

Estrogen Receptor, 内因性 Estradiol および Epidermal Growth Factor Receptor と乳癌の増殖活性の関連

三 神 俊 彦

札幌医科大学外科学第1講座 (主任 早坂 滉)

成 松 英 明

札幌医科大学附属病院病理部 (主任 森 道夫)

The Relationship of Estrogen Receptor, Endogenous Estradiol and Epidermal Growth Factor Receptor to the Proliferative Activity of Breast Cancer

Toshihiko MIKAMI

Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. H. HAYASAKA)

Eimei NARIMASTU

Division of Pathology, Sapporo Medical College Hospital

(Chief : Prof. M. MORI)

ABSTRACT In order to evaluate the relationship of the expression of estrogen receptor (ER), endogenous estradiol (E_2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) to the proliferative activity of primary breast cancers, immunohistochemical studies were performed on 71 cases of primary breast cancer. Proliferative activity was evaluated by using anti-DNA polymerase α monoclonal antibody, CL22-2-42B, which reacts with cells in the proliferation cycle. The percentage of positive stained cancer cells was calculated and used as an indicator of the proliferative activity of each specimen. The relation of ER, endogenous E_2 and EGFR to the proliferative activity was investigated. The results are summarized as follows :

1. The ER positive breast cancers had a lower proliferative activity than the ER negative breast cancers.
2. Among the ER positive breast cancers, E_2 positive cancers had higher proliferative activity than E_2 negative cancers. Thus endogenous E_2 seems to play a role in the proliferation of ER positive breast cancers.
3. EGFR positive cancers had higher proliferative activity than EGFR negative cancers.
4. ER(-)EGFR(+)tumors had greater proliferative activity than ER(+)-EGFR(-)tumors. The expression of EGFR relates much more closely to higher proliferative activity of breast cancer than ER.

(Received October 21, 1989 and accepted November 13, 1989)

Key words: Human breast cancer, Estrogen receptor, Epidermal growth factor receptor, Endogenous estradiol, DNA polymerase α

Abbreviations

L. R. : labeling rate

EGFR : epidermal growth factor receptor

ER : estrogen receptor

E_2 : estradiol

1 緒 言

乳腺上皮は、ステロイドホルモン、とりわけestrogenにより増殖が促進される典型的なホルモン標的細胞である。また、多くの乳癌細胞もestrogenに対するreceptor (ER) を有し、乳癌にもホルモン依存性の増殖機構が存在すると考えられている。このような癌細胞の増殖は、主に生体内のestradiol (E_2) 活性の程度に依存していると考えられるが、ERや癌組織内の E_2 と増殖との関係を検討した報告はほとんどみられない。一方、免疫組織化学的に乳癌組織の E_2 を検索した成松ら¹⁾は、内因性 E_2 が、ERの生化学的測定結果と密接な関係を示すことを報告しているが、内因性 E_2 とERの関係免疫組織化学的に検索した報告はない。

また、ERを介する系以外の増殖因子の関与もER陰性の乳癌については重要と考えられる。epidermal growth factor (EGF)やtransforming growth factor α (TGF α) は、EGF receptor (EGFR) と結合して、上皮細胞や繊維芽細胞などを増殖させることが知られている。EGFRはER陰性乳癌に多く発現されることが報告されており²⁾、その発現と腫瘍の増殖活性との関係を明らかにすることは、意義があると考えられる。そこで本研究では、原発性乳癌71例について、ER、 E_2 、EGFRの免疫組織化学的同定を行い、それらの結果とDNA polymerase α によって表現される乳癌の増殖能との関係について比較検討した。

2 研究材料および方法

2.1 研究材料

昭和62年から昭和63年に教室において手術を施行した原発性乳癌71例の手術摘出材料を用いた。対象症例の年齢は30歳から78歳で、平均48.4歳である。閉経前症例は41例、閉経後症例は30例である。tnm病期ではtis 4例、病期 I 41例、病期 II 13例、病期 III 11例、病期 IV 2例であった。組織型では非浸潤癌4例、浸潤癌67例で、その内訳は浸潤性乳管癌59例(乳頭腺管癌16例、充実腺管癌7例、硬癌36例)、特殊型8例(粘液癌、3例、髄様癌4例、軟骨化生を伴う癌1例)であった。

2.2 ER、EGFRおよび内因性 E_2 の検討

2.2.1 ERおよびEGFRの免疫組織化学的染色法

手術材料を即座にOCTコンパウンドに凍結包埋後クライオスタットを用いて約6 μ mの切片を作成した。これらの切片のうちER用には10%ホルマリン phosphate buffer saline(PBS)に10分間浸漬後、 -20°C メタノー

ルに4分間、 -20°C アセトンに1分間浸漬固定した。EGFR用には -20°C アセトンに10分間浸漬固定した。ERはダイナボット社(USA)のER-ICAキットを、EGFRにはアマーシャム社(England)抗EGFRモノクローナル抗体EGFR 1を用いた。組織切片は非特異的反応を抑えるため正常ヤギ血清(室温15分)で処理し、一次抗体(ラット抗ER抗体またはマウス抗EGFR抗体、室温60分)、二次抗体(室温30分)による反応を行った。これらの抗体による反応の後にはPBSによる洗浄(5分 \times 2)を行った。次に、peroxidase-anti-peroxidase (PAP)液(室温30分)を作用させた後、PBS洗浄を行って、 H_2O_2 加0.05%3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)を用いて発色を行った。核染色にはメチルグリーンを用いた。

