

学位論文題名

Cyclin D1 expression in non-small-cell lung cancers :  
its association with altered p53 expression,  
cell proliferation and clinical outcome

(肺非小細胞癌におけるサイクリンD1の発現と  
p53タンパク質発現異常, 細胞増殖, 予後との関係)

学位論文内容の要旨

【背景】細胞周期の調節制御は、おもにG<sub>1</sub>期の後期 (G<sub>1</sub> check point) になされる。サイクリンD1は、G<sub>1</sub>サイクリンファミリーの1つであり、cyclin-dependent kinases (CDK) 4、6と結合し、RBタンパク質 (RB) をリン酸化 (不活化) することによって、このG<sub>1</sub> check pointにおいて細胞周期の進行を正に制御している。p16<sup>INK4A</sup>タンパク質 (p16) は、CDK4、6-サイクリンD1に対するCDKインヒビターである。以前我々は、肺非小細胞癌におけるp16およびRBのレシプロカルな発現異常を明らかにし、細胞増殖に対して、p53タンパク質 (p53) 異常と相乗効果を及ぼすことを示した (Kinoshita et al., Cancer Res., 56: 5557-5562, 1996)。一方、サイクリンD1遺伝子の増幅や過剰発現が、食道癌、頭頸部扁平上皮癌、乳癌等、種々のヒト癌で報告されており、予後との関係も示されている。

【目的】今回我々は、サイクリンD1の肺非小細胞癌の発生、進展における役割を明らかにするため、サイクリンD1の発現の有無、サイクリンD1の遺伝子増幅の有無を解析し、サイクリンD1発現の有無と、臨床病理学的因子、細胞周期調節因子群 (p53、p16、RB) の異常、細胞増殖能 (Ki-67陽性細胞率) との関連や、1990年から1995年の間に治癒切除を受けた肺非小細胞癌患者77例の予後との関係を調べた。

【材料と方法】(1) 1990年から1995年に手術で摘出され、凍結保存された、以前の研究 (Kinoshita et al., 1996) で用いたものと同じ肺非小細胞癌組織111検体を材料とした。薄切、ホルマリン固定後、一次抗体として抗サイクリンD1抗体 (DCS-6) を用いてSAB法にて免疫染色を施行し、一部の腫瘍細胞にでも核に一致して染色が認められたものを陽性と判定した。陽性コントロールとして、サイクリンD1タンパク質発現が既に明らかな食道扁平上皮癌を用いた。(2) 1990年から1995年に手術で摘出され、凍結保存された肺非小細胞癌組織29検体を材料とした。各肺癌組織から、核酸抽出剤SepaGeneを用いて高分子DNAを抽出し、RNAを除くためRNase処理を行った。サイクリンD1プローブ (Dr. A. Arnold, Massachusetts General Hospital, Boston, MAより供与) を用いてサザンブロット法を施行し、オートラジオグラフィのバンド濃度をデンストメーターで測定した。コン

トロールの遺伝子として心アクチン遺伝子を、正常コントロール組織として正常肺組織を用いた。(3) Ki-67陽性細胞率やp53、p16、RBの異常の有無に関しては、以前に免疫染色によって検討、報告した結果 (Kinoshita et al., 1996) を用いた。(4) 根治手術を施行した77例において、サイクリンD1発現の有無と生存期間の関係について、術後生存曲線をKaplan-Meier法で作成し、Log-rank法を用いて統計学的に検討した。

