 765-774.
 70. Halvey O, Michalovitz D, Oren M. Different tumor-derived p53

- mutants exhibit distinct biological activities. *Science* 1990; 250: 113-116.
71. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwachheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression. *Nature* 1992; 355: 846-847.
72. Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Iglehart JD, Bast RC Jr, Berchuck A. Over-expression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 2979-2984.
73. Moll UE, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: Mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7262-7266.
74. Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, Yandell DW. p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4961-4965.
75. Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM. Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures. In: *Armed Forces Institute of Pathology. Atlas of tumor pathology, 3rd series. 11th fascicle.* Washington DC: 1993; 223.
76. Kakizoe S, Kojiro M, Nakashima T. Hepatocellular carcinoma with sarcomatous change. Clinicopathologic and immunohistochemical studies of 14 autopsy cases. *Cancer* 1987; 59: 310-316.
77. Coulson WF. *Surgical Pathology*. 2nd ed. Lippincott Co. Philadelphia, USA: 1992; 374-376.
78. Battifora H. Spindle cell carcinoma. Ultrastructural evidence of squamous origin and collagen produced by the tumor cells. *Cancer* 1976; 37: 2275-2282.

図 表

表1 日本病理剖検輯報にもとづく腎悪性腫瘍年次集計

期間(年)	1974-1978	1979-1983	1984-1988	1974-1988 (総計)
剖検数	126,740	186,635	199,244	512,619
腎悪性腫瘍症例数 (%)	1,154 (0.911)	1,998 (1.071)	2,360 (1.184)	5,512 (1.075)
男女比(男/女)	2.55	2.82	2.81	2.76

表2 日本病理剖検報にもとづく腎悪性腫瘍の組織型分類

組織型	症例数
腎細胞癌	5,027 (91.2%)
Clear cell ca.	3,660 (66.4%)
Poorly differentiated ca.	707 (12.8%)
Undifferentiated ca.	65 (1.2%)
Papillary ca.	41 (0.7%)
Pleomorphic ca.	33 (0.6%)
Carcinoma NOS	521 (9.5%)
腎細胞癌以外の癌	
Transitional cell ca.	92 (1.7%)
Squamous cell ca.	23 (0.4%)
腎芽種	200 (3.6%)
肉腫	54 (1.0%)
Leiomyosarcoma	29 (0.5%)
Rhabdomyosarcoma	12 (0.2%)
Sarcoma NOS	13 (0.2%)
総症例数	5,512

NOS: not otherwise specified.

表3 日本病理剖検輯報にもとづく腎細胞癌の転移部位と頻度

臓器転移		リンパ節転移	
1. 肺	38.5%	1. 傍大動脈	18.2%
2. 肝	20.0%	a. 腹部	11.3%
3. 骨	18.7%	b. その他	6.9%
4. 副腎	16.3%	2. 肺	11.7%
5. 腎	12.7%	3. 傍気管	7.3%
6. 胸膜	8.9%	4. 膵、脾	5.2%
7. 膵	7.9%	5. 縦隔	4.2%
8. 脳	7.5%	6. 鎖骨上	3.1%

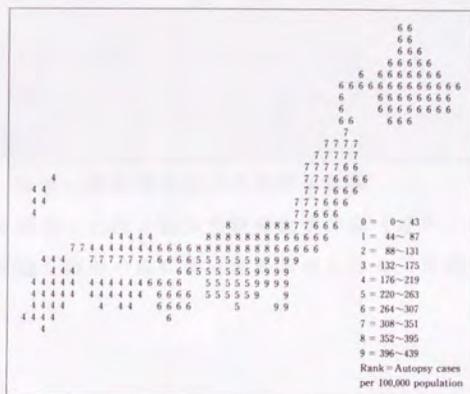


図1 日本病理剖検輯報にもとづく地区別人口10万人あたりの腎癌剖検数
腎癌の人口10万人あたりの剖検数は関東、北陸で高く、九州、四国、山陰で低い傾向が認められる。

