

## 子宮頸部浸潤癌における Epidermal Growth Factor (EGF)

## 受容体発現の免疫組織学的検討

浜松医科大学産科婦人科学教室 (主任: 寺尾俊彦教授)

杉村 基 小林 浩  
金山 尚裕 寺尾 俊彦

## Immunohistochemical Study on the Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) in Invasive Cervical Cancer of the Uterus

Motoi SUGIMURA, Hiroshi KOBAYASHI, Naohiro KANAYAMA  
and Toshihiko TERAO*Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu***概要** 術後進行期 I 期および II 期の子宮頸部浸潤癌 20 症例における epidermal growth factor (EGF) 受容体の発現とリンパ節転移との関係について、免疫組織学的検討を用いて解析を行った。

1) 検討に用いた EGF 受容体に対する単クローン抗体は、その ligand の受容体への結合部位を認識するため、無処理凍結切片による検討のみならず、切片に酸処理を施し、受容体に結合した ligand を除去したのちに染色を行った。しかし、ligand 除去前と後において著明な染色性の差は認めなかった。

2) すべての症例において癌組織内において癌細胞膜に EGF 受容体の発現を認めた。また正常組織では健常部扁平上皮基底層、動脈中膜、間質繊維芽細胞に EGF 受容体の局在を認めた。

3) 癌組織内における EGF 受容体の染色性とリンパ節転移の間には有意に逆の関連性を認めた ( $p < 0.05$ )。

以上より、子宮頸部浸潤癌においては、EGF 受容体の発現が低いほど転移能が高いことが明らかとなった。

**Synopsis** We have investigated the expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in invasive cervical cancer tissue of the uterus to determine whether there is a relationship between the expression of EGF-R and lymph node metastasis.

Frozen sections of surgical specimens from twenty patients with invasive cervical cancer were immunohistochemically stained by the alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase method. The monoclonal antibody 528 we employed reacts with the receptor binding epitope within the EGF molecule, indicating that monoclonal antibody 528 is competitive with ligands such as EGF.

Immunohistochemical staining was carried out before and after dissociation of ligands from the cellular surface of the tumor by acid treatment. However, the staining was resulted in no difference between before and after acid treatment. Consequently, the expression of EGF-R was detected in all cancer tissues as well in some normal tissue such as basal cell layers of epidermis. The expression of EGF-R was related inversely with lymph node metastasis by Wilcoxon rank sum test ( $p < 0.05$ ).

These findings suggest that the expression of EGF-R in cervical cancer does not always lead to tumor growth or tumor invasion, although it does in some types of cancer.

**Key words:** Epidermal growth factor receptor • Lymph node metastasis cervical cancer • Immunohistochemistry

## 緒言

細胞増殖因子の多くは細胞表面の受容体に結合し、細胞内情報伝達系を介して核酸合成に関与し、さらにはタンパク質合成を促進して細胞増殖を来すと考えられている。特に一部の悪性腫瘍におい

てはその受容体の過剰な発現が観察されており、細胞増殖因子の autocrine, paracrine 的作用がその自己増殖に有利に働いている可能性があると考えられている。

Epidermal growth factor (EGF) はその受容

体を介して悪性腫瘍の細胞増殖に関与していることが知られており、膀胱癌<sup>18)~20)27)</sup>、胃癌<sup>35)</sup>、乳癌<sup>25)</sup>等においては受容体の発現とリンパ節転移及び予後と正の関連性が認められるという報告がある。

一方、子宮頸癌においては EGF 受容体<sup>23)</sup>の発現とリンパ節転移との関係について関連性<sup>2)</sup>があるという報告とそれを否定する報告<sup>1)</sup>もあり詳細は不明である。しかしながらこれらの検討は、EGF 受容体に対する単クローン抗体を用いた免疫組織学的検討によりなされることが多いので、使用する抗体の評価を行う必要がある<sup>21)</sup>。何故ならば、用いた抗体が EGF, Transforming growth factor (TGF)-alpha<sup>24)</sup>等 ligand と競合的に受容体と結合する場合、染色性が受容体の発現をそのまま示しているかどうか不明な点があるからである。

