

学位論文題名

子宮体癌における p53, MDR-1, GST-pi 過剰発現の検討

学位論文内容の要旨

はじめに

近年子宮体癌罹患数の増加に伴い予後不良症例も増加しており、適切な治療法の確立が求められている。漿液性腺癌・明細胞腺癌のいわゆる特殊型体癌は類内膜腺癌に比べて予後不良であり、体癌治療で標準的に用いられる cisplatin, adriamycin, cyclophosphamide 併用の化学療法は予後改善に寄与していない。特殊型体癌の大部分を占める漿液性腺癌では早期から高頻度に p53 遺伝子変異や p53 過剰発現が認められることが指摘されている。ある種の p53 ミスセンス変異はドミナントネガティブ作用を有し、さらに増殖能や浸潤能の亢進をもたらす(gain-of function mutation)ことが示されている。この中には mdr-1 多剤耐性遺伝子の転写亢進も含まれており、漿液性腺癌の化学療法を考慮する上で MDR-1 の発現状態は重要な問題である。一方新規薬剤の paclitaxel がここ数年で卵巣癌の標準的治療薬剤として定着し、更に子宮体癌での有効性も示されてきている。本研究ではこれらの点に着目し、組織型と抗癌剤耐性関連蛋白(p53, MDR-1, GST-pi)発現との関連を検討した。

対象と方法

1993 年 1 月から 1999 年 12 月までの期間に北海道大学医学部附属病院婦人科において拡大子宮全摘術、両付属器摘出術、骨盤および傍大動脈リンパ節郭清を施行した子宮体癌 62 症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて病理組織学的因子および抗癌剤耐性関連蛋白発現の検討を行った。進行期は I 期 37 例、II 期 8 例、III 期 16 例、IV 期 1 例で、組織型は類内膜腺癌 52 例、特殊型体癌(漿液性腺癌、明細胞腺癌)10 例である。臨床進行期に加えて検討した病理組織学的因子は組織型、分化度、筋層浸潤度、卵巣転移、リンパ節転移である。抗癌剤耐性関連蛋白の組織内局在は SAB 法による免疫組織化学染色で検討した。染色強度と陽性細胞比率により、染色結果を陰性 (-), 陽性 (1+), 強陽性 (2+) に分け、(2+) を過剰発現と規定した。各因子の関連性は χ^2 -test あるいは Fisher 直接確率検定法を用いて検討した。病理組織学的予後因子および抗癌剤耐性関連遺伝子と予後との関連は Kaplan-Meier 法による生存曲線と Log-rank 検定を用いて解析した。有意水準は $p < 0.05$ に設定した。また 5 種の体癌細胞株(HHUA, Ishikawa, HEC-1, SPAC-1-L, SPAC-1-S)について、Northern blot 解析により MDR-1 と GST-pi の遺伝子発現を検討した。

研究成績

体癌組織を用いた免疫組織化学染色の結果、核内 p53 過剰発現を 62 例中 12 例 (19.4%)、細胞膜、細胞質における MDR-1 過剰発現を 62 例中 5 例(5.4%)、細胞質の GST-pi 過剰発現を 62 例中 17 例(27.4%)に認めた。P53 過剰発現は特殊型体癌で類内膜腺癌よりも有意に高頻度に認められた(70.0% vs. 9.6%, $P < 0.0001$)。また FIGO 進行期($P = 0.0076$)、組織分化度(G1/G2 vs. G3, $p = 0.020$)、脈管侵襲 (-/+ vs. +/+, $p = 0.0049$)、筋層浸潤の深さ($P = 0.020$)、卵巣転移($P < 0.0001$)、リンパ節転移($P = 0.030$)との間に有意