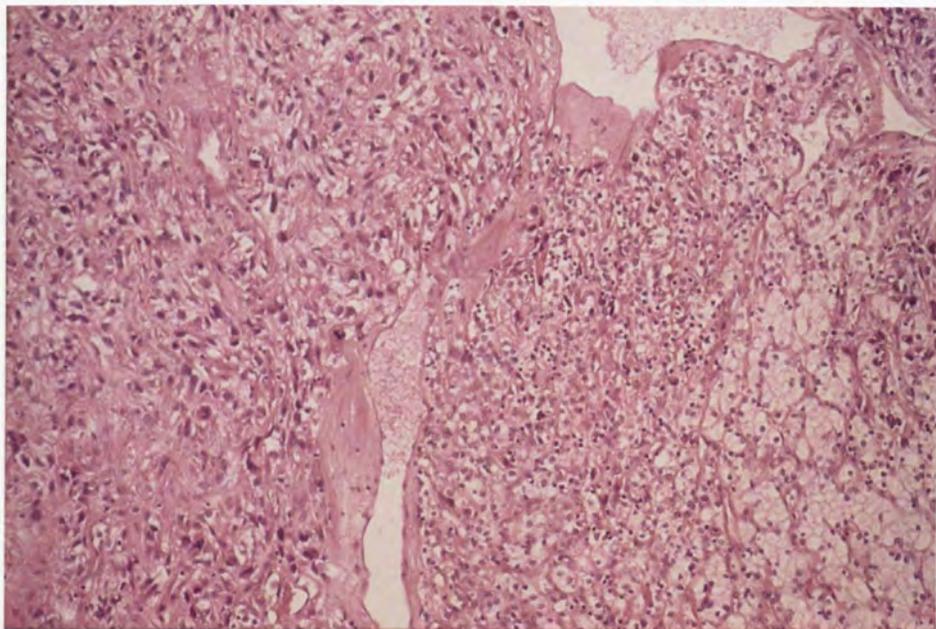


図2 肉腫様腎癌の代表的組織像

肉腫に類似した像と明かな腎細胞癌の像（左下）が認められ、両者は互いに接し両者の間に移行像が認められる（症例2、H.E. x25）。

表 4 肉腫様腎癌患者 12 例の臨床病理データ

症例 No.	年齢 (才)	性	腫瘍の部位 (左右)	腫瘍のサイズ (cm)	TNM分類
1	73	男	左	7.0 (diameter)	pT3b
2	58	男	左	11x10x7	pT3a
3	55	男	右	6x5x5	pT2
4	66	男	右	7x6.5x6	pT3a
5	49	男	右	13.5x9.5x9.5	pT3a
6	48	男	右	12x10x6.5	pT3a
7	58	男	右	9x5x5	pT3a
8	77	男	右	5x5x3	pT2
9	43	男	右	6x5.5x5.5	pT3b
10	32	男	左	8.5x9.5x9.5	pT4
11	59	男	右	14x10x9	pT3b
12	57	男	左	7.5x4.5x4	pT3a

T N M : tumor-node-metastasis

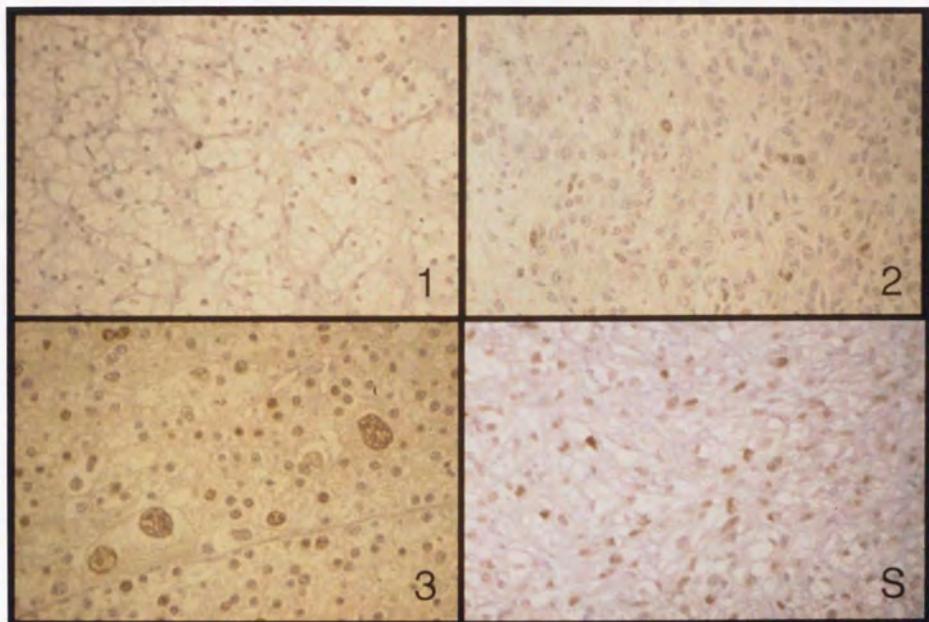


図3 PCNA免疫組織化学(x280)