そこで、本研究においてはこれらの点を明らかにしたうえで、EGF と子宮頸癌リンパ節転移との関係を明らかにせんとした。すなわち、手術時採取した子宮頸癌新鮮組織より凍結切片を作成し、EGF 受容体に対する単クローン抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。特に用いた単クローン抗体は EGF 受容体の ligand 結合部位を認識し、競合的に結合するため<sup>13)</sup>、組織染色の際、無処理切片についての組織染色のみならず、ligand 除去し<sup>10)29)</sup>受容体を free の状態にしてから組織染色を行い、その両者について検討を行った。

#### 対象及び方法

対象は1989年より1991年までの当科において子宮頸癌の診断のもと広汎性子宮全摘出術を行った浸潤癌20症例である。

摘出標本より癌組織と思われる一部を採取し、ただちに液体窒素中に保存した。摘出標本より組織型、進展の程度、リンパ節転移の有無について病理学的検討を加え、術後進行期を決定した。

液体窒素中に保存した標本を Tissue Tek O.C. T. compound (Ames Division, Miles Laboratories, Elkhart, Ind.) に包埋し、6 $\mu$ m に薄切片凍結切片を作成した。

1% bovine serum albumin (BSA) 加0.05M Tris buffered saline (TBS, pH 7.6) により親

水化した後、ligand 除去のため0.1M NaCl 加50 mM glycine-HCl buffer (pH 3.0) に室温にて3分間酸処理し、ただちに0.1M NaCl 加 Hepes buffer (pH 7.5) で中和し、1mg/ml BSA を含む TBS で4回洗浄した<sup>29)</sup>。

一次抗体として抗 EGF 受容体単クローン抗体 528 (Oncogene Science Inc.) を20 $\mu$ g/ml の濃度で各スライドに添加し4 $^{\circ}$ C over night で反応させた。

酵素抗体法は alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase 法<sup>16)</sup>を用い、発色は1M levamisole 加 naphthol AS-MX phosphate, fast red TR salt により行い、後に Meyer 染色で核染色を行い封入、鏡検した。Negative control として non-immune murine IgG を用いた。また、連続切片の H.E.染色により癌組織を確認した。

染色性の判定は2名の産婦人科医により行い、間質、血管壁等の正常組織での染色性を除き、100倍視野において癌細胞における染色強度、染色頻度により染色性を決定した。染色強度は弱、中、強、の三段階に分類し、染色頻度は各切片の各視野中の癌細胞全体における陽性細胞の比率により、10%以下、10から50%、50%以上の三段階に分類した。染色性は強度、頻度に基づき決定した。

卍は50%以上の頻度、かつ強の強度を、卐は10%以上の頻度、かつ中以上の強度、+は中以上の強度をもつて判定した。リンパ節転移と EGF 受容体との関連性は Wilcoxon rank sum test により検定した。

#### 結 果

写真1に H.E.染色、無処理及び、酸処理による ligand 除去後の凍結切片による EGF 受容体陽性例を示す。A は H.E. 染色、B は無処理凍結切片を用いた免疫組織染色、さらに C は酸処理後凍結切片を用いた染色を示す。B と C はその染色強度、染色頻度に差を認めなかつた。すべての症例において EGF 受容体が癌細胞膜に染色されたが、同一組織内の健常扁平上皮においても従来からの報告どおり、その基底層、動脈中膜及び間質繊維芽細胞に EGF 受容体の局在を認めた。また、EGF 受容体の同一切片内の染色頻度に差は少なく、染

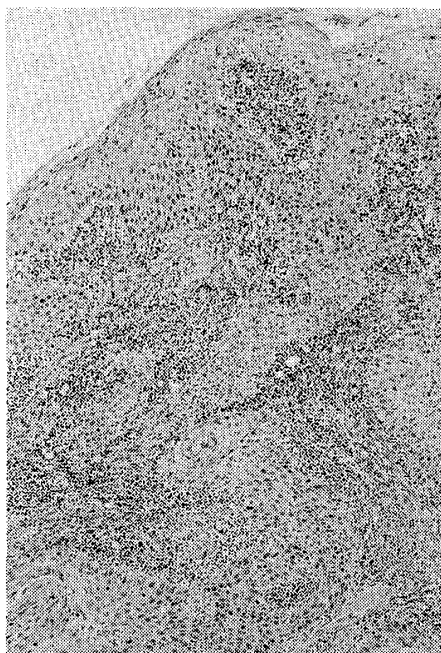


写真 1A 子宮頸部浸潤癌(角化型扁平上皮癌)の H.E. 染色標本 (25×)



写真 1C 酸処理後の EGF 受容体の免疫組織学的染色 (50×)

