

学位論文題名

Prognostic Significance of p27^{KIP1} Protein and
Ki-67 Growth Fraction in Non-small Cell Lung Cancers

(肺非小細胞癌手術摘出腫瘍における P 27/Kip 1 および
Ki-67 タンパク質発現異常の意義)

学位論文内容の要旨

p27/Kip1 タンパク質 (p27) は、サイクリン依存性リン酸化酵素抑制因子 (CDK inhibitor) の一つで、retinoblastoma 蛋白質のリン酸化を抑制することによって細胞周期の G1/S 期間の移行を負に制御していると考えられている。これまで乳癌、大腸癌、胃癌、肺癌、前立腺癌などで、p27 の発現が低い群が有意に生存期間が短く、独立した予後因子であるとの報告がある。また、Ki-67 は腫瘍の増殖能の指標で、肺非小細胞癌の予後因子であることが報告されている。肺非小細胞癌における p27 および Ki-67 発現を免疫組織化学的に解析し、発現異常の有無とその臨床的意義を検討した。また、同一検体で過去に報告した ras p21 タンパク質 (ras) の発現 (Harada, M., et al, Cancer, 69:72-77,1992)との関係もあわせて解析した。

方法は、肺非小細胞癌手術摘出腫瘍 215 例において、p27 の発現をモノクローナル抗体 clone 1B4 を、Ki-67 の発現を MIB-1 抗体を用いて、免疫組織化学的に検討した。組織型は、腺癌 106 例、扁平上皮癌 91 例、大細胞癌 10 例、腺扁平上皮癌 8 例、術後病理病期は I 期 120 例、II 期 17 例、IIIa 期 70 例、IIIb 期 1 例、IV 期 6 例であった。p27 は正常気管支上皮細胞やリンパ球の核に強く染色され、陽性コントロールとして用いた。癌細胞の核がこれらと同等に強く染色されている場合を陽性、陽性コントロールに比べて淡く染まる場合を陰性と判定し、各腫瘍において p27 陽性細胞率 (labeling index) を算定し、5%以上の癌細胞が染色された場合を陽性群、5%未満の場合を陰性群と判定した。Ki-67 については、癌細胞の核が少しでも染色されている場合を陽性、全く染色されない場合を陰性と判定し、30%以上の癌細胞が染色された場合を高発現群、30%未満の場合を低発現群と判定した。

p27 発現は、207 腫瘍中 25 例、13%において陰性であった。p27 と Ki-67 の labeling index には有意な相関はなかった。p27 発現陰性化は年齢、性、組織型、術後病理病期と明らかな関係を示さなかったが、非喫煙者に有意に多く認められた。Ki-67 高発現は、215 腫瘍中、116 例、54%に認められた。Ki-67 高発現は、男性、重喫煙者、扁平上皮癌で有意に多く認められた。

p27 および Ki-67 発現と術後生存期間、予後との関係を、術後病理病期 I および II 期の治癒切除例 109 例について解析した。p27 陰性群は陽性群に比し生存期間が有意に短かった (5 年生存率 ; 38%対 68%, P = 0.02)。Ki-67 高発現群は、低発現群に比し生

生存期間が有意に短かった（5年生存率；48%対78%， $P = 0.005$ ）。種々の因子が予後因子であるか否か多変量解析を行ったところ、p27陰性化は $P = 0.054$ で予後不良の傾向を認め、Ki-67高発現は $P = 0.004$ と有意で独立した予後不良因子であった。肺非小細胞癌を組織型別に扁平上皮癌と非扁平上皮癌に分けて検討すると、p27陰性化は扁平上皮癌で、Ki-67高発現は非扁平上皮癌で有意で独立した予後不良因子であった（それぞれ $P = 0.01, P = 0.007$ ）。さらに、p27発現をKi-67またはrasと組み合わせて術後生存期間との関係を解析した。p27陰性・Ki-67高発現群は、p27陽性・Ki-67高発現群に比し生存期間が有意に短かった（5年生存率；17%対52%， $P = 0.003$ ）。p27陰性・ras陽性群は、p27陽性・ras陽性群に比し生存期間が有意に短かった（5年生存率；0%対38%， $P < 0.0001$ ）。p27陰性化は、これら2つのマーカーと組み合わせることで、より生存の短い群を層別化することができた。

以上の結果から、p27およびKi-67は、肺非小細胞癌術後予後に重要な役割を果たしており、術後早期に再発する患者や、現在無効とされている術後化学療法により延命が期待できる群の層別化に役立つことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Prognostic Significance of p27^{KIP1} Protein and Ki-67 Growth Fraction in Non-small Cell Lung Cancers

(肺非小細胞癌手術摘出腫瘍における p27/Kip 1 および
Ki-67タンパク質発現異常の意義)

