

学 位 論 文 題 名

多形膠芽腫における腫瘍抑制遺伝子 p53 の

変異とその臨床病理学的意義

学位論文内容の要旨

＜緒言＞ 多形膠芽腫は成人脳に発生する最も悪性な脳腫瘍の一つで、様々な治療の施行に関わらず、その予後は極めて悪い。多形膠芽腫の予後に関わる因子として年齢、手術、腫瘍の局在、放射線治療、術後の神経症状(Karnofsky performance status,以下KPS)等が報告されているが、いずれにせよ5年以上の生存例は稀である。多形膠芽腫での遺伝子異常として、腫瘍抑制遺伝子p53の変異、p16遺伝子の変異・欠失、上皮細胞増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor,以下EGFR)の遺伝子再構成・増幅、第10染色体の欠失などが報告されているが、p53の変異は星細胞腫で約半数に認められる。p53のノックアウトマウスの星状膠細胞は増殖が早く、不死化しており、12代継代培養すると腫瘍形質を獲得する。膠芽腫の細胞株に野性型p53を導入すると腫瘍形質が失われる。p53の変異が原因とされるLi-Fraumeni症候群でも、若年者に星細胞腫が高発するなどの理由からp53遺伝子の変異は星細胞腫の原因の一つと考えられている。p53変異のある星細胞腫は高率に再発し、多形膠芽腫へと悪性転化する。このp53機能喪失が関連する悪性転化は多形膠芽腫へ至る経路の一つとされている。従来、多形膠芽腫はp53の変異の有無により2群に分類され、変異のあるものは比較的若年発症で予後が良く、無いものはEGFRの過剰発現を認め、高齢発症で予後不良とされている。しかしながら、多形膠芽腫におけるp53の変異の臨床的意義は必ずしも明らかとなっていない。そこで今回、多形膠芽腫におけるp53の変異とその臨床病理学的意義を検討した。

＜材料と方法＞ 対象は、1990年6月から1996年12月までに北海道大学附属病院ならびに関連施設で、摘出手術あるいは生検を受け、WHO分類に基づいて、多形膠芽腫(WHO Grade IV) と病理学的に診断された計42例である。

1. Yeast functional assay によるp53変異の検出 腫瘍組織は-80℃で冷凍保存の後、Trizol溶液と共にホモジナイザーで破碎しAGPC法により全RNA抽出を行った。抽出したRNAをp53特異的プライマーにて、逆転写反応を行い、このcDNAを鋳型としてp53特異的プライマーにて、PCR増幅をおこなった。p53レポータープラスミドをあらかじめ組み込んだ ADE2変異酵母株yIG397を使用し、アデニンを含む完全YPDA++で培養し、PCR産物を線形化されたp53発現ベクターpSS16とともに酵母 yIG397にリチウム酢酸・熱ショック法で導入し、低アデニン加・ロイシン無添加選択プレート上で30℃に

て48時間培養した。ADE2遺伝子変異株の酵母内で野性型p53が発現すると、酵母に導入してあるレポータープラスミドのp53蛋白認識配列に結合し、下流のADE2遺伝子の転写を活性化し、アデニン合成経路が正常に作動し酵母コロニーは白色となり、変異型p53が発現すると異常なp53蛋白が合成され、ADE2遺伝子は転写されず、アデニン合成の中間代謝産物が蓄積し酵母コロニーが赤くなる。コロニー形成後、赤コロニーの百分率を計算し、赤コロニーが10%以上のものをp53変異ありとした。

2. EGFR免疫組織化学染色 病理標本の利用可能であった37例でEGFR免疫組織化学染色を施行した。ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い、90℃の10mMのクエン酸緩衝液にて20分間処理した後、50倍のウサギポリクローナル抗体を4℃で一晩反応させ、ビオチン化抗ウサギIgGやポリクローナル抗体を用い、ABC法にて染色した。染色の判定は著者を含めた3人の独立した判定者によって行い、その判定結果を総合した。

3. 放射線感受性 放射線照射前後のMRIで腫瘍の状態を評価し、放射線照射終了後から再増大までの期間(time to progression,以下TTP)を放射線による制御期間とした。

4. 統計学的検討 年齢、性別、p53変異、EGFR染色、腫瘍の局在、手術による腫瘍摘出度、術後のKPSの7つの項目で発症後の生存期間(survival)及びTTPとの関係を統計学的に検討した。survival及びTTPはKaplan-Meier法により計算し、log-rank解析にて有意差検定を行った。同時にCoxの比例ハザードモデルにて多変量解析を行い、危険率5%以下のとき有意差ありとした。

<結果> 1. p53変異 42例中、p53の変異を認めたのが18例(43%)、変異の無いのが24例であった。変異の有る群(平均42歳)が無い群(平均55歳)より有意に若い年齢にて発病していた。(p<0.027)

2. EGFRの発現 p53変異を認めた17例のうち10例でEGFR染色が陽性であり、p53変異を認めなかった20例中14例で陰性であった。p53変異のある例でEGFRの発現が強い傾向があるが、有意な差は認めなかった。(p=0.078)

3. 予後に関わる因子 log-rank 解析では、発症年齢が若く(50歳以下,p<0.0111)、p53変異が有り(p<0.0005)、腫瘍が浅い部位にあり(p<0.0026)、術後のKPSが良いほど(80以上のとき,p<0.0147) survivalが長いという結果であった。多変量解析ではp53変異(p<0.0335)と腫瘍の局在(p<0.0297)のみがsurvivalと相関する因子であった。

