

# 甲状腺腫瘍における塩基性線維芽細胞 増殖因子の発現に関する検討

新宮 聖士

信州大学医学部第2外科学教室

(指導: 飯田 太教授)

## Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in Thyroid Tumors

Kiyoshi SHINGU

Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Futoshi IIDA)

The expression and biological significance of basic fibroblast growth factor (bFGF) in human thyroid neoplasms were studied using immunohistochemical and biochemical procedures.

Eighty malignant tumors (50 papillary carcinomas, 14 follicular carcinomas, 9 medullary carcinomas, and 7 anaplastic carcinomas), 11 follicular adenomas, 6 adenomatous goiters, and 6 Graves' strumas were used for this study. An anti-human bFGF polyclonal antibody was used as a primary antibody for immunostaining and extract of malignant thyroid tumor tissues was examined by Western blotting to elucidate the molecular weight form.

Immunohistochemical staining of bFGF revealed a positive reaction on the cytoplasm of malignant thyroid tumors more frequently than in benign diseases. The immunohistochemical reaction was observed in all cases of low grade differentiation of both papillary and follicular carcinomas and the sporadic type of medullary carcinoma. Anaplastic carcinoma showed an apparently intense reaction to bFGF antibody in all cases. The frequency of the positive reaction in papillary carcinoma was related to the extent of lymph node metastasis but not to tumor size. Western blot analysis of bFGF demonstrated bFGF band at 33KDa in addition to the regular band at 18KDa in anaplastic carcinoma.

This study made it clear that the expression of bFGF was closely related to the degree of malignancy and that the bFGF-like protein at 33KDa might have some influence on tumor growth. *Shinshu Med J* 42 : 359-369, 1994

(Received for publication April 12, 1994)

---

**Key words:** basic fibroblast growth factor, thyroid tumor

塩基性線維芽細胞増殖因子, 甲状腺腫瘍

---

### I 緒 言

線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, 以下 FGF) は, 腫瘍増殖, 血管新生, 損傷組織の修復,

別刷請求先: 新宮 聖士

〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部第2外科

神経細胞の成長, 中胚葉組織の誘導等, 多岐にわたる機能を持つポリペプチドと考えられている<sup>1)~7)</sup>。FGFは現在までにアミノ酸配列に相同性を持つ8種類のファミリーが知られている<sup>8)</sup>。なかでも塩基性 FGF (basic FGF, 以下 bFGF) は, 1970年代にウシの脳および下垂体から単離され, マウス培養線維芽細胞の

増殖を促進する因子としてはじめて報告された<sup>9)10)</sup>。その後 bFGF は生体内のほとんど全ての組織に広く分布していることが、生化学的あるいは免疫学的分析により明らかとなった<sup>11)12)</sup>。しかしながら、数年前までは生体内での bFGF の正確な生理学的意義についてはほとんど知られていなかった。

最近、Zagzag ら<sup>13)</sup>は免疫組織化学的手法を用いて、bFGF がヒト星状膠細胞腫における腫瘍増殖および血管新生に重要な役割を果たしている可能性を報告している。さらに、Emoto ら<sup>14)</sup>は正常ブタ甲状腺組織に bFGF が存在することを示し、それが局所の成長と機能を調節する因子の1つとして作用することを示唆した。しかし、ヒト甲状腺腫瘍細胞において bFGF 活性を検討した報告は未だみられない。

腫瘍細胞が bFGF を産生する場合、その効果として次の3つの可能性が考えられる。すなわち、①腫瘍細胞自身の増殖促進効果、②宿主血管内皮細胞の増殖促進効果、③宿主線維芽細胞の増殖促進効果である。

そこで本研究では、ヒト甲状腺腫瘍における bFGF の生物学的重要性を明らかにするために、腫瘍細胞における bFGF の発現、局在ならびに分子量の検討を行った。また腫瘍間質の増殖活性を調べるために、cell cycle において増殖期に出現するとされている proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA)<sup>15)~19)</sup>の間質における発現を検討した。

## II 対 象

信州大学第2外科において外科的治療を行った甲状腺疾患患者の切除材料を本研究に供した。その内訳は甲状腺癌80例(乳頭癌50例、濾胞癌14例、髓様癌9例、未分化癌7例)、濾胞腺腫11例、腺腫様甲状腺腫6例、パセドウ病6例である。これらの症例の病理組織学的診断は World Health Organization criteria<sup>20)</sup>に従った。また乳頭癌および濾胞癌症例に関しては Sakamoto ら<sup>21)</sup>の提唱した分化度分類に従い、高分化型と低分化型に分類した。さらに乳頭癌50例は全て Union Internationale Contre le Cancer (UICC) の TNM 分類に従って分類し、検討した。髓様癌9例に関しては散発性と家族性に分け、比較検討した。一方、乳頭癌9例の切除材料の非癌部分を正常組織として取り扱った。

## III 方 法

### A bFGF 免疫組織染色

手術材料から得られた甲状腺組織切片を直ちに10%中性ホルマリンにて固定し、エタノール系列で脱水した後、パラフィン包埋した。このパラフィン包埋ブロックより4 μmの薄切切片を作製し、スライドガラスに貼付した。キシレンにて脱パラフィンし、エタノール系列で親水化した後、室温で0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加メタノール溶液と30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化した。