1 : G1腎癌、2 : G2腎癌、3 : G3腎癌、S : 肉腫様腎癌 (症例1)。

組織学的異型度分類によるとG1は正常近位尿細管類似の核を有し、G2は核がG1よりやや大きく不整形で核小体明瞭であり、G3では不整形および多形性が強く巨大核や奇怪核の出現をみる。異型度が高くなるにつれてPCNA陽性細胞の増加が認められ肉腫様腎癌では陽性細胞の割合(PCNA-LI)が最も高い)。

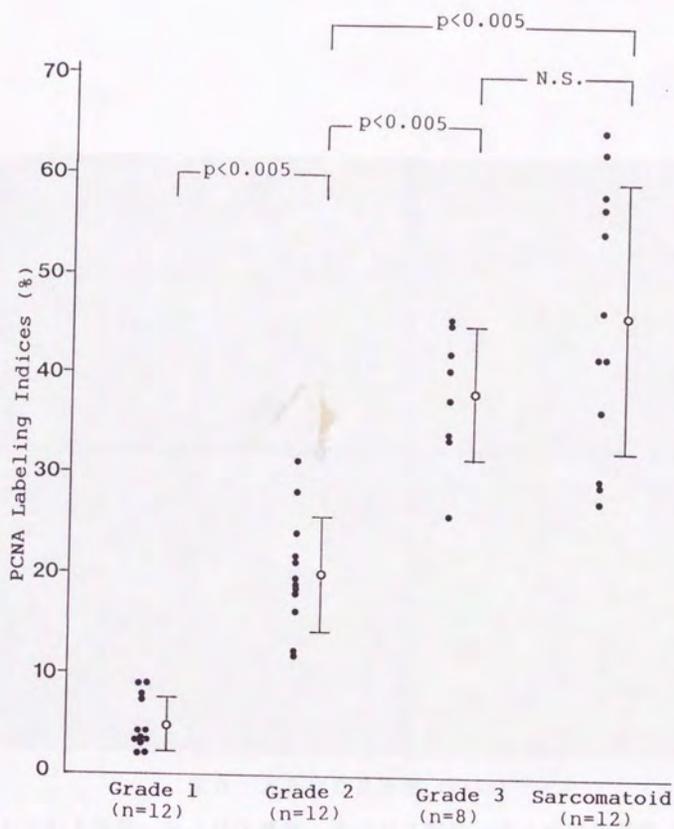


図4 PCNAのscattergram

白丸は各群の平均値を、縦の棒はstandard deviationsを表す。

N.S.: statistically not significant.

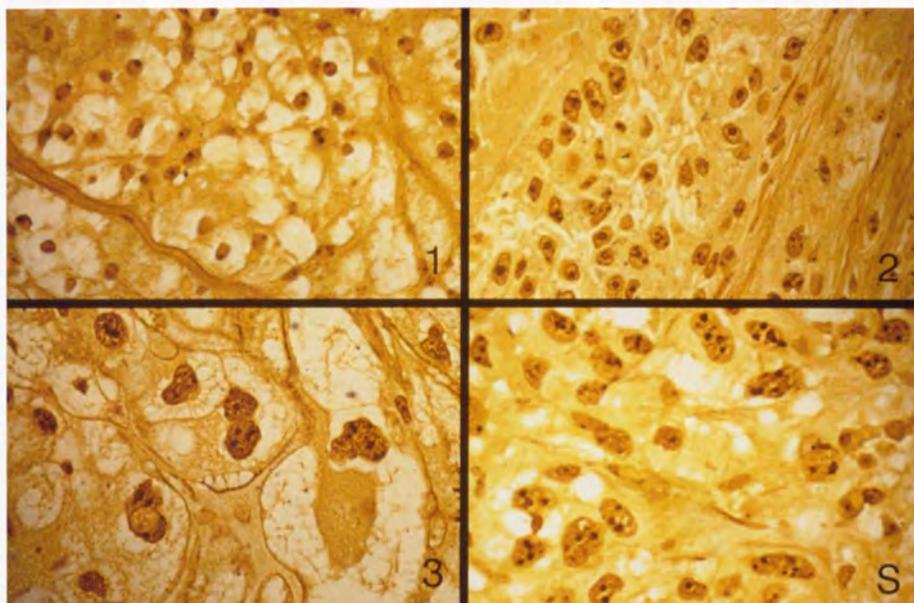


図5 AgNOR染色 (x400)