4. 放射線感受性に関わる因子 log-rank 解析では放射線感受性を高める因子は年齢(50歳以下のとき,p<0.0145)、p53変異の有るとき(p<0.0001)、腫瘍が浅い部位とき(p<0.0122)、手術により根治的に摘出したとき(p<0.0198)、術後のKPSが良いとき(80以上:p<0.0001)であった。多変量解析ではp53変異があること(p<0.0146)のみが放射線感受性を高める因子であった。

5. 放射線による再発抑制期間と生存期間の関係 腫瘍の再増大から死亡までの期間は、p53変異の有る群(平均11.4年)と、無い群(平均9.1年)では有意な差はなかった(p=0.3785)。そして、survivalとTTPとのあいだには有意な相関が得られた(p<0.0001)。

以上の結果より、p53の変異は予後においても放射線感受性においても最も相関の高い因子であり、p53変異のある多形膠芽腫では有意に放射線の感受性が高く、それが予後に

影響していると考えられる結果であった。

＜考察＞ 従来、p53変異腫瘍は放射線抵抗性と考えられているが、今回の検討ではp53変異の有る多形膠芽腫の方が放射線感受性であるという結果であった。この原因として、p53変異の有無にかかわらず、多形膠芽腫ではp53依存性のアポトーシスは起こらなくなっている可能性があり、p53変異の有るときは放射線によるDNA損傷後、p53非依存性のアポトーシスにより細胞死となるが、変異の無い細胞ではG1期停止を起こし、細胞死には至らない。このため結果としてp53変異の無い細胞では放射線感受性が低くなると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

多形膠芽腫における腫瘍抑制遺伝子 p53 の 変異とその臨床病理学的意義

腫瘍抑制遺伝子p53の遺伝子転写活性可能を直接判定できるYeast functional assay 及びEGFR免疫組織化学染色を用いて多形膠芽腫におけるp53の変異とその臨床病理学的意義を検討した。対象は、1990年6月から1996年12月までに北海道大学附属病院ならびに関連施設で、摘出手術あるいは生検を受け、WHO分類に基づいて、多形膠芽腫 (WHO Grade IV) と病理学的に診断された計42例である。

この42例についてYeast functional assay にてp53の変異を検討、免疫組織化学染色にてEGFRの過剰発現を調べた。次に放射線照射前後のMRIで腫瘍の状態を評価し、放射線照射終了後から再増大までの期間を放射線による制御期間とし、年齢、性別、p53変異、EGFR染色、腫瘍の局在、手術による腫瘍摘出度、術後のKarnofsky performance status(KPS)の7つの項目で発症後の生存期間及び放射線による制御期間をKaplan-Meier法により計算し、log-rank解析にて有意差検定を行った。同時にCoxの比例ハザードモデルにて多変量解析を行い、危険率5%以下のとき有意差ありとした。

42例中、p53の変異を認めたのが18例 (43%)、変異の無いのが24例であった。変異の有る群(平均42歳)が無い群(平均55歳)より有意に若い年齢にて発病していた。(p<0.027) p53変異を認めた17例のうち10例でEGFR染色が陽性であり、p53変異を認めなかった20例中14例で陰性であった。p53変異のある例でEGFRの発現が強い傾向があるが、有意な差は認めなかった。(p=0.078) 発症後の生存期間についてはlog-rank 解析では、発症年齢が若く(50歳以下,p<0.0111)、p53変異が有り(p<0.0005)、腫瘍が浅い部位にあり(p<0.0026)、術後のKPSが良いほど(80以上のとき、p<0.0147) 生存期間が長いという結果であった。多変量解析ではp53変異(p<0.0335)と腫瘍の局在(p<0.0297)のみが生存期間を規定する因子であった。放射線感受性についてはlog-rank 解析では放射線感受性を高める因子は年齢(50歳以下のとき,p<0.0145)、p53変異の有るとき(p<0.0001)、腫瘍が浅い部位とき (p<0.0122)、手術により根治的に摘出したとき (p<0.0198)、術後のKPSが良いとき (80以上:p<0.0001)であった。多変量解析で

はp53変異があること($p<0.0146$)のみが放射線感受性を高める因子であった。腫瘍の再増大から死亡までの期間は、p53変異の有る群(平均11.4月)と、無い群(平均9.1月)では有意な差はなかった($p=0.3785$)。そして、生存期間と放射線感受性とのあいだには有意な相関が得られた($p<0.0001$)。以上の結果より、p53の変異は予後においても放射線感受性においても最も関係の高い因子であり、p53変異のある多形膠芽腫では有意に放射線の感受性が高く、それが予後に影響していると考えられる結果であった。

公開發表において長嶋和郎教授より星細胞腫から多形膠芽腫への悪性転化とp53変異の関係、及び放射線治療の感受性の判定法について質問があった。次いで守内哲也教授より、p53変異とMDM2遺伝子増幅の関係、及び放射線照射によるアポトーシスの誘導について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、豊富な知識に基づいて明快に解答した。

この論文は、多形膠芽腫における腫瘍抑制遺伝子p53の変異の意義、特に放射線感受性との関係を明かにした点で高く評価され、今後の多形膠芽腫での実臨床とくに放射線治療において役立つものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(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。