

学位論文題名

Yeast Functional Assay と免疫組織染色法を  
用いたヒト乳癌の p53 変異の解析

学位論文内容の要旨

目的

最近、酵母を用いた癌抑制遺伝子p53の変異を検出する新しい方法(yeast functional assay)が開発された。同法は簡便・安価のみならず従来の検出法(PCR-SSCP)より高精度であることが、口腔扁平上皮癌を用いた研究で明らかにされている。今回、52例のヒト乳癌組織を用いyeast functional assay法(YA)によるp53変異率を分析するとともに、同一乳癌組織を用いたp53免疫組織染色法(IHC)の結果と比較した。さらにこれらの所見と臨床病理学的因子との関連について検討した。

材料と方法

平成5年より平成8年までに北海道大学医学部第一外科にて行われた乳癌手術例より52例を無作為に抽出し新鮮手術材料を得た。各検体は肉眼的に癌部のみを摘出し、APGC法にて全RNAを抽出し、RT-PCR法によりDNA結合領域を完全を含むp53 cDNAを増幅した。ヒトp53発現プラスミドpSS16を制限酵素を用いてp53のコドン67から347にギャップを生ぜしめ、線状pSS16を作製した。線状pSS16は、p53 PCR産物とともに熱ショック法を用いて酵母に導入した。酵母は、低アデニン加ロイシン無添加選択プレート上で30°C48時間培養し、肉眼的に変異型p53(赤コロニー)と野生型p53(白コロニー)の比率を算定した。その比率が16%以上のものを陽性とし10%以下を陰性、両者の中間を境界型とした。境界型と陽性の検体については独立した4個の赤コロニーよりalkaline lysis法にてプラスミドを抽出し、電気穿孔法にて大腸菌に導入後再度プラスミドを精製しオートシーケンサーで塩基配列を解析した。

p53免疫組織染色(IHC)は、薄切切片を脱パラフィンした後、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去し、マイクロウエーブ照射を行った。一次抗体としてDO7(DAKO)を反応させ、二次抗体を加えた後、DAB発色を行った。染色の判定は癌組織において10%以上の細胞の核が染色されていれば陽性とし、10%未満であれば陰性とした。

臨床病理学的因子として年齢、腫瘍径、リンパ節転移、遠隔転移、臨床病期、組織型、脈管浸潤、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、無再発生存率、術後生存率の11項目を検討した。

2群間の比較は $\chi^2$ 検定を用い、危険率 5 %以下で有意差を検定した。また、生存曲線の算出にはKaplan-Meier法を用い、その有意差の検定にはgeneralized Wilcoxon およびlog rank testを用いた。

## 結果

1. Yeast Functional Assay : 52 症例中 19 例(36.5 %)は陽性であり境界型は 3 例(5.8 %)、陰性が 30 例(57.7 %)を占めた。YA 法陽性および境界例について塩基配列を解析した結果では、陽性例は全例独立した 4 個のコロニーの結果が一致する clonal な変異を示し、境界型は random な変異を示した。
2. 免疫組織染色 : DO7 を用いた IHC を YA を施行した同一標本について行った。その結果、52 例中 11 例(21.2%)において核の p53 が陽性に染色された。41 例(79.8 %)は染色陰性であった。また、染色は核のみに限局され細胞質が染色された症例は認めなかった。
3. YA法とIHC法の関連 : YAとIHCの結果に基づき52症例を 4 群に分類した。第 1 群はYA (+), IHC (+)の症例で8例(15.4 %)であった。第 2 群はYA (+), IHC (-)の症例で11例(21.2 %)であった。第 3 群はYA (-), IHC (+)の症例で、3 例(5.8 %)だけであった。第 4 群はYA (-), IHC (-)の症例で、30例(57.7 %)がこれに属した。塩基配列を解析すると第 1 群の 8 例中 7 例はDNA結合領域内のミスセンス変異がであり、変異の箇所はコドン150-300の間に集中していた。一方第 2 群では 11 例中 8 例が塩基の欠失あるいは挿入によるフレームシフト変異であり変異の箇所は一定した傾向は得られなかった。
4. 臨床病理学的因子との関連 : 検討した臨床病理学的因子のうちYAおよびIHC陽性率はエストロゲンレセプター(ER)陰性率、脈管浸潤率および術後生存率と有意に相関した。特にYA法陽性のものは、ER陰性率が高く脈管浸潤が多く術後生存率が低下していた。YA法陽性の中でもIHC法陽性であるミスセンス群は、IHC法陰性のフレームシフト群に比較して有意に脈管浸潤が多く見られた。

## 考察

本研究により、酵母を用いた YA 法は、簡便・安価でさらに高感度な変異型 p53 の検出法であることが判明した。さらに、IHC 法を組み合わせることにより、ミスセンスおよびフレームシフトの同定が、塩基配列の決定を行うことなく可能であることを証明した。一般に、変異型 p53 のミスセンス変異は生物学的に悪性度が高いと言われており、本研究でも ER 陰性率、脈管浸潤所見および術後生存率との関連において同様な結果が得られた。したがって、YA 法は乳癌症例の変異型 p53 の同定に極めて有用である。さらに YA 法と IHC 法を組み合わせることにより、それらの p53 変異の塩基配列を煩雑な分子生物学的手法を用いずして分類できることは臨床的に重要である。即ち、YA 法と IHC 法の併用により乳癌症例の悪性度を正確に予測し、それに基づき抗癌剤、biological response modification、放射線療法等による適切な術後治療法の選択が可能となり、さらには予後の改善に寄与すると考えられる。今後生検材料を用いた YA 法による p53 変異検出法を開発することにより、術前から正確な悪性度の判定に基づく治療法の選択が可能となると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省  
副 査 教 授 加 藤 紘 之  
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