また、ERでは正常ラット血清を、EGFRでは正常マウス血清を一次抗体の代わりに使用し、陰性コントロールとした。

2.2.2 E_2 の免疫組織化学的染色法

手術材料の10%ホルマリン固定パラフィン切片を脱パラフィン後、3% H_2O_2 加メタノール中に30分浸漬し、内因性ペルオキシダーゼの阻止を行った。PBSによる洗浄後、非特異的反応を抑えるため正常ヤギ血清(室温15分)で処理した。次に、anti-17 β -estradiol antiserum (SIGMA社、30 mg/ml、室温30分)による反応の後、ビオチン標識ウサギIgG抗体(室温30分)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(室温30分)による反応を順次行い、PBS洗浄の後、 H_2O_2 加0.05%DABを用いて発色した。核染色はメチルグリーンを用いて行った。

また、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清を使用し、陰性コントロールとした。

2.2.3 ER、 E_2 、EGFRの陽性判定基準

ER陽性陰性の判定基準はPertschuk *et al.*³⁾の方法に従い、ER陽性細胞が10%以上を占める症例を陽性とした。また、 E_2 は、岡崎ら⁴⁾の方法に従い、組織切片における腫瘍細胞のうち陽性細胞が30%以上を占める症例を陽性とした。EGFRは戸井ら⁵⁾の方法に従い、陽性細胞の全く認められないものを陰性、それ以外のものを陽性と判定した。

2.3 増殖細胞に関する検討

2.3.1 DNA polymerase α の免疫組織化学的染色法

採取した乳癌組織を2% periodatelysine-paraformaldehyde (PLP) 溶液で4 \times 2時間固定後、10、15、20%サッカロースを含む0.1 M PBSで各4時間ずつ洗

浄し、さらに5%グリセリンと20%サッカロースを含むPBSで1時間洗浄しOCTコンパウンドを用いて凍結包埋した。凍結切片はクライオスタットで厚さ約6 μ mに作成し、医学生物研究所(MBL)のDNA polymerase α に対するモノクローナル抗体(CL 22-2-42 B)を切片に作用させた。0.3% H₂O₂ PBSで内因性ペルオキシターゼの活性阻止(室温5分)の後、非特異的反応を抑えるため正常ヤギ血清(室温15分)で処理し、一次抗体(マウス抗DNA polymerase α 抗体, 4°C over night), 二次抗体(ヤギ抗マウスIgG抗体, 室温30分), PAP液(マウスモノクローナル抗体, 室温30分)による反応を順次行った後、H₂O₂加0.05%DABにより発色させ、メチルグリーンによる核染色を行った。

また、一次抗体の代わりに正常マウス血清を使用し、陰性コントロールとした。

2.3.2 DNA polymerase α Labeling Rate (L. R.) の算出

顕微鏡下に約1000個の乳癌細胞を観察し、その中でDABによる発色がみられた細胞のパーセントを算出した。なお、観察にあたっては変性壊死のみられない部位を選定して行った。

2.3.3 mitotic count の算出

Hematoxylin Eosin (HE) 染色標本を400倍で10視野観察し、乳癌細胞のmitosisの数を求めた。

2.4 統計学的処理

DNA polymerase α L. R. の各因子ごとの平均値の差の検定はWilcoxon rank-sum testによって行った。また、相関係数はSpearmanの順位相関係数を用いた。

3 結果

3.1 ER, 内因性 E₂ および EGFR の免疫組織化学的所見

3.1.1 ER

乳癌細胞では抗ER抗体は核とのみ反応を示し、陽性細胞の組織内分布および染色強度にはheterogeneityが認められた(Fig. 1-1)。また、癌組織内にみられた正常乳管上皮にも陽性所見がみられた。

陽性コントロールとして用いたヒト乳癌由来の培養細胞株MCF-7においても、同様の染色所見が認められた(Fig. 1-2)。陰性コントロールでは全く反応が認められなかった。

3.1.2 内因性 E₂

内因性 E₂ は核にもみられたが、多くは細胞質に反応産物が認められ、ERと異なる局在を示すことが多かつ

た(Fig. 2)。陰性コントロールでは全く反応が認められなかった。

3.1.3 EGFR

陽性所見は主に細胞膜にみられ、一部の細胞では細胞質にも同時に認められた(Fig. 3-1)。また、癌組織内に存在する正常乳管上皮にも、主として細胞膜に局在していた。陽性コントロールとして染色したEGFR陽性のヒト扁平上皮由来の培養細胞株A-431でも細胞膜に強くEGFRの局在がみられた(Fig. 3-2)。陰性コントロールは全く染色されなかった。

3.2 ER, EGFR, 内因性 E₂ の陽性率

原発性乳癌71例のER, E₂ およびEGFRの陽性率はそれぞれ76.0%(54/71), 52.1%(37/71), 28.2%(20/71)であった。

このなかで最も症例の多かった浸潤性乳管癌59例についてみると、ERの陽性率は76.3%(45/59)で、内因性 E₂ の陽性率は52.5%(31/59)であった。また、ER陽性群におけるE₂陽性率は60.0%(27/45)で、ER陰性群におけるE₂陽性率28.6%(4/14)に比し高い傾向を示した。また、 χ^2 検定ではERとE₂の陽性陰性判定に従属関係がみられ(p<0.05)、ERとE₂の陽性陰性判定の一致率は62.7%(37/59)と必ずしも高くなかった(Table 1)。以上より、内因性 E₂ がERの発現と密接な関係にあることが示された。

