

卵巣癌の予後に関する HSP 27の免疫組織化学的検討

～第1報～

最適な評価法に関する研究

前畑賢一郎

「目的」heat shock protein 27 (HSP 27) の免疫組織化学的な発現が上皮性卵巣癌の予後因子として意義があるかどうかを検討するために、最適な判定基準を作成することを試みた。

「材料と方法」上皮性卵巣癌71症例の組織切片を用い、免疫組織化学的に HSP 27を染色した。Geisler らと Arts らおよび著者らの基準に従って HSP 27の染色性をそれぞれ評価し、予後との関連について解析を行った。

「結果」陽性の cut off を25%以上に設定した著者の評価方法での生存解析と Geisler らの基準を一部変更した生存解析で、HSP 27陽性群の予後が有意に不良であった。しかし、他の評価方法を行った場合には生存曲線に有意な差はみられなかった。Geisler らの本来の評価方法でも HSP 27発現スコアの平均は生存群で4.97、死亡群では6.16であり、有意な差がみられなかった。

「考察」上皮性卵巣癌の予後因子として HSP 27の発現を検討する場合に、我々の作成した25%陽性基準は適切であることが示唆された。
(平成14年8月28日受理)

Immunohistochemical Study of HSP 27 in Ovarian Cancer, 1st Report — Determination of Optimal Evaluation Method —

Kenichiro MAEHATA

Objectives : To determine which staining evaluation method is best for determining the immunohistochemical expression of heat shock protein 27 (HSP 27), which could be the most significant prognostic factor in epithelial ovarian cancer patients.

Methods : Expression of HSP 27 was studied in 71 epithelial ovarian cancer patients by immunohistochemical staining. The relationship between survival analysis and the expression was determined by some staining evaluation methods ; Geisler's, Arts' and ours.

Results : Survival analysis using our 25% cut-off scale ($p < 0.01$) and one of Geisler's modified staining evaluation methods ($p < 0.05$) demonstrated that HSP 27 expression is significantly related to a poor survival rate, but this relationship did not reach statistical significance when evaluated by Arts' method, another method of Geisler's and our 50% cut-off scale. The mean HSP 27 staining score in deceased patients (6.16) was not significantly different from that in surviving

patients (4.97) by Geisler's original staining evaluation method.

Conclusion: The current study data suggest that our staining evaluation method (25% cut-off scale) is the most satisfactory and that HSP 27 expression is significantly related to a poor survival rate. (Accepted on August 28, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28 (3): 157-164, 2002

Key Words ① HSP 27 ② Ovarian carcinoma
③ Immunohistochemistry ④ Clinical evaluation

はじめに

卵巣癌の臨床において進行期, 組織型, 分化度などが予後因子として重要視されている。しかし卵巣癌の予後は, これらの因子によっても必ずしも正確に推測できない場合が多く, 近年は p 53 に代表されるような分子生物学的な側面から, あるいは臨床病理学的には Shimizu らの報告による universal grading system など様々な見地から多くの研究がなされるようになった^{1)~4)}。

Heat shock protein (HSP) は抗癌剤などの感受性に関連しているといわれるが^{5), 6)}, 最近, 各種の悪性腫瘍において予後を判定する指標となるという報告がみられる^{7)~12)}。一方 HSP のうち HSP 27 に関しては, 卵巣癌の免疫組織化学的検討でその発現が予後不良あるいは逆に良好因子にもなるという相反する報告がなされており, その評価は定まっていない^{13), 14)}。その原因のひとつは HSP 27 の染色性の判定基準に統一された見解がなく, 報告者によって異なった結果が得られたことが考えられる。例えば, 実際に Geisler ら¹³⁾と Arts ら¹⁴⁾の研究内容を見ると共通点はなく, それぞれ独自の評価法で検討されていた。そこで今回, 上皮性卵巣癌の HSP 27 の染色性について新たに判定基準を作ってその妥当性を検討し, あわせて自験例を用いて Geisler らと Arts らの基準の再評価を行った。

