

学 位 論 文 題 名

Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor.

(星細胞腫における p53 遺伝子変異細胞は選択的増殖を起こし、腫瘍の悪性化ならびに予後の悪化に強い影響を及ぼす。)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 p53 癌抑制遺伝子異常は星細胞腫(astrocytoma)の約 40%で発見されており、腫瘍発生、悪性化に大きく関わっていると考えられている。本疾患は、一般的には比較的良性腫瘍と理解されているが、しばしば、悪性化を伴って再発し、この場合の予後は、非常に不良である。従って、この悪性化の機構を解明、理解することは、非常に重要である。これまで、p53 と星細胞腫の臨床予後に関する報告は散見されるが、いずれも免疫染色法や SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法を用いたもので、これらの検出法は p53 遺伝子機能異常を正確には反映せず、統一した見解は得られていない。また、腫瘍の悪性化に伴う p53 異常細胞のクローンの増大(clonal expansion) 現象に関する報告は唯一 Sidransky らの 2 例をみるのみで、この現象が一般的なものなかは不明である。そこで、本研究では、①星細胞腫における p53 遺伝子異常と予後について②星細胞腫の悪性化に伴う p53 遺伝子異常細胞集団のクローンの拡大について、の二点を主題に、酵母を用いた p53 機能アッセイを用い、より大きな患者集団において検討を行った。本アッセイ法は、遺伝子の転写活性化能異常を定量的検出が可能という利点を持つ。

【材料および方法】 対象は、スイス国ローザンヌ市中央病院脳神経外科において 1983 年から 1995 年に手術で摘出された原発性星細胞腫(WHO grade II) 60 例のうち、迅速凍結組織標本が保存され、かつ 3 名の神経病理医 (RCJ,KVM,ODW)による診断が一致した 36 例である。P53 遺伝子の検討を、この初発腫瘍に加え再発腫瘍において行った。アッセイは、凍結標本組織より mRNA を抽出し、p53 特異的プライマー(RT-1)と MMLV 逆転写酵素を用いて cDNA に変換後、pfu ポリメラーゼと p53 特異的プライマー(P3,P4)を用い PCR 増幅を行った。これを、p53 発現ベクター pLS76 とともに leu2, ade 2 欠損リポーター酵母株 yIG397 に導入し、低アデニン、ロイシン無添加選択合成培地に 48 から 72 時間培養した。本アッセイでは、発現された p53 蛋白が正常な転写活性能を有する場合は、

リポーターの p53 配列下流の ADE2 遺伝子が酵母内で発現され正常な白色コロニーを形成するが、p53 が変異体の場合は、ADE2 が発現せず、中間代謝産物の phosphoribosylaminoimidazole が蓄積し酵母は赤色コロニーを呈する。アッセイの結果 10% 以上の赤色コロニーを呈した症例では p53 遺伝子変異を疑い、4 個以上の赤色コロニーからプラスミドを抽出し、自動シーケンサーにて塩基配列解析を行った。

患者の生存解析には、Kaplan-Meier 法を用いた。Progression-free-survival (PFS) は、初回手術から第 2 回手術までの、あるいは腫瘍の再発が画像診断で明らかになった時点の期間とし、overall survival (OS) は初回手術から死亡時もしくは最終観察時点 (1998 年 9 月 1 日) とした。PSF と OS に帰与する各因子についての多変量解析は Cox proportional hazard model を用いた。

【結果】 初発腫瘍 36 例中 p53 遺伝子変異は 14 例(39%)で検出された。このうち、13 例(92%)で再発がみられ、うち 8 例 (57%)では再発時の組織像に悪性転化が観察された。また、これらの再発腫瘍においては常に赤色コロニーの割合が初発腫瘍に比べ増加していた。塩基配列解析の結果では、初発と再発腫瘍では常に同一の遺伝子変異が検出された。これは、腫瘍の再発、悪性化には、p53 変異細胞集団のクローンの拡大を伴うことを示唆した。一方、変異の検出されなかった群 22 例では、再発が 14 例 (64%) に、悪性転化が 9 例 (41%) にみられ、この再発腫瘍は全て野生型 p53 であった。野生型 p53 群のうち 8 例で再発が見られなかった。

生存解析では、変異型 p53 群では野生型 p53 群に比べ PFS が有意に短縮していた ( $47.6 \pm 9.6$  ヶ月 vs.  $67.8 \pm 8.2$  ヶ月;  $p < 0.05$ , log-rank test)。OS に関しても変異型 p53 群の短縮傾向がみられたが、その差は統計学的有意に届かなかった ( $p = 0.13$ )。予後因子解析においては、p53 遺伝子変異と放射線照射が予後不良と強い関連をしめした。