浸潤性乳管癌におけるEGFRの陽性率は30.5%(18/59)であった。また、EGFRとERの陽性陰性判定結果の相関を χ^2 検定でみると両項目に負の従属関係が認められ(p<0.01)、EGFRの発現がER陰性乳癌に多くみられた(Table 2)。

非浸潤癌4例では、全例ER陽性EGFR陰性で、そのうち2例がE₂陽性であった。特殊型乳癌についてみると、粘液癌3例は全てER陽性E₂陽性EGFR陰性であった。髄様癌4例のうちER陽性例は2例で、EGFR陽性例は2例であった。軟骨化性を示す癌にはいずれのレセプターの発現もみられなかった。

Table 1 Correlation between ER and Endogenous E₂ status in invasive ductal carcinomas (59 cases)

		ER		total
		+	-	
E ₂	+	27(45.8%)	4(6.8%)	31(52.5%)
	-	18(30.5%)	10(16.9%)	28(47.5%)
total		45(76.3%)	14(23.7%)	59(100%)

Table 2 ER and EGFR status in invasive ductal carcinomas.

		EGFR		total
		+	-	
ER	+	7(11.9%)	38(64.4%)	45(76.3%)
	-	11(18.6%)	3(5.1%)	14(23.7%)
total		18(30.5%)	41(69.5%)	59(100%)

3.3 抗 DNA polymerase α monoclonal 抗体を用いた免疫組織化学的方法による増殖活性の検討

3.3.1 DNA polymerase α の免疫組織化学的染色所見

乳癌細胞における DNA polymerase α は分裂期以外の癌細胞では核内に限局してみられた。しかし、分裂期の癌細胞では核膜の消失に伴い、細胞質に陽性所見が観察された (Fig. 4-1)。乳癌組織内の正常乳管上皮および良性増殖性病変にも同様の所見がみられたが、その頻度はきわめて少なかった (Fig. 4-2)。

増殖細胞に対する特異性を検討するためにリンパ節、胃粘膜、皮膚組織について免疫組織化学的に DNA polymerase α を検索したところ、リンパ節では濾胞胚中心の細胞に、胃粘膜では腺頸部上皮に、皮膚では基底細胞に乳癌細胞と同様の陽性所見がみられ、本抗体が増殖細胞に特異的に反応することが確かめられた (Fig. 4-3, 4-4, 4-5)。

3.3.2 mitotic count と DNA polymerase α L. R.

原発性乳癌 71 例の DNA polymerase α L. R. の平均値は 27.4 ± 17.3 であった。同一症例における mitotic count の平均値は 9.5 ± 10.6 であり、DNA polymerase α L. R. より低かった。両者の相関係数は $rs=0.7420$ で正の相関を示し ($p<0.001$)、その回帰直線は mitotic count を x 、DNA polymerase α L. R. を y とすると $y=1.158x+16.604$ であった (Fig. 5)。これらの結果から DNA polymerase α L. R. は乳癌の増殖速度を反映することが示唆された。

3.3.3 組織型と DNA polymerase α L. R.

組織型別に DNA polymerase α L. R. の平均値を比較すると、非浸潤癌 11.45 ± 7.98 、浸潤癌 28.38 ± 17.29 で浸潤癌が有意に高かった ($p<0.05$)。さらに、浸潤癌の中でも浸潤性乳管癌の L. R. の平均値が 27.28 ± 16.17 であるのに対し、特殊型は 38.74 ± 22.84 と高い傾向を示した。この理由は、髄様癌が 37.43 ± 18.15 と高い値を示し、さらに軟骨化生を示す癌の L.

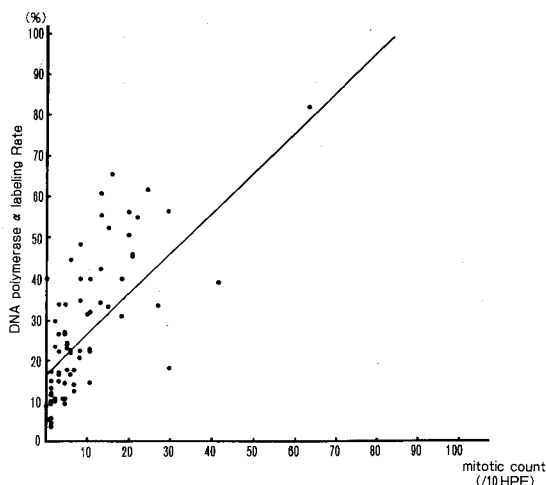


Fig. 5 Relationship between DNA polymerase α labeling rates (LR) and mitotic counts. The coefficient of correlation for DNA polymerase α labeling rates and mitotic counts in 71 primary breast cancers was 0.7420 ($p<0.01$). The regression line was $Y=1.158X+16.604$ (X =mitotic counts, Y =DNA polymerase α L. R.).