な関連を認めた。MDR-1 については免疫組織化学染色で明瞭に認められるような強い発現は体癌では稀であることが示された。類内膜腺癌で 5.8%、特殊型体癌で 20.0% に認められたが両者の間に有意差は認められなかった。FIGO 進行期、筋層浸潤の深さ、卵巣転移、組織分化度、リンパ節転移との間に有意な関連は認めなかった。GST-pi 過剰発現については特殊型体癌で類内膜腺癌よりも有意に高頻度に認められた (60.0% vs. 21.2%, $P=0.012$)。FIGO 進行期、筋層浸潤の深さ、卵巣転移、組織分化度、リンパ節転移との間に有意な関連は認められなかった。

体癌細胞株を用いた Northern blot 解析では Ishikawa, HEC-1, SPAC-1-L で MDR-1 遺伝子発現を認め、特に SPAC-1-L で強い mRNA 発現を認めた。HHUA, SPAC-1-S では発現を認めなかった。GST-pi 遺伝子発現は全ての細胞株で認められ、HHUA で他の細胞株に比べて軽度の亢進が認められた。

予後との関連については FIGO 進行期 (I/II 期 vs. III/IV 期, $p<0.0001$), 組織型 ($p=0.0002$), 傍大動脈節転移 ($p=0.0004$), p53 過剰発現 ($p=0.0006$), 脈管侵襲 ($p=0.0009$), 卵巣転移 ($p=0.0011$), 骨盤リンパ節転移 ($p=0.0044$), 分化度 ($p=0.023$), 筋層浸潤の深さ ($p=0.021$) と生存率との間に有意な関連を認めた。MDR-1, GST-pi 発現と生存率との間に関連は認められなかった。

考察

今回の検討からは、組織型が p53, GST-pi 過剰発現と強く関連していることが明らかとなった。p53 は細胞周期の調節、DNA 修復、アポトーシス誘導に関与している。p53 の機能喪失は p53 依存性アポトーシスを介して作用を発現する cisplatin などの抗癌剤に対する抵抗性に関与すると考えられている。MDR-1 蛋白(P-glycoprotein)は細胞膜に存在し、薬剤をエネルギー依存性に細胞外へ排出することにより細胞内薬剤濃度を低下させる蛋白で、paclitaxel, adriamycin などに対する耐性に関与している。GST は抗癌剤とグルタチオンを結合させ、解毒作用を発揮する蛋白で、cisplatin, adriamycin, cyclophosphamide に対する耐性に関与している。特殊型体癌では p53 過剰発現、GST-pi 発現が高率であったが、これらは臨床的に特殊型体癌が cisplatin 主体の化学療法に抵抗性を示す事実に対応している。paclitaxel は cisplatin と異なり、そのアポトーシス誘導効果は p53 非依存性であることが示されており、特殊型体癌に p53 変異が存在することは paclitaxel 使用の妨げにはならないと考えられる。MDR-1 過剰発現が特殊型体癌においても 20%にしか認められなかったことから特殊型体癌の補助化学療法として paclitaxel が検討されるべきと考えられた。

生存率の解析からは p53 過剰発現が予後因子であることが確認されたが、MDR-1 と GST-pi についてはその意義は明らかではなかった。p53 は細胞生物学的悪性度に関する gain-of function を示すことがあるのに対し、MDR-1, GST-pi はその機能から考えても癌細胞の遺残や微小転移が存在する症例で検討しなければ予後因子としての意義は明らかにならないと考えられる。転移巣におけるこれら蛋白の発現についても検討が必要であり、今後の課題である。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

子宮体癌における p53, MDR-1, GST-pi 過剰発現の検討

子宮体癌（以下体癌）において、漿液性腺癌・明細胞腺癌の特殊型は類内膜腺癌に比べて予後不良であり、標準的に用いられる化学療法は予後改善に寄与していない。本研究ではこの点に着目し、組織型と薬剤耐性関連蛋白(p53, MDR-1, GST-pi)発現との関係を検討した。