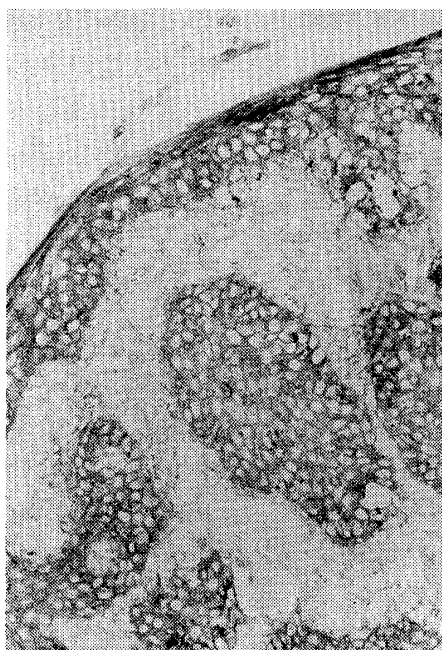


写真 1B 酸処理前の EGF 受容体の免疫組織学的染色 (50×)

色性の判定の多くは癌細胞の染色強度によつた。

表 1 に症例の術後進行期, 病理組織型, リンパ節転移の有無, EGF 受容体の染色性について記した。特に, 癌細胞の EGF 受容体の染色性とリンパ節転移の関係については, 有意に逆の関連性が認

表 1 Patients characteristics and expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in patients with cervical cancer

case	post surgical stage (FIGO)	lymph node metastasis	pathology	EGF-R
1	I a	-	LNK	++
2	I a	-	LNK	+
3	I b	-	K	+
4	I b	-	LNK	++
5	I b	-	K	+
6	I b	+	AS	+
7	I b	-	LNK	++
8	I b	-	K	##
9	I b	-	LNK	+
10	I b	+	LNK	+
11	II a	-	K	++
12	II b	+	S	+
13	II b	+	S	+
14	II b	-	LNK	++
15	II b	-	LNK	++
16	II b	+	LNK	+
17	II b	-	LNK	##
18	II b	+	LNK	++
19	II b	-	LNK	++
20	II b	+	K	+

LNK: large cell non-keratinizing type squamous cell carcinoma, K: keratinizing type squamous cell carcinoma, S: small cell carcinoma, AS: adenosquamous cell carcinoma

められた( $p < 0.05$ ). すなわち EGF 受容体の発現が低いほどリンパ節転移の可能性が高いことが確認された。

### 考 察

細胞増殖因子のひとつである EGF は1962年 Cohen<sup>5)</sup>により発見され, その後アミノ酸配列から構造決定まで行われ, その核酸配列も解明された. さらにその受容体の構造も決定され<sup>30)</sup>, 癌遺伝子のひとつである v-Erb B と相同性が高い<sup>6)</sup>ことから細胞増殖の制御の乱れが癌化に関連するものとして注目を集めた.

一方臨床上的の問題として, EGF 受容体と悪性度に関連した検討では, 膀胱癌では, EGF が通常尿中に高濃度に存在することから, EGF 受容体の発現亢進とリンパ節転移及び予後とに有意な関係があると報告されている<sup>18)</sup>.

in vitro の実験系においては, EGF を培養液中に添加することにより癌浸潤に関与する<sup>11)</sup>といわれる urokinase-type plasminogen activator の産生が高まる<sup>4)17)22)</sup>ことが認められている. 受容体の発現の亢進が ligand との結合を高め, 細胞内情報伝達系を介し核酸合成, ひいてはタンパク質合成の促進を引き起こし細胞増殖並びに癌の浸潤転移に関連したタンパク質の産生を高める可能性も考えられる.

しかし, 婦人科領域での従来の報告では EGF 受容体の発現とリンパ節転移の有無, 予後との関連性の検討の結果が一定ではなかつた. その理由として癌細胞自身, 1) EGF 受容体数のみならず, EGF 受容体の EGF に対する affinity に差がある可能性<sup>26)</sup>, また, 2) 情報伝達系からタンパク質産生までの経路<sup>7)12)14)15)31)</sup>が癌のもつクローンの多様性のためにその調節機構も修飾されて表現されてくる可能性が考えられる.

