

学 位 論 文 題 名

Prognostic Significance of the Expression of *ras*
Oncogene Product in Non - Small Cell Lung Cancer

（非小細胞肺癌における *ras* 癌遺伝子産物発現の予後因子としての意義）

学位論文内容の要旨

I はじめに

ras 癌遺伝子の遺伝子産物 *ras* p21は、細胞膜の内側に存在する分子量21,000の蛋白質で、G蛋白質の一種と考えられている。*ras* 癌遺伝子は突然変異ないし遺伝子発現の亢進により活性化される。いくつかのヒトの癌腫において *ras* 癌遺伝子の異常と腫瘍の悪性度や予後との関連性が報告されているが肺癌におけるその臨床的意義は未だ確立されていない。我々はこれまで、葛巻らによって作製された抗 *ras* p21モノクローナル抗体 rp-28及び rp-35を用いて非小細胞肺癌における *ras* p21の発現を検討し腫瘍径との関連性などを報告した。本研究ではモノクローナル抗体 rp-35を用いて非小細胞肺癌組織のパラフィン包埋標本における *ras* p21の発現を免疫組織化学的に検討し、種々の臨床病理学的パラメーターとの関係及び予後因子としての重要性を明らかにした。

II 材料と方法

1. 材料

1975年から1985年までの間に当病院で手術をうけた非小細胞肺癌116例（男性76例，女性40例，平均年齢61才）の腫瘍組織を材料とした。組織型別には腺癌51例，扁平上皮癌54例，大細胞癌7例，腺扁平上皮癌4例である。術後病理学的病期分類（pTNM）はUICC（1978）の分類に従った。予後の検討においては，経過観察期間が3年以上の症例で，術後3カ月以内の死亡及び術後5年以内の他病院を除く94例を対象とした。

2. 免疫組織化学的方法

通常の avidin - biotin - complex immunoperoxidase 法（ABC法）で免疫組織化学染色を行なった。ホルマリン固定パラフィン包埋標本から5 μ mの切片を作り，脱パラフィン化及び加

水処理の後、0.3% H_2O_2 を含むメタノールで処理し内因性ペルオキシダーゼを抑制した。1次抗体としては葛巻らによって作製された抗 *ras* p21マウス IgM モノクローナル抗体 rp-35を用いた。陽性対照は肺癌培養細胞株 A2182を用い、陰性対照は1次抗体を3.4B2ないし PBS で置換した。染色の強さを陰性 (-)、陽性 (+)、強陽性 (++) の3群に分けた。

3. 統計解析

染色性と種々のパラメーターとの相関については χ^2 検定を用いた。生存期間は手術日から死亡までの期間とし、生存曲線には Kaplan - Meier 法を、生存曲線の有意差検定には generalized Wilcoxon test を用いた。多変量解析には Cox の重回帰型生命表を用いた。

III 結 果

1. *ras* p21の発現と組織型、病期分類、喫煙との関係

rp-35は癌細胞の他に非癌細胞（大部分の気管支上皮細胞、一部の気管支腺細胞、肺泡マクロファージ）とも反応を示した。いずれの場合も細胞質がびまん性に染色された。

116例中、41例 (35.3%) が陰性、42例 (36.2%) が陽性、33例 (28.4%) が強陽性の染色性を示した。組織型別では腺癌と扁平上皮癌で染色性に有意な差異を認めなかった。

TNM 分類との関係では、T 1 症例は T 2・T 3 症例に比べて有意に強陽性例が少なかった ($p < 0.05$)。N 因子、M 因子と染色性との間には相関関係を認めなかった。I 期症例は II～IV 期症例に比べて有意に染色性が弱かった ($p < 0.05$)。

患者の喫煙歴との関係では、腺癌症例において、喫煙指数 (1日の喫煙本数×喫煙年数) が40以上の群は40未満の群に比べて有意に陽性・強陽性例が多かった ($p < 0.05$)。

2. *ras* p21発現の予後因子としての意義

94症例において染色性と予後との関係を検討した結果、染色陰性例は陽性例ないし強陽性例に比べてそれぞれ有意に生存期間が長かった ($p < 0.05$, $p < 0.005$)。5年生存率は、陰性例64.1%、陽性例38.0%、強陽性例11.5%であった。組織型別に腺癌ないし扁平上皮癌に分けた場合でも、陰性例は強陽性例に比べて有意に生存期間が長かった ($p < 0.05$)。異なる手術根治度や病期、T 因子、N 因子ごとの解析でも、陰性例は強陽性例に比べて有意に予後良好であった ($p < 0.05$)。

予後因子の重みを *ras* p21の染色性、病期、T 因子、N 因子について多変量解析で検討した結果、*ras* p21の染色性が生存期間と最も強く有意な関連性を示した ($p < 0.0005$)。組織型別に腺癌と扁平上皮癌に分けた場合も *ras* p21の染色性は有意な予後因子であった。

