

学 位 論 文 題 名

Prognostic Significance of p53 and *ras* p21 Expression
in Nonsmall Cell Lung Cancer

（非小細胞肺癌の予後因子としての p 53 タンパク質
及び *ras* p 21 タンパク質発現の意義）

学位論文内容の要旨

（目的）

p 53 遺伝子異常は、肺癌をはじめとする多くの悪性腫瘍において最も普遍的に認められる遺伝子異常の一つであり、PCR-SSCP法による遺伝子変異の検出や免疫組織化学による p 53 タンパク質の検出により検討されている。一方 *ras* 遺伝子異常も非小細胞肺癌で多く認められる遺伝子異常であり、遺伝子点突然変異や *ras* p 21 タンパク質の発現の検出により検討されている。我々は *ras* p 21 タンパク質発現が非小細胞肺癌の独立した予後因子のひとつであることを既に報告した。今回我々は非小細胞肺癌手術標本において p 53 遺伝子異常を免疫組織化学的に検出し、p 53 タンパク質発現が *ras* p 21 タンパク質発現と同様に独立した予後因子であるか否かを検討した。さらに p 53 タンパク質発現と *ras* p 21 タンパク質発現を同一症例で組み合わせて解析することが、患者の予後を推定する上で有用であるか否かについて検討した。

（対象と方法）

対象は既に *ras* p 21 タンパク質の発現を検討した非小細胞肺癌切除例の手術標本 96 例で、1977 年から 1985 年にかけて北大病院で切除された。内訳は、男性 60 例、女性 36 例、組織型は腺癌 46 例、扁平上皮癌 39 例、大細胞癌 6 例、腺扁平上皮癌 5 例で、手術の根治度により治癒切除群 65 例と、非治癒切除群 31 例に分けられた。全 96 例中 63 例で術後に全身化学療法が行われたが、放射線治療は行われなかった。

p 53 タンパク質の免疫染色は手術標本のホルマリン固定パラフィン包埋標本に対して、labeled streptavidin biotin 法で行い、一次抗体として Novo Castra 社のモノクローナル抗体 D07 を用いた。細胞核の染色性を顕微鏡下で判定し標本の腫瘍細胞のうち 5% 以上で細胞核が染色されるものを陽性とし、それ未満のものを陰性とした。

同一の全 96 例に対する *ras* p 21 タンパク質の免疫染色の結果は既に報告した論文で使用したものを用いた。(Harada M, et al. Cancer 1992;69:72-7)

全 96 例の p 53 免疫染色の結果と他の臨床病理学的因子の相関は χ^2 検定で判定した。患者の生存期間の解析は術後 3 年以上の観察期間を有するもので、術後 3 ヶ月以上生存し、5 年以内に他病死しなかった 91 症例について行った。生存曲線の作成は Kaplan-Meier 法で行い、生存曲線の差の検定は一般化 Wilcoxon 法で行った。予後因子の解析には Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析を用いた。

（結果）

p 53 タンパク質発現は検討した非小細胞肺癌全 96 例中 56 例 (58%) で陽性、40 例 (42%) で陰性と判定された。年齢、性別、組織型、術後 T、N、M 因子、術後病期分類、喫煙歴、手術根治度の 9 つの臨床的及び臨床病理学的因子と p 53 免疫染色性との関係を検討したところ、術後

T因子が相関を示したが($p=0.005$)その他の因子はp53免疫染色との相関を示さなかった。

生存期間を検討した91例全例を、p53免疫染色陽性群56例と陰性群40例の2群に分けて生存曲線を比較した場合、5年生存率はそれぞれ24%と50%でp53陽性群で有意に低値だった($p=0.002$)。さらに治癒切除された65例のうち、前述した生存期間解析の基準に当てはまる63例をp53免疫染色陽性群36例と陰性群27例の2群に分けて生存期間を検討したところ5年生存率はそれぞれ36%と63%で、p53陽性群で有意に低値だった($p=0.005$)。

予後因子の解析として、最初に単変量解析を行った。対象とした性別、年齢、病理組織型、術後T、N、M因子、術後病期、手術根治度、化学療法の有無、p53免疫染色性の10因子のうちで、病理組織型($p=0.02$)、術後N因子($p=0.04$)、術後M因子($p=0.04$)、術後病期($p=0.008$)、手術根治度($p<0.001$)、p53免疫染色性($p=0.03$)の6因子が有意であった。さらにCoxの比例ハザードモデルを用いてこれらの因子のうちで独立した有意な予後因子を検討したところ、p53免疫染色性(ハザード比1.72、 $p=0.04$)は、手術根治度(ハザード比4.69、 $p<0.001$)、病理組織型(ハザード比1.58、 $p=0.004$)と共に独立した有意な予後因子であった。

