

学 位 論 文 題 名

Prognostic Significance of Bcl-2, p53 Overexpression,  
and Lymph Node Metastasis  
in Surgically-staged Endometrial Carcinoma

(術後臨床期分類された子宮体癌症例における予後因子としての  
Bcl-2, p53 過剰発現, リンパ節転移の意義について)

学位論文内容の要旨

緒言

近年我が国における子宮体癌（以下体癌）罹患数の増加が指摘されており、予後不良症例の的確な分別にもとづいた治療法層別化の確立が求められている。体癌において、生物学的マーカー (biological marker) が、従来の臨床進行期、組織分化度、筋層浸潤の深さなどの予後因子よりも優れたものとなる可能性が考えられる。しかし、現在までのところ、体癌において従来の予後因子よりも信頼できうる生物学的マーカーは確立されていない。

系統的リンパ節郭清術を施行し、術後臨床期分類された体癌症例において、生物学的マーカーとしての Bcl-2 発現, p53 過剰発現について予後因子としての意義を検討することを本研究の目的とした。

対象及び方法

症例

1990～2000 年までの期間に、北海道大学医学部附属病院産婦人科において、体癌根治手術（準広汎あるいは広汎性子宮全摘術+両側付属器摘出術+傍大動脈節までのリンパ節郭清術）後に術後進行期分類ならびに体癌の免疫組織化学染色を施行された 102 症例（年齢 23～87 歳, 平均 57 歳）を対象とした。術後進行期分類 (FIGO1988) の内訳は I 期 58 例 (56.9%), II 期 5 例 (4.9%), III 期 28 例 (27.5%), IV 期 11 例 (10.8%) であった。術後病理組織学的検索において再発の high-risk-group (筋層浸潤 > 1/2, 頸部浸潤, 付属器転移, リンパ節転移, 中等度～高度脈管浸襲などを伴う) と考えられる症例には術後化学療法 (cisplatin 50 mg/m<sup>2</sup>, adriamycin 30-40 mg/m<sup>2</sup>, cyclophosphamide 350 mg/m<sup>2</sup>, 3 週毎) を 3～6 course 施行した。組織型は 93 例が類内膜腺癌, 9 例が特殊型 (漿液性腺癌, 明細胞腺癌) であった。病理組織学的予後因子としては筋層浸潤, 組織分化度 (構造異型度), 核異型度, 脈管侵襲, 卵巣転移, リンパ節転移につき検討した。

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は凍結組織切片を用いて indirect streptavidin-biotin-peroxidase complex 法により行った。抗体には抗ヒト Bcl-2 モノクローナル抗体 (clone 124, DAKO 社) と抗ヒト p53 モノクローナル抗体 (DO-7, DAKO 社) を用いた。Bcl-2 の細胞質染色程度は, 0 : 全く染色されない, 1+ : 50%以下の腫瘍細胞が染色される, 2+ : 50%を超える腫瘍細胞が染色される, と分類した。p53 については核の染色強度と陽性細胞比率から, 0 : 全く染色されない, 1+ : 50%

を超える腫瘍細胞に弱い反応が認められるか、あるいは 50%以下の細胞に強い染色を認めるもの、2+ : 50%を超える腫瘍細胞に強い染色が認められるもの、と分類した。2+を p53 過剰発現と規定した。

### 統計学的解析

観測値の比較には $\chi^2$ -検定あるいは Fisher の直接確率検定を用いた。リンパ節転移のリスク因子の検討にはロジスティック回帰分析を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 法により求め、群間の比較には log-rank 検定を用いた。予後因子の検討には Cox 回帰分析を用いた。

## 結果

### Bcl-2 発現

Bcl-2 発現は I 期症例において II-IV 期症例よりも有意に高頻度に認められた (28/58 vs. 12/44,  $p=0.021$ )。組織型に関しては類内膜腺癌で 39/93 (41.9%) に認められ、漿液性腺癌/明細胞腺癌では 2/9 (22.2%) であった ( $p=0.31$ )。類内膜腺癌の組織分化度については、高分化型 (G1) で 22/42 (52.4%) , 中分化型 (G2) で 13/34 (38.2%) , 低分化型 (G3) で 4/17 (25.3%) に認められ、G1 に比べて G2/G3 で Bcl-2 発現が抑制されている傾向を認めた ( $p=0.05$ )。Bcl-2 発現と核異型度との間には関連性は認められなかった。Bcl-2 発現喪失と筋層浸潤の深さ ( $p=0.0012$ )、脈管侵襲の程度 ( $p=0.017$ )、リンパ節転移の有無 ( $p=0.019$ ) とは相関していた。

