

学位論文題名

上皮性卵巣癌における *TP53* 変異と予後への影響

学位論文内容の要旨

[背景と目的]

癌抑制遺伝子 *TP53* の遺伝子変異はヒト癌において最も一般的に認められ、癌の発生、進展に重要な遺伝子と考えられている。上皮性卵巣癌において *TP53* は最も研究されている遺伝子の一つであるが、*TP53* の治療に対する予測因子としての役割は未だ不明な点が残されている。*TP53* 変異には、主に dominant negative 変異と recessive 変異の二つがあり、前者は一方の対立遺伝子由来の変異 p53 蛋白が他方の野生型 p53 蛋白の機能を抑制するが、後者の変異はそのような抑制は起こさない。酵母機能アッセイは、p53 の転写活性化能力を *in vivo* で検討する方法であり、Transdominance assay はこの方法を改変し *TP53* の変異が dominant negative 変異か recessive 変異かを検討するものである。今回我々は、p53 の転写活性化能力と変異の状態に注目し、酵母機能アッセイと Transdominance assay を用いて *TP53* 変異が上皮性卵巣癌の進展や予後に与える影響を検討した。

[材料と方法]

1993 年から 2006 年の間に上皮性卵巣癌と診断され、cytoreductive surgery および化学療法にて治療された 74 例を対象とした。腫瘍組織から全 RNA を抽出して RT-PCR を行い *TP53* 遺伝子を増幅し、酵母 p53 機能アッセイを行って *TP53* 遺伝子変異の有無を同定した。酵母 p53 機能アッセイで変異 p53 と判明した症例では、シーケンス解析を行い変異部位を同定し、同定された p53 変異が dominant negative 効果をもつかどうかを Transdominance assay で検定した。Progression-Free survival および Overall survival は、Kaplan-Meier 法で算出した。有意差は log-rank test で検定した。各臨床パラメータと *TP53* 変異の関連については χ^2 テストで検定した。また、独立予後決定因子の検定はコックス比例ハザード回帰分析を使用して行った。全てにおいて $p < 0.05$ 以下で有意差ありと判定した。

[結果]

TP53 変異は 74 例中 34 例 (45.9%) に認められ、残り 40 例 (54.1%) は野生型であった。シーケンス解析の結果、ミスセンス変異が 21 例 (60.0%)、ナンセンス変異が 4 例 (11.4%)、挿入変異が 1 例 (2.9%)、欠失変異が 9 例 (25.7%) に認められた。Transdominance Assay により、ミスセンス変異を有する症例のうち 14 例 (18.9%) が dominant negative 変異、ミスセンス変異の残り 7 例とナンセンス変異、挿入変異および欠失変異の 20 例が recessive 変異 (27.0%) と判定された。各組織型における *TP53* 変異は、漿液性腺癌では dominant negative 変異 8 例 (22.2%)、recessive 変異 16 例 (44.4%)、野生型 13 例 (33.3%)、非漿液性腺癌では dominant negative 変異 6 例 (16.2%)、recessive 変異 4 例 (10.8%)、野生型 27 例 (73.0%) であり、*TP53* 変異は漿液性腺癌において非漿液性腺癌に比べ有意に多く認められた ($p = 0.001$)。FIGO stage 分類では、stage I+II 期において dominant negative 変異 1 例 (3.2%)、recessive 変異 4 例 (12.9%)、野生型 26 例 (83.9%)、stage III+IV 期において dominant negative 変異 13 例 (30.2%)、recessive 変異 16 例 (37.2%)、野生型 14 例 (32.6%) であり、*TP53* 変異と FIGO stage 分類は相関していた ($p = 0.00005$)。Kaplan-Meier 法と log-rank test により、変異 *TP53* を有する症例では野生型 *TP53* に比べ Progression-Free survival が短かった ($p = 0.009$)。一方、Overall survival では有意差は見られなかった。*TP53* の dominant negative 変異と recessive