対象と方法

1) 対象

1985年から1999年にかけて, 川崎医科大学附属病院産婦人科で経験した表層上皮性・間質性卵巣悪性腫瘍のうち予後の追求が可能であった71例を対象とした。組織型の内訳は漿液性腺癌33例, 粘液性腺癌7例, 類内膜腺癌12例, 明細胞癌17例, 未分化癌2例で, 臨床進行期はI期41例, II期16例, III期37例, IV期3例, 再発3例であった。腫瘍分化度は Shimizu らが提唱した universal grading system^{3), 4)}に従って判定し, Grade 1 は25例, Grade 2 は31例, Grade 3 は15例であった (Table 1)。観察期間は1~162カ月 (平均48.2カ月) であった。

2) HSP 27免疫組織化学染色方法

最も特徴的な腫瘍像を反映した切片と同一部の10%ホルマリン固定・パラフィンブロックを用い, 4 μm に薄切した免疫組織化学染色用のスライド標本を作製した。陽性コントロールとして HeLa 細胞を用いた。HSP 27 に対する一次抗体として, SPA-800, mouse monoclonal IgG₁ (StressGen, Victoria, Canada) を使用し ENVISION PLUS 法にて染色した。すなわち脱パラフィン・脱キシレン後, 5分間のマイクロウェーブ加熱処理による抗原賦活化を行った。冷却後に, 3% H₂O₂ による内在性ペルオキシ

Table 1. Clinical and pathological characteristics and universal grading system

| | Grade 1 (n=25) | Grade 2 (n=31) | Grade 3 (n=15) |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Serous (n=33) | 4 | 16 | 13 |
| Mucinous (n=7) | 5 | 2 | 0 |
| Endometrioid (n=12) | 8 | 3 | 1 |
| Clear cell (n=17) | 8 | 9 | 0 |
| Undifferentiated (n=2) | 0 | 1 | 1 |
| FIGO stage | | | |
| I (n=19) | 7 | 10 | 2 |
| II (n=13) | 7 | 3 | 3 |
| III (n=33) | 8 | 15 | 10 |
| IV (n=3) | 1 | 2 | 0 |
| Rec. (n=3) | 2 | 1 | 0 |

ダーゼ阻害を5分間行った。PBSにて洗浄した後、ブロッッキング試薬を10分間反応させた。一次抗体は200倍に希釈し室温にて60分間反応させた。PBS洗浄後、ENVISION試薬を室温にて30分間反応させ、PBS洗浄した後、diaminobenzidine (DAB)による発色を行い、ヘマトキシリン染色をした。

3) 染色性判定方法

染色結果は、染色強度と染色率の2項目で総合的に評価した。まず、コントロールと比較した上で、腫瘍細胞の細胞質がDABの発色にて明らかにこげ茶色に染色されていたもの（一般的に moderate, strong positive ないし +, ++ と判定されるもの）を発現腫瘍細胞と判定した。ただし、一般的に weak や ± などに判定されるような微妙な染色結果を呈したものは発現なしとした (Fig. 1)。そして全腫瘍細胞に対する発現腫瘍細胞の比率を算出した。この結果を25%以上または50%以上にて陽性と判定する2種類の基準にあてはめ、陰性群と陽性群の2群にそれぞれ分類した。この2群間における生存曲線との関連について検討した。

生存曲線はKaplan-Meier法で求め、両曲線の有意差はlog rank testで検定し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4) 他の判定基準との比較

明確な判定基準が示された報告のなかで、卵巣癌に関する研究は Geisler ら¹³⁾と Arts ら¹⁴⁾の報告のみであった。しかも彼らは異なる結論を導いていたため、両者の基準を選択し比較検討することにした。

各基準に従い染色性を判定した。Geisler らの基準に従った結果からは、死亡群と生存群との2群間で平均スコアの比較検討を行った。さらにスコア毎に段階的に cut-off 値を設定し陰

性群、陽性群の2群に分類したうえで生存曲線との関連について検討した。Arts らの基準に従った結果からは、陰性群、陽性群の2群で生存曲線との関連について検討した。

結 果

Figure 1 に HSP 27 の免疫組織化学的染色像を呈示した。HSP 27 の発現は細胞質主体にみられ核内でも認められた。Table 2 に同一症例を対象にした各基準別の HSP 27 の陽性率を示す。HSP 27 の陽性率は著者らの25%以上を陽性とした場合には69.0%、50%以上を陽性とし