1993年1月から1999年12月の期間に、骨盤および傍大動脈リンパ節郭清を含む根治手術を施行した体癌62症例（I期37例、II期8例、III期16例、IV期1例）の手術摘出物のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、病理組織学的因子および薬剤耐性関連蛋白発現の検討を行った。組織型は類内膜腺癌52例、特殊型体癌（漿液性腺癌、明細胞腺癌）10例である。染色強度と陽性細胞比率により、染色結果を陰性(-)、陽性(1+)、強陽性(2+)に分け、(2+)を過剰発現と規定した。また5種の体癌細胞株(HHUA, Ishikawa, HEC-1, SPAC-1-L, SPAC-1-S)について、Northern blot解析によりMDR-1とGST-piの遺伝子発現を検討した。

体癌組織を用いた免疫組織化学染色の結果、核内p53過剰発現を62例中12例(19.4%)、細胞膜、細胞質におけるMDR-1過剰発現を62例中5例(5.4%)、細胞質のGST-pi過剰発現を62例中17例(27.4%)に認めた。p53過剰発現は特殊型で類内膜腺癌よりも有意に高頻度に認められた(70.0% vs. 9.6%, $p < 0.0001$)。またFIGO進行期($p = 0.0076$)、組織分化度(G1/G2 vs. G3, $p = 0.020$)、脈管侵襲(-/+ vs. +/+/+, $p = 0.0049$)、筋層浸潤の深さ($\leq 1/2$ vs. $> 1/2$, $p = 0.020$)、卵巣転移($p < 0.0001$)、リンパ節転移($p = 0.030$)との間に有意な関連を認めた。MDR-1については免疫組織化学染色で明瞭に認められる強い発現は体癌では稀で、類内膜腺癌で5.8%、特殊型で20.0%に認められたが両者の間に有意な関連は認められなかった。FIGO進行期、筋層浸潤の深さ、卵巣転移、組織分化度、リンパ節転移との間に有意な関連は認められなかった。GST-pi過剰発現については特殊型で類内膜腺癌よりも高頻度に認められた(60.0% vs. 21.2%, $p = 0.012$)。FIGO進行期、筋層浸潤の深さ、卵巣転移、組織分化度、リンパ節転移との間に有意な関連は認められなかった。

体癌細胞株を用いたNorthern blot解析ではIshikawa, HEC-1, SPAC-1-LでMDR-1遺伝子発現を認め、特にSPAC-1-Lで強いmRNA発現を認めた。HHUA, SPAC-1-Sでは発現を認めなかった。GST-pi遺伝子発現は全ての細胞株で認められ、HHUAで他の細胞株に比べて軽度の亢進が認められた。

予後との関連については、FIGO 進行期 (I/II 期 vs. III/IV 期, $p < 0.0001$)、組織型 ($p = 0.0002$)、傍大動脈節転移 ($p = 0.0004$)、p53 過剰発現 ($p = 0.0006$)、脈管侵襲 ($p = 0.0009$)、卵巣転移 ($p = 0.0011$)、骨盤リンパ節転移 ($p = 0.0044$)、分化度 ($p = 0.023$)、筋層浸潤の深さ ($p = 0.021$) と生存率との間に有意な関連を認めた。MDR-1、GST-pi 発現と生存率との間に関連は認められなかった。

公開発表に際し、吉木教授 (副査) より、薬剤耐性関連蛋白の検討から有効な薬剤の選択の可能性について、薬剤耐性関連蛋白の解析から薬剤を選択する試みの世界的な動向について、MDR-1 が全く検出されない漿液性腺癌培養細胞株の由来・患者背景について、質問があった。長嶋教授 (副査) からは、卵巣癌での MDR-1、GST-pi 発現の検討について、GST-pi の予後因子としての意義について、培養細胞株での薬剤耐性蛋白自体の発現について、MDR-1 高発現の腫瘍における薬剤反応性について、正常内膜、月経周期での MDR-1、GST-pi の発現について、次いで、主査の藤本教授から、明細胞腺癌と漿液性腺癌とにおける薬剤耐性関連蛋白の発現の差について、原発病巣と薬剤治療後の再発腫瘍や残存病変における薬剤耐性関連蛋白の発現の差について、類内膜腺癌の術前化学療法 (Paclitaxel) について、それぞれ質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例の解析結果、内外の文献情報、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、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。