



大腸癌におけるp53発現及び DNA ploidy pattern と予後との検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 利夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1521

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 244号	学位授与年月日	平成 8年12月 6日
氏 名	中 村 利 夫		
論文題目	大腸癌における p53 発現および DNA ploidy pattern と予後との検討		

博士(医学) 中 村 利 夫

論文題目

大腸癌における p53発現および DNA ploidy pattern と予後との検討

論文の内容の要旨

目的：大腸癌における免疫組織学的に p53の異常発現を検索し、病理組織学的所見および DNA ploidy pattern との比較検討を行なう。

対象：浜松医科大学第二外科において外科的切除を行った大腸癌117例（直腸癌51例、結腸癌66例）。

方法：1) p53免疫組織染色；切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより $3\mu\text{m}$ の切片を作製し、抗 p53 monoclonal 抗体 (NCL-p53-DO-7 Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle UK) を用い、Streptavidin biotin complex (SAB) 法にて免疫染色を行った。

2) 細胞核 DNA 量の測定；パラフィンブロックより $30\mu\text{m}$ の切片を切り出し、脱パラフィン、加水を行い、pH1.5に調整した0.5% pepsin (Sigma Chem. Co. St. Luis USA) にて37℃で30分間 incubate し単離細胞群を作製した。それらを RNase (1 mg/ml) 中で30分間 incubate し、propidium iodide ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) 1 ml で DNA 染色をした。検体を flow cytometer (EPICS(労)、Coulter Electronics, Florida USA) にて10,000個の細胞の DNA 量を測定し、DNA ヒストグラムを作製した。統計学的検討には t 検定および χ^2 検定を用い、生存曲線は Kaplan-Meier 法により求め、generalized Wilcoxon 法にて生存率の検定を行った。

結果：p53の発現は主として癌細胞の核に認められ、p53陽性例は全体の51.3% (60/117) であった。性別、年齢、腫瘍占拠部位などの臨床所見に両群間で差は認められなかった。

1) p53と臨床病理学的所見との関係；p53の異常発現は ly 因子、inf 因子陽性群において有意に高く認められた。

2) p53と ploidy pattern との関係；DNA ヒストグラムの解析では117例中 diploid 72例 (61.5%)、aneuploid 45例 (38.5%) であった。p53陽性例で、aneuploid は29例 (48.3%)、diploid 31例 (51.7%) であり、p53陰性例では各々、16例 (28.1%)、41例 (71.9%) であり、p53陽性例で aneuploid の出現頻度が高い傾向にあった。

3) p53と予後との関係；p53発現と予後との関連については、全症例における p53陽性例と陰性例の5年生存率はそれぞれ50.0%、71.9%となり、p53陽性例において予後不良の傾向が認められた。さらに進行度別に p53発現と予後との関係をみると、Dukes A では p53陽性例、陰性例のいずれも予後は良好で差はないが、Dukes B 以上の進行した症例では p53陽性群、陰性群の5年生存率はそれぞれ46.4%、69.8%と p53陽性例における予後が不良であった ($p < 0.05$)。つぎに p53の発現と ploidy pattern との組み合わせによる生存率の検討では、p53陽性例における aneuploid、diploid 各群の5年生存率は、それぞれ37.9%、61.3%であり、また p53陰性例における aneuploid、diploid 各群の5年生存率は、それぞれ70.7%、75.0%であった。これら4群における5年生存率の差をみると p53陽性で aneuploid である症例と p53陰性で diploid である症例において予後にもっとも差の開きが認められた ($p < 0.01$)。

考察：p53遺伝子は、第17番染色体短腕17p13に存在する遺伝子であり、大腸癌において、この領域が共通して欠損が認められる loss of heterozygosity (LOH) の症例があることが報告されている。われわれが行った大腸癌における p53の異常発現の免疫組織学的検索では、症例の約半数に p53の異常発現を認めた。野生型 p53半減期はきわめて短く免疫組織染色では認識されにくいものに対して、変異型 p53は半減期が延長しており免疫組織染色によって認識が可能であることから、ここで認識された p53は変異型 p53と考えられる。今回検討を加えた p53異常発現と予後との関係をみると、stage 別にみた場合 Dukes B 以上の症例において5年生存率では p53陽性例における予後が不良であった ($p < 0.05$)。比較的前期の大腸癌症例ではこの差は認められず、大腸癌全体では p53遺伝子の変異の有無が予後因子のひとつとなりうるかは否かは、今後さらに症例を追加し検討を重ねる必要があると考えられる。しかし Kernらは大腸癌における17pの allelic lossを検索し、欠損の認められる症例において予後が不良であったと報告しており、変異した p53が発癌のメカニズムのみならず、大腸癌の進展にも関与することが示唆される。また同時に解析を行った DNA ploidy pattern はこれまでに大腸癌の予後や進展を反映する因子としての報告があり、われわれの行った p53と DNA ploidy pattern との解析では両者の間に有意な関連性は認められなかったが、p53陽性例において aneuploid の出現頻度が高くみられた。また p53の発現と DNA ploidy pattern のちがいにより各群の予後を比較すると4群の間では、p53陽性で aneuploid である症例において最も予後が不良であった。p53や DNA ploidy pattern を検索し、病理組織所見と組み合わせることにより、大腸癌の生物学的悪性度や予後を推定する因子となりうると思う。