変異との比較では、Progression-Free survival、Overall survivalともに違いは認められなかった。さらに、コックス比例ハザード回帰分析にて多変量解析を行ったところ、Progression-Free survivalについてはFIGO stageと手術時の残存病変の有無が、Overall survivalについては手術時の残存病変の有無が独立の予後決定因子であった。

[考察]

p53 の転写活性化能力と変異の状態に注目し、酵母機能アッセイと Transdominance assay を用いて *TP53* 変異が上皮性卵巣癌の進展や予後に与える影響を検討した。上皮性卵巣癌における *TP53* 変異の予後に与える影響を解析したところ、変異 *TP53* を有する症例では野生型 *TP53* に比べ Progression-Free survival が有意に短かった($p=0.009$)が、Overall survival では有意差は見られなかった。この理由としては、①症例数が少ないこと②経過観察期間が短いため Overall survival に関しては今後差が出てくる可能性があること③化学療法中の進行例や再発例などでは化学療法剤が変更されており新しく使用された化学療法剤の効果に *TP53* 変異は影響を与えなかった可能性があることなどが考えられる。今回我々は上皮性卵巣癌における dominant negative 変異 *TP53* と年齢、組織型、FIGO stage 分類、Progression-Free survival および Overall survival について検討したが、有意な相関は認められなかった。これは、上皮性卵巣癌の予後については *TP53* の変異の有無そのものがその変異の種類よりも強いインパクトを持つためと考えられる。上皮性卵巣癌には生物学的特性の異なる複数の組織型があること、治療法も複数存在することから独立予後因子の検討は困難であり、*TP53* の dominant negative 変異と recessive 変異が上皮性卵巣癌に与える影響を正確に検討するためには症例数を増やし各組織型ごとに検討するなど、さらなる研究が必要であると思われる。

[結論]

上皮性卵巣癌組織における p53 変異頻度と FIGO stage との間に相関関係が認められた。また、FIGO stage III+IV 期では I+II 期に比べ、dominant negative 変異が多い傾向が認められた。変異 *TP53* を有する症例では野生型 *TP53* に比べ Progression-Free survival が短かったが、Overall survival との間には相関関係は認められなかった。p53 dominant negative 変異をもつ癌組織と、recessive 変異をもつ癌組織との違いに相関する臨床病理学的パラメーターは見出せなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 櫻 木 範 明

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

上皮性卵巣癌における *TP53* 変異と予後への影響

癌抑制遺伝子 *TP53* の遺伝子変異はヒト癌において最も一般的に認められ、癌の発生、進展に重要な遺伝子と考えられている。上皮性卵巣癌において *TP53* は最も研究されている遺伝子の一つであるが、*TP53* の治療に対する予測因子としての役割は未だ不明な点が残されている。*TP53* 変異には、主に dominant negative 変異と recessive 変異の二つがあり、前者は一方の対立遺伝子由来の変異 *TP53* 蛋白が他方の野生型 *TP53* 蛋白の機能を抑制するが、後者の変異はそのような抑制は起こさない。酵母機能アッセイは、*TP53* の転写活性化能力を *in vivo* で検討する方法であり、Transdominance assay はこの方法を改変し *TP53* の変異が dominant negative 変異か recessive 変異かを検討するものである。今回我々は、*TP53* の転写活性化能力と変異の状態に注目し、酵母機能アッセイと Transdominance assay を用いて *TP53* 変異が上皮性卵巣癌の進展や予後に与える影響を検討した。

1993 年から 2006 年の間に上皮性卵巣癌と診断され、cytoreductive surgery および化学療法にて治療された 74 例を対象とした。腫瘍組織から全 RNA を抽出して RT-PCR を行い *TP53* 遺伝子を増幅し、酵母 *TP53* 機能アッセイを行って *TP53* 遺伝子変異の有無を同定した。酵母 *TP53* 機能アッセイで変異 *TP53* と判明した症例では、シークエンス解析を行い変異部位を同定し、同定された *TP53* 変異が dominant negative 効果をもつかどうかを Transdominance assay で検定した。Progression-Free survival および Overall survival は、Kaplan-Meier 法で算出した。有意差は log-rank test で検定した。各臨床パラメーターと *TP53* 変異の関連については χ^2 テストで検定した。また、独立予後決定因子の検定はコックス比例ハザード回帰分析を使用して行った。全てにおいて $p < 0.05$ 以下で有意差ありと判定した。