### p53 過剰発現

p53 過剰発現と Bcl-2 発現喪失の間には関連がある傾向が認められた ( $p=0.059$ )。進行期との関連では I 期症例より II-IV 期症例に有意に高頻度 (5/58 vs. 17/44 :  $p=0.0003$ ) に認められた。組織型との関連をみると、漿液性腺癌/明細胞腺癌では類内膜腺癌よりも著明に高頻度に認められた (7/9 vs. 15/93:  $p=0.0002$ )。また類内膜腺癌においては分化度が低くなるほど有意に高頻度に p53 過剰発現が認められた ( $p=0.0054$ )。核異型度 ( $p=0.0018$ )、筋層浸潤 ( $p=0.0007$ )、脈管侵襲 ( $p<0.0001$ )、卵巣転移 ( $p=0.0029$ )、リンパ節転移 ( $p=0.0024$ ) に関しても p53 過剰発現と有意な関連が認められた。

### リンパ節転移のリスク因子

ロジスティック回帰モデルを用いたリンパ節転移に関連する因子の多変量解析では、脈管侵襲 ( $p=0.0006$ ) と核異型度 ( $p=0.0015$ ) のみがリンパ節転移の独立したリスク因子であった。

### 予後因子

単変量解析では、臨床進行期 (I/II 期 vs. III/IV 期:  $p=0.0045$ )、組織型 ( $p=0.0034$ )、組織分化度 ( $p=0.032$ )、核異型度 ( $p<0.0001$ )、筋層浸潤 ( $p=0.0037$ )、脈管侵襲 ( $p=0.004$ )、卵巣転移 ( $p<0.0001$ )、リンパ節転移 ( $p<0.0001$ )、Bcl-2 発現喪失 ( $p=0.04$ )、p53 過剰発現 ( $p=0.0002$ ) が予後と関連していた。Cox 回帰モデルを用いた多変量解析においては、核異型度 ( $p=0.019$ )、リンパ節転移 ( $p=0.0008$ )、p53 過剰発現 ( $p=0.0015$ ) が独立した予後因子であった。

進行体癌における p53 の予後因子としての重要性を明らかにするために、III/IV 期症例について Kaplan-Meier 曲線および log-rank 検定を行ったところ、p53 過剰発現陽性例は陰性例と比較して有意に予後不良であった ( $p=0.0053$ )。p53 過剰発現陽性例と陰性例の推定 5 年生存率はそれぞれ 40.4%、75.7%であった。III/IV 期症例についての多変量解析の結果からも核異型度 ( $p=0.0043$ )、p53 過剰発現 ( $p=0.0044$ ) が進行体癌の予後を規定する因子であることが明らかとなった。

## 結論

p53 過剰発現、核異型度、リンパ節転移が、系統的リンパ節郭清が施行された体癌症例における重要な独立予後因子である。Bcl-2 発現は体癌の悪性進展には重要な役割を果たしていないと考えられる。予後因子としては p53 過剰発現が Bcl-2 発現喪失よりも重要である。進行体癌においても p53 過剰発現の有無により予後に明らかな差があるため、今後、p53 過剰発現の認められた進行体癌症例に対する治療法個別化の必要性が示唆される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

## Prognostic Significance of Bcl-2, p53 Overexpression, and Lymph Node Metastasis in Surgically-staged Endometrial Carcinoma

(術後臨床期分類された子宮体癌症例における予後因子としての  
Bcl-2, p53 過剰発現, リンパ節転移の意義について)

近年, 我が国における子宮体癌 (以下体癌) 罹患数の増加が指摘されており, 予後不良症例の的確な分別にもとづいた治療法の層別化の確立が求められている。

系統的リンパ節郭清術を施行し, 術後臨床期分類された体癌症例において, 生物学的マーカーとしての Bcl-2 発現, p53 過剰発現について予後因子としての意義を検討することを本研究の目的とした。

1990~2000 年までの期間に, 体癌根治手術後に術後進行期分類 (FIGO1988) ならびに体癌組織の免疫組織化学染色を施行した 102 症例 (年齢 23~87 歳, 平均 57 歳; I 期 58 例, II 期 5 例, III 期 28 例, IV 期 11 例) を対象とした。術後病理組織学的検索において再発の high-risk-group (筋層浸潤  $>1/2$ , 頸部浸潤, 付属器転移, リンパ節転移, 中等度~高度脈管浸襲などを伴う) と考えられる症例には術後化学療法 (cisplatin 50 mg/m<sup>2</sup>, adriamycin 30-40 mg/m<sup>2</sup>, cyclophosphamide 350 mg/m<sup>2</sup>, 3 週毎) を 3~6 course 施行した。組織型は 93 例が類内膜腺癌, 9 例が特殊型 (漿液性腺癌, 明細胞腺癌) であった。病理組織学的予後因子としては筋層浸潤, 組織分化度 (構造異型度), 核異型度, 脈管侵襲, 卵巣転移, リンパ節転移につき検討した。