【結果】(1) サイクリンD1は、肺非小細胞癌111腫瘍中13腫瘍 (11.7%) で発現していた。サイクリンD1発現の機序を探るためにサザンプロット法を施行したが、(2) 心アクチン遺伝子量で補正した肺癌組織におけるサイクリンD1遺伝子量は、同様に補正した正常肺組織におけるサイクリンD1遺伝子量に比べて、0.6~2.2倍であり、明らかな遺伝子増幅を示す腫瘍は認められず、また、明らかな遺伝子再構成を示す例も認められなかった。(3) サイクリンD1の発現は、pT1腫瘍よりpT2-4腫瘍で多く認められた (31腫瘍中1腫瘍 vs. 80腫瘍中12腫瘍) が、統計学的有意差は認められなかった。サイクリンD1発現の有無と、年齢、性別、喫煙、組織型、術後N、M因子、術後病理病期との間に、有意な相関は認められなかった。(4) サイクリンD1発現陽性11腫瘍は、陰性91腫瘍に比し、Ki-67陽性細胞率はMean、Medianともに高く、Mann-Whitney U検定で $p = 0.08$ と傾向差が認められた。(5) サイクリンD1発現陽性とp53タンパク質異常との間に、有意な相関が認められた ( $p = 0.04$ ) が、p16やRB発現異常との間には、有意な相関は認められなかった。また、p16とRBは細胞周期制御の上で同一の系で機能し、肺非小細胞癌ではどちらか一方の発現が異常となっていることが示されている (Kinoshita et al., 1996) ので、サイクリンD1の発現の有無を、p16とRB発現がともに正常の腫瘍とどちらか一方の発現が異常の腫瘍に分けて検討してみたが、やはり有意な相関は認められなかった。(6) サイクリンD1発現陽性の肺癌患者の方が、サイクリンD1発現陰性肺癌患者より、有意に術後生存期間が長く (5年生存率; 89% vs. 64%,  $p = 0.045$ )、サイクリンD1の発現陽性は、単変量解析上、予後を良好とする因子である傾向があった ( $p = 0.08$ )。

【考案】免疫染色によって検討された、サイクリンD1発現が陽性の肺非小細胞癌の割合や癌細胞内での局在は、報告により差があり (本研究では11.7%で、核に局在)、これは、一次抗体や抗原賦活法、組織検体の固定や保存法、期間等の違いによるのではないかと考えられた。肺非小細胞癌におけるサイクリンD1発現の機序は、遺伝子増幅や再構成によるのではなく、これまでに報告があるepidermal growth factor (EGF) やras癌遺伝子産物等が関与する情報伝達系の異常による過剰発現や、サイクリンD1タンパク質分解の異常等によるのかもしれない。サイクリンD1発現陽性とp53タンパク質異常との間の有意な相関から、肺非小細胞癌の発生、進展の過程で、それらの異常が同時に生じる可能性や遺伝子異常の蓄積を反映している可能性が考えられ、サイクリンD1が肺非小細胞癌の発生、進展に何らかの形で関与しており、その一部は、Ki-67陽性細胞率との関係から、癌細胞の増殖促進であると考えられた。しかし、患者の予後に関しては、サイクリンD1は生存期間を延長することに寄与していることが示唆され、本研究においてはその機序は不明だが、サイクリンD1が細胞のアポトーシスを誘導するとの報告もあり、今後、長期に渡った均一でより多くの症例での検討や、in vitroでの研究によって、さらに

サイクリンD1の多彩な機能や今回検討されていない他の様々な細胞周期調節因子群等との相互作用等の解明、整理が必要であると思われる。

【結論】サイクリンD1発現は、肺非小細胞癌の発癌、進展、細胞増殖能に関与する一方、臨床的には術後予後良好因子となることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

## Cyclin D1 expression in non-small-cell lung cancers : its association with altered p53 expression, cell proliferation and clinical outcome

(肺非小細胞癌におけるサイクリンD1の発現と  
p53タンパク質発現異常, 細胞増殖, 予後との関係)

