

学位論文題名

大腸癌における p53mdm2 遺伝子産物発現と
PCNA 標識率の臨床病理学的意義

学位論文内容の要旨

I 結 言

mdm2遺伝子はp53の発現増大に伴って転写活性化されて増幅する反面、その産生した蛋白がp53と結合することによって逆にp53の機能を抑制することが報告されている。ヒト肉腫や脳腫瘍ではp53遺伝子の異常がないものでmdm2の高発現が認められ、腫瘍発生の一因となりうる事が示されている。そこで本研究ではp53とmdm2の相互作用がヒト大腸癌においてどのような意義をもつのかを免疫組織化学染色を用いて検討した。

II 対象と方法

1. 対象

1980年1月から1989年12月までに北海道大学第一外科で治療した大腸癌肝転移例は67例のうち、検索可能であった46例(同時性34例、異時性12例)を対象とした。コントロールとして1983年から1985年までに原発巣が切除され、その後5年以上肝転移を認めていない43例を用いた。

2. 方法

ホルマリン固定標本のパラフィン包埋ブロックより4 μ mの薄切切片を4枚ずつ作製した。1枚はHE染色に、他の3枚はp53,mdm2,PCNA染色用とし、streptavidin biotin (SAB)法により免疫染色を行った。一次抗体には抗p53モノクローナル抗体(DO 7、Dako)、抗mdm2モノクローナル抗体(Ab 1、Oncogene Science)、抗PCNAモノクローナル抗体(PC 10、Dako)を用いた。p53とmdm2については、最大深達度の部の切片につき癌巣全体を観察し、癌巣内の核が顆粒状に褐色に染まったものを染色陽性とした。染色パターンは次の4段階に分かれ、(1)(2)を陰性、(3)(4)を陽性と判定した。

- (1) 全く染色されなかったもの(-)
- (2) 全体の10%未満が染色されたもの($\pm$)
- (3) 全体の10%以上50%未満が染色されたもの(+)
- (4) 全体の50%以上が染色されたもの(++)

PCNAについては癌の最大深達度の部と口側および肛門側の先進部の3か所を数視野ずつ鏡検し、癌細胞を1,000個以上数え、核が一様に染まっているものを陽性とし、陽性細胞の比率をPCNA標識率(labelling index、以下LI)とした。

3. 統計学的解析法

平均値の差の比較にはt検定、2群間の比較には χ^2 検定(期待値が5以下の場合はFisherの直接確率法)を、生存曲線の算出はKaplan-Meier法で行い、有意差の検定にはgeneralized Wilcoxon、Cox-Mantel、log rank testを用い、危険率5%以下を有意差ありとした。

III 結 果

p53,mdm2の陽性率は69.7%、43.8%で、PCNA LIは平均で45.60±15.12%であった。

1. 臨床病理学的因子との関連

p53は検索各因子との間に有意な相関はみられなかったが、mdm2では肝転移群、脈管侵襲陽性例で有意に陽性率が高かった。PCNA LIでも肝転移群で有意に高値であり、また深達度が進むにつれて高値となる傾向がみられた。とくに深達度mpまでの群とsi以上の群ではsi以上の群で有意にLIが高値であった。また深達度ss以下では、肝転移群が非肝転移群に比して有意にLIが高値であった。

2. p53,mdm2,PCNA相互の関係

p53とmdm2の間に正の相関関係がみられ、p53,mdm2とPCNAとの間には有意差はないもののp53,mdm2陽性群でPCNA LIが高値であった。

3. 原発巣と転移巣の染色性の相違

原発巣と肝転移巣（部分切除以上24例）を比較すると、p53では両者は100%一致し、mdm2は82.9%の一致率であった。PCNAについては転移巣が原発巣より低値となる傾向がみられた。

4. 予後

肝転移群46例中、他病死1例を除く45例について予後との関連を検討した。

p53,mdm2単独では、5年生存率に差はなかった。p53とmdm2を組み合わせると予後との関係をみると、p53(-)群ではmdm2発現の有無で生存率に有意な差がみられ、mdm2発現群は極端に予後が悪かった。p53(+)群ではmdm2発現の有無で5生率に差はなかった。

IV 考 察

p53蛋白発現と臨床病理学的因子との関係をみると、これまでの多くの報告と同様に有意な関連はみられなかったことから、p53は大腸癌発生後の発育、進展には直接関与していないと考えられた。mdm2は脈管侵襲陽性群、とくにv(+)群で有意に発現陽性率が高く、かつ肝転移群で有意に陽性率が高かったことから、血行性転移、とくに肝転移にmdm2が深く関与しており、予知因子として有用である可能性が示唆された。また、PCNA LIも深達度および肝転移の有無で有意差があり、とくに深達度がss以下でPCNA LIが高値のものは肝転移の高危険群と考えられた。

p53,mdm2蛋白発現とPCNAの関係では、p53およびmdm2とも陽性群でPCNA LIが高い傾向にあったが有意差はなかった。このことから、増殖期においては遺伝子産物の発現は細胞の増殖に必要なものではないが、機能的なつながりがあると考えられた。原発巣と転移巣でのp53,mdm2の染色性の相違、PCNA LIの推移についてみると、p53,mdm2ともに両者の染色性はほぼ一致し、原発巣での染色性は転移巣でも維持されると考えられた。PCNA LIでは、有意差はなかったものの転移巣の方が原発巣よりも低値を示した。これについては全く逆の結果も報告されており、細胞増殖のための周囲の環境の違いなども含めさらに検討が必要と考えている。