同一の91症例におけるras p21免疫染色の結果とp53免疫染色の結果を併せて検討した。p53免疫染色陽性/ras p21免疫染色陽性(p53+/ras+)群、p53免疫染色陽性/ras p21免疫染色陰性(p53+/ras-)群、p53免疫染色陰性/ras p21免疫染色陽性(p53-/ras+)群、p53免疫染色陰性/ras p21免疫染色陰性(p53-/ras-)群の4群で生存曲線を作成したところ、p53-/ras-の群は5年生存率が87%で他の3群(p53+/ras-、p53-/ras+、p53+/ras+、それぞれ5年生存率43%、26%、23%)と比べ有意に生存期間が長かった($p=0.005$)。

p53免疫染色陰性の群はras p21の染色性によりp53-/ras-、p53-/ras+の2群に分けられ、5年生存率はそれぞれ87%と26%で有意差を示したが($p=0.001$)、p53免疫染色陽性の群をras p21の染色性で分けたp53+/ras-、p53+/ras+の2群間で5年生存率は43%と23%で有意差を示さなかった($p=0.5$)。同様にras p21免疫染色陰性の群をp53の染色性によりp53-/ras-、p53+/ras-の2群に分けると、5年生存率はそれぞれ87%と43%で有意差を示したが($p=0.03$)、ras p21免疫染色陽性の群をp53の染色性で分けたp53-/ras+、p53+/ras+の2群間で5年生存率は26%と23%で有意差を示さなかった($p=0.5$)。

(考案)

正常なp53遺伝子により作られるp53タンパク質は半減期が短く通常は免疫染色で染色されないが、アミノ酸置換を伴う点突然変異を有するp53遺伝子から作られるp53タンパク質は半減期が延長し、細胞核に集積されるため免疫染色で検出可能となる。今回我々はp53免疫染色の一次抗体としてD07(Novo Castra社)を使用した。1977年にさかのぼる古い標本に対しても細胞核に限局した明瞭な染色態度を示し有用であった。

この研究において、我々はp53タンパク質発現が、手術により切除された非小細胞肺癌の独立した有意な予後因子であることを示した。非小細胞肺癌の手術例に対しp53の遺伝子異常をPCR-SSCP法やタンパク質の免疫染色を用いて検出し、有意な予後不良な因子であることをQuinlanら(Cancer Res 1992;52:4828-31)、Horioら(Cancer Res 1993;53:1-4)、Mitsudomiら(J Natl Cancer Inst 1993;85:2018-23)も示している。しかしMcLarenら(Br J Cancer 1992;66:735-8)、Brambilaら(Am J Pathol 1993;143:199-210)はp53遺伝子異常と非小細胞肺癌の予後には相関はないとし、さらにPasslickら(J Natl Cancer Inst 1994;86:801-2)はp53遺伝子異常が予後良好な因子であるとしており論議のあるところである。今回我々が示したように、ras p21免疫染色陰性の群をp53の染色性により2群に分けると5年生存率は有意差を示したが、ras p21免疫染色陽性の群をp53の染色性で分けた2群間で5年生存率は有意差を示さず、検討対象症例の背景にある他の遺伝子異常の有無や偏りにより異なった結果が導かれる可能性が示唆された。

さらに我々はp53とras p21の免疫染色を同一症例で行い、両者が陰性な群が他の3群と比較して有意に生存期間が長いことを示した。これがさらに大規模な臨床試験で確認されれば、非小細胞肺癌患者の予後の推定や治療戦略の上で有用な指標となることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

Prognostic Significance of p53 and *ras* p21 Expression in Nonsmall Cell Lung Cancer