一方, こうした癌細胞自身の多様性とは別に, 検討方法の違いにより結果に差がでる可能性もある. 子宮体癌や卵巣癌といった, 癌組織が比較的十分に採取できるものにおいては, binding assay を用いることができるため, 受容体の定量的評価は比較的可能である. 膀胱癌における検討では, 免疫組織学的染色性と, binding assay<sup>8)</sup>を用いた

EGF 受容体量に有意に関連性があるという報告もなされている. しかし初期の子宮頸癌においては採取可能な癌組織の量の問題や, 正常組織の混入の問題もあり, 定量的評価が困難となつている. そのため, 免疫組織学的検討が主となるが, 用いた一次抗体が EGF や TGF- $\alpha$  といった ligand の受容体への binding site を認識する場合, 抗体と ligand が競合的に働き, 受容体の染色性がそのまま受容体を示すとは限らない. 今回使用した抗体は, A431より抽出した EGF 受容体に対する抗体であり, その binding site を認識することが知られておりその点の検討が必要である.

しかし, 今回の我々の検討では酸処理未施行の検体と酸処理後の検体に明らかな染色性の差を認めなかつた. 逆に, EGF 受容体の発現が著明であつた1症例について EGF 添加ののちに染色を行つたが(データは示さず)著明な染色性の差は認められなかつた. これはたとえ抗体が ligand の binding site を認識するもの<sup>18)</sup>であつても, 実際は ligand と結合した細胞膜表面の受容体が少ないため<sup>32)</sup>その染色性に差がないのか, もしくは細胞膜より抽出した受容体を用いる binding assay は in vivo とは異なる結果を導く可能性が推測される. つまり, 今回の検討における染色結果は, EGF 受容体の発現をほぼそのまま表していると考えられた.

こうした検討の結果, 子宮頸癌においては EGF 受容体の発現が低下しているほどリンパ節転移の可能性が高くなることが認められた. ただし, 癌組織中の癌細胞の population の多様性を考慮すると, 癌細胞における EGF 及びその受容体の発現と転移浸潤能, さらには種々の治療法に対する感受性, 予後との関係からみた評価には, EGF 受容体を情報伝達系というネットワークのなかで理解すべきであり, 臨床的側面についてはなお一層慎重な検討が必要と思われる.

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました川島吉良, 前浜松医科大学産科婦人科学教室教授, 現学長に感謝いたします. また, 能登裕史講師, 前田 真講師ほか教室員各位の検体採取の際の御協力に感謝します.

## 文 献

1. 植田政嗣：子宮頸癌発生過程における EGF 受容体の発現に関する免疫組織化学的研究。日産婦誌，41：1401，1989。
2. 山崎正明，丸尾 猛，赤堀泰一郎，望月真人：子宮頸部扁平上皮癌における EGF 受容体並びに癌遺伝子 myc 産物の発現に関する免疫組織学的検討。日産婦誌，40：51，1988。
3. Berchuck, A., Soisson, A.P., Olt, G.J., Soper, J. T., Clarke-Pearson, D.L., Bast, R.C. Jr. and McCarty, K.S. Jr.: Epidermal growth factor receptor expression in normal and malignant endometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 161: 1247, 1989.
4. Boyd, D.: Examination of the effects of epidermal growth factor on the production of urokinase and the expression of the plasminogen activator receptor in a human colon cancer cell line. *Cancer Res.*, 49: 2427, 1989.
5. Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.*, 237: 1555, 1962.
6. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M.D.: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307: 521, 1984.
7. Gill, G.N., Kawamoto, T., Cochet, C., Le, A., Sato, J.D., Masui, H., McLeod, C. and Mendelsohn, J.: Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 259: 7755, 1984.
8. Gullick, W.J., Downward, J.H., Marsden, J.J. and Waterfield, M.D.: A radioimmunoassay for human epidermal growth factor receptor. *Anal. Biochem.*, 141: 253, 1984.
9. Gullick, W.J., Marsden, J.J., Whittle, N., Ward, B., Bobrow, L. and Waterfield, M.D.: Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. *Cancer Res.*, 46: 285, 1986.
10. Haigler, H.T., Maxfield, F.R., Willingham, M.C. and Pastan, I.: Dansylcadaverine inhibits internalization of <sup>125</sup>I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 255: 1239, 1980.
11. Hearing, V.J., Law, L.W., Corti, A., Apella, E. and Blasi, F.: Modulation of metastatic potential by cell surface urokinase of murine melanoma cells. *Cancer Res.*, 48: 1270, 1988.
12. Kawamoto, T., Mendelsohn, J., Le, A., Sato, G. H., Lazar, C.S. and Gill, G.N.: Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermoid carcinoma A431 cells. *J. Biol. Chem.*, 259: 7761, 1984.
13. Kawamoto, T., Sato, J.D., Polikoff, A.L., Sato, G.H. and Mendelsohn, J.: Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 1337, 1983.
14. King, I. and Sartorelli, A.C.: Epidermal growth factor receptor gene expression, protein kinase activity, and terminal differentiation of human malignant epidermal cells. *Cancer Res.*, 49: 5677, 1989.
15. Lai, W.H., Cameron, P.H., Wada, I., Doherty, J. J. II, Kay, D.G., Posner, B.I. and Bergeron, J.J. M.: Ligand-mediated internalization, recycling, and down regulation of the epidermal growth factor receptor in vivo. *J. Cell Biol.*, 109: 2741, 1989.
16. Lee, L.B. and Weinstein, I.B.: Epidermal growth factor, like phorbol esters, induces plasminogen activator in HeLa cells. *Nature*, 274: 696, 1978.
17. Mason, D.Y. and Sammons, R.: Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J. Clin. Pathol.*, 31: 454, 1978.
18. Messing, E.M.: Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res.*, 50: 2530, 1990.
19. Neal, D.E., Marsh, C., Bennett, M.K., Abel, P. D., Hall, R.R., Sainsbury, J.R.C. and Harris, A. L.: Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: Comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet*, 1: 366, 1985.
20. Neal, D.E., Sharples, L., Smith, K., Fennelly, J., Hall, R.R. and Harris, A.L.: The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, 65: 1619, 1990.
21. Neal, D.E., Smith, K., Fennelly, J.A., Bennet, M.K., Hall, R.R. and Harris, A.L.: Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: A comparison of immunohistochemistry and ligand binding. *J. Urol.*, 141: 517, 1989.