免疫組織化学染色は凍結組織切片を用いて indirect streptavidin-biotin-peroxidase complex 法により行った。抗体には抗ヒト Bcl-2 モノクローナル抗体 (clone 124, DAKO 社) と抗ヒト p53 モノクローナル抗体 (DO-7, DAKO 社) を用いた。Bcl-2 の細胞質染色程度は, 0: 全く染色されない, 1+: 50%以下の腫瘍細胞が染色される, 2+: 50%を超える腫瘍細胞が染色される, と分類した。p53 については核の染色強度と陽性細胞比率から, 0: 全く染色されない, 1+: 50%以下の細胞に染色を認めるか, あるいは 50%を超える腫瘍細胞に弱い反応が認められるもの, 2+: 50%を超える腫瘍細胞に強い染色が認められるもの, と分類した。2+を p53 過剰発現と規定した。

Bcl-2 発現は I 期症例において II-IV 期症例よりも高頻度に認められた (28/58 vs. 12/44,  $p=0.021$ )。組織型に関しては類内膜腺癌で 39/93 (41.9%) に認められ, 漿液性腺癌/明細胞腺

癌では 2/9 (22.2%) であった ( $p=0.31$ )。類内膜腺癌の組織分化度については、G1 で 22/42 (52.4%) , G2 で 13/34 (38.2%) , G3 で 4/17 (25.3%) に認められ、G1 に比べて G2/G3 で Bcl-2 発現が抑制されている傾向を認めた ( $p=0.05$ )。Bcl-2 発現喪失と筋層浸潤の深さ( $p=0.0012$ )、脈管侵襲の程度( $p=0.017$ )、リンパ節転移の有無 ( $p=0.019$ ) とは相関していた。

進行期との関連では I 期症例より II-IV 期症例に高頻度 ( 5/58 vs. 17/44 :  $p=0.0003$ ) に p53 過剰発現が認められた。組織型との関連をみると、漿液性腺癌/明細胞腺癌では類内膜腺癌よりも高頻度に認められた(7/9 vs. 15/93:  $p=0.0002$ )。また類内膜腺癌においては分化度が低くなるほど高頻度に p53 過剰発現が認められた ( $p=0.0054$ )。核異型度 ( $p=0.0018$ )、筋層浸潤 ( $p=0.0007$ )、脈管侵襲 ( $p<0.0001$ )、卵巣転移 ( $p=0.0029$ )、リンパ節転移 ( $p=0.0024$ ) に関しても p53 過剰発現と関連が認められた。

ロジスティック回帰モデルを用いたリンパ節転移に関連する因子の多変量解析では、脈管侵襲 ( $p=0.0006$ )と核異型度 ( $p=0.0015$ )のみがリンパ節転移の独立したリスク因子であった。

単変量解析では、解析した 10 因子が予後と関連していたが、Cox 回帰モデルを用いた多変量解析においては、核異型度 ( $p=0.019$ )、リンパ節転移 ( $p=0.0008$ )、p53 過剰発現 ( $p=0.0015$ ) が独立した予後因子であった。

p53 の予後因子としての重要性を明らかにするために、進行体癌 (III/IV 期) 症例について Kaplan-Meier 曲線および log-rank 検定を行ったところ、p53 過剰発現陽性例は陰性例と比較して予後不良であった ( $p=0.0053$ )。III/IV 期症例についての多変量解析の結果からも核異型度 ( $p=0.0043$ )、p53 過剰発現 ( $p=0.0044$ ) が進行体癌の予後を規定する因子であることが明らかとなった。

公開発表に際して、副査の長嶋教授より、Bcl-2 発現喪失が体癌の悪性進展の要因にならない理由について、体癌の p53 変異が多く認められるエクソンについて、変異の種類と予後との関連について、p53 過剰発現と体癌の予後との関連が認められた背景について、質問があった。次いで、副査の藤本教授からは、Bcl-2(-), p53(-)群と Bcl-2(-), p53(+)群との予後の間に有意差がなかった理由、p53 過剰発現症例の治療の個別化の具体について、質問があった。主査の吉木教授よりは、野生型 p53 の過剰発現と変異型 p53 の過剰発現との区別について、卵巣癌や頸癌での Bcl-2, p53 発現とその意義について、核異型度が高いことと腫瘍が低分化であることとの異同について、質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例のデータ解析結果、内外の文献的知見、自身の臨床経験などをもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、p53 過剰発現、核異型度、リンパ節転移が体癌における独立予後因子であることを解明しえた本研究の成果を高く評価し、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。