免疫染色は、抗ヒト bFGF ポリクローナル抗体(ウサギ IgG) (Oncogene Science, NY, U. S. A.) を一次抗体として、50倍希釈溶液に室温で60分間反応させた後、Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, CA, U. S. A.) を用い、Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (以下 ABC) 法<sup>22)</sup>にて行った。ビオチン化抗ウサギ抗体(ヤギ IgG) と室温で60分間反応させ、さらに ABC 溶液と室温で60分間反応させた後、DAB 溶液と反応させ可視化した。ヘマトキシリンにて核染色を行い、脱水、透徹、封入後、光学顕微鏡にて観察した。染色反応の判定は、反応物質が腫瘍細胞全てに認められる場合を陽性、反応物質が一部の腫瘍細胞にしか認められない場合およびまったく認められない場合を陰性として判定した。

なお陽性対照としては、これまでに免疫組織化学的手法により bFGF の発現が確認されているヒト汗腺<sup>23)</sup>を用い、陰性対照としては、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清を使用した。

### B PCNA 免疫組織染色

対象症例の中から無作為に乳頭癌を10例および濾胞腺腫4例を選び、抗 PCNA モノクローナル抗体(日化機、東京)を用い、Shimizu ら<sup>24)</sup>の方法に従って免疫組織染色を行った。この組織標本を光学顕微鏡で観察し、間質を中心に1例につき5~7視野撮影した。現像されたプリントの間質以外の部分を黒く塗りつぶし(図1)、画像解析装置(Macintosh, Quadra 900)で間質の面積比率を計算した。これをもとにプリント上の間質の面積(cm<sup>2</sup>)を求め、間質の PCNA 陽性細胞をカウントし密度(個/cm<sup>2</sup>)を計算した。

### C Western blot 法

前述の bFGF 免疫組織染色にて陽性と判定された乳頭癌および未分化癌のうち、凍結組織の入手が可能であった乳頭癌10例、未分化癌2例を用い、発現している bFGF の分子量を検討した。これらの組織は切除後直ちに凍結され、-80°C下で保存されていたものである。組織を4倍量の水冷した0.01M Tris-HCl, pH

7.4, 1 M NaCl, 0.1%(w/v) 3-[ (3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 0.2mg/ml leupeptin, 0.001M phenylmethylsulfonylfluoride でホモジナイズし, 100,000×g で60分間遠心した。この上清を室温で同量の0.01M Tris-HCl, pH7.4で希釈し, ヘパリンセファロース・カラム (Pharmacia, NJ, U. S. A.) に流し, さらに0.01M Tris-HCl, pH 7.4, 2M NaCl, 0.1%(w/v) CHAPS で溶出することにより比較的濃度の高いbFGFを含む溶液が得られた。これを sodium dodecylsulfate (SDS) サンプルバッファーに溶解後, 16% SDS-ポリアクリルアミドゲルに負荷し, 電気泳動を行った。分子量検討のための分子量マーカー (東レ・メディカル, 東京) と同時に対照としてリコンビナント・ヒト bFGF (Sigma Chemical, MO, U. S. A.) も泳動した。ゲルをニトロセルロース膜 (Kodak, NY, U. S. A.) に転写後, bFGF 免疫組織染色に用いた一次抗体 (50倍希釈) と反応させた。二次抗体としてペルオキサンダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ血清 (和光純薬, 大阪) を用い, DAB にて発色させた。

#### D 統計処理

bFGF 免疫組織染色陽性率の各群間の比較は  $\chi^2$  検定により, また PCNA 陽性細胞の細胞密度の平均値の比較は Student-t test により危険率 5% 以下をもって有意差ありと判定した。

### IV 結 果

#### A bFGF 免疫組織染色

本免疫組織染色によりヒト汗腺細胞が染色され, また一次抗体の代わりに正常ウサギ血清を用いた染色では陰性であることを確認した。

#### 1 甲状腺腫瘍および増殖性病変における bFGF の染色成績 (表 1)

##### a 正常甲状腺組織

9例全例が染色陰性であった (図 2)。

##### b 乳頭癌

50例中40例 (80.0%) が陽性で, 反応物質は細胞質に顆粒状に認められた (図 3)。染色強度は腫瘍の辺縁部で強く認められた。腫瘍内および腫瘍近傍の正常組織内の間質の血管内皮細胞の細胞質もよく染色された (図 4)。組織学的分化度による検討では, 高分化型75.6%, 低分化型100%に陽性であった。

##### c 濾胞癌

14例中10例 (71.4%) が陽性で, 反応物質はおもに細胞質に顆粒状に認められたが, 一部核にも顆粒状に認められた (図 5)。分化度による検討では乳頭癌と同様, 低分化型に bFGF 陽性率が高い傾向が認められた (高分化型: 55.6%, 低分化型: 100%)。

##### d 髄様癌

9例中6例 (66.7%) が陽性で, 反応物質はおもに細胞質に均一に認められたが, 一部核にも顆粒状に認められた (図 6)。発生要因別に bFGF の陽性率をみると, 家族性40.0%, 散发性100%であった。

