

論文の内容の要旨

論文題目 Overexpression of Retinoblastoma Protein Predicts Decreased Survival and Correlates with Loss of p16^{INK4} Protein in Gallbladder Carcinomas

和訳 胆嚢癌における Rb 蛋白過剰発現と予後および p16^{INK4} 蛋白欠失との関連性に関する研究

指導教官 幕内雅敏 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 史 亜洲

【背景と目的】

癌抑制遺伝子の異常はほとんどすべてのヒトの腫瘍で高頻度に見いだされており、ヒトの癌の発症にと進展に重要な役割を果たしていると考えられている。Rb と p16^{INK4} 遺伝子は代表的な癌抑制遺伝子であり、その発現異常は多くのヒトの癌で報告されている。

Rb 蛋白は細胞増殖抑制能をもち、細胞周期の G1 期を負に制御しているが、その活性はリン酸化により調節されている。低リン酸化型の Rb 蛋白が活性型であり、高リン酸化型の Rb 蛋白は不活性型である。Rb 蛋白は G1 期においては低リン酸化状態で、E2F などの転写因子と結合してその活性を積極的に抑制し、増殖関連遺伝子群の転写を負に制御している。G1 後期から S 期において Rb 蛋白はサイクリン/サイクリン依存性キナーゼ (cdk) 複合体によりリン酸化される。それにより Rb 蛋白と E2F との結合は解離して E2F が活性化する。そして S 期に必須な増殖関連遺伝子群の転写が活性化し、S 期へと進行する。cdk の活性は cdk 阻害蛋白 (p16^{INK4} 蛋白など) によって抑制的に制御されている。p16^{INK4} 蛋白はサイクリン D/cdk 複合体を阻害することにより Rb 蛋白のリン酸化を抑制し、細胞周期を G1 期に止める。最近、培養細胞において、p16^{INK4} の転写は Rb 蛋白によって抑制されることが報告された。また、Rb の転写は p16^{INK4} 蛋白によって抑制されることも報告された。これにより、Rb と p16^{INK4} の間、bi-directional feedback 経路が存在する可能性を示した。p16^{INK4}/Rb 経路の異常が多くの癌で

報告されている。本研究では、胆嚢癌における Rb 蛋白および p16^{INK4} 蛋白の発現を免疫組織化学法により解析し、その発現異常と臨床病理因子及び予後との関連性の検討を目的とした。

【対象と方法】

1. 対象

対象は 1990 年 1 月から 1999 年 4 月までの間に東京大学附属病院肝胆膵外科で切除術を施行した胆嚢癌症例 36 例とした。二つの腫瘍がある症例は 1 例あった。年齢は 45 歳から 84 歳まで、中間値は 65 歳で、男性 17 例、女性 19 例であった。術式は、胆嚢切除術 23 例（単純胆嚢切除術 15 例、拡大胆嚢切除術 8 例）であり、胆嚢切除兼他臓器合併切除術は 13 例であった。Follow-up 期間は 3 ヶ月から 101 ヶ月まで、中間値は 28 ヶ月であった。生存解析は根治性切除の 32 症例を対象とする。正常胆嚢 7 標本及び胆嚢癌患者 23 例の非癌部胆嚢標本を対照とした。

病理組織学的検討は胆道癌取り扱い規約に従い行った。37 腫瘍の腫瘍の組織学的分類は、乳頭腺癌が 12 例で、管状腺癌が 21 例（高分化型 12 例、中分化型 6 例、低分化型 3 例）で、粘液癌が 1 例で、印環細胞癌が 1 例で、腺扁平上皮癌が 1 例で、未分化癌が 1 例であった。37 腫瘍を stage 別にみると、stage I が 11 例、II が 11 例、III が 7 例、IV が 8 例であった。

2. 免疫組織化学的方法

1) Rb 蛋白の免疫染色

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより 5 μ m の薄切切片を作製し、脱パラフィンの後、autoclave で抗原復活を行った。1 次抗体として抗 Rb 蛋白マウスモノクローナル抗体 (clone G3-245) と一晚反応させた。2 次抗体として biotinylated anti-mouse IgG を用いた。続いて、Avidin-Biotin Complex と 30 分反応させた後に DAB 液にて発色させ、Hematoxylin で核染色を行って、顕微鏡で観察した。

2) p16^{INK4} 蛋白の免疫染色

p16^{INK4} 蛋白の免疫染色は Rb 蛋白と同じ方法により行った。1 次抗体は抗 p16^{INK4} 蛋白マウスモノクローナル抗体 (clone G175-405) と抗 p16^{INK4} 蛋白ウサギポリクローナル抗体 (C-20) を用いて、免疫染色を行った。

3. 統計学的方法

Rb 蛋白、p16^{INK4} 蛋白発現と臨床病理因子との相関については Fisher の直接

確率法により行った。累積生存率は Kaplan-Meier 法により算出し、生存率の有意差検定は log rank test により行った。生存率の有意差検定は Cox's regression hazards model による多変量解析を行った。 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