(非小細胞肺癌の予後因子としての p 53タンパク質
及び *ras* p 21タンパク質発現の意義)

p 53遺伝子異常は、悪性腫瘍で最も普遍的に認められる遺伝子異常の一つである。非小細胞肺癌の手術例に対し p 53遺伝子異常をPCR-SSCP法や p 53蛋白質の免疫染色で検出し予後との相関を検討した報告はこれまで数編あるが一定の結論は得られていない。一方 *ras* 遺伝子異常も非小細胞肺癌で多く認められ、申請者らは *ras* p 21蛋白質発現が非小細胞肺癌の独立した予後因子の一つであることを既に報告した (Harada M, et al. Cancer 1992;69:72-7)。本研究では非小細胞肺癌手術標本において p 53遺伝子異常を免疫組織化学的に検出し、p 53蛋白質発現が独立した予後因子であるか否かを検討した。更に p 53蛋白質発現と *ras* p 21蛋白質発現を同一症例で組み合わせて解析することが、患者の予後を推定する上で有用であるか否かを検討した。

対象は既に *ras* p 21蛋白質の発現を検討した非小細胞肺癌切除96例で、p 53蛋白質の免疫染色はlabeled streptavidin biotin法で行い、一次抗体としてNovo Castra社のモノクローナル抗体D07を用いた。p 53免疫染色の結果と臨床病理学的諸因子の相関は χ^2 検定で判定した。生存曲線はKaplan-Meier法で作成し、その差の検定は一般化Wilcoxon法で行った。予後因子の解析にはCoxの比例ハザードモデルによる多変量解析を用いた。

p 53蛋白質発現は非小細胞肺癌全96例中56例 (58%) で陽性、40例 (42%) で陰性であった。臨床病理学的諸因子と p 53免疫染色性との関係では、術後T因子のみが相関を示した。生存期間を検討した91例を p 53免疫染色陽性群53例と陰性群38例の2群に分けて比較した場合、生存期間は p 53陽性群で有意に短かった。予後因子の多変量解析で p 53免疫染色性は、手術根治度、病理組織型と共に独立した有意な予後因子であった。*ras* p 21免疫染色の結果と p 53免疫染色の結果を併せて検討したところ、p 53陰性/*ras* p 21陰性の群は他の3群と比べ有意に生存期間が長かった。*ras* p 21免疫染色陰性の群を p 53の染色性により2群に分けるとも年生存率は有意差を示したが、*ras* p 21免疫染色陽性の群を p 53で分けた2群では有意差を示さず、検討対象症例の背景にある p 53以外の遺伝子異常の有無や偏りにより異なった結果が導かれる可能性が示唆された。以上より、p 53免疫染色性が非小細胞肺癌の独立した予後因子であり、これを *ras* p 21免疫染色と併せて用いることの有用性が示された。

審査に当たっては、副査加藤教授より、1. p 53蛋白質の検討の他に、PCR法などを用いたDNAの検索を加える必要性について、2. 予後因子である手術根治度や組織型と p 53蛋白質の異常における、予後を判定する上での重要性の度合いについて、3. 他のグルー

ブからの研究報告で、p53蛋白質に異常がある方が予後が良いとする結果との差異をどう考えるべきかについて質問があった。申請者はこれらの質問に対して的確な回答をおこなった。さらに副査川上教授より、1. 今回用いたp53蛋白質の免疫学的検索法は定性的なものであるが、定量的な方法はあるか、およびその方法を用いることによってより多くの正確な情報が得られるかどうかについて、2. 今回の解析で、年齢が予後因子にならなかった理由、3. p53とras蛋白質の組み合わせにおける予後の判定において、臨床の背景因子がそろっているかどうかについて、4. p53蛋白質の異常における評価の差異が他の遺伝子異常によることについて、考えうる具体的な遺伝子名について質問があった。申請者はこれらいずれの質問に対しても適切な回答をおこなった。また主査葛巻より、1. p53の検出に用いた抗体について、この抗体が野生型の蛋白質と反応する可能性、2. p53変異蛋白質にのみ反応する抗体を用いた経験の有無について、3. p53の異常を判定する際のcut off pointを5-10%とする妥当性と、他の研究報告との相違について、4. p53とras遺伝子の相関作用における試験管内での成績と、今回の予後に及ぼす影響の相違について質問をおこなった。申請者はこれらいずれの質問に対しても適切な回答をおこなった。

さらに、抗体による蛋白質の検索に加え遺伝子の異常の検索をおこなう検体数を増やす事によって、より詳細な結果が得られることが期待される。

審査員一同は、本研究を、癌抑制遺伝子p53および癌遺伝子rasの基礎研究を非小細胞肺癌の予後の判定という临床上重要な診断法に応用するための研究として高く評価し、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。