【考察】 今回の結果から、星細胞腫における p53 遺伝子異常は腫瘍の再発、悪性転化に強く関わり、患者の予後に強い影響を与えていることが観察された。すなわち、星細胞腫に p53 変異細胞が存在する場合、これら細胞は遺伝子的に不安定であることから生物学的悪性度を増し、この細胞集団の選択的な増殖が起ると推察された。これは、1976 年に Nowell が提唱した clonal expansion model を確証するものと思われる。

一方、星細胞腫の大多数は p53 変異とは無関係に発生すること、さらにこれらの中には予後の良好な群と不良群が混在することも確認された。将来的にこれらの分子生物学的特徴付けが可能となれば、星細胞腫を細分化することで治療法の改善、さらには予後の改善が期待できると思われた。

#### 【結語】

p53 遺伝子異常は星細胞腫の約 40% でみられ腫瘍の発生に強く関与している可能性が示唆された。また、この群では p53 変異細胞が clonal expansion を起こし腫瘍の悪性化や患者予後の悪化に強く影響していると考えられた。

# 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

## Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor.

(星細胞腫における p53 遺伝子変異細胞は選択的増殖を起こし、腫瘍の悪性化ならびに予後の悪化に強い影響を及ぼす。)

p53 癌抑制遺伝子異常は星細胞腫(astrocytoma)の約 40%で発見されており、腫瘍発生、悪性化に大きく関わっていると考えられている。本疾患は、一般的には比較的良性腫瘍と理解されているが、しばしば、悪性化を伴って再発し、この場合の予後は、非常に不良である。従って、この悪性化の機構を解明、理解することは、非常に重要である。そこで、本研究では、①星細胞腫における p53 遺伝子異常と予後について②星細胞腫の悪性化に伴う p53 遺伝子異常細胞集団のクローンの拡大について、の二点を主題に、検討を行った。p53 遺伝子異常は、酵母を用いた p53 機能アッセイを用い検出した。本アッセイでは、組織内由来の p53 蛋白が正常な転写活性を有する場合は、酵母は正常な白色コロニーを形成し、p53 が変異体の場合は、酵母は赤色コロニーを呈すことから、これらのコロニーをカウントすることで、検体組織内に存在した野生型と変異型 p53 遺伝子の相対比を調べる事が可能と考えらる。遺伝子変異が疑われた場合は、塩基配列解析を行った。対象は、スイス国ローザンヌ市中央病院脳神経外科において 1983 年から 1995 年に手術で摘出された原発性星細胞腫(WHO grade II)36 例である。この初発腫瘍に加え再発腫瘍において行った。その結果、p53 遺伝子変異は grade II astrocytoma の 39%で検出されたが、これらは非常に高率に再発悪性化した。また、再発腫瘍においては常に赤色コロニーの割合が初発腫瘍に比べ増加していた。塩基配列解析の結果では、初発と再発腫瘍では常に同一の遺伝子変異が検出さ

れたことから、腫瘍の再発悪性化には、p53 変異細胞集団のクローンの拡大を伴うことが示唆された。一方、変異の検出されなかった群では、36%で再発が見られず、悪性化率も、変異型群に比べ有意に低かった。Kaplan-Meier 法を用いた生存解析では、変異型 p53 群では野生型 p53 群に比べ PFS が有意に短縮していた( $p < 0.05$ )。OS についても変異型 p53 群の短縮傾向がみられたが、その差は統計学的有意に届かなかった( $p = 0.13$ )。予後因子解析においては、p53 遺伝子変異と放射線照射が予後不良と強い関連を示した。

今回の結果から、星細胞腫における p53 遺伝子異常は腫瘍の再発、悪性転化に強く関わり、患者の予後に強い影響を与えていることが観察された。すなわち、星細胞腫に p53 変異細胞が存在する場合、これら細胞は遺伝子的に不安定であることから生物学的悪性度を増し、この細胞集団の選択的な増殖が起ると推察された。これは、1976 年に Nowell が提唱した clonal expansion model を確証するものと思われる。

公開発表において、その後、守内哲也教授より、de novo glioblastoma における p53 変異の役割との相違点について、p53 の DNA 結合ドメイン部以外の変異について、X 線照射の影響についてなどに関する質問があった。次いで、長嶋和郎教授より腫瘍細胞の heterogeneity (異種混在性) について、p53 遺伝子と血管新生因子の関連について、p53 以外の予後因子についての質問があった。最後に、阿部弘教授より p53 以外の遺伝子異常についての質問があった。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解に解答した。

この論文は、low grade astrocytoma の発生、悪性化における p53 遺伝子異常役割を明らかにした点が高く評価され、今後の low grade astrocytoma に対する基礎研究ならびに治療法の改善に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、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。