肝転移例について予後との関連を検討した。p53,mdm2それぞれ単独では生存率に有意差はなかったが、p53とmdm2の相互作用に注目して両者を組み合わせると予後をみると、p53(-)群ではmdm2発現の有無により予後に大きく差が出るが、p53(+)群ではmdm2発現の有無で予後は左右されなかった。このことから、mdm2によりp53の機能が抑制されることが生物学的悪性度に大きな影響を与えていると推察された。この理由としてp53の転写活性化能により発現が誘導される遺伝子群のなかには生体にとって有利に働くものもあり、mdm2の発現がこれらをも間接的に抑制することにより悪性度が高まることが考えられた。

V 結 論

1) p53は臨床病理学的因子とは有意な関連はみられなかった。mdm2は肝転移群、脈管侵襲陽

性群で有意に陽性率が高く、肝転移の予知因子として有用である。

2) PCNA LIは肝転移群で、また深達度が進むにつれて有意に高値を示し、とくに深達度ss以下でPCNA LIが高値の場合は肝転移の高危険群である。

3) p53とmdm2の間には正の相関がみられたが、p53およびmdm2とPCNAの間に相関はなかった。原発巣と転移巣においてp53とmdm2の染色性はほぼ一致した。またPCNA LIは転移巣で低値となる傾向にあった。

4) p53,mdm2それぞれ単独では予後を推定することは困難であったが、p53(－)群でmdm2が過剰発現していた症例の予後は極端に悪かった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

大腸癌における p53mdm2 遺伝子産物発現と PCNA 標識率の臨床病理学的意義

mdm2遺伝子はp53の発現増大に伴って転写活性化されて増幅する反面、その産生した蛋白がp53と結合することによって逆にp53の機能を抑制することが報告されている。ヒト肉腫や脳腫瘍ではp53遺伝子の異常がないものでmdm2の高発現が認められ、腫瘍発生の一因となりうることを示されている。そこで本研究ではp53とmdm2の相互作用がヒト大腸癌においてどのような意義をもつのかを免疫組織化学染色を用いて検討した。

研究方法：対象は1980年から1989年までに北海道大学第一外科で治療した大腸癌肝転移46例で、コントロールとして1983年から1985年までに原発巣が切除され、その後5年以上肝転移を認めていない43例を用いた。方法はホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより4 μ mの薄切切片を作製し、streptavidin biotin (SAB)法により免疫染色を行った。一次抗体には抗p53モノクローナル抗体 (DO7, Dako)、抗mdm2モノクローナル抗体 (Ab 1, Oncogene Science)、抗PCNAモノクローナル抗体 (PC 10, Dako) を用いた。p53とmdm2については、最大深達度の部の切片につき癌巣全体を観察し、癌細胞内の核が顆粒状に褐色に染まったものを染色陽性とし、全体の10%以上が染色されたものを陽性例と判定した。PCNAについては癌の最大深達度の部と口側および肛門側の先進部の3か所を数視野ずつ鏡検し、癌細胞を1,000個以上数え、核が一様に染まっているものを陽性とし、陽性細胞の比率をPCNA標識率 (labelling index, 以下LI) とした。

研究結果：1. p53は検索各因子との間に有意な相関はみられなかったが、mdm2では肝転移群、脈管侵襲陽性例で有意に陽性率が高かった。PCNA LIでも肝転移群で有意に高値であり、また深達度が進むにつれて高値となる傾向がみられた。とくに深達度mpまでの群とsi以上の群ではsi以上の群で有意にLIが高値であった。また深達度ss以下では、肝転移群が非肝転移群に比して有意にLIが高値であった。2. p53とmdm2の間に正の相関関係がみられ、p53,mdm2とPCNAとの間には有意差はないもののp53,mdm2陽性群でPCNA LIが高値であった。3. 原発巣と肝転移巣 (部分切除以上24例) を比較すると、p53では両者は100%一致し、mdm2は82.9%の一致率であった。PCNAについては転移巣

が原発巣より低値となる傾向であった。4. 肝転移群のうち肝切除が施行された24例（他病死1例を除く）における予後との関連の検討ではp53、mdm2単独では、5年生存率に差はなかった。p53とmdm2を組み合わせた予後の関係では、p53(-)群はmdm2発現の有無で生存率に有意な差をみとめ、mdm2発現群は極端に予後が悪かった。p53(+)群ではmdm2発現の有無で5年生存率に差はなかった。

以上より、mdm2遺伝子産物発現は大腸癌肝転移の予知因子として有用であること、深達度ss以下でPCNA LIが高値のものは肝転移の高危険群であることを示唆した。また、p53(-)群でmdm2が過剰発現している症例は極端に予後が悪く、mdm2によりp53の機能が抑制され生物学的悪性度に大きな影響をあたえていることを示唆したことは高く評価された。さらに、p53とmdm2蛋白発現を同時に測定することにより大腸癌肝転移の、より精度の高い予後の推定が可能となることが期待された。

審査にあたって、浅香教授より熱処理による抗原賦活化の過程での蛋白変性およびmdm2蛋白の蓄積の原因について、長嶋教授よりp53とPCNAの独立性およびPCNA LIの観測部位による相違について、藤岡助教授より異時性に肝転移を来すものにmdm2が予知因子として有用か、などの質疑があったが、申請者は抗原賦活化の方法はほぼ確立され蛋白変性が染色性に大きな影響を及ぼさないこと、mdm2はDNA損傷を契機として野生型p53の発現増大に伴って蓄積してくること、p53とPCNAはともにcell cycleに関与しているが他の因子も深く関わっていること、PCNA LIは癌の先進部で高値であること、mdm2は異時性肝転移の予知因子として有用である可能性が高いことなど、文献や自己の実験データを引用し、豊富な知識に基づいて明解に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。