V 考 察

ras 癌遺伝子の発現が、細胞の造腫瘍性や転移能、さらに放射線や化学療法剤に対する抵抗性と関連するという最近の実験結果から、*ras* 癌遺伝子の異常が、ヒトの癌においてもその悪性度や臨床像、さらに予後にも影響を与える可能性が推測される。事実、モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学ないし免疫ブロッティング法による検討により、いくつかのヒトの癌腫において *ras* p 21 の発現と腫瘍の悪性度との関連性が報告されてきたが、肺癌においてはその臨床的意義は未だ確立されていない。我々は以前、腫瘍径が 30mm を超える非小細胞肺癌は 30mm 以下のものに比べて rp-35 に対する反応性が強いことを報告した。本研究では、T 1 症例ないし I 期症例に比べて進行例の染色性が強かった。

腺癌症例において喫煙指数が 400 以上の群で陽性反応が有意に多かったことは、喫煙が肺腺癌における *ras* p 21 の発現亢進の一因である可能性を示唆している。また K - *ras* の点突然変異をもつ肺癌の大部分は喫煙者の腺癌であるという報告があり、喫煙と K - *ras* の点突然変異の因果関係が推測されている。従って喫煙が *ras* 遺伝子の活性化を引き起こすことによって一部の肺腺癌の発生と進展に関与している可能性が示唆され興味深い。

本研究の主目的は *ras* p 21 の発現と予後との関係の検討である。大腸癌や乳癌などにおいては *ras* p 21 の発現が亢進している症例の予後が不良であることが報告されている。本研究でも *ras* p 21 の発現が亢進している症例は有意に予後不良であった。組織型別に腺癌ないし扁平上皮癌に分けた場合でも *ras* p 21 の発現と予後との有意な相関関係を認めた。病期や T 因子、N 因子、手術根治度で層別化した場合にも同様の結果が得られた。多変量解析では *ras* p 21 の染色性が最も有意な予後因子であった。以上よりモノクローナル抗体 rp-35 を用いた免疫組織化学的評価による *ras* p 21 の発現性は、病期分類とは独立した重要な非小細胞肺癌の予後因子であることが示された。今回の免疫組織化学的方法は臨床上、非小細胞肺癌患者の術後予後を推定し治療計画を立てる上で有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 細 川 真澄男

目的：*ras* 癌遺伝子産物 *ras* p 21の発現亢進と腫瘍の悪性度や予後との関連性がいくつかの癌腫で報告されているが、肺癌における検討はなされていなかった。本研究では非小細胞肺癌における *ras* p 21の発現を免疫組織化学的に調べ、臨床病理学的パラメーターとの関連性及び予後因子としての意義について検討を行った。

材料：1975年～1985年に手術を行った非小細胞肺癌116例（腺癌51例，扁平上皮癌54例，大細胞癌7例，腺扁平上皮癌4例）の腫瘍組織を材料とした。予後の検討では術後早期死亡及び他病死を除き3年以上経過観察された94例を対象とした。

方法：ホルマリン固定パラフィン包埋標本に対して通常のABC法で免疫染色を行った。1次抗体は葛巻教授らが作製した抗 *ras* p 21マウス IgM モノクローナル抗体 rp-35を用いた。

結果：全116例中，陰性例は35.3%，陽性例は36.2%，強陽性例は28.4%であった。組織型による差異は認めなかったが，T 1 症例ないし1期症例において染色性が弱かった。腺癌症例においては，喫煙指数が400未満の群に比べて400以上の群で陽性以上の反応が多かった。予後の検討では，陰性例は陽性例，強陽性例に比べて術後生存期間が延長していた（5年生存率はそれぞれ64.1%，38.0%，11.5%）。さらに多変量解析の結果から，*ras* p 21の染色性は，腺癌と扁平上皮癌の両者において病期分類とは独立した有意な予後因子であった。

以上の結果は，①喫煙が肺腺癌における *ras* p 21の発現亢進の一因である可能性があること，② *ras* p 21の発現性は非小細胞肺癌の悪性度を示す生物学的指標の一つであり，また重要な術後予後因子であることを示している。

なお口頭発表に際し，葛巻教授からDNAやRNAレベルでの検討，癌抑制遺伝子との関係につき，細川教授から染色性の判定，非癌細胞における発現，肺癌の進展における *ras* p 21の発現亢進の時期などにつき，柿沼教授から *ras* p 21の発現亢進の機序や点突然変異との関係につき，また吉木教授から分化度との関連性や小細胞癌での検討につき質問があったが，申請者はほぼ妥当に答えた。

また個別に葛巻，細川両教授から諮問をうけ合格との御返事をいただいている。

以上, 本研究は *ras* p21 の発現性が非小細胞肺癌の予後因子として重要であることを明らかにしたもので, 博士 (医学) の学位に相当するものと認めた。