本研究では、肺非小細胞癌における p27 および Ki-67 発現を免疫組織化学的に解析し、これらの発現異常の臨床的意義を明らかにした。p27 発現陰性化は、207 腫瘍中 25 例 (13%) に認め、非喫煙以外の因子とは有意な関係を示さなかった。Ki-67 高発現は、215 腫瘍中 116 例 (54%) に認め、男性、重喫煙者、扁平上皮癌で有意に高頻度に認めた。p27 と Ki-67、両者の発現には有意な関係はなかった。p27 陰性群は陽性群に比し、また、Ki-67 高発現群は低発現群に比し、生存期間が有意に短縮していた。肺非小細胞癌全体で p27 陰性化は予後不良の傾向を示し、Ki-67 高発現は有意で独立した予後不良因子であった。組織型別検討では、p27 陰性化は扁平上皮癌で、Ki-67 高発現は非扁平上皮癌で、それぞれ有意で独立した予後不良因子であった。p27 陰性化に Ki-67 または ras を組み合わせることで、より高精度に生存期間の短い群を層別化することができた。

発表後副査葛巻教授から、(1) p27 の細胞接着や浸潤・転移に関して検討しているか、(2) 遺伝子の異常はすべて予後因子になるのか、組み合わせに意味があるか、(3) adjuvant 療法のマーカーとしての意義、について質問があった。それに対して、(1) p27 発現は N、M 因子と有意な関連はなかったので浸潤・転移と強い関連はないと考えるが、臨床的に肺非小細胞癌の術後死亡は遠隔再発によるので、浸潤・転移の機能もあるかもしれない、(2) 肺非小細胞癌は heterogeneous な腫瘍細胞の集団で単独の生物学的因子で層別化することは困難なため、機能や経路が異なる因子を組み合わせることが臨床的意義をもつ、(3) 2、3 種類のマーカーを組み合わせると術後予後が悪いと予想される患者を無治療群と術後化学療法群との 2 群に分けて、prospective な臨床試験を行い術後化学療

法の効果を検証する、と解答した。次いで副査加藤教授から、(1) 免疫染色の具体的な方法論、特にカットオフ値の設定、(2) p27 陰性化が扁平上皮癌で、Ki-67 高発現が扁平上皮癌以外の腫瘍で予後不良因子である理由、(3) 予後因子解析では病理病期 I, II 期に限定した理由、(4) IIIA 期を含むデータ解析、生検材料を用いた手術適応判断における生物学的因子の評価についての質問があった。それに対して、(1) 可能な限り視野数は 10、癌細胞は 1,000 個以上を、申請者一人がカウントした。検体は numbering してあり、臨床的なデータによる bias がかからないようにした。カットオフ値の設定は、p27 については、labeling index のヒストグラム、過去の報告を参照し、また、p27 は癌抑制因子なので、発現が全く陰性化することで機能が喪失する可能性があるという理論的根拠で 5%に設定し、Ki-67 については、labeling index のヒストグラムから、2 峰性のピークがみられたので、30%に設定した、(2) p27 については、p27 は apoptosis を促進するという報告があり、p27 陰性化により癌細胞の不死化が生じることで悪性度を高めている可能性が考えられる。Ki-67 については、腺癌は一般的には進行が緩徐であるが、一方で分化度が低く、細胞増殖能が高い腫瘍があり、細胞増殖能が不均一なため層別化できると考えた、(3) 病期 III, IV の進行期では、縦隔リンパ節転移を含めた癌の広がりや全身状態がより強力な予後因子となるので、生物学的因子による層別化が困難になる、また予後が悪いので層別化しても治療方針が変わらない、(4) I-III A 期の検討では p27 は層別化因子にならなかったが、Ki-67 高発現は有意な予後不良因子だった。IIIA 期においては縦隔リンパ節転移の有無が強力な予後因子になるので、FDG-PET や縦隔鏡を積極的に利用し、I,II 期においてはマーカーを組み合わせた microarray による遺伝子発現を調べて手術適応を判断できる可能性がある、と解答した。引き続き、主査西村教授から、(1) p27 陰性化と in vitro の機能との関係、(2) 5%以上の p27 陽性群がさらに層別化できる可能性、(3) p27 陰性化が非喫煙者に多かった理由、について質問があった。それに対して、(1) 癌細胞株に p27 を過剰発現させると細胞増殖が抑制されたという報告がある、(2) 今回のコホートでは差がでなかったが、p27 発現を 3 または 4 群にわけて、発現が高くなるほど生存期間が延長していたという報告がある、(3) p27 陰性化が非喫煙者に多いということは、p27 陽性群が喫煙者に多いということである。p27 は cyclin E の抑制因子であるが、今回と同じコホートでの検討で、cyclin E 高発現が喫煙者に有意に高頻度に認められたことを報告している。また、卵巣癌で、p27 が高発現していると cyclin E、cdk2 の発現が高いとの報告があり、negative feedback の機序で cyclin E の高発現を抑制するために p27 が陽性になっており、結果として p27 陽性群が喫煙者に多かったという可能性がある、と解答した。

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。