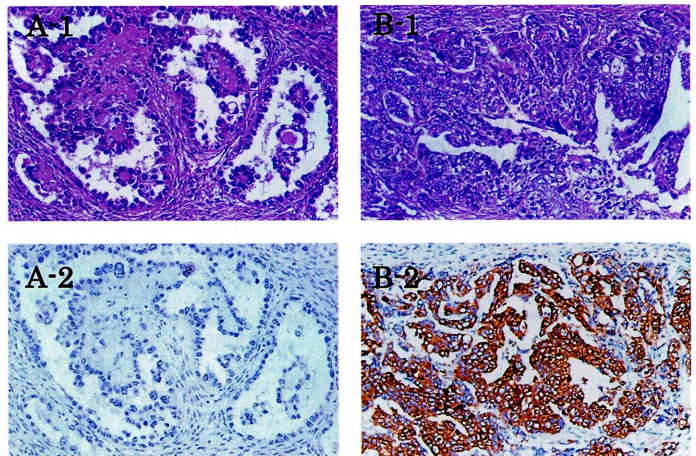


Fig. 1. Immunohistochemical stain for HSP 27 in ovarian carcinoma

A-1. Clear cell adenocarcinoma (HE × 100)

A-2. Clear cell adenocarcinoma (Immunohistochemistry × 100) Note that HSP 27 is negative in this case

B-1. Serous adenocarcinoma (HE × 100)

B-2. Serous adenocarcinoma (Immunohistochemistry × 100) Note that HSP 27 is positive in this case

Table 2. HSP 27 expression in ovarian carcinoma

| | HSP 27 | |
|-----------------------------------|---------------|---------------|
| | Positive rate | Negative rate |
| Maehata (25%) | 69.0% (n=49) | 31.0% (n=22) |
| Geisler's scale (cut-off score 3) | 71.8% (n=51) | 28.2% (n=20) |
| Arts' scale | 83.1% (n=59) | 16.9% (n=12) |
| Maehata (50%) | 53.5% (n=38) | 46.5% (n=33) |

た場合は53.5%となった。Geislerらは特に陽性率を示していないが、彼らのスケールでスコア3以上を陽性として著者らが検討してみると陽性率は71.8%になった。Artsらのスケールでは83.1%と高い陽性率となった。

我々の基準において陽性のcut offを25%以上に設定した場合の生存解析では、陽性群が有意に予後不良であった ($p < 0.01$)。しかし、cut offを50%に設定したものでは、HSP 27陽性群と陰性群の間では生存曲線に有意差はなかった ($p = 0.9170$) (Fig. 2)。

我々の上皮性卵巣癌の症例をGeislerの評価法で判定してみると、スコアの平均が生存群(39例)が4.97、死亡群(32例)が6.16となった。有意差はなかったものの死亡群での値が高い傾向にあり、Geislerの報告¹³⁾と相反する結

果となった。しかし、Geislerの基準を変更して、スコア0~2を陰性群、スコア3以上を陽性群として生存解析してみると、この場合には有意に陽性群が予後不良であった ($p < 0.05$)。その他の場合には統計学的な差はみられなかった (Fig. 3)。なお、生存解析で有意差を認めた我々の基準(25%)とこの変更したGeislerの基準(cut off score 3)による陽性率は約70%で近似していた。

Artsの基準を用いた生存解析では、有意差はないものの ($p = 0.4557$) 陰性群にくらべ陽性群で低い生存率を示す傾向がみられ、彼らの報告¹⁴⁾と同様の結果が得られた (Fig. 4)。

考 察

今回我々は、卵巣癌におけるHSP 27の発現を免疫組織化学的に追求し、新しい判定基準を作ってその予後因子としての可能性について検討を行った。我々の基準(25%以上を陽性と判定する基準)を用いた場合、陽性群は陰性群に比較して有意に予後不良であった。またHSP 27の陽性率は、我々の基準とGeislerらの基準では、ほぼ同様であった。したがって、HSP 27の発現は卵巣癌では予後不良因子となる可能性があり、その発現を評価するのに我々の基準は有用であると考えられた。