##### e 未分化癌

7例全例陽性で, 反応物質はおもに細胞質に均一に認められたが, 一部核にも顆粒状に認められた (図 7)。また7例中5例にとくに強い染色性が認められた。

##### f 濾胞腺腫

11例中6例 (54.5%) が陽性で, 反応物質は細胞質に顆粒状に認められた。

##### g 腺腫様甲状腺腫

6例中1例 (16.7%) の濾胞細胞の細胞質に bFGF の発現が認められた。

##### h パセドウ病

6例全例が染色陰性であった (図 8)。

#### 2 乳頭癌における bFGF の発現と pTNM 分類との関係

乳頭癌50例における bFGF の免疫染色陽性率を UICC の TNM 分類に従って分類し検討した。

切除標本の腫瘍の大きさ (pT) と bFGF の陽性率との関係を表 2 に示した。乳頭癌における腫瘍の大きさと bFGF の発現との間に関連は認められなかった。

組織学的に認められたリンパ節転移 (pN) と bFGF 陽性率との関係を表 3 に示した。pN の grade が進むに従って bFGF 陽性率が高くなる傾向が認められた。とくに, pN0 と pN1b との間では統計学的に有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた。

#### B PCNA 免疫組織染色

乳頭癌10例と濾胞腺腫4例のおおの間質における PCNA 陽性細胞の細胞密度を比較検討した結果を表 4 に示した。乳頭癌間質における PCNA 陽性細胞の密度は対照群に比べて明らかに高く, 統計学的にも有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた。

#### C Western blot 法

乳頭癌および未分化癌の代表例を図 9 に示した。陽

性対照として泳動したリコンビナント・ヒト bFGF は 18KDa のバンドを示した。検索した10例の乳頭癌は全例18KDa のバンドのみを示した。一方、未分化癌の2例はいずれも18KDa と33KDa の2種類のバンドを示した。

表1 甲状腺腫瘍における bFGF の発現

	症例数	bFGF 染色陽性例	陽性率(%)
乳頭癌	50	40	80.0
高分化型	41	31	75.6
低分化型	9	9	100.0
濾胞癌	14	10	71.4
高分化型	9	5	55.6
低分化型	5	5	100.0
髄様癌	9	6	66.7
家族性	5	2	40.0
散発性	4	4	100.0
未分化癌	7	7	100.0
濾胞腺腫	11	6	54.5
腺腫様甲状腺腫	6	1	16.7
パセドウ病	6	0	0.0
正常甲状腺組織	9	0	0.0

表2 乳頭癌における pT 分類と bFGF 発現の関係

	症例数	bFGF 染色陽性例	陽性率(%)
pT1	3	3	100.0
pT2	25	17	68.0
pT3	9	7	77.8
pT4	13	13	100.0

表3 乳頭癌における pN 分類と bFGF 発現の関係

	症例数	bFGF 染色陽性例	陽性率(%)
pN0	9	4	44.4
pN1a	23	19	82.6
pN1b	18	17	94.4*

\* p<0.01 vs. pN0

表4 乳頭癌と濾胞腺腫の間質における PCNA 陽性細胞密度

	症例数	PCNA 陽性細胞密度 (個/cm <sup>2</sup> )	
乳頭癌	10	0.021 ± 0.017	* }
濾胞腺腫	4	0.0018 ± 0.0012	

\* p<0.01

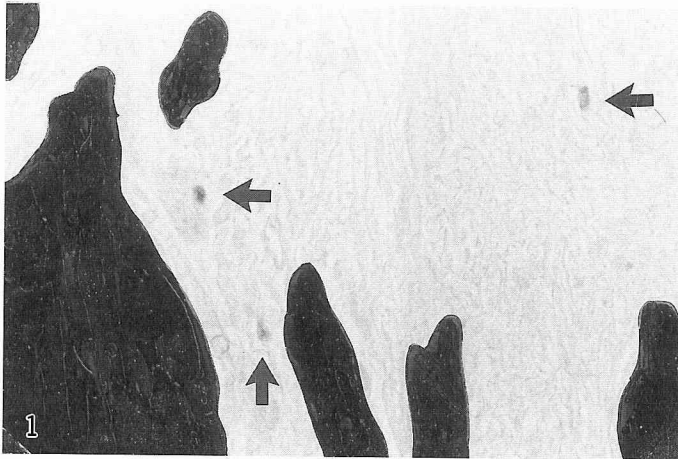


図1 乳頭癌 (PCNA,  $\times 400$ )

間質以外の部分を黒く塗り、画像解析装置にて間質の面積比率 (%) を計算し、これをもとにプリント上の間質の面積 ( $\text{cm}^2$ ) を求め、PCNA 陽性細胞 (矢印) をカウントし密度 (個/ $\text{cm}^2$ ) を計算した。