1 : G1腎癌、2 : G2腎癌、3 : G3腎癌、S : 肉腫様腎癌 (症例6)

1核あたりのAgNOR数はG1腎癌では1ないし2個、G2腎癌では1から4個、G3腎癌では数個認められるのに対し肉腫様腎癌では多数のドットを認める。

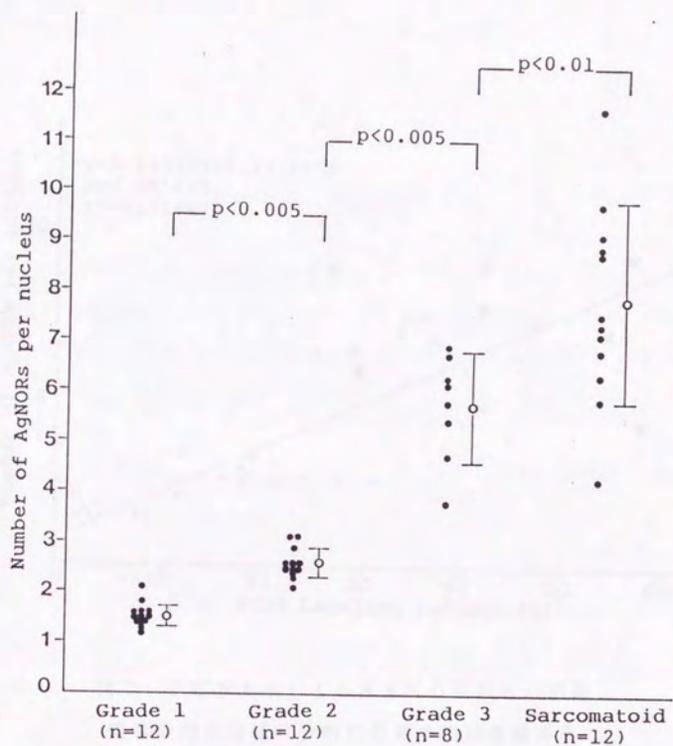


図6 各症例の1核あたりのAgNOR数をしめすScattergram
 白丸は各群の平均値を、縦の棒はstandard deviationsを表す。

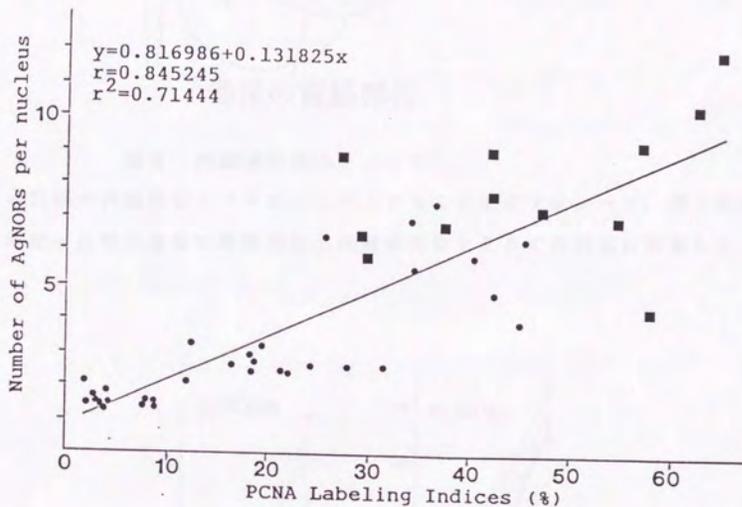


図7 PCNA-LIとAgNOR数との相関

両者の間には統計学的に有意の相関を認める。

黒丸は各症例の値、黒四角は肉腫様腎癌症例を示す。

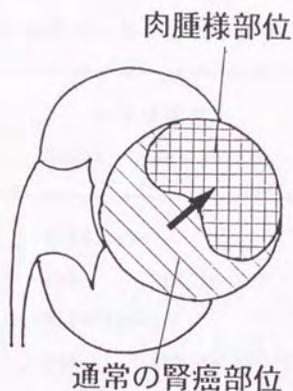


図8 肉腫様腎癌のシェーマ

通常の腎癌が肉腫様にトランスフォームすることを示すシェーマ。単一腫瘍内での増殖能の比較は通常の腎癌部位と肉腫様部位をそれぞれ別個に検索した。

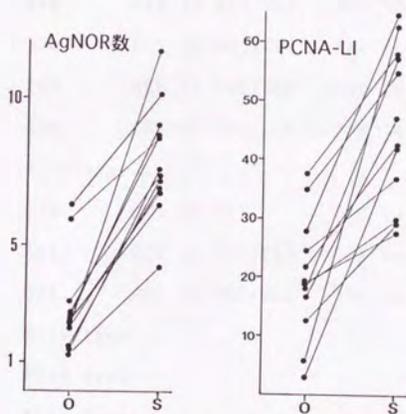


図9 肉腫様腎癌における部位別増殖能の比較

O : 通常の腎癌部位、S : 肉腫様腎癌部位。PCNA-LI、AgNOR数を指標に増殖能を比較したところ全ての症例で肉腫様部位の方が高い値を示した ($p < 0.01$)。

表5 肉腫様腎癌におけるp53遺伝子変異と免疫組織化学の結果

症例	単一腫瘍内 部位*	p53変異			免疫組織化学
		Codon	Nucleotide	Amino acid	
1	2, Cl	Wild type			-
	S	278	CCT to CTT	Pro to Leu	+
2	1, Cl	Wild type			-
	S	244	GGC to TGC/GGC	Gly to Cys	+
		278	CCT to CTT	Pro to Leu	
3	2, Mix	Wild type			-
	S	244	GGC to TGC/GGC	Gly to Cys	+