卵巣癌以外の他の悪性腫瘍におけるHSP 27の発現については乳癌^{12), 15)}、肝細胞癌⁸⁾、脳腫瘍^{16), 17)}、前立腺癌¹⁸⁾、食道癌^{7), 9)}、舌癌¹⁹⁾などで検討されている。しかし、これらの報告^{7)~20)}を通して染色性や予後を判定していくうえで特に統一された基準はなかった (Table 3)。また、予後因子としての意義も悪性腫瘍により異なった結論が導かれており、その原因が判定基準の不統一性に基づくものなのか、HSP 27そのものの生物学的特徴なのかは不明である。

我々の基準では染色強度において一般的に±あるいはweakly positiveと判定されるものを発現なしとした。また、染色率に関しても10%な

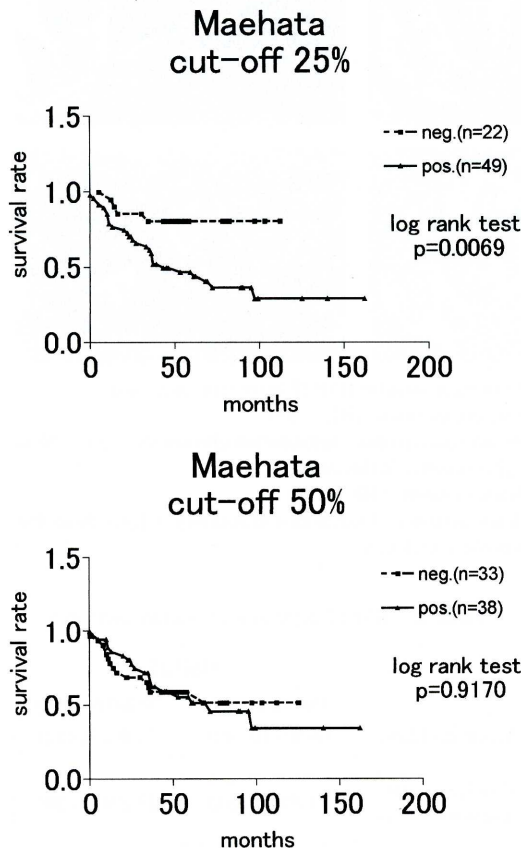


Fig. 2. Overall survival for ovarian carcinoma by HSP 27 expression (Maehata's scale) (Kaplan-Meier method, Log-rank test, $P < 0.05$)