22. Niedbala, M.J. and Sartorelli, A.C. : Regulation by epidermal growth factor of human squamous cell carcinoma plasminogen activator-mediated proteolysis of extracellular matrix. *Cancer Res.*, 49 : 3302, 1989.
23. Pfeiffer, D., Stellwag, B., Pfeiffer, A., Borlinghaus, P., Meier, W. and Scheidel, P. : Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.*, 33 : 146, 1989.
24. Reynolds, F.H. Jr., Todaro, G.J., Fryling, C. and Stephenson, J.R. : Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of EGF receptors. *Nature*, 292 : 259, 1981.
25. 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, 1985.
26. Schlessinger, J. : Allosteric regulation of the epidermal growth factor receptor kinase. *J. Cell Biol.*, 103 : 2067, 1986.
27. Smith, K., Fennelly, J.A., Neal, D.E., Hall, R.R. and Harris, A.L. : Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer Res.*, 49 : 5810, 1989.
28. Steele, R.J.C., Kelly, P., Ellul, B. and Eremin, O. : Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptors on human colonic carcinomas. *Br. J. Cancer*, 61 : 325, 1990.
29. Stoppelli, M.P., Tacchetti, T., Cubellis, M.V., Corti, A., Hearing, V.J., Cassani, G., Apell, E. and Blasi, F. : Autocrine saturation of pro-urokinase receptors on human A431 cells. *Cell*, 45 : 675, 1986.
30. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Liebermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, V., Waterfield, M.D. and Seeburg, P.H. : Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309 : 418, 1984.
31. Ushiro, H. and Cohen, S. : Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J. Biol. Chem.*, 255 : 8363, 1980.
32. Wiley, H.S. and Cunningham, D.D. : The endocytotic rate constant. *J. Biol. Chem.*, 257 : 4222, 1982.
33. Wu, D., Wang, L., Sato, G.H., West, K.A., Harris, W.R., Crabb, J.W. and Sato, J.D. : Human epidermal growth factor (EGF) receptor sequence recognized by EGF competitive monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, 264 : 17469, 1989.
34. Yamamoto, T., Kamata, N., Kawano, H., Shimizu, S., Kuroki, T., Toyoshima, K., Rikimaru, K., Nomura, N., Ishizaki, R., Pastan, I., Gamou, S. and Shimizu, N. : High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 46 : 414, 1986.
35. Yasui, W., Hata, J., Yokozaki, H., Nakatani, H., Ochiai, A., Ito, H. and Tahara, E. : Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, 41 : 211, 1988.

(No. 7175 平4・2・7受付)