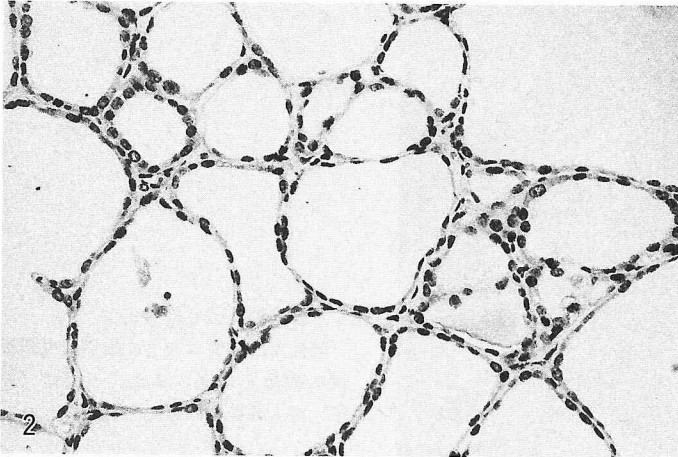


図2 正常甲状腺組織 (bFGF,  $\times 200$ )

免疫染色は陰性である。核が染色されているのはヘマトキシリンによるものである。

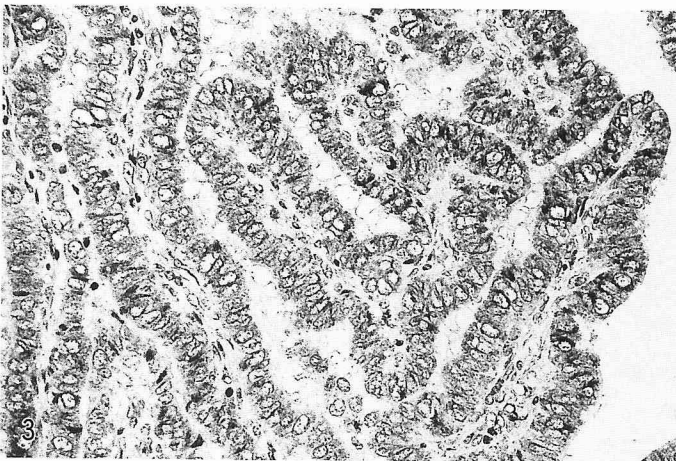


図3 乳頭癌 (bFGF,  $\times 400$ )