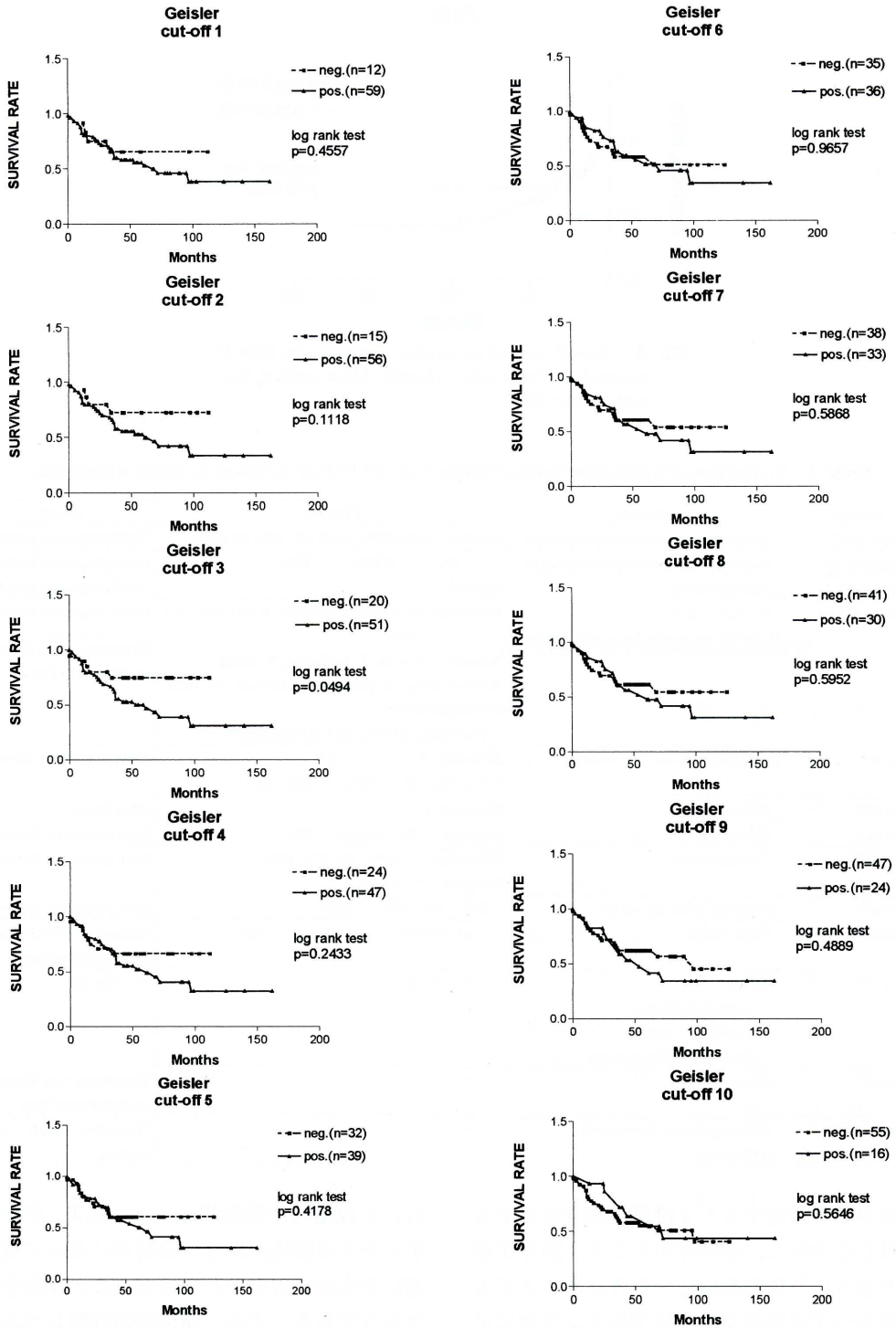


Fig. 3. Overall survival for ovarian carcinoma by HSP 27 expression (Geisler's scale) (Kaplan-Meier method, Log-rank test, $P < 0.05$)

Arts

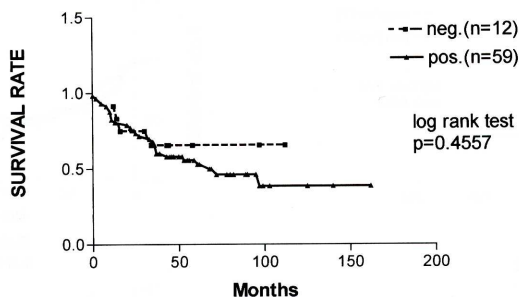


Fig. 4. Overall survival for ovarian carcinoma by HSP 27 expression (Arts' scale) (Kaplan-Meier method, log-rank test, $p < 0.05$)

Table 3. Comparison of immunohistochemical staining scale and HSP 27 expression in relation to prognosis