【結果】

1. Rb 蛋白の発現

7 例正常胆嚢上皮及び 23 例非癌部の胆嚢上皮は Rb 陽性を示し、陽性細胞の百分率は 90%以上であった。免疫染色の強度は弱陽性と強陽性を分けたところ、7 例正常胆嚢上皮及び大部分症例の非癌部胆嚢上皮の染色強度は弱陽性であった。強陽性の胆嚢上皮細胞は一部の症例の非癌部胆嚢上皮にみられ、その百分率は 50%以下であった。これに基づいて、胆嚢癌を 3 群に分けた。pRb 0 (欠失)、陽性腫瘍細胞が見られないあるいはその百分率 $<1\%$; pRb 1+ (正常)、陽性腫瘍細胞の百分率 $\geq 1\%$ かつ強陽性腫瘍細胞の百分率 $<50\%$; pRb 2+ (過剰発現)、強陽性腫瘍細胞の百分率 $\geq 50\%$ 。

37 腫瘍の中、pRb 0 は 5 (13.5%) 例で、pRb 1+ は 14 (37.8%) 例で、pRb 2+ は 18 (48.6%) 例であった。pRb 1+ と比べて、pRb 0、pRb 2+ 腫瘍は stage III/IV 群の中に有意に高率であった (pRb 0 vs. pRb 1+, 26.7% vs. 6.7%, $P = 0.0061$; pRb 2+ vs. pRb 1+, 66.7% vs. 6.7%, $P = 0.0075$)。pRb 1+ 腫瘍は、リンパ節転移群の中に 1 例もみられなかったが、pRb 0、pRb 2+ 腫瘍は、高率であった (pRb 0 vs. pRb 1+, 16.7% vs. 0%, $P = 0.059$; pRb 2+ vs. pRb 1+, 83.3% vs. 0%, $P = 0.0013$)。また、pRb 1+ と比べて、pRb 0、pRb 2+ 腫瘍は神経浸潤群の中に有意に高率であった (pRb 0 vs. pRb 1+, 23.1% vs. 7.7%, $P = 0.037$; pRb 2+ vs. pRb 1+, 69.2% vs. 7.7%, $P = 0.019$)。Rb 蛋白の発現はほかの臨床病理学因子との間には相関が認められなかった。

根治性切除の 32 症例の術後生存率を検討したところ、pRb 1+、pRb 0、pRb 2+ 群症例の 5 年生存率はそれぞれ 90%、60%、21.5%であった。pRb 0 群症例と比べて、pRb 1+ 群症例の予後は良い傾向がみられたが、有意差がなかった ($P = 0.19$; log-rank test)。pRb 1+ 群症例は pRb 2+ 群症例より有意に予後良好であった ($P = 0.001$)。この差は stage I/II 群症例 (22 例) で検討してもリンパ節陰性の症例 (25 例) で検討しても全症例 (36 例) で検討してもいずれでも認められた。多変量解析により、根治性切除の 32 症例における有意な生存予後因子は、pRb 2+ ($P = 0.011$)、腫瘍の組織学的分類 ($P = 0.016$) の 2 因子であった。

2. p16^{INK4} 蛋白の発現

p16^{INK4} 蛋白は正常胆嚢上皮細胞には染まらない。p16^{INK4} の cut off 値を 1% とし、胆嚢癌を 2 群に分けた。p16^{INK4} 陰性腫瘍、陽性腫瘍細胞が見られないあるいはその百分率 < 1% ; p16^{INK4} 陽性腫瘍、陽性腫瘍細胞の百分率 ≥ 1%。37 腫瘍の中、p16^{INK4} 陰性は 28 (75.7%) 腫瘍で、p16^{INK4} 陽性は 9 (24.3%) 腫瘍であった。p16^{INK4} 蛋白の発現は臨床病理学因子及び予後との間には有意な相関が認められなかった。

3. Rb 蛋白発現と p16^{INK4} 蛋白発現との関連性

Rb 蛋白発現と p16^{INK4} 発現に関して χ^2 検定を行ったところ、両者の間に有意な相関がみられた。pRb 0 腫瘍 5 例全例は p16^{INK4} 陽性で、pRb 2+ 腫瘍 18 例全例は p16^{INK4} 陰性であった。Rb 蛋白と p16^{INK4} 蛋白の同時欠失がみられなかったが、両者の同時陽性が 4 例であった。pRb 2+ (過剰発現) は p16^{INK4} 蛋白の欠失と有意に相関した。

【まとめ】

本研究は胆嚢癌における Rb 蛋白および p16^{INK4} 蛋白の発現異常と腫瘍の臨床病理因子及び予後との関連性を検討し、以下の結論を得た。

- 1) 胆嚢癌において、Rb 蛋白過剰発現は Rb 蛋白欠失と同程度に、腫瘍の進展に関与している。また、Rb 蛋白過剰発現は胆嚢癌の予後因子として有用である。
- 2) 胆嚢癌において、Rb 蛋白過剰発現は p16^{INK4} 蛋白の欠失と関連がある。