R. が 82.4 ときわめて高かったことによる。対象症例における非浸潤癌および特殊型乳癌は、ER、EGFR の陽性率や増殖活性において浸潤性乳管癌と異なる態度を示し、その症例数も少ないことから、ER、 E_2 および EGFR の発現と増殖活性の関係を検討する際、非浸潤癌と特殊型を除外した浸潤性乳管癌のみで行った。

3.3.3 ER および内因性 E_2 と DNA polymerase α L. R.

ER の発現の有無と乳癌の増殖活性との関係を検討した結果、ER 陽性群と陰性群の DNA polymerase α L. R. の平均値はそれぞれ 21.36 ± 12.37 、 45.01 ± 13.60 で ER 陰性群が有意に高い増殖活性を有することが示された ($p<0.001$) (Fig. 6)。

E_2 陽性群と陰性群における DNA polymerase α L. R. の平均値の比較では、それぞれ 28.06 ± 14.36 、 25.77 ± 18.09 で、両群間に有意差はみられなかった。

ER と E_2 の陽性陰性判定の組合せから DNA polymerase α L. R. の平均値を比較すると、ER(+) E_2 (+)群 25.51 ± 12.98 、ER(+) E_2 (-)群 15.14 ± 8.36 、ER(-) E_2 (+)群 45.30 ± 12.14 、ER(-) E_2 (-)群 44.89 ± 14.76 であった。つまり、ER 陽性群では、 E_2 も共に陽性の群が有意に高く ($p<0.01$)、ER 陰性群では E_2 が陽性と陰性の群の間に差はみられなかった (Table 3)。以上より、内因性 E_2 は ER 陽性乳癌の

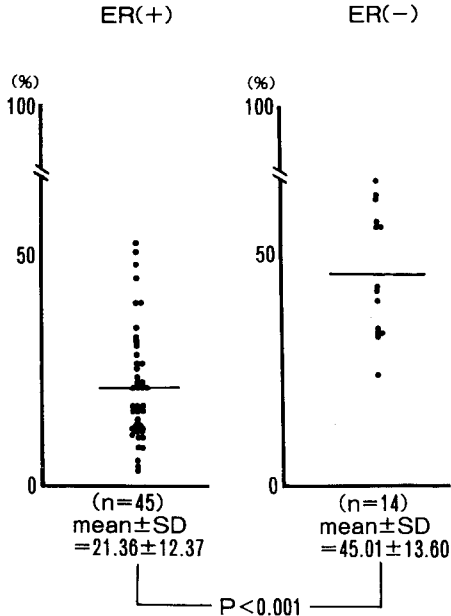


Fig. 6 ER and DNA polymerase α labeling rate. ER-negative tumors showed significantly higher DNA polymerase α labeling rate than ER-positive tumors. (59 cases of invasive ductal carcinoma)

増殖活性に強く関与していることが示唆された。

3・3・4 EGFR と DNA polymerase α L. R.

浸潤性乳管癌 59 例の EGFR 陽性群と陰性群における DNA polymerase α L. R. の平均値を比較すると、それぞれ 41.60 ± 17.56 , 20.55 ± 10.39 で、EGFR 陽性乳癌が高い増殖活性を示した ($p < 0.001$) (Fig. 7).

ER および EGFR の陽性陰性判定の組合せによる DNA polymerase α L. R. の平均値を比較検討すると、ER(+)EGFR(+)群 33.09 ± 19.38 , ER(+)EGFR(-)群 19.20 ± 9.50 , ER(-)EGFR(+)群

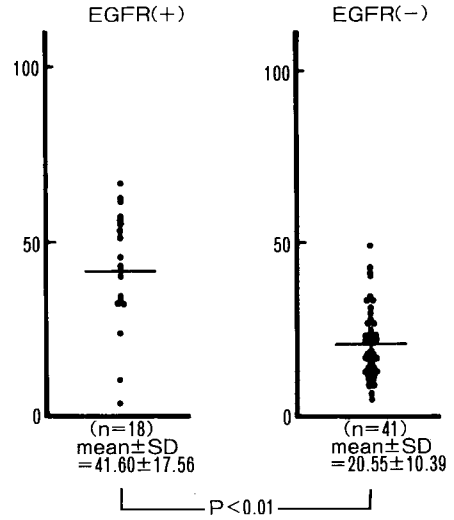


Fig. 7 EGFR and DNA polymerase α labeling rate. EGFR-positive tumors showed significantly higher DNA polymerase α labeling rate than EGFR-negative tumors. (59 cases of invasive ductal carcinoma)

47.02 ± 14.69 , ER(-)EGFR(-)群 37.63 ± 4.41 で、ER のみ陽性の群が他に比べ有意に DNA polymerase α L. R. が低かった ($p < 0.01$) (Table 4).

4 考 察

4・1 DNA polymerase α に関する検討

乳癌における増殖活性を解析する方法としては、mitotic count が古くより汎用され⁶⁾、DNA 合成期(S 期)にある細胞を同定する³H-thymidine を用いた DNA の radiolabeling 法や、DNA を測定する flow cytometry (FCM) 法などが用いられて来た^{7,8)}。近年、免疫組織化学的手法が広く臨床病理学に応用され、増殖細胞に特異的に反応する抗体を用いた解析が可能に

Table 3 ER, E₂ status and DNA polymerase α Labeling Rates. (in invasive ductal carcinomas.)

	No.	DNA Polymerase α L. R. (%) (mean \pm SD)
ER(+)E ₂ (+)	27	25.51 \pm 12.98
ER(+)E ₂ (-)	18	15.14 \pm 8.36
ER(-)E ₂ (+)	4	45.30 \pm 12.14
ER(-)E ₂ (-)	10	44.89 \pm 14.76

P < 0.01

Table 4 ER, EGFR status and DNA polymerase α Labeling Rates in invasive ductal carcinomas.