## Yeast Functional Assay と免疫組織染色法を 用いたヒト乳癌の p53 変異の解析

最近、酵母を用いた癌抑制遺伝子p53の変異を検出する新しい方法(yeast functional assay)が開発された。同法は簡便・安価のみならず従来の検出法(PCR-SSCP)より高精度であることが口腔扁平上皮癌を用いた研究で明らかにされている。今回、52例のヒト乳癌組織を用いyeast functional assay法(YA)によるp53変異率を分析するとともに、同一乳癌組織を用いたp53免疫組織染色法(IHC)の結果と比較した。さらに臨床病理学的因子との関連について検討した。平成5年より平成8年までに北海道大学医学部第一外科にて行われた乳癌手術例より52例を無作為に抽出し、柏崎らの方法に準じてp53 YAを行った。肉眼的に変異型p53(赤コロニー)と野生型p53(白コロニー)の比率を算定し、16 %以上のものを陽性とし10 %以下を陰性、両者の中間を境界型とした。境界型と陽性の検体については独立した4個の赤コロニーをピックアップし塩基配列を解析した。p53免疫組織染色(IHC)は一次抗体としてDO7を反応させ、癌組織において10 %以上の細胞の核が染色されていれば陽性とした。これらによって得られたp53の異常と臨床病理学的因子、予後との関連を調べた。YA: 52症例中19例(36.5 %)は陽性であり境界型は3例(5.8 %)、陰性が30例(57.7 %)を占めた。YA法陽性および境界例について塩基配列を解析した結果では、陽性例は全例独立した4個のコロニーの結果が一致するclonalな変異を示し、境界型はrandomな変異を示した。IHC: 52例中11例(21.2%)において核のp53が陽性に染色された。41例(79.8 %)は染色陰性であった。YA法とIHC法の関連: YAとIHCの結果に基づき52症例を4群に分類した。第1群はYA(+), IHC(+)の症例で8例(15.4 %)であった。第2群はYA(+), IHC(-)の症例で11例(21.2 %)であった。第3群はYA(-), IHC(+)の症例で、3例(5.8 %)だけであった。第4群はYA(-), IHC(-)の症例で、30例(57.7 %)がこれに属した。塩基配列を解析すると第1群の8例中7例はDNA結合領域内のミスセンス変異がであり、変異の箇所はコドン150-300の間に集中していた。一方第2群では11例中8例が塩基の欠失あるいは挿入によるフレームシフト変異または停止コドンとなるナンセンス変異であり変異の箇所は一定した傾向は得られなかった。臨床病理学的因子との関連: 検討した臨床病理学的因子のうちYAおよびIHC陽性率はエストロゲンレセプター(ER)陰性率、脈管浸潤率および術後生存率と有意に相関した。特にYA法陽性のものは、ER陰性率が高く脈管浸潤が多く術

後生存率が低下していた。YA法陽性の中でもIHC法陽性であるミスセンス群は、IHC法陰性のフレームシフト群に比較して有意に脈管浸潤が多く見られた。

審査にあたって加藤教授から赤コロニーの比率と悪性度との関連、他の癌や生検材料への応用などについて質問があった。申請者は申請者自身の実験データを引用し、赤コロニーの比率が高い症例はほとんどミスセンス変異をおこしており予後不良であったこと、一部のミスセンス変異は赤コロニーの比率は低くても悪性度が高かったことを明解に応答した。守内教授より従来のアッセイとの比較、免疫染色と酵母アッセイの結果の差異に関する事などについて質問があった。申請者は申請者自身の実験データ、インターネット上に公開されているp53変異の報告例をまとめたデータベースなどを引用し、酵母アッセイは従来の方法より高感度でp53変異を検出可能であるため、YAとIHCの結果の差異を利用し乳癌症例の分類ができることを応答した。細川教授より予後不良な第1群の治療方針について質問があった。申請者はp53の変異と化学療法や放射線療法に対する感受性に関する報告例を引用し、現在確定した治療方針はないが、今後プロスペクティブな研究より適切な治療法を見つけていく必要があると応答した。主査よりさらに感度をあげる方法や予後診断としての臨床応用などについての質問があった。申請者は分子生物学的知見、申請者自身の実験データなどを引用し、さらに検出感度を高めることは困難であること、YAは従来の方法より正確にp53の異常を判定できるためp53の変異と予後に相関が見られ、治療成績向上に役立つことを明解に回答した。

さらに、このYAとIHCとの結果の差異を利用した新しい分類法を臨床応用し、予後不良の群に対する治療指針が決定されれば癌治療成績の向上が期待される。

審査員一同は、これらの結果を高く評価し、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。