論文審査の結果の要旨

p53遺伝子はヒト腫瘍で高頻度に変異の認められる癌抑制遺伝子であり、大腸癌においては Vogelsteinらの提唱する多段階発癌の過程においてこの遺伝子の異常は比較的后期に認められるとされている。一方、腫瘍細胞の DNA ploidy pattern は従来より腫瘍の遺伝子不安定性など生物学的性格との関連がいわれてきた。このふたつの指標と予後との相関についてはそれぞれに報告はいくつかあるが、現在までのところ見解の一致をみておらず、また両者が複合した場合に関しても報告が少ない。申請者は野生型 p53蛋白の半減期がきわめて短く免疫組織染色では認識されにくいものに対して、変異型 p53蛋白は半減期が延長しており免疫組織染色によって認識が可能であることから、これを利用して大腸癌における p53の異常発現を検索した。また同時に flow cytometry により DNA ploidy pattern との比較を行ない、それぞれのあるいは両者の予後への寄与を検討した。

(対象と方法)

外科的切除を行った大腸癌117例（直腸癌51例、結腸癌66例）を対象として p53の異常発現を免疫組織学的に検索し、また細胞核 DNA 量を flow cytometer を用いて測定した。これらの結果を病理組織学的所見つまり分化度や深達度などとあわせて検討し術後5年間追跡をして予後との関係を考察した。

p53の免疫組織染色には3 μ m のパラフィン切片を用い、Streptavidin biotin complex (SAB) 法にて免疫染色を行い、腫瘍部の代表的切片において核が陽性の腫瘍細胞が3割以上しめる症例を陽性例とした。細胞核 DNA 量の測定にはパラフィンブロックより単離細胞群を作製し、それらを RNase (1 mg / ml) 中で30分間 incubate し、propidium iodide 1 ml (50 μ g / ml) で DNA 染色を行い、flow cytometer にて10,000個の細胞の DNA 量を測定し、DNA ヒストグラムを作製した。

(結 果)

p53の発現は主として癌細胞の核に認められ、p53陽性例は全体の51.3% (60/117) であった。性別、年齢、腫瘍占拠部位などの臨床所見について陽性群と陰性群の間で差は認められなかった。また臨床病理学的所見との関係では p53発現と Dukes 分類の Stage との相関は認めなかったが、リンパ管侵襲陽性群、組織浸潤増殖が著しく境界不明瞭である例 (いわゆる inf γ) において p53発現が有意に高く認められた。本研究対象における p53発現と予後との関連については、全症例における p53陽性例と陰性例の5年生存率はそれぞれ50.0%、71.9%となり、統計的有意差はでなかったものの p53陽性例において予後不良の傾向が認められた。さらに進行度別に p53発現と予後との関係をくわしくみると、Dukes A では p53陽性例、陰性例のいずれも予後は良好で差はないが、Dukes B 以上の進行した症例において p53陽性群、陰性群の5年生存率はそれぞれ46.4%、69.8%であり p53陽性例における予後が不良であることが有意に検出された ($p < 0.05$)。また DNA ヒストグラムの解析による ploidy pattern の検討では117例中 aneuploid45例 (38.5%)、diploid72例 (61.5%) であり、5年生存率では aneuploid は49.5%、diploid は69.1%と aneuploid において予後不良の傾向が認められた。つぎに ploidy pattern と p53発現との相関をみると p53陽性例では aneuploid29例 (48.3%)、diploid31例 (51.7%) であり、p53陰性例では aneuploid16例 (28.1%)、diploid41例 (71.9%) で、p53陽性例に aneuploid の出現頻度が高い傾向が認められた。p53の発現と ploidy pattern との組み合わせによる生存率の検討では、p53陽性例における aneuploid、diploid 各群の5年生存率は、それぞれ37.9%、61.3%であり、p53陰性例における aneuploid、diploid 各群の5年生存率は、それぞれ70.7%、75.0%であった。これら4群間における5年生存率の比較では p53陽性でかつ aneuploid である症例の予後がきわだって不良であった ($p < 0.01$)。

(結 論)

免疫染色で同定できる p53変異 (文献的には約70%)、ならびに DNA ploidy pattern はいずれも予後に影響していたが、両者の組み合わせを比較すると、p53陽性でかつ aneuploid である群が統計的に有意に予後不良の marker となることをはじめて明らかにした。この結果の解釈については症例数の限界などもあり、各種 parameter も加味して行うべきであると考えられるが、さらに種々の予後因子の中で比較的生物学の意味がよく研究されている両者の組み合わせが非常に実際的な判定基準となることは日常診療においても有用である。一方、たとえば近年話題になっているような遺伝子不安定性の強い、一見予後不良が予測されるような一群の大腸癌が、実は予後良好であったといった知見が話題となっていることを考慮すると、単一指標では予測し得ない heterogenous な疾患群の解析方法として臨床応用の可能性からも意義のある仕事と考えられた。

審査員の熱心な議論の末、別紙のような多数のつまんだ質問が行われたが、申請者の解答は適切であった。問題点も十分理解しており、博士 (医学) の学位論文にふさわしいと審査員全員で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 梶 村 春 彦

副査 教授 市 山 新 副査 教授 金 子 榮 蔵

副査 助教授 中 村 達 副査 助教授 宮 本 愛