	No.	DNA polymerase α L. R. (%) (mean \pm SD)	
ER(+)EGFR(+)	7	33.09 \pm 19.38	p < 0.01
ER(+)EGFR(-)	38	19.20 \pm 9.50	
ER(-)EGFR(+)	11	47.02 \pm 14.69	p < 0.001
ER(-)EGFR(-)	3	37.63 \pm 4.41	

なった^{9,10}。本研究では、このような免疫組織化学的手法を応用して、乳癌組織切片についてDNA polymerase α を検索し、その所見から乳癌の増殖活性を検討した。ここで用いたモノクローナル抗体 CL 22-2-42 B は、ウシの胸腺より抽出した 10 S DNA polymerase α を抗原として作成されたものであるが、ヒト DNA polymerase α とも交差反応を示すことが確かめられている¹¹。また、ヒト培養細胞株 HeLaS₃ および KB における検索では、DNA polymerase α は G₀ 期を除く細胞周期の各 phase で増加しており、免疫組織化学的にも G₀ 期の細胞には認められないが、G₁, S, G₂ 期には核内に、M 期には細胞質に瀰漫性に認められることが報告されている¹²。

本研究における検索では、本抗体は正常ヒト組織の増殖細胞に対して高い特異性を有することが確認され、また、乳癌組織における DNA polymerase α L. R. は mitotic count と正の相関を示したことから、本法は乳癌組織の増殖活性を比較するうえで、簡便かつ再現性のある方法と考えられた。

4.2 ER および内因性 E₂ に関する検討

ER 陽性乳癌は、陰性乳癌に比して予後や内分泌療法への反応性がなどが一般に良好なことから、ER の検索は臨床さきわめて重要な意義を有する^{13,14}。その手法には大別して Dextran Coated Charcoal (DCC) 法などの生化学的方法と、免疫組織化学的方法があり、両者は高い相関を有している¹⁵。

本研究における ER の発現と増殖活性の検討結果から、ER 陽性乳癌の増殖活性は、ER 陰性のそれより低いことが示唆された。このことは一般に ER 陽性乳癌に早期再発例が少ない¹⁶ という臨床的な観察結果と関連しているかも知れない。即ち ER 陽性乳癌の低い増殖活性が再発までの期間を遅らせている可能性が考えられる。

しかし一方、ER 陽性乳癌でも内因性 E₂ が陽性の場合、その増殖活性が高いことが、今回の研究から示された。ER 陽性乳癌は、上記のように早期の再発例は少ないにもかかわらず、長期間追跡すると、必ずしも予後が良好でないことが最近報告されている^{17,18}。この一つの要因として ER 陽性乳癌に対する E₂ の増殖増強作用が考えられる。また、近年 *in vitro* の実験において、ER 陽性乳癌細胞株が E₂ によって増殖因子の産生や蛋白分解酵素の誘導を行うことも指摘されており^{19,20}、これらが間接的に乳癌細胞の浸潤および増殖に結びつく可能性も考えられる。このように、内因性 E₂ の検索は ER の間接的証明法としてばかりでなく、ER 陽性乳癌の増殖活性、ひいてはその予後を推測する手段として重要な意義を有すると考えられる。

しかし、ER との関係を除いて検討した場合は、E₂ 陽性乳癌と陰性のそれとの間には増殖活性の差を認めることができなかった。ステロイド・ホルモンはレセプターと結合することによってその生物学的作用を発現するが、免疫組織化学的な検索では内因性 E₂ が主として細胞質内に局在するのに対し、ER は核内に限定して認められ、両者の細胞内局在に解離が認められることが多かった。また、ER 陰性例のなかにも E₂ 陽性のものが認められたことなどから、乳癌に見いだされる E₂ が必ずしも ER と結合していない可能性もあり得ると思われる。この点に関して、Pascal *et al.*²¹ は内因性 E₂ が estrogen との affinity が高い estrophillin (type I binding sites) と結合するだけでなく、これより affinity は低い細胞質内に type I より多量に存在する type II および type III binding sites と結合する可能性を示唆している。これらの binding sites が ER 陰性例にも存在することが報告されている²²。

また、乳癌細胞内に aromatase などのステロイド変換酵素を有する症例のあることが報告されており²³、血

中の E₂ 濃度の低下した閉経後の ER 陽性乳癌の増殖に大きな影響を及ぼしていることが示唆されている。抗 E₂ 抗体がこのようにして腫瘍細胞のマイクロソームで合成された E₂ を認識している可能性も否定できない。

4.3 EGFR に関する検討

本研究で使用した抗 EGFR モノクローナル抗体 EGFR 1 は Waterfield *et al.*²⁴⁾ により開発されたもので、この抗体を用いた免疫組織化学的検索結果は、¹²⁵I EGF を用いた competitive binding assay によって得られた生化学的測定結果と高い相関を有することが報告されている⁵⁾。乳癌における EGFR の陽性率を免疫組織化学的に検討した報告は他にもみられるが、その陽性率はおおむね 30% であり、本研究結果でも同様の結果がえられた^{5,25,26)}。

また、EGFR 陽性乳癌はその組織学的特徴として histologic grade が高い傾向を示し、vimentin の発現がしばしばみられ、腫瘍内に squamous metaplasia が散見されるなどの報告があり^{25,26,27)}、通常の乳癌とはやや異なる性格を有すると考えられる。本研究結果から、EGFR 陽性乳癌は高い増殖活性を持つことが示された。Sainsbury *et al.*²⁷⁾ は EGFR 陽性乳癌が早期再発および早期死亡の risk が高いことを報告しているが、これらの結果は EGFR 陽性乳癌の高い増殖活性と関係しているものと推察される。

乳癌における EGFR の発現は、ER と負の相関関係を有することが生化学的検討によって指摘されているが²⁸⁾、免疫組織化学的手法による本研究でも同様の結果が得られた。