4	2, Mix	Wild type			-
	S	Wild type			-
5	1, Cl	Wild type			-
	S	278	CCT to CTT/CCT	Pro to Leu	+
6	2, Cl	278	CCT to CTT/CCT	Pro to Leu	+
	S	244	GGC to TGC/GGC	Gly to Cys	+
		278	CCT to CTT/CCT	Pro to Leu	+
7	2, Cl	Wild type			-
	S	278	CCT to CTT	Pro to Leu	-
8	3, Mix	244	GGC to TGC/GGC	Gly to Cys	+
	S	244	GGC to TGC/GGC	Gly to Cys	+
9	2, Mix	Wild type			-
	S	Wild type			-
10	2, Mix	Wild type			-
	S	157	GTC to TTC/GTC	Val to Phe	+
11	2, Cl	Wild type			-
	S	244	GGC to TGC/GGC	Gly to Cys	+
		278	CCT to CTT	Pro to Leu	

12	2, Cl	Wild type			-
	S	Wild type			-
13	2, Gr	Wild type			-
	S	244	GGC to TGC/GGC	Gly to Cys	+
		278	CCT to CTT	Pro to Leu	
14	3, Gr	Wild type			-
	S	248	CGT to CTG/CGT	Arg to Leu	+
		278	CCT to CTT	Pro to Leu	

*: S=肉腫様部位、1,2,3=G 1, 2, 3 腎癌部位、Cl=clear cell type, Gr=granular cell type, Mix=mixed cell type.

症例 1 から 1 2 は A, B の増殖能の検討に用いた症例 N o と同一であり、症例 1 3、1 4 は新たな症例で遺伝子変異の検索のみに用いた症例である。