陽性反応物質が細胞質に顆粒状に認められる。

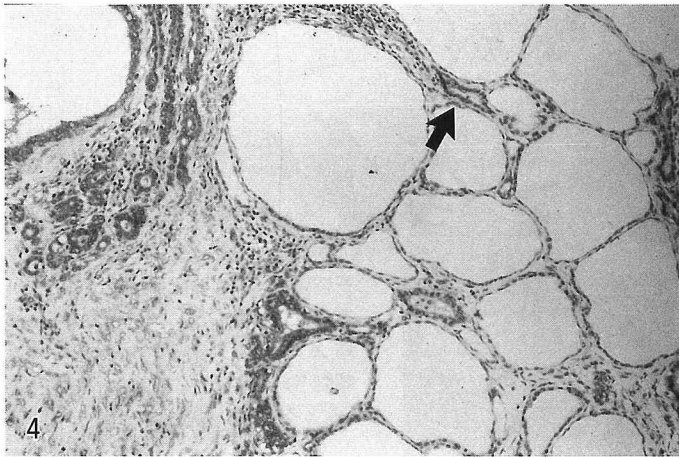


図4 血管内皮細胞のbFGF陽性反応 (bFGF, ×130)  
乳頭癌近傍の正常組織内の血管内皮細胞に陽性反応物質(矢印)を認める。

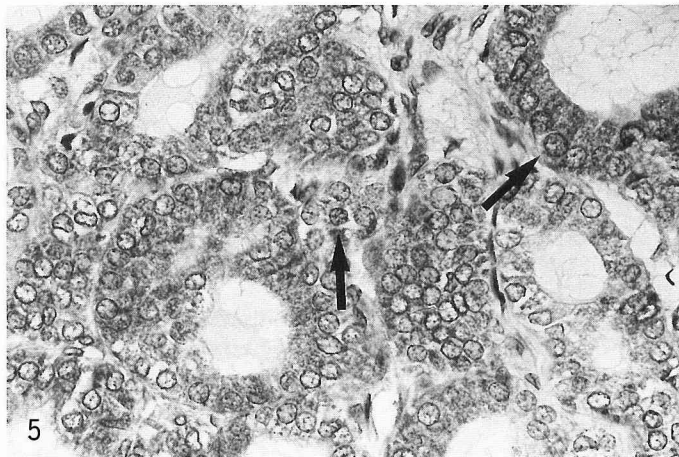


図5 濾胞癌 (bFGF, ×520)  
陽性反応物質はおもに細胞質に顆粒状に認められる。また、一部核(矢印)にも顆粒状に認められる。

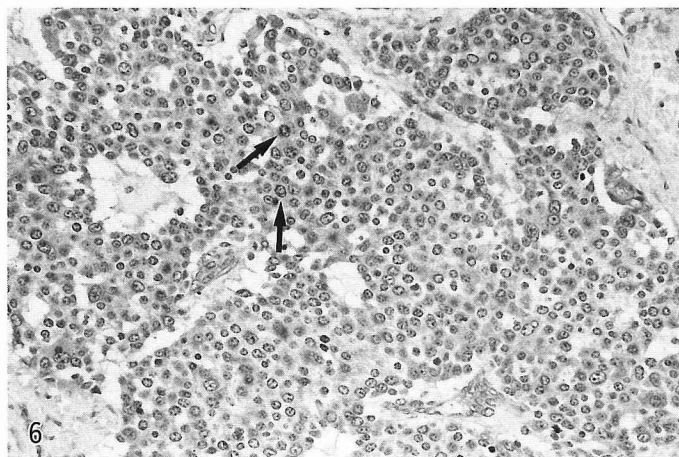


図6 髓様癌 (bFGF, ×260)  
陽性反応物質はおもに細胞質に均一に認められる。また、一部核(矢印)にも顆粒状に認められる。

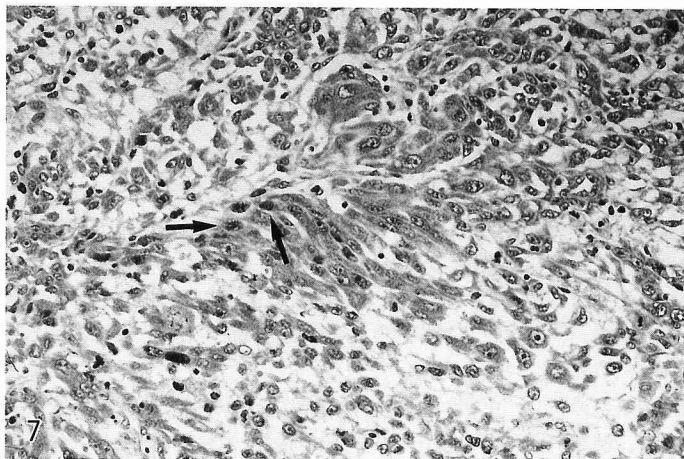


図7 未分化癌 (bFGF, ×260)  
陽性反応物質はおもに細胞質に均一に認められる。また、一部核 (矢印) にも顆粒状に認められる。

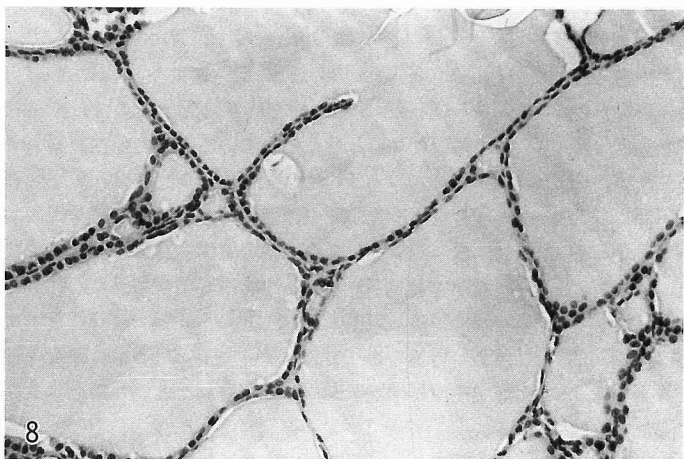


図8 パセドウ病 (bFGF, ×180)  
免疫染色は陰性である。核が染色されているのはヘマトキシリンによるものである。

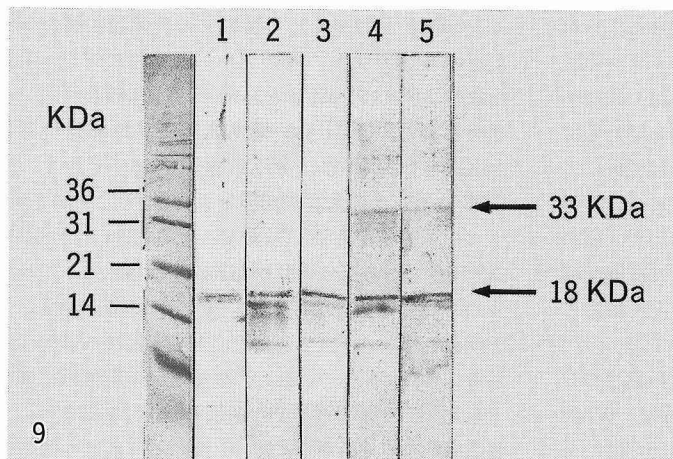


図9 Western blot 法による bFGF 分子量の検討  
lane 1: リコンビナント・ヒト bFGF, lanes 2,3: 乳頭癌, lanes 4,5: 未分化癌。lanes 1,2,3は分子量 18KDa の位置に, lanes 4,5は18KDa と33KDa の位置にバンドを認める。