ER と EGFR の陽性陰性判定の組合せからみると、乳癌の増殖活性は EGFR のみ陽性のものが最も高く、ER のみ陽性のものが最も低く、ER と EGFR が組織内に混在してみられた群ではこれらの中間の値を示した。このように、2つのレセプターは細胞動態において異なった態度を示したが、乳癌の増殖には EGFR が ER より大きい影響を与えていると考えられる。ER および EGFR が同一組織内に混在している症例では、その腫瘍の増大に伴って増殖活性の高い EGFR 陽性細胞が組織内に占める割合が高くなることが予想される。また、進行再発乳癌に対して内分泌療法を施行すると、増殖活性の低い ER 陽性細胞が減少し、増殖活性の高い EGFR 陽性細胞が増加すると考えられる。したがって、ER 陽性乳癌に対する内分泌療法が約 60% の有効率にとどまる背景には、このような要因も含まれていると考えられる¹⁴⁾。

最近、EGFR を介した癌治療の試みがなされており、

今後の臨床応用が期待される²⁹⁾。Hennipman *et al.*³⁰⁾ は乳癌組織のチロシンキナーゼ活性が正常乳腺組織に比して高いことを報告している。このことより、乳癌では EGFR と異なるチロシンキナーゼ活性を有する細胞膜蛋白が存在して、増殖を亢進させている可能性があり、臨床材料におけるこれらの蛋白質の検索と、EGFR を含めたそれぞれの蛋質をターゲットとした癌治療が今後の課題となるであろう。さらに、本研究では ER、EGFR がともに発現されなかった乳癌の増殖活性が EGFR のみが陽性の乳癌とほぼ同様の値を示したことから、これらの乳癌における増殖機構の解明が待たれる。

5 結 語

1. 原発性乳癌 71 例について ER、E₂ および EGFR に関する免疫組織化学的検索を行い、これらの発現と乳癌細胞の増殖活性の関係を解析した。
2. ER 陽性群は ER 陰性群に比して DNA polymerase α L. R. が低く、ER 陽性乳癌は増殖活性が低いことが示された。ER 陽性群のなかで内因性 E₂ 陽性のものは陰性のものに比して高い増殖活性を有し、内因性 E₂ が ER 陽性乳癌の増殖能に強く影響していることが明らかになった。
3. EGFR 陽性群は EGFR 陰性群に比べ高い増殖活性を示した。
4. ER と EGFR の組合せからみると、増殖活性は ER のみ陽性の群が最も低い増殖活性を示し、EGFR のみ陽性の群が最も高かった。EGFR は ER に比べて乳癌の増殖により強い影響を及ぼしていると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った外科学第 1 講座、早坂 滉教授ならびに病理学第 2 講座、森 道夫教授に深謝いたします。また、培養細胞の御供与をいただきました病理学第 1 講座、佐藤昇志助教授に感謝致します。

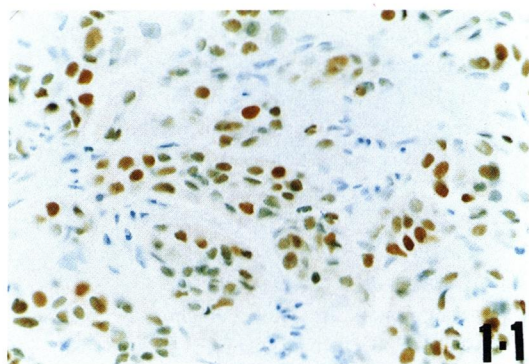
なお、本論分の内容の一部は第 77 回病理学会および第 35 回臨床病理学会にて報告した。

文 献

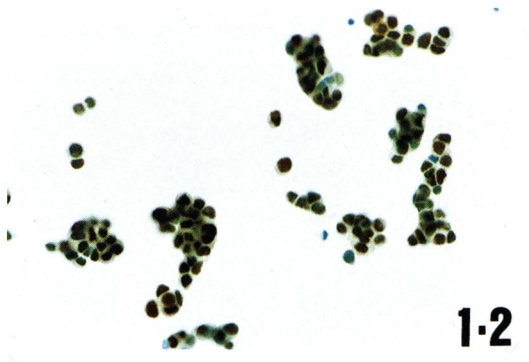
1. 成松英明, 岡崎 裕, 岡崎 亮, 戸田和則, 岡崎 稔: 乳癌におけるホルモンレセプター測定結果の解析と諸因子との関係. *臨床病理* 33, 231-238 (1986).
2. Fitzpatrick, S. L., Brightwell, J., Wittliff, J. L., Barrows, G. H. and Schultz, G. S.: Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies

- and relationship to estrogen receptor and progesterin receptor levels. **Cancer Res.** **44**, 3448-3453 (1984).
3. Pertschuk, L. P., Eisenberg, K. B., Carter, A. C. and Feldman, J. G.: Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies.: **Cancer** **55**, 1513-1518 (1985).
 4. 岡崎 裕, 浅石和昭, 岡崎 亮, 三神俊彦, 戸田和則, 岡崎 稔, 早坂 滉, 成松英明: Estradiolの酵素抗体法による組織内局在に関する検討. **臨床病理** **34**, 80-85 (1986).
 5. 戸井雅和: 乳癌における estrogen receptor, epidermal growth factor, epidermal growth factor receptorに関する免疫組織化学的, 生化学的研究. **日外誌** **89**, 725-736 (1988).
 6. Bloom, H. J. G. and Richardson, W. W.: Histological grading and prognosis in breast cancer. **Brit. J. Cancer** **11**, 359-377 (1957)
 7. Meyer, J. S., Prey, U. M., Babcock, S. D. and McDivitt, W. R.: Breast carcinoma cell kinetics, morphology, stage, and host characteristics. **Lab. Invest.** **54**, 41-51 (1986).
 8. Mcdivitt, R. W., Stone, K. R., Craig, R. B. and Meyer, J. S.: A comparison of human breast cancer cell kinetics measured by flow cytometry and thymidine labeling. **Lab. Invest.** **52**, 287-291 (1985).
 9. Gredes, J., Schwab, U., Lemke, H. and Stein, H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer** **31**, 13-20 (1983).
 10. Ochs, R. L., Reilly, M. T., Freeman, J. W. and Busch, H.: Intranucleolar localization of human proliferating cell nucleolar antigen P120. **Cancer Res.** **48**, 6523-6529 (1988).
 11. Masaki, S., Shiku, H., Kaneda, T., Koiwai, O. and Yoshida, S.: Production and characterization of monoclonal antibody against 10S DNA polymerase α from calf thymus. **Nucleic Acids Res.** **10**, (1982).
 12. Nakamura, H., Morita, T., Masaki, S. and Yoshida, S.: Intracellular localization and metabolism of DNA polymerase α in human cells visualized with monoclonal antibody. **Exp. Cell Res.** **151**, 123-133 (1984).
 13. Parl, F. F., Schmidt, B. P., Dupont, W. D. and Wagner, R. K.: Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis, and histopathologic grading.: **Cancer** **54**, 2237-2242 (1984).
 14. Nomura, Y., Kobayashi, S., Takatani, O., Sugano, H., Matsmoto, K. and McGuire, W. L.: Estrogen receptor and endocrine responsiveness in Japanese versus American breast cancer patients. **Cancer Res.** **37**, 106-110 (1977).
 15. 三神俊彦, 浅石和昭, 岡崎 裕, 岡崎 稔, 渡部芳樹, 岡崎 亮, 早坂 滉, 佐藤昌明, 成松英明, 森道夫: 抗 estrogen receptor monoclonal 抗体を用いた乳癌組織切片および細胞塗沫標本の酵素抗体法による検討. **乳癌の臨床** **3**, 436-440 (1988).
 16. Knight, W. A., Livingston, R. B., Gregory, E. J. and McGuire, W. L.: Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. **Cancer Res.** **37**, 4669-4671 (1977).
 17. Aamdal, S., Bormer, O., Jorgensen, O., Host, H., Eliassen, G., Kaalhus, O. and Pihl, A.: Estrogen receptor and long-term prognosis in breast cancer. **Cancer** **53**, 2525-2529 (1984).
 18. Howat, J. M. T., Barnes, D. M., Harris, M. and Swindell, R.: The association of cytosol oestrogen and progesterone receptors with histological features of breast cancer and early recurrence of disease. **Br. J. Cancer** **47**, 629-640 (1983).
 19. Dickson, R. B., Bates, S. E., McManaway, M. E. and Lippman, M. E.: Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. **Cancer Res.** **46**, 1707-1713 (1986).
 20. Rochefort, H., Capony, F., Garcia, M., Cavailles, V., Freiss, G., Chambon, M., Morisset, M. and Vignon, F.: Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: A role in carcinogenesis? **J. Cell. Biochem.** **35**, 17-29 (1987).
 21. Pascal, R. R., Santeusano, G., Sarrell, D. and Johnson, C. E.: Immunohistologic detection of estrogen receptors in paraffin-embedded breast cancers **Hum. Pathol.** **17**, 370-375 (1986).
 22. Panko, W. B., Watson, C. S. and Clark, J. H.: The presence of second specific estrogen binding site in human breast cancer. **J. Steroid Biochem.** **14**, 1311-1316 (1981).
 23. Miller, W. R., Hawkins, R. A. and Forrest, A. P. M.: Significance of aromatase activity in human breast cancer. **Cancer Res.** **42(Suppl.)**, 3365s-3368s (1982).
 24. Waterfield, M. D., Mayes, E. L. V., Stroobant, P.,

- Bennet, P. L. P., Young, S., Goodfellow, P. N., Banting, G. S. and Ozanne, B.: A monoclonal antibody to the human epidermal growth factor receptor. **J. Cell. Biochem.** **20**, 149-161 (1982).
25. Cattoretti, G., Andreola, S., Clemente, C., D'Amato, L. and Rilke, F.: Vimentin and P53 expression on epidermal growth factor receptor-positive, oestrogen receptor-negative breast carcinomas. **Br. J. Cancer** **57**, (1988).
26. Möller, P., Mechttersheimer, G., Kaufmann, M., Moldenhauer, G., Momburg, F. and Mattfeldt, T.: Expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant primary tumors of the breast. **Virchows Arch.** **414**, 157-164 (1989).
27. Sainsbury, J. R. C., Farndon, J. R., Needham, G. K., Malcolm, A. J. and Harris, A. L.: Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. **Lancet** **1**, 1398-1402 (1987).
28. Sainsbury, J. R. C., Farndon, J. R., Sherbet, G. V. and Harris, A. L.: Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. **Lancet** **1**, 364-366 (1985).
29. 齊藤大三, 吉田茂昭, 岡崎伸生, 大倉久直: ヒト胃癌株を用いた 5-fluorouracil と Human Epidermal Growth Factor の併用効果に関する実験的検討. **癌と化学療法** **16**, 2117-2120 (1989).
30. Hennipman, A., van Oirschot, B. A., Smits, J., Rijksen, G. and Staal, G. E. J.: Tyrosin kinase activity in breast cancer, benign breast disease, and normal breast tissue. **Cancer Res.** **49**, 516-512 (1989).
-
- 別刷請求先:
〒060 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学外科学第1講座 三神俊彦