図 10 エクソン 7 コドン 244 近傍のシーケンス

N: 正常(wild type)のシーケンス、2: 症例 2、3: 症例 3

症例 2、3 のシーケンスには G から T への点突然変異と正常の G のバンドが認められる。

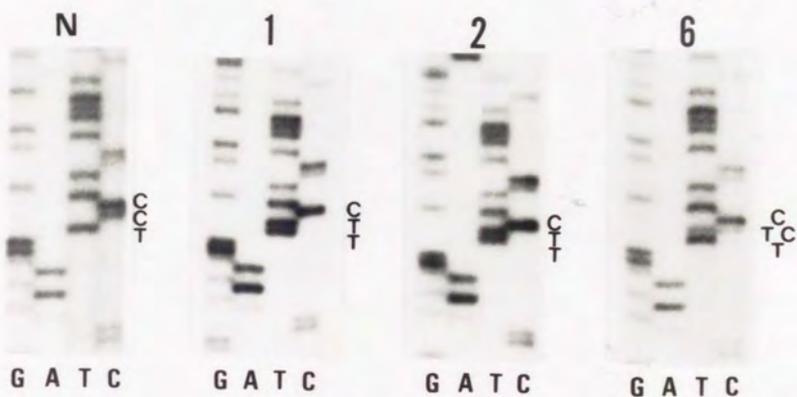


図 1 1 エクソン 8 コドン 278 近傍のシーケンス

N : 正常 (Wild type) のシーケンス、1、2、6 : 症例 1、2、6 のシーケンス。症例 1、2 には C から T への点突然変異バンドのみが認められ、症例 6 には変異型と野生型の両者のバンドが認められる。

表6 肉腫様腎癌におけるp53遺伝子変異

症例	通常の腎癌部位	肉腫様部位
1	WT	278、CCT→CTT
2	WT	244、GGC→TGC/GGC 278、CCT→CTT
3	WT	244、GGC→TGC/GGC
4	WT	WT
5	WT	278、CCT→CTT/CCT
6	278、CCT→CTT/CCT	244、GGC→TGC/GGC 278、CCT→CTT/CCT
7	WT	278、CCT→CTT/CCT
8	244、GGC→TGC/GGC	244、GGC→TGC/GGC
9	WT	WT
10	WT	157、GTC→TTC/GTC
11	WT	244、GGC→TGC/GGC 278、CCT→CTT
12	WT	WT
13	WT	244、GGC→TGC/GGC 278、CCT→CTT/CCT
14	WT	248、CGG→CTG/CGG 278、CCT→CTT

変異の認められたコドンNoと塩基の変化を示す。WT: Wild type。

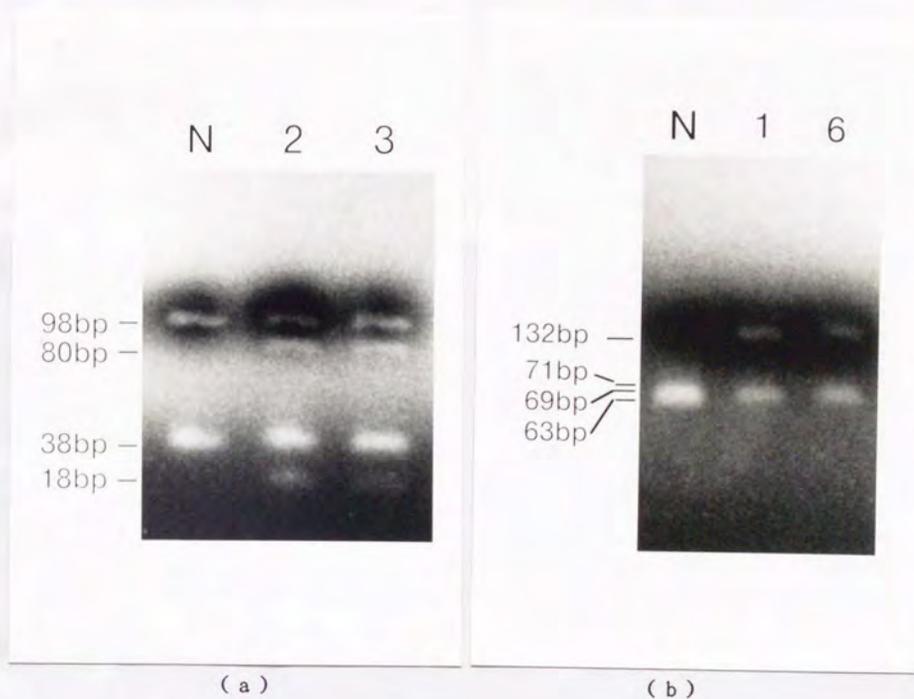


図 12 PCR産物の制限酵素解析

(a) p53遺伝子エクソン7を制限酵素Nsp Iにて消化した。Nsp Iは正常PCR産物を98bp, 38bpのサブフラグメントに切断する。コドン244の変異により新たにNsp I siteが生じ変異PCR産物は80bp, 38bp, 18bpのフラグメントに切断される。症例2、3では正常と変異の両者の切断パターンが認められる。(N:正常、2:症例2の肉腫様部位、3:症例3の肉腫様部位)