## V 考 察

本研究においてヒト甲状腺腫瘍に bFGF が発現し、それが腫瘍の悪性度と相関することが示された。さらに、乳頭癌において bFGF の発現とリンパ節転移との間には有意な相関関係が認められた。

bFGF は血管内皮細胞、平滑筋細胞、顆粒膜細胞、ある種の腫瘍細胞等、実に多種多様な細胞で産生されている<sup>25)-29)</sup>が、今回の検討では陽性対照としてヒト汗腺<sup>29)</sup>を使用した。

bFGF の発現は甲状腺悪性腫瘍においては 66.7~100% の高頻度に認められたが、良性腫瘍の濾胞腺腫では 54.5% の染色陽性率を示した。一方、腺腫様甲状腺腫およびパセドウ病においては bFGF の発現はほとんど認められなかった。乳頭癌および濾胞癌における組織学的分化度による検討では、低分化型が高分化型に比べて bFGF 染色陽性率が高い傾向が認められた。また、未分化癌においては 7 例全例が陽性で、その中の 5 例には他の癌では認められない強い染色性が細胞質に認められた。この成績は bFGF が高悪性度の癌により強く発現することを示している。一方、髄様癌では、散発性 100%、家族性 40.0% に bFGF の発現を認め、散発性が臨床的により悪性であるという教室の成績<sup>30)31)</sup>と符合した。

Zagzag ら<sup>19)</sup>は星状膠細胞腫に bFGF 免疫活性が存在し、その発現と組織の anaplasia との間には相関関係があることを述べている。われわれの結果も bFGF の発現と甲状腺腫瘍の生物学的悪性度との間には密接な関連があることを示唆していると考えられる。

乳頭癌 50 例を UICC の TNM 分類に従って分類し、bFGF の発現を検討した結果、bFGF の発現と腫瘍の大きさとの間には一定の関係は存在しなかった。しかしながら、原発巣における bFGF の発現はリンパ節転移の程度とよく相関した。この結果より、bFGF はリンパ行性転移に関して何らかの重要な役割を果たしている可能性が示唆された。リンパ節転移は bFGF により活性化された新生血管系を介して誘導されるとも考えられる。Weidner ら<sup>32)</sup>は浸潤性乳癌において、癌組織内の新生血管の数がリンパ節転移あるいは遠隔転移に関する独立した predictor となりうることを報告している。

今回の検討において、bFGF は腫瘍細胞の細胞質だけでなく、症例によっては核にも認められた。Western blot 法による検討では、リボソームおよび核の分

面に高分子量の bFGF が認められるという報告がある<sup>33)</sup>。この核に存在する bFGF に関して種々の検討が行われている<sup>34)-36)</sup>が、その機能や意義については未だ明らかではない。

bFGF は autocrine 増殖の機能を有していると考えられている<sup>26)37)</sup>が、本研究では FGF-receptor (以下 FGF-R)<sup>38)-41)</sup> の発現は検討していないので、それを確認することはできなかった。しかし、bFGF には FGF-R を介さない情報伝達経路も考えられている<sup>42)</sup>ので、bFGF 自体の発現を検討することも意味はあると思われる。

FGF の発見の動機となった線維芽細胞に対する増殖促進作用の甲状腺における発現および腫瘍増殖との関係については明らかにされていない。本研究においては乳頭癌と良性腺腫の間質の増殖能を抗 PCNA モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。抗 PCNA 抗体は Ogata ら<sup>43)</sup>、Takasaki ら<sup>44)</sup>、Waseem と Lane<sup>45)</sup>が述べているように細胞周期の late G1 期から S 期の細胞核を染色するので、細胞増殖の指標になると考えられている。著者の検討結果では間質における PCNA 陽性細胞の密度は、良性腺腫よりも有意に乳頭癌のほうが高いという成績が得られた。この成績から腫瘍細胞で産生された bFGF は間質の増殖にも関与している可能性が示唆された。間質の増殖は腫瘍細胞由来の bFGF の paracrine 作用だけで説明し得るものではないが、従来の FGF の線維芽細胞増殖作用は本研究でも確認されたということではある。

以前より、bFGF には分子量の異なる複数種の分子が存在することが知られていた<sup>33)-36)</sup>。われわれの Western blot 法による検討でも、リコンビナント・ヒト bFGF を対照として検索した乳頭癌 10 例の全例に 18KDa のバンドのみが認められたのに対し、未分化癌の 2 例には 18KDa と 33KDa の 2 種類のバンドが認められた。bFGF は一般的な翻訳開始部位である AUG コドン以外に、その 5' 上流に存在する 3 つの CUG コドンからも翻訳が開始される<sup>34)35)</sup>。そのため、1 つの遺伝子から 18KDa のほかに 22KDa、22.5KDa、24KDa の 3 つの高分子型 bFGF が産生される。これら 3 つの高分子型 bFGF は、いずれも 5' 側に向核シグナルをもつため、産生されたのちに直接核へ移行すると考えられている<sup>36)</sup>。最近、腫瘍細胞の細胞核に局在する bFGF が増殖に必要な遺伝子の転写制御を行い、腫瘍細胞の自発的増殖に関与している可能性も推察さ



れている<sup>46)47)</sup>。今回の検討では未分化癌のみに高分子量の33KDaの部位にバンドが検出された。この33KDaのbFGF様蛋白が未分化癌に特異的に発現していることを示すためにはさらに症例を重ねて検討する必要があるが、これが未分化癌の予後不良な事実に関与している可能性は考えられる。分子量33KDaのbFGF様蛋白が他の甲状腺癌で産生されている可能性は本検索系の検出感度を考慮するとまったく否定することはできないが、この高分子型bFGFの報告は現在までになく、今後さらに症例を重ね検討する必要がある。