細胞周期の調節制御は、主にG1期の後期 (G1 check point) になされる。サイクリンD1は、cyclin-dependent kinases (CDK) 4、6と結合し、RBタンパク質 (RB) をリン酸化 (不活性化) することによって、このG1 check pointにおいて細胞周期の進行を正に制御している。p16<sup>INK4</sup>タンパク質 (p16) が、CDK4、6/サイクリンD1複合体に対するCDKインヒビターである。以前、本申請者を含めたグループは、肺非小細胞癌におけるp16およびRBのレシプロカルな発現異常を明らかにし、細胞増殖に対して、p53タンパク質 (p53) 異常と相乗効果を及ぼすことを示している (Kinoshita et al., Cancer Res., 56: 5557-5562, 1996)。今回の研究では、サイクリンD1の肺非小細胞癌の発生、進展における役割を明らかにするため、サイクリンD1の発現の有無を、以前の研究と同じ手術摘出肺非小細胞癌組織111検体を対象にして、免疫組織化学的に検討した。また、29例においては、サイクリンD1発現の機序を探るため、サイクリンD1の遺伝子増幅の有無をサザンブロット法で解析した。更に、サイクリンD1発現の有無と、臨床病理学的因子、細胞周期調節因子群 (p53、p16、RB) の異常、細胞増殖能 (Ki-67陽性細胞率) との関連や、1990年から1995年の間に治癒切除を受けた肺非小細胞癌患者77例の予後との関係が調べられた。その結果、サイクリンD1は、肺非小細胞癌111腫瘍中13腫瘍 (11.7%) で発現していることが明らかとなった。しかし、サイクリンD1遺伝子の明らかな増幅や再構成は認められず、肺非小細胞癌におけるサイクリンD1発現の機序は、これまでに報告があるepidermal growth factor (EGF) やras癌遺伝子産物等が関与する情報伝達系の異常や、サイクリンD1タンパク質分解の異常等による可能性があることが考察された。また、サイクリンD1発現陽性腫瘍では同陰性腫瘍

に比し、Ki-67陽性細胞率が高い傾向にあり ( $p = 0.08$ )、サイクリンD1発現陽性とp53タンパク質異常との間に、有意な相関が認められた ( $p = 0.04$ ) が、p16やRB発現異常との間には、有意な相関は認められなかった。サイクリンD1発現陽性とp53タンパク質異常との間の有意な相関から、肺非小細胞癌の発生、進展の過程で、それらの異常が同時に生じる可能性や遺伝子異常の蓄積を反映している可能性が考えられ、サイクリンD1が肺非小細胞癌の発生、進展に何らかの形で関与しており、その一部は、Ki-67陽性細胞率との関係から、癌細胞の増殖促進であると考察された。一方、サイクリンD1発現陽性の肺癌患者の方が、サイクリンD1発現陰性肺癌患者より、有意に術後生存期間が長く (5年生存率; 89% vs. 64%,  $p = 0.045$ )、サイクリンD1の発現陽性は、単変量解析上、予後良好因子である傾向があった ( $p = 0.08$ )。本研究においてはその機序は検討されていないが、サイクリンD1が癌細胞のアポトーシスを誘導するとの報告があることについても言及し、サイクリンD1の多彩な機能の更なる解明が必要であるとまとめられた。

公開発表にあたって、副査加藤紘之教授より、免疫組織化学によるサイクリンD1染色性の程度と判定基準、他の因子p53やKi-67の予後への影響と今回成績との関係、サイクリンD1の増殖促進作用以外の多様な機能、サイクリンD1陽性9症例のpTNM分類と、総合的に判断してのサイクリンD1陽性の予後因子としての重要性についてなど、副査川上義和教授より、研究方法から見た今回の成績の信頼性、検索材料の準備方法、サイクリンD1陽性症例が予後良好となるのは予想に反しているが、総合的に判断すると多くの遺伝子群の中で予後規定因子としては何が重要かなど、主査細川真澄男教授より予後規定因子の重みづけとサイクリンD1の発現を促す因子について質問があり、申請者は自分の所属する研究グループから以前に報告された成績も引用して妥当に回答し得た。

本論文は、サイクリンD1発現が、肺非小細胞癌の発癌、進展、細胞増殖能に関与する一方、臨床的には他臓器原発の癌とは異なり術後予後良好因子となることを示唆しており、サイクリンD1の、肺癌の分子生物学における役割と臨床における役割を明らかにしたのみならず、それらを有機的に結び付けようと試みた点でも高く評価され、今後、更なるサイクリンD1の機能解明が期待される。

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。