(b) Eco RIで消化したエクソン8の正常PCR産物(N)。71bp, 69bp, 63bpのフラグメントがみられる。コドン278に変異のある肉腫様部位では、二ヶ所のEco RI siteの内一つが失われるため132bpのフラグメントが検出される。(1、6:それぞれ症例1、6の肉腫様部位)

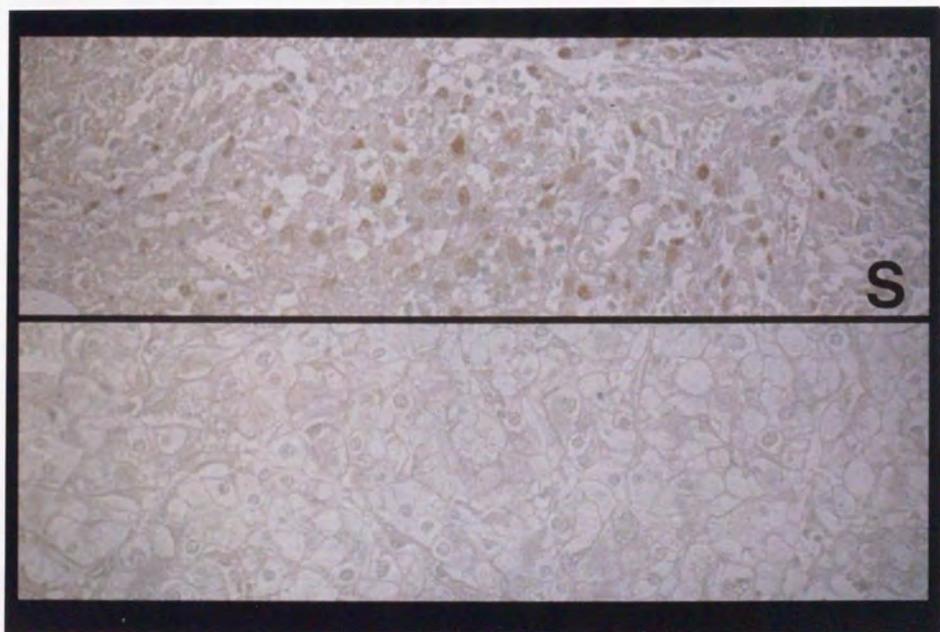


図13 p53タンパク免疫組織化学
肉腫様腎癌肉腫様部分（S，上段）と肉腫様腎癌の通常腎癌部分（下段）との比較（x400、症例11）。肉腫様部分には大部分の腫瘍細胞核に陽性所見を認めるが通常腎癌部分には陽性所見を認めない。

表7 肉腫様腎癌におけるp53タンパク免疫組織化学

症例	通常の腎癌部位	肉腫様部位
1	- (W)	+ (M)
2	- (W)	+ (M)
3	- (W)	+ (M)
4	- (W)	- (W)
5	- (W)	+ (M)
6	+ (M)	+ (M)
7	- (W)	- (M)
8	+ (M)	+ (M)
9	- (W)	- (W)
10	- (W)	+ (M)
11	- (W)	+ (M)
12	- (W)	- (W)
13	- (W)	+ (M)
14	- (W)	+ (M)

- : 陰性、+ : 陽性。() 内に p53 遺伝子変異の有無を記した、W : Wild type, M : Mutant type. 大部分の症例で p53 遺伝子変異が存在することと p53 タンパク免疫組織化学陽性結果は一致するが、症例7の肉腫様部位に限って異なる結果を得た。

表 8 肉腫様腎癌におけるH a - r a s 遺伝子変異

	通常の腎癌部位	肉腫様部位
エクソン1 (コドン12、 13を含む)	0 / 14	0 / 14
エクソン2 (コドン61を 含む)	0 / 14	0 / 14

検索症例数 (n) 中の変異のあった症例数 (m) を m/n で表す。

正常部位には何れの症例も変異はなかった。また、通常の腎癌部位、肉腫様部位にも変異は認められなかった。