#### IV 結 語

ヒト甲状腺腫瘍におけるbFGFの発現を検討した結果、以下のことが明らかとなった。

- 1 bFGFは甲状腺腫瘍、特に癌に高率に発現を認めたが、正常甲状腺組織、パセドウ病および腺腫様甲状腺腫ではほとんど発現を認めなかった。
- 2 甲状腺癌の中でも、乳頭癌、濾胞癌の低分化癌および未分化癌などの分化度の低い癌においてbFGFは100%発現していた。また、髄様癌において予後不良な散発例に100%発現していた。
- 3 乳頭癌においてbFGFの発現は腫瘍の大きさとは関係なく、リンパ節転移の程度と相関した。
- 4 腫瘍間質のPCNA陽性細胞の密度を乳頭癌と濾

胞腺腫において比較した結果、乳頭癌に有意に高かった。

- 5 Western blot法により分子量を検討した結果、乳頭癌では分子量18KDaの位置に、未分化癌では18KDaと33KDaの2カ所にバンドを認めた。

以上の結果より、ヒト甲状腺癌においてbFGFの発現と生物学的悪性度とは密接に関連していることが明らかとなった。また、乳頭癌においてbFGFはリンパ行性転移ならびに間質の増殖に関与している可能性が示唆された。さらに、分子量33KDaのbFGF様蛋白が未分化癌の著明な悪性度の一因である可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第25回甲状腺外科検討会(1992年11月、倉敷)、第2回がん転移研究会(1993年5月、札幌)、第66回日本内分泌学会学術総会(1993年6月、金沢)、第35回万国外科学会(35th World Congress of Surgery of ISS/SIC)(1993年8月、香港)において発表した。

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に直接御指導、御助言をいただいた本学第1病理学教室伊藤信夫助教授ならびに医療技術短期大学部加藤亮二助教授に心から感謝致します。

#### 文 献

- 1) Schweigerer L, Neufeld G, Mergia A, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D: Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: implications for the proliferation and neovascularization of myoblast-derived tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 842-846, 1987
- 2) Broadley KN, Aqino AM, Woodward SC, Buckley-Sturrock A, Sato Y, Rifkin DB, Davidson JM: Neutralizing antibodies to basic fibroblast growth factor retard wound healing. *Lab Invest* 61: 571-575, 1989
- 3) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
- 4) Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G: Structural characterization and biological functions of basic fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8: 95-114, 1987
- 5) Kimelman D, Abraham JA, Haaparanta T, Palisi TM, Kirschner MW: The presence of fibroblast growth factor in the frog egg: its role as a natural mesoderm inducer. *Science* 242: 1053-1056, 1988
- 6) Rifkin DB, Moscatelli D: Recent development in cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 109: 1-6, 1989
- 7) Thompson JA, Haudenschild CC, Anderson KD, Dipietro JM, Anderson WF, Maciag T: Heparin-binding growth factor 1 induces the formation of organoid neovascular structures in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7928-7932, 1989
- 8) Tanaka A, Miyamoto K, Minamino N, Takeda M, Sato B, Matsuo H, Matsumoto K: Cloning and

- characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8928-8932, 1992
- 9) Gospodarowicz D, Moran JS: Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage culture of human and murine fibroblasts. *J Cell Biol* 66: 451-456, 1975
  - 10) Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, Bohlen P: Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-Sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6963-6967, 1984
  - 11) Joseph-Silverstein J, Rifkin DB: Endothelial cell growth factors and the vessel wall. *Semin Thromb Hemost* 13: 504-513, 1987
  - 12) Lobb RR, Harper JW, Fett JW: Purification of heparin-binding growth factors. *Anal Biochem* 154: 1-14, 1986
  - 13) Zagzag D, Miller DC, Sato Y, Rifkin DB, Burstein DE: Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in astrocytomas. *Cancer Res* 50: 7393-7398, 1990
  - 14) Emoto N, Iozaki O, Arai M, Murakami H, Shizume K, Baird A, Tsurhima T, Demura H: Identification and characterization of basic fibroblast growth factor in porcine thyroids. *Endocrinology* 128: 58-64, 1991
  - 15) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234, 1978
  - 16) Bravo R, Fey SJ, Bellantin J, Larsen PM, Arevalo J, Celis JE: Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Exp Cell Res* 136: 311-316, 1981
  - 17) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309: 374-376, 1984
  - 18) Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein DNA polymerase-delta. *Nature* 326: 515-517, 1987
  - 19) Prelich G, Tan C-K, Kostura M, Mathews NB, So AG, Downey KM: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520, 1987
  - 20) Hedinger C, Williams ED, Sobin LH: Histological typing of thyroid tumours. 2nd ed, no. 11. In: International histological classification of tumours, World Organization, pp 5-18, Berlin, Springer-Verlag, 1988
  - 21) Sakamoto A, Kasai N, Sugano H: Poorly differentiated carcinoma of the thyroid: a clinicopathological entity for a high risk group of papillary and follicular carcinomas. *Cancer* 52: 1849-1855, 1983
  - 22) Hsu S, Raine L, Fanger H: The use of anti-avidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technique. *Am J Clin Pathol* 75: 816-821, 1981
  - 23) Schulze-Osthoff K, Risau W, Vollmer E, Sorg C: In situ detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies. *Am J Pathol* 137: 85-92, 1990
  - 24) Shimizu T, Usuda N, Yamanda T, Sugeno A, Iida F: Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies. *Cancer* 71: 2807-2812, 1993
  - 25) Klagsbrun M, Vlodavsky I: Biosynthesis and storage of basic fibroblast growth factor (bFGF) by endothelial cells: implication for the mechanism of action of angiogenesis. *Prog Clin Biol Res* 266: 55-61, 1988
  - 26) Sato Y, Rifkin DB: Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol* 107: 1199-1205, 1988
  - 27) Gospodarowicz D, Ferrara N, Haaparanta T, Neufeld G: Basic fibroblast growth factor: expression in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol* 46: 144-151, 1988