TP53 変異は 74 例中 34 例 (45.9%) に認められ、残り 40 例 (54.1%) は野生型であった。シークエンス解析の結果、ミスセンス変異が 21 例 (60.0%)、ナンセンス変異が 4 例 (11.4%)、挿入変異が 1 例 (2.9%)、欠失変異が 9 例 (25.7%) に認められた。Transdominance Assay により、ミスセンス変異を有する症例のうち 14 例 (18.9%) が dominant negative 変異、ミスセンス変異の残り 7 例とナンセンス変異、挿入変異および欠失変異の 20 例が recessive 変異 (27.0%) と判定された。各組織型における *TP53* 変異は、漿液性腺癌では dominant negative 変異 8 例 (22.2%)、recessive 変異 16 例 (44.4%)、野生型 13 例 (33.3%)、非漿液性腺癌では dominant negative 変異 6 例 (16.2%)、recessive 変異 4 例 (10.8%)、野生

型27例(73.0%)であり、*TP53*変異は漿液性腺癌において非漿液性腺癌に比べ有意に多く認められた($p=0.0288$)。FIGO stage分類では、stage I+II期においてdominant negative変異1例(3.2%)、recessive変異4例(12.9%)、野生型26例(83.9%)、stage III+IV期においてdominant negative変異13例(30.2%)、recessive変異16例(37.2%)、野生型14例(32.6%)であり、*TP53*変異とFIGO stage分類は相関していた($p = 0.0033$)。Kaplan-Meier法とlog-rank testにより、変異*TP53*を有する症例では野生型*TP53*に比べProgression-Free survivalが短かった($p=0.009$)。一方、Overall survivalでは有意差は見られなかった。*TP53*のdominant negative変異とrecessive変異との比較では、Progression-Free survival、Overall survivalともに違いは認められなかった。変異*TP53*を有する症例でコドン72番目のポリモルフィズムによりProgression-Free survival、Overall survivalが異なるかを検討したところ、コドン72番目にアルギニンを有する症例の方がプロリンを有する症例より良いProgression-Free survivalを有していた($p=0.395$)。さらに、コックス比例ハザード回帰分析にて多変量解析を行ったところ、Progression-Free survivalについてはFIGO stageと手術時の残存病変の有無が、Overall survivalについては手術時の残存病変の有無が独立の予後決定因子であった。

結論として、上皮性卵巢癌組織における *TP53* 変異頻度と FIGO stage との間に相関関係が認められた。変異 *TP53* を有する症例では野生型 *TP53* に比べ Progression-Free survival が短く、変異 *TP53* を有しさらにコドン 72 番目にアルギニンを有する症例ではプロリンを有する症例より良い Progression-Free survival を有していた。*TP53* dominant negative 変異をもつ癌組織と、recessive 変異をもつ癌組織との違いに相関する臨床病理学的パラメーターは見出せなかった。

この論文は、上皮性卵巢癌においては *TP53* 変異が dominant negative 変異と recessive 変異の間に予後の違いがないことを示した点が評価される。子宮体部癌が *TP53* の dominant negative 変異で予後が悪いこととは対照的な結果で、両者の比較により *TP53* の dominant negative 変異の機序解明が進むことが期待される。

質疑応答では、副査の秋田教授から *TP53* 遺伝子変異の対立遺伝子の状態について、dominant negative 変異の効果に関する質問、および卵巢癌の *TP53* 変異がグアニンからアデニンに変化する例が多いことについて質問があった。次いで、副査の櫻木教授から子宮体癌では *TP53* の Dominant negative 変異で予後が悪かったが、卵巢癌ではそうではなかったがどのような理由が考えられるかについて質問があった。最後に主査の守内教授から卵巢癌が緩徐に進行する Type I pathway と急速に進展する Type II pathway について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験データや先行論文を引用し、妥当な回答をした。

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。