| Author | Disease | Criteria | Result |
|-----------------------------------|--|--|---|
| Nakajima et al ⁷⁾ | Squamous cell carcinoma, esophagus | negative : fewer 20%, positive : 20% or more | Good prognostic factor |
| Kawanishi et al ⁹⁾ | Squamous cell carcinoma, esophagus | - : < 5%, ± : 5-80%, + : 80% < | Good prognostic factor |
| Ungar et al ¹⁰⁾ | neuroblastoma | original | Good prognostic factor |
| Geisler et al ^{13), 20)} | Ovarian cancer | Percentage : 0: < 10%, 1: 10 - 25%, 2: 26 - 50%, 3: > 50% | Good prognostic factor |
| | Endometrial cancer | Intensity : 1: weak, 2: moderate, 3: strong Heterogeneity: 1: marked, 0: moderate, + 1: mild Final score(0~10) = Percentage x Intensity + Heterogeneity | Expression was dependent on histological type |
| Tetu et al ¹¹⁾ | Malignant fibrous histiocytoma | Intensity : 0, +, 2+, 3+ Percentage : 0, < 10%, 10-50%, 50% < | Good prognostic factor |
| Love et al ¹⁵⁾ | Breast cancer | Stain index | No relation |
| Thor et al ¹²⁾ | Breast cancer | negative : 1-9%, positive : 10% < | Poor prognostic factor |
| Arts et al ¹⁴⁾ | Ovarian cancer | Percentage : < 10%, 10-50%, 50% < Intensity : -, ±, +, ++ | Poor prognostic factor |
| King et al ⁸⁾ | Hepatocellular carcinoma | ~25% : low, 26%~ : high | Poor prognostic factor |
| Hitotsumatsu et al ¹⁶⁾ | Brain tumors | - : no or often, + : < 50%, 2+ : 50% < | Expression was dependent on histological type |
| Ito et al ¹⁹⁾ | Tongue Normal epithelium Dysplastic lesions Squamous cell carcinoma | -, ±, +, 2+ | No relation |
| Kato et al ¹⁷⁾ | Brain tumors | - or + | Expression was dependent on histological type |
| Thomas et al ¹⁸⁾ | Benign prostatic hyperplasia malignancy | - or + | Correlated with tumor grading |

どの低い値の設定や3~4段階に細分類化することはしなかった。その理由として、向井が指摘したように²¹⁾免疫組織化学染色はあくまでも定性的かつ半定量的な検査法であり、完全に定量化した判定はそもそも困難であるということに基づいている。そのため曖昧な染色結果を示したものを取り扱う場合や細分類化する過程に

において疑陽性や疑陰性などの“誤差”が生じやすくなる可能性があり、診断者によって見解の違いを生む要因のひとつになることが懸念されたからである。また、卵巣癌の細胞レベルでの遺伝子変化は非常に多彩で、分子生物学的に単一の責任遺伝子が同定されていない現状を考えれば、個々の細胞において多段階的なあるいは

複合的な異常が起きていると考えられる。そのため p 53, ER, PgR などすでにコンセンサスが得られつつあるものを除き 10% 程度の低い発現細胞数で病変（腫瘍）自体を陽性と判定することに疑問があり、陽性基準を高めに設定した。

これまでに HSP 27 と卵巣癌との関連性については幾つか報告されている。Langdon らは ELISA 法にて HSP 27 の発現が高いほど生存率が低かったとしている²²⁾。免疫組織化学的検討では、Arts らは HSP 27 の発現が認められた場合、Ⅲ・Ⅳ期症例に限れば有意に生存率は低く、全進行期でも低い傾向であったとしている。一方、Geisler らは HSP 27 の発現は 2 年生存率では良好な因子であると報告している。我々の結果は、Langdon らや Arts らの見解と同様であった。しかし、Geisler らの基準に準じて行った検討では、生存群、死亡群での平均スコアが彼らと相反する結果となった。彼らが HSP 27 が予後良好な因子であるとの結果を得た理由は、観察期間が 2 年間であったこと、新鮮凍結切片を用いていたこと、抗体の希釈濃度が異なっていたこと、そして ABC 法を用いていたことな

ど、検討方法が異なるためかもしれない。いずれにしても一定条件のもとで、より多数例での検討を行うことが必要であると思われる。今後は、他の HSP family や p 53, Ki-67 などの分子生物学的マーカーとの関連を追求し、Shimizu らの universal grading system, 組織型, 進行期, 再発および化学療法との関連についてもより詳細な検討を重ね、HSP 27 の予後因子としての有用性についてさらに検討したい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と校閲を賜りました川崎医科大学産婦人科教室河野一郎教授に深謝いたしますと共に、終始有益な御助言とご協力を頂いた前川崎医科大学病理学教室真鍋俊明教授、川崎医科大学病理学教室三上芳喜講師、川崎医科大学産婦人科教室藤原恵一助教授に感謝いたします。また同病理学教室員の方々に感謝いたします。本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費（12-119, 13-103）、文部省科学研究費補助金（13671758）からの援助を受けた。