- 28) Neufeld G, Ferrara N, Schweigerer L, Mitchell R, Gospodarowicz D: Bovine granulos cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 121: 597-603, 1987
- 29) Moscatelli D, Presta M, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB: Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 129: 273-276, 1986
- 30) 新宮聖士, 伊藤信夫, 菅谷 昭: 甲状腺癌における病理組織型と予後. *KARKINOS* 5: 591-597, 1992
- 31) 菅谷 昭: 今日の甲状腺癌診療: 病理組織型と治療法からみた術後遠隔成績. *臨外* 47: 1555-1560, 1992
- 32) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8 1991
- 33) Renko M, Quarto N, Morimoto T, Rifkin DB: Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J Cell Physiol* 144: 108-114, 1990
- 34) Prats H, Kaghad H, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Amalric F, Smith JA, Caput D: High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1836-1840, 1989
- 35) Florkiewicz RZ, Sommer A: The human bFGF gene encodes four polypeptides: Three initial translation from non-ATG codons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3978-3981, 1989
- 36) Quatro N, Finger FP, Rifkin DB: The NH<sub>2</sub>-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. *J Cell Physiol* 147: 311-318, 1991
- 37) Sato Y, Shimada T, Takaki R: Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 1098-1102, 1991
- 38) Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT: Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245: 57-60, 1989
- 39) Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J: Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J* 9: 2685-2692, 1990
- 40) Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ: Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1095-1099, 1991
- 41) Li Y, Koga M, Kasayama S, Matsumoto K, Arita N, Hayakawa T, Sato B: Identification and characterization of high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1436-1441, 1992
- 42) Roghani M, Moscatelli D: Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J Biol Chem* 267: 22156-22162, 1992
- 43) Ogata K, Kurki P, Celis JE: Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated DNA replication. *Exp Cell Res* 168: 475-486, 1987
- 44) Takasaki Y, Deng JS, Tan EM: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 154: 1899-1909, 1981
- 45) Waseem NH, Lane DP: Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Cell Sci* 96: 121-129, 1990
- 46) Yoshitake Y, Nishikawa K, Adachi K: DNA synthesis-stimulating activities for BALB/3T3 cells present in histone and non-histone protein fractions from rat rhodamine fibrosarcoma. *Cell Struct Funct* 7: 229-243, 1982
- 47) Nishikawa K, Yoshitake Y, Minemura M: Localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in a metastatic cell line (AT-3) established from the Dunning prostatic carcinoma of rat: application of a specific monoclonal antibody. *Adv Exp Med Biol* 324: 131-139, 1992

(6. 4. 12 受稿)

■ショートトピックス■

トロンボポエチンのクローニング

トロンボポエチンの本命と目されていた c-mpl リガンドがとうとうクローニングされた。(Nature 6月16日号) c-mpl は, cytokine receptor superfamily に属する受容体型の蛋白をコードする proto-oncogene であるが, リガンドは不明であった。1993年に, c-mpl antisense oligonucleotides が *in vitro* で巨核球コロニー形成を選択的に阻害することが報告され, 熾烈なリガンド探し競争がスタートした。そしてこの度, 数グループがほぼ同時に, c-mpl リガンドのクローニングに成功したことを発表した。報告によれば, ヒトの c-mpl リガンドは, 153のアミノ酸からなる糖蛋白で, その遺伝子はエリスロポエチンと相同性を有し, 構造も類似しているという。また, 従来, 巨核球の増殖を促進する Meg-CSF と, 巨核球の成熟, 血小板の産生を誘導するトロンボポエチンは異なった物質であると考えられてきたが, c-mpl リガンドはその両方の活性を合わせ持つという。巨核球系にのみ作用する特異性と非常に高い血小板増殖活性を有する c-mpl リガンドは, 抗癌剤投与後や骨髄移植後の血小板減少状態の改善や, 再生不良性貧血の治療など, 臨床面への応用が大いに期待される。一方, エリスロポエチン, G-CSF と同様, 巨大な市場を持つ医薬品となることはまず間違いなく, 果たしてどのグループが一番乗りなのか, どのグループが特許を獲得するのかなど, 俗っぽい興味も尽きないのである。

(信州大学医学部小児科学教室 菊地 俊実)