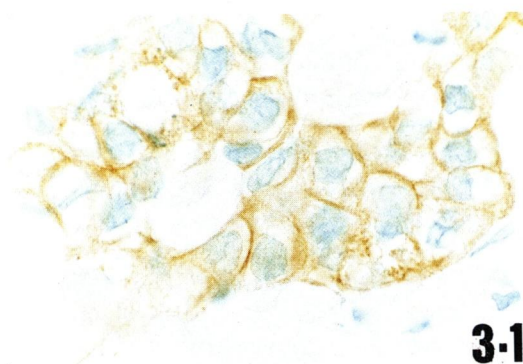


1-1

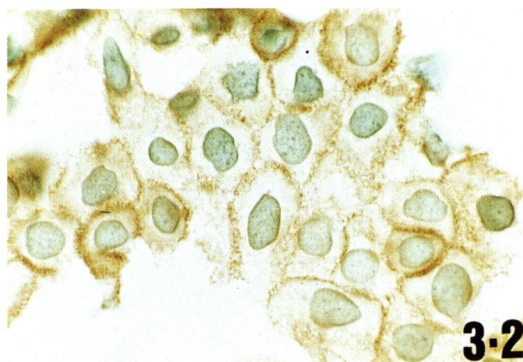


1-2

Fig. 1 Immunohistochemical staining of a frozen section of invasive breast cancer (1-1) and a smear of ER positive cultured cell MCF-7 (1-2) with anti-ER monoclonal antibody (ER-ICA). Nuclear localization of ER and the heterogeneity of the staining can be seen in the frozen section and MCF-7. ($\times 400$)

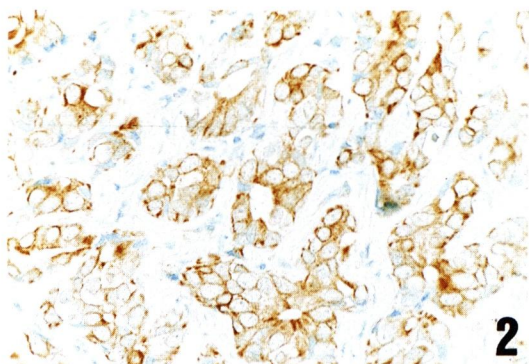


3-1



3-2

Fig. 3 Immunohistochemical staining of a frozen section of invasive breast cancer (3-1) and a smear of EGFR positive cultured cell A-431 (3-2) with anti-EGFR monoclonal antibody (EGFR 1). Localization of EGFR can mainly be seen at the cell membrane and peripheral cytoplasm. ($\times 1000$)



2

Fig. 2 Immunohistochemical staining of a paraffin section of invasive breast cancer with anti-E₂ monoclonal antibody. Cytoplasmic staining can be seen in most of the cancer cells. ($\times 400$)

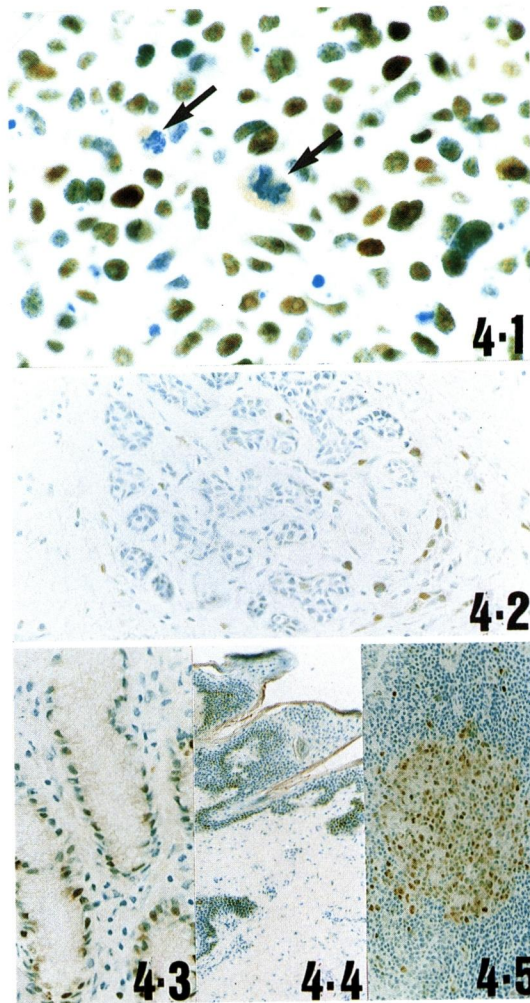


Fig. 4 Immunohistochemical staining of a frozen section with anti-DNA polymerase α monoclonal antibody (CL22-2-42B).
 4-1: Invasive breast cancer. Nuclear staining is seen in a majority of the cancer cells. The arrows show the cytoplasmic staining of cancer cells in M-phase. ($\times 1000$) 4-2: Positive staining can rarely be seen in normal duct cells. ($\times 400$) 4-3: Gastric mucosa ($\times 400$) 4-4: skin ($\times 200$) 4-5: Lymphnode ($\times 400$)