文 献

- 1) Vogl FD, Frey M, kreienberg R, Runnebaum IB : Autoimmunity against p 53 predicts invasive cancer with poor survival in patients with an ovarian mass. *Br J Cancer* 83 : 1338 - 1343, 2000
- 2) Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, Oishi T, Takahashi M, Shimada M, Kamazawa S, Sato S : Alteration of a p 53 gene status affects outcome of patients with recurrent ovarian cancer. *Oncol* 58 : 237 - 241, 2000
- 3) Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Hasumi K, Akiyama F, Silverberg SG : Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features—problems involved in the architectural grading system. *Gynecol Oncol* 70 : 2 - 12, 1998
- 4) Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG : Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma : testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer* 82 : 893 - 901, 1998
- 5) Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y : Heat shock protein 27 was up-regulated in cisplatin resistant human ovarian tumor cell line and associated with the cisplatin resistance. *Cancer Lett* 168 : 173 - 181, 2001
- 6) Fujiwara K, Shirafuji H, Fushitani K, Fujimoto K, Kohno I, Modest EJ : Change in the localization of heat shock protein 27 (HSP 27) in BG-1 human ovarian cancer cells following treatment by the ether lipid ET-18-OCH3. *Anticancer Res* 19 : 181 - 187, 1999
- 7) Nakajima M, Kuwano H, Miyazaki T, Masuda N, Kato H : Significant correlation between expression of heat shock proteins 27, 70 and lymphocyte infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 178 : 99 - 106,

2002

- 8) King KL, Li AF, Chau GY, Chi CW, Wu CW, Huang CL, Lui WY : Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival. *Cancer* 88 : 2464 - 2470, 2000
- 9) Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, Tsujinaka T, Shamma A, Monden M : Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 85 : 1649 - 1657, 1999
- 10) Ungar DR, Hailat N, Strahler JR, Kuick RD, Brodeur GM, Seeger RC, Reynolds CP, Hanash SM : Hsp 27 expression in neuroblastoma : correlation with disease stage. *J Natl Cancer Inst* 86 : 780 - 784, 1994
- 11) Tetu B, Lacasse B, Bouchard HL, Lagace R, Huot J, Landry J : Prognostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma : a clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res* 52 : 2325 - 2328, 1992
- 12) Thor A, Benz C, Moore ID, Goldman E, Edgerton S, Landry J, Schwartz L, Mayall B, Hickey E, Weber LA : Stress-response-protein (srp 27) determination in primary human breast carcinomas : clinical, histologic and prognostic correlations. *J Nat Cancer Inst* 83 : 170 - 178, 1991
- 13) Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W : Heat shock protein 27 : an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 69 : 14 - 16, 1998
- 14) Arts HJ, Hollema H, Lemstra W, Willemse PH, De Vries EG, Kampinga HH, Van der Zee AG : Heat-shock-protein -27 (hsp 27) expression in ovarian carcinoma : relation in response to chemotherapy and prognosis. *Int J Cancer* 84 : 234 - 238, 1999
- 15) Love S, King RJ : A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 69 : 743 - 748, 1994
- 16) Hitotsumatsu T, Iwaki T, Fukui M, Tateishi J : Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha B-crystallin) in human brain tumors. *Cancer* 77 : 352 - 361, 1996
- 17) Kato M, Herz F, Kato S, Hirano A : Expression of stress-response (heat-shock) protein 27 in human brain tumors : an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 83 : 420 - 422, 1992
- 18) Thomas SA, Brown IL, Hollins GW, Hocken A, Kirk D, King RJ, Leake RE : Detection and distribution of heat shock proteins 27 and 90 in human benign and malignant prostatic tissue. *Br J Urol* 77 : 367 - 372, 1996
- 19) Ito T, Kawabe R, Kurasono Y, Hara M, Kitamura H, Fujita K, Kanisawa M : Expression of heat shock proteins in squamous cell carcinoma of the tongue : an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 27 : 18 - 22, 1998
- 20) Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z : A study of heat shock protein 27 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 72 : 347 - 350, 1999
- 21) 向井 清 : 免疫組織化学と in situ hybridization のすべて (長村義之, 笹野公伸編). 病理と臨床第18巻臨時増刊号. 文光堂. 2000, pp 63 - 68
- 22) Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJB, Hawkins RA, Smyth JF, Miller WR : Expression of the heat-shock protein hsp 27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1